



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INACTIVACIÓN EPIGENÉTICA DEL *miR-125b1* Y SU ASOCIACIÓN CON BORIS Y
LAS METILTRANSFERASAS *DE NOVO* EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ILIANA MONSERRAT ALCALÁ MORENO

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. ELENA ARECHAGA OCAMPO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

INACTIVACIÓN EPIGENÉTICA DEL *miR-125b1* Y SU ASOCIACIÓN CON BORIS Y LAS METILTRANSFERASAS *DE NOVO* EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ILIANA MONSERRAT ALCALÁ MORENO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. ELENA ARECHAGA OCAMPO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de agosto del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ALCALÁ MORENO ILIANA MONSERRAT** con número de cuenta **30500466-2** con la tesis titulada "Inactivación epigenética del *miR-125b1* y su asociación con **BORIS** y las metiltransferasas de *nov*o en un modelo de cáncer de mama", realizada bajo la dirección del **DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS**:

Presidente: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
Vocal: DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG
Secretaria: DRA. ELENA ARECHAGA OCAMPO
Suplente: DR. FELIPE VACA PANIAGUA
Suplente: DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de octubre del 2015.


DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 83959 y 182997) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN213311). La alumna Iliana Monserrat Alcalá Moreno fue una estudiante del Programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la UNAM apoyada por CONACyT (becario 294486).

A los miembros del comité tutor: Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y Dra. Elena Arechaga Ocampo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, por haberme permitido vivir y alcanzar esta meta. Por las bendiciones que me has otorgado y las personas que has puesto en mi camino para ayudarme, guiarme y protegerme. Por enseñarme que no hay nada que no podamos lograr en tu nombre.

A mis padres, por ser las personas más maravillosas de este mundo. No sería la persona que soy ahora sin su consejo y su guía. Gracias por su amor incondicional. Las palabras no alcanzan para expresar la importancia que tienen en mi vida. Los amo con toda mi alma.

A mi familia, por su apoyo y compañía a través de este camino. A mi abuela Eva y mi abuelo Miguel, por enseñarme fortaleza aun cuando los años incomoden. A mi tía Norma y mi tío Jaime por cuidarme con si fuera su hija. A los que nunca conocí, mis abuelos Carmen y Roberto, estos logros también son suyos.

A Erick, por su amor incondicional. Por darme ánimos, defenderme de la maldad del mundo y tomarme de la mano cuando sentía que iba a caer. Te amo y siempre te amaré. Rebe, Fide, Albita y Güicha, muchas gracias por su calidez, su cariño y sus consejos; por ser mi segunda familia.

A los miembros del jurado: Dra. Sara Frías Vázquez, Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg, Dr. Felipe Vaca Paniagua y Dr. Sergio Juárez Méndez, por sus observaciones y sus comentarios positivos sobre el presente trabajo.

A Ernesto, por permitirme continuar mis estudios de maestría a su lado. Gracias por tus enseñanzas y consejos. Por la experiencia que me permitiste adquirir y la confianza que pusiste en mí.

A Rodrigo, por ser cómplice de este trabajo. Gracias por darme consejo en tiempos de crisis y hacerme olvidar los malos momentos con una sonrisa. Siempre te veré como el hermano mayor que nunca tuve.

Al grupo de los “Epiñoños” (Cristian, David, Fernanda, Lissania, Marisol y Nancy), por hacer que los días en el laboratorio fueran más agradables y divertidos. Por compartir conmigo el gusto por la epigenética.

Al equipo del laboratorio de carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología, por enseñarme las cuestiones básicas de trabajo y brindarme su compañía y amistad. En especial, gracias al Dr. Luis Herrera, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio, a Clementina Castro por su apoyo técnico y a Lucy Tapia por su apoyo administrativo.

A mis amigos Romina, Bono, Chucho, Misa, Vaquero y Zéttter; Karina, Mariana, Ulises, Paty, Ithzel y Ximena; Julio, Ángel, Tomás, Carlos y Karla. Les agradezco a todos por su amistad inigualable e inquebrantable. Gracias por la diversión, la irreverencia y los buenos momentos. ¡Salud! ¡Arrrggghhh!

Iliana Monserrat Alcalá Moreno

Noviembre 2015

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS Y CUADROS | 3 |
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| La epigenética | 9 |
| Definición de epigenética | 9 |
| La metilación del DNA | 10 |
| Características de la metilación del DNA | 10 |
| Las DNA metiltransferasas (DNMTs) | 11 |
| La metilación del DNA en cáncer | 16 |
| Las islas CpG | 17 |
| Definición e importancia de las islas CpG | 17 |
| Regiones promotoras | 18 |
| Definición de promotor | 18 |
| Los componentes epigenéticos están asociados con regiones promotoras | 19 |
| Las islas CpG y su asociación con promotores | 20 |
| Los microRNAs (miRNAs) | 21 |
| Definición de microRNAs | 21 |
| El microRNA <i>miR-125b1</i> | 21 |
| CTCF | 23 |
| <i>CTCF-L</i> (BORIS) | 25 |
| ANTECEDENTES | 29 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 29 |
| HIPÓTESIS | 30 |
| OBJETIVOS | 30 |
| Objetivo general | 30 |
| Objetivos particulares | 30 |
| METODOLOGÍA | 32 |
| PCR en tiempo real (RT-PCR) con sondas TaqMan | 32 |
| PCR sensible a metilación (MS-PCR) | 32 |
| Inmunofluorescencias de las proteínas CTCF y BORIS | 33 |
| RT-PCR cuantitativo | 33 |

| | |
|---|-----------|
| Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)..... | 34 |
| RESULTADOS..... | 35 |
| Estudio de la expresión relativa del transcrito maduro del <i>miR-125b1</i> por RT-PCR cuantitativo con sondas TaqMan. | 35 |
| Estudio del estado de metilación de la región promotora del <i>miR-125b1</i> por PCR sensible a metilación (MS-PCR) en cuatro líneas celulares. | 35 |
| Estudio de la presencia y la localización de las proteínas CTCF y BORIS por medio de inmunofluorescencias en cuatro líneas celulares. | 37 |
| Determinación de la expresión relativa de los genes <i>CTCF</i> y <i>CTCF-L</i> por medio de RT-PCR cuantitativo en cuatro líneas celulares. | 38 |
| Estudio de la presencia y la localización de las proteínas DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 por medio de inmunofluorescencias y estudio de la expresión relativa de los genes <i>DNMT3A</i> y <i>DNMT3B</i> por medio de RT-PCR cuantitativo en cuatro líneas celulares | 40 |
| Estudio de la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 en la región promotora del <i>miR-125b1</i> por medio de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en cuatro líneas celulares. | 45 |
| DISCUSIÓN..... | 50 |
| CONCLUSIONES..... | 58 |
| ANEXO 1 | 59 |
| METODOLOGÍA EN EXTENSO..... | 59 |
| Aislamiento de ácidos nucleicos | 59 |
| Inmunodetección de proteínas por microscopía fluorescente | 64 |
| Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)..... | 66 |
| Líneas celulares | 74 |
| Análisis de metilación del DNA | 76 |
| Reacción de retrotranscriptasa reversa para la obtención de cDNA..... | 79 |
| Reacción de retrotranscriptasa reversa para la obtención de cDNA con sondas TaqMan | 82 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 84 |

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema representativo de los dominios de las DNA metiltransferasas en mamíferos..... | 15 |
| Figura 2. Sitios que presentan metilación del DNA en mamíferos | 17 |
| Figura 3. CTCF y la regulación de la cromatina..... | 24 |
| Figura 4. CTCF y BORIS regulan el funcionamiento del locus <i>Igf2/H19</i> | 27 |
| Figura 5. Expresión relativa del transcrito maduro del <i>miR-125b1</i> y estado de metilación de su región promotora..... | 35 |
| Figura 6. Localización y presencia de las proteínas CTCF y BORIS..... | 37 |
| Figura 7. Expresión relativa de <i>CTCF</i> | 39 |
| Figura 8. Expresión relativa de <i>CTCF-L</i> | 39 |
| Figura 9. Localización y presencia de la proteína DNMT3A | 42 |
| Figura 10. Expresión relativa de <i>DNMT3A</i> | 42 |
| Figura 11. Localización y presencia de la proteína DNMT3B..... | 43 |
| Figura 12. Expresión relativa de <i>DNMT3B</i> | 43 |
| Figura 13. Localización y presencia de la proteína DNMT1..... | 44 |
| Figura 14. Expresión relativa de <i>DNMT1</i> | 44 |
| Figura 15. Presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 en la región promotora del <i>miR-125b1</i> en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa..... | 47 |
| Figura 16. Cuantificación por densitometría para evaluar la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y la marca de silenciamiento H3K9me3 en la región promotora del <i>miR-125b1</i> de la línea celular MCF 10A..... | 47 |
| Figura 17. Cuantificación por densitometría para evaluar la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y la marca de silenciamiento H3K9me3 en la región promotora del <i>miR-125b1</i> de la línea celular MCF7..... | 48 |
| Figura 18. Cuantificación por densitometría para evaluar la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y la marca de silenciamiento H3K9me3 en la región promotora del <i>miR-125b1</i> de la línea celular MDA-MB-231..... | 48 |

Figura 19. Cuantificación por densitometría para evaluar la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y la marca de silenciamiento H3K9me3 en la región promotora del *miR-125b1* de la línea celular HeLa 49

Tabla 1. Definición de cada subtipo basado en la expresión molecular del receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR) y CK5/6 75

Tabla 2. Definición del subtipo molecular en base a los patrones de expresión de ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 y el receptor de andrógenos (AR) por análisis inmunohistoquímico en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF7 y MCF 10A 75

RESUMEN

Introducción. La proteína CTCF ha sido reconocida como un factor que puede regular la transcripción génica. A nivel global, puede mediar interacciones cromatínicas de largo alcance para regular la expresión génica de dominios completos. A nivel local, impide la propagación de la metilación del DNA y las marcas represivas de histonas, particularmente en promotores génicos asociados con islas CpG como el del microRNA *miR-125b1*. La pérdida de CTCF en la región promotora del *miR-125b1* está relacionada con su silenciamiento génico y el desarrollo de cáncer. El gen *CTCF* cuenta con un parálogo llamado *CTCF-Like (CTCF-L)* que codifica a la proteína BORIS. Se ha propuesto que BORIS podría ocupar los mismos sitios de unión de CTCF debido a que comparten un dominio de 11 dedos de zinc. Esta situación derivaría en la interacción con proteínas involucradas en el establecimiento de la metilación y favorecería el silenciamiento génico. **Objetivo.** Evaluar la presencia de BORIS y las metiltransferasas *de novo* DNMT3A y DNMT3B en la región promotora del *miR-125b1*. **Métodos.** La expresión del transcrito maduro del *miR-125b1* y los genes *CTCF*, *BORIS*, *DNMT3A*, *DNMT3B* y *DNMT1* se determinó por medio de PCR en tiempo real (qRT-PCR) en una línea no neoplásica de mama (MCF 10A) y tres líneas celulares neoplásicas (MCF7, MDA-MB-231 y HeLa). El estado de metilación del DNA de la región promotora del *miR-125b1* se evaluó por medio de PCR sensible a metilación (MS-PCR). La localización de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 se evaluó por medio de inmunofluorescencias. La presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 en la región promotora del *miR-125b1* se determinó por medio de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). **Resultados.** El *miR-125b1* disminuyó su expresión en las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa en

comparación con la línea celular no neoplásica MCF 10A mientras que la región promotora del *miR-125b1* se encontró no metilada en MCF 10A y metilada en las tres líneas celulares neoplásicas. La proteína CTCF tuvo localización nuclear mientras que BORIS tuvo localización nuclear y nucleolar en las tres líneas celulares neoplásicas. DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 tuvieron localización nuclear en las tres líneas celulares neoplásicas. El gen *CTCF* mostró mayor expresión en las líneas celulares neoplásicas MCF7 y MDA-MB-231 mientras que HeLa no presentó diferencias. *CTCF-L* presentó un aumento de expresión en las tres líneas celulares neoplásicas. *DNMT3A*, *DNMT3B* y *DNMT1* tuvo mayor expresión en las tres líneas celulares neoplásicas. CTCF está presente en la región promotora del *miR-125b1* en la línea celular no neoplásica mientras que BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y la modificación post-traducciona asociada a silenciamiento H3K9me3 están presentes en dicha región en las tres líneas celulares neoplásicas. **Conclusiones.** El *miR-125b1* disminuyó su expresión en las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. La región promotora se encontró metilada en las tres líneas celulares neoplásicas. CTCF, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 tienen localización nuclear mientras que BORIS tiene localización nuclear y nucleolar en las tres líneas celulares neoplásicas. *CTCF*, *CTCF-L*, *DNMT3A*, *DNMT3B* y *DNMT1* presentaron mayor expresión en las tres líneas celulares neoplásicas. Nuestros datos sugieren que la proteína BORIS está presente en el promotor del *miR-125b1* en aquellas líneas celulares neoplásicas analizadas. Esto se asocia a su vez con la presencia de las metiltransferasas de *nov* DNMT3A y DNMT3B, la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1 y la modificación de histonas H3K9me3.

ABSTRACT

Introduction. The CTCF protein has been recognized as a factor that can regulate gene transcription. Globally, it can mediate long-range chromatin interactions allowing the regulation of gene expression of whole domains. Locally, CTCF prevents the propagation of DNA methylation and repressive histone marks, particularly in gene promoters associated with CpG islands such as the microRNA *miR-125b1*. Loss of CTCF binding in the promoter region of *miR-125b1* is related with its gene silencing and cancer development. A paralog gene of *CTCF* known as *CTCF-Like (CTCF-L)* encodes a protein called BORIS. It has been proposed that BORIS could occupy the same CTCF binding sites because both proteins share an 11-zinc finger domain. This situation would let the interaction with proteins involved in the establishment of methylation and favor gene silencing. **Objective.** Evaluate the presence of BORIS and the *de novo* methyltransferases DNMT3A and DNMT3B at the promoter region of *miR-125b1*. **Methods.** The expression levels of the mature transcript *miR-125b1*, *CTCF*, *BORIS*, *DNMT3A*, *DNMT3B* and *DNMT1* were determined by real time PCR (qRT-PCR) in a non-neoplastic breast cell line (MCF 10A) and three neoplastic cell lines (MCF7, MDA-MB-231 and HeLa). DNA methylation status of the promoter region of *miR-125b1* was assessed by methylation-sensitive PCR (MS-PCR). The localization of CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 was assessed by immunofluorescence. The presence of CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 at the promoter region of *miR-125b1* was determined by chromatin immunoprecipitation (ChIP). **Results.** The expression levels of *miR-125b1* decreased in the neoplastic cell lines MCF7, MDA-MB-231 and HeLa compared to non-neoplastic cell line MCF 10A. The promoter region of *miR-125b1* was unmethylated in the cell line MCF 10A and methylated in the three neoplastic cell lines. CTCF had nuclear

localization while BORIS had nuclear and nucleolar localization in the three neoplastic cell lines. DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 had nuclear localization in the three neoplastic cell lines. *CTCF* showed higher expression levels in neoplastic cell lines MCF7 and MDA-MB-231 while HeLa did not show differences. *CTCF-L* showed an increase in their expression levels in the three neoplastic cell lines. *DNMT3A*, *DNMT3B* and *DNMT1* had higher expression levels in the three neoplastic cell lines. CTCF is present in the promoter region of *miR-125b1* in the non-neoplastic cell line while BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 and the post-translational modification associated with silencing H3K9me3 are present in this region in the three neoplastic cell lines. **Conclusions.** The expression levels of *miR-125b1* decreased in the neoplastic cell lines MCF7, MDA-MB-231 and HeLa. The promoter region was found methylated in the three neoplastic cell lines. CTCF, DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 have nuclear localization while BORIS has nuclear and nucleolar localization in the three neoplastic cell lines. *CTCF*, *CTCF-L*, *DNMT3A*, *DNMT1* and *DNMT3B* had higher levels of expression in the three neoplastic cell lines. Our data suggest that BORIS is present in the promoter of *miR-125b1* in the neoplastic cell lines where it is expressed. This in turn is associated with the presence of the *de novo* methyltransferases DNMT3A and DNMT3B, the maintenance methyltransferase DNMT1 and histone modification H3K9me3.

INTRODUCCIÓN

La epigenética

Definición de epigenética

A inicios del año 1940, Conrad Waddington introdujo el término de epigenética definiéndola como “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que determinan el fenotipo del ser”^{1,2}. Su significado se ha modificado gradualmente con el paso del tiempo. Actualmente se define como el estudio de los cambios en la función de los genes que no implican un cambio en la secuencia del DNA y que pueden ser heredables de manera mitótica y/o meiótica³. Los procesos epigenéticos comprenden a las variantes de histonas, las modificaciones post-traduccionales de las histonas, los RNAs no codificantes y las modificaciones covalentes en las bases del DNA como la metilación³⁻⁵.

La epigenética ha adquirido una gran relevancia ya que las modificaciones de la cromatina tienen un papel importante en la regulación de la expresión génica⁶. Aun cuando los estudios a nivel genético han contribuido de manera relevante en el entendimiento de la expresión génica, recientemente la contribución de los procesos epigenéticos ha comenzado a reconocerse. La genética y la epigenética solían verse como mecanismos que funcionaban de manera independiente. Sin embargo, recientemente se ha observado que los mecanismos genéticos y epigenéticos están relacionados⁷.

La metilación del DNA

Características de la metilación del DNA

Una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas es la metilación del DNA. En vertebrados, la metilación del DNA es la unión covalente de un grupo metilo (-CH₃) en el carbono 5 de una citosina (C) que se encuentra adyacente a una guanina (G), una conformación conocida por el nombre de dinucleótido CpG (la “p” indica al grupo fosfato que une a la citosina con la guanina en dirección 5’-3’)^{8,9}. La adición de los grupos -CH₃ se presenta en el surco mayor del DNA y cuando se encuentra metilado simétricamente, los grupos -CH₃ se enfrentan provocando cambios en la estructura del DNA; de esta manera a algunos factores transcripcionales se les dificulta reconocer sus secuencias de unión en el DNA¹⁰. Es así que una de las funciones principales de la metilación es controlar la expresión génica, ya que los genes metilados presentan represión transcripcional.

El mecanismo de acción para la incorporación de los grupos -CH₃ se lleva a cabo mediante la unión de las DNA metiltransferasas (DNMTs) al DNA. A continuación se realiza una eversión de la citosina blanco para permitir un ataque nucleofílico de una cisteína conservada en las DNMTs hacia el carbono 6 de la citosina¹¹. La formación de un enlace covalente entre el carbono 6 y la enzima permite un ataque electrofílico hacia el carbono que posee el donador de grupos -CH₃: la S-adenosil-L-metionina (SAM). Esta molécula se convierte en S-adenosil-L-homocisteína (SAH) al donar el grupo -CH₃. Por último, se romperá el enlace covalente entre la DNMT y la citosina metilada a través de la eliminación

del protón que se encuentra en el carbono 5 y dando origen a una molécula conocida como 5-metilcitosina (5mC)¹².

A su vez, se ha reportado que la N4-metilcitosina (4mC) es una modificación que es muy común en bacterias y está ausente en mamíferos¹³. Una modificación que recientemente ha sido reportada es la N6-metiladenina (6mA)¹⁴. Dicha marca forma parte de los sistemas de restricción-modificación (R-M), mecanismos de defensa que son capaces de distinguir entre el DNA bacteriano y un DNA exógeno (fagos o plásmidos). El DNA exógeno no metilado es degradado debido a que la presencia de la 6mA evita la degradación del genoma bacteriano mediante enzimas de restricción sensibles a la metilación del DNA. Esta molécula también participa en la replicación del DNA, la reparación y la transcripción génica¹³. Recientemente se ha observado su presencia en células eucariontes aunque se desconoce qué funciones podría estar desempeñando¹⁵⁻¹⁷.

Las DNA metiltransferasas (DNMTs)

El establecimiento y el mantenimiento de la metilación en mamíferos están mediadas por las DNMTs. Las DNMTs poseen un extremo amino (N-) que varía en tamaño y tiene varias funciones reguladoras como determinar su localización nuclear y controlar su interacción con otras proteínas, el DNA y la cromatina. También presentan un extremo carboxilo (C-) que posee el centro activo y determina su función catalítica.

La familia de las DNMTs está dividida convencionalmente en la familia DNMT1 (que mantiene los patrones de metilación durante la replicación del DNA) y en la familia DNMT3 (que participa en la metilación *de novo*)¹⁸.

DNMT1

La expresión del gen *DNMT1* es principalmente en células que se encuentran en proliferación¹⁹, por lo tanto, su expresión depende del ciclo celular. La proteína DNMT1 es reclutada a las horquillas de replicación durante la fase de síntesis del DNA²⁰, para conservar los patrones de metilación de manera estable, a través de su preferencia por el DNA hemimetilado²¹. La localización de la proteína DNMT1 cambia de manera dinámica durante el ciclo celular. Se distribuye de manera difusa en el núcleo durante la interfase y se acumula en las horquillas de replicación durante la fase de síntesis²².

La actividad de la DNMT1 es posible gracias a que presenta varios dominios funcionales (Figura 1):

1. Un dominio de interacción con la proteína 1 asociada a DNA metiltransferasas (DMAP1) que funciona como represor transcripcional²³ y que está involucrado en la estabilidad de DNMT1²⁴.
2. Un dominio de unión al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) conocido como PBD que controla la interacción con PCNA y permite el reclutamiento de DNMT1 a las horquillas de replicación²⁵.

3. Al menos tres secuencias de señal de localización nuclear (NLS) funcionales e independientes²⁶.
4. Un dominio de secuencia blanco (TS) que permite la presencia de DNMT1 en la cromatina centromérica²⁷ y las horquillas de replicación²⁰.
5. Un dominio de zinc conocido como dominio CXXC, similar al dominio rico en cisteínas encontrados en otras proteínas asociadas a la cromatina como MeCP2²⁸. DNMT1 posee ocho residuos conservados de cisteínas organizados en dos repetidos CXXCXXC que se unen a dos iones de zinc, los cuales son necesarios para la actividad catalítica²².
6. Los dominios de homología bromoadyacente (BAH) 1 y 2 son parte del dominio de polibromohomología (PBDH), el cual está presente en proteínas involucradas en la regulación transcripcional. Se ha propuesto que puede actuar como un módulo de interacción entre proteínas especializadas en el silenciamiento génico, sin embargo, aún no se sabe cuál es su función en DNMT1²².
7. La unión KG se localiza entre el N- y el C- terminal y se compone por una serie de repetidos de lisina y glicina. Se ha observado que estos repetidos se unen al DNA en conformación Z que se produce durante la transcripción debido a la superhelicoidización del DNA. Se sugiere que podría contribuir en el reclutamiento de DNMT1 a las regiones que flanquean las horquillas de replicación²⁹.
8. El dominio del C- terminal de DNMT1 comprende al centro catalítico de la enzima. Sin embargo, no está activo de manera aislada, ni *in vitro* ni *in vivo*, a pesar de la presencia de todos los motivos de aminoácidos requeridos para el establecimiento de la metilación³⁰⁻³².

DNMT3A y DNMT3B

La familia DNMT3 incluye a las proteínas DNMT3A y DNMT3B, las cuales son conocidas como metiltransferasas *de novo*, ya que adicionan los grupos -CH₃ a las citosinas que no han sido metiladas previamente^{18,33}. La expresión de los genes *DNMT3A* y *DNMT3B* se presenta en tejidos embrionarios y células indiferenciadas²². Las proteínas DNMT3A y DNMT3B se localizan principalmente en regiones de DNA metilado y heterocromatina pericentromérica³⁴⁻³⁷.

DNMT3A y DNMT3B poseen dos dominios en el N- terminal (Figura 1):

1. El dominio PWWP cuenta con un motivo conservado de prolina y triptófano y es esencial para que ambas proteínas sean reclutadas a las regiones de heterocromatina pericentromérica³⁵⁻³⁷.
2. El dominio ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) es una región rica en cisteína y favorece las interacciones con otras proteínas como SUV39H1³⁸ y EZH2³⁹, que son metiltransferasas de histonas.

De manera interesante, existe un tercer miembro de la familia DNMT3 conocido como DNMT3L, una metiltransferasa sin función catalítica, ya que carece del dominio PWWP, los motivos IX, X y varios residuos catalíticos importantes en el extremo C-. No obstante, DNMT3L interactúa directamente con DNMT3A y DNMT3B e incrementa su habilidad para unirse a SAM y estimula su actividad *in vivo*⁴⁰. De manera interesante, DNMT3L posee el motivo conservado PHD a través del cual puede asociarse con diferentes proteínas como la desacetilasa de histonas 1 (HDAC1) y reprimir la transcripción^{41,42}.

Por lo tanto, se ha sugerido que las DNMTs no sólo reprimen la transcripción mediante la metilación del DNA sino también pueden hacerlo de manera independiente interactuando con otras proteínas (como las HDACs). Las DNMTs pueden ser dirigidas a regiones específicas del genoma a través de interacciones con factores de transcripción, proteínas de unión a histonas metiladas y/o correpresores (como el complejo RB/E2F) lo que sugiere que tienen una participación importante en el proceso de la represión transcripcional^{35,41,43}.

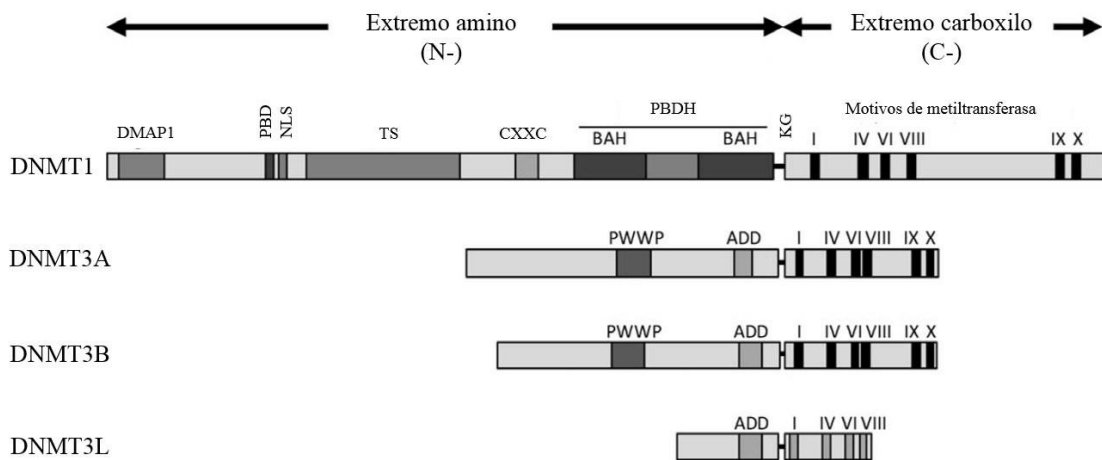


Figura 1. Esquema representativo de los dominios de las DNA metiltransferasas en mamíferos. DNMT1 posee varios dominios funcionales. En el extremo amino posee el dominio de unión a DMAP1, el dominio de unión a PCNA (PBD), al menos tres secuencias de señal de localización nuclear (NLS), el dominio de secuencia blanco (TS), el dominio de zinc CXXC, el dominio de polibromohomología (PBDH) y la unión KG. En el extremo carboxilo posee el centro catalítico, el cual contiene los motivos de aminoácidos (I a X) necesarios para el establecimiento de la metilación. DNMT3A y DNMT3B presentan los dominios PWWP y ADD. DNMT3L solamente tiene el dominio ADD. Modificado de Jurkowska, *et al.*, 2011.

La metilación del DNA en cáncer

La metilación del DNA se encuentra desregulada en enfermedades como el cáncer^{10,44} (Figura 2), por lo que se le ha propuesto como un marcador de riesgo, actividad y pronóstico^{45,46}. Se ha observado que las células cancerosas presentan una hipometilación global del DNA y una hipermetilación local en unas regiones conocidas como islas CpG, resultando en el silenciamiento y activación transcripcional de cientos de genes entre los cuales destacan los genes supresores de tumores y los oncogenes⁴⁷⁻⁴⁹. Un ejemplo es el gen *MGMT*, el cual se localiza en el cromosoma 10q26 y codifica a una proteína encargada de la reparación de aductos en el DNA. La región promotora de este gen incluye una isla CpG y puede activarse a través de factores transcripcionales. La pérdida de expresión de *MGMT* ha sido reportada en diferentes tipos de cáncer, incluyendo: glioblastoma, linfomas, retinoblastoma, tumores de mama y próstata. Se ha propuesto que su silenciamiento se debe a la metilación de su promotor, un proceso que se ha observado *in vitro* con tumores sin actividad de *MGMT*. Con la metilación del promotor, los factores transcripcionales no pueden reconocer su sitio de unión e iniciar la síntesis del transcrito⁵⁰. En el caso del glioblastoma se ha observado que *MGMT* se encuentra metilado entre el 35 y el 45% de los gliomas malignos (grados III y IV) y el 80% de los gliomas grado II^{51,52}. Por este motivo, el estado de metilación de *MGMT* ha sido propuesto como un biomarcador importante en este tipo de cáncer. La evaluación del estado de metilación de *MGMT* ha sido importante como marcador de pronóstico, ya que aquellos pacientes que presentan metilación en el promotor de éste gen tiene una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia que incluyen agentes alquilantes tienen derivando en una mayor supervivencia⁵²⁻⁵⁴.

| Células no neoplásicas | Células neoplásicas |
|--|---------------------|
| Genes improntados | |
| Secuencias repetidas | |
| Genes supresores de tumores | |
| Oncogenes | |

Figura 2. Sitios que presentan metilación del DNA en mamíferos. Los genes improntados, las secuencias repetidas y los oncogenes son tres tipos de sitios que se encuentran metilados (la metilación se señala con puntos de color rojo) en células no neoplásicas. Los genes supresores de tumores, así como la mayoría de los genes con promotores que contienen islas CpG, no están metilados. En las células neoplásicas, los genes improntados pueden ser desmetilados en un alelo o ser metilados en ambos alelos (situación no representada en el esquema) mientras que las secuencias repetidas pueden ser desmetiladas. Algunos genes que se encuentran desmetilados pueden ser metilados y silenciados transcripcionalmente, como ocurre con los genes supresores de tumores. Finalmente, algunos genes que se encontraban metilados pueden ser desmetilados como sucede con los oncogenes. Modificado de Prokhortchouk y Defossez, 2008.

Las islas CpG

Definición e importancia de las islas CpG

Las islas CpG son sitios en el genoma de vertebrados que se caracterizan por tener una longitud de entre 200 y 1,000 pares de bases (pb) con un contenido de C+G del 60% y una frecuencia de CpGs (observado/esperado) mayor de 0.6^{55,56}. Las islas CpG son secuencias de DNA no metilado y se ha demostrado que el 60 - 70% de los promotores de genes constitutivos y aproximadamente el 40% de los genes tejido-específicos están contenidos en estas regiones^{55,57}.

Las islas CpG han sido clasificadas en tres tipos en función de su localización genómica:

1. Islas CpG localizadas en regiones asociadas con el sitio de inicio de la transcripción.
2. Islas CpG localizadas en regiones intragénicas.
3. Islas CpG localizadas en regiones intergénicas.

Una de las funciones más importantes de las islas CpG es la regulación de la expresión del gen inmediato a ella⁵⁸. No obstante, estas regiones también desempeñan otras funciones. Se ha observado que las islas CpG localizadas en regiones intragénicas han sido relacionadas con la regulación del proceso de *splicing* alternativo⁵⁹ mientras que las que se localizan en regiones intergénicas tienen funciones estructurales⁶⁰.

Regiones promotoras

Definición de promotor

La transcripción debe ser regulada a niveles diferentes debido a que la ejecución de los procesos biológicos necesita una regulación génica espacio-temporal precisa. La iniciación es uno de los pasos donde hay una mayor regulación⁶¹. Los genes que codifican para proteínas y los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II (RNA Pol II) y

generalmente estos genes poseen dos elementos reguladores de la transcripción que actúan en *cis*: el promotor y los elementos reguladores distales.

El promotor se compone por dos secciones: el núcleo y la región proximal. El núcleo del promotor es la secuencia mínima necesaria para que el complejo pre-iniciador de la transcripción (PIC) sea reclutado, la RNA Pol II se una y la transcripción inicie⁶². Esta secuencia comprende el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y se extiende aproximadamente 35 nucleótidos río arriba y río abajo. Por otro lado, el promotor proximal se encuentra inmediatamente cercano al sitio de inicio de la transcripción (generalmente de -250 a +250 nucleótidos con respecto al TSS). En este sitio se reclutan factores de transcripción específicos, activadores y represores. Asimismo, existen otros reguladores distales de la transcripción tales como las regiones de control del locus (LCR), los silenciadores, *insulators* y *enhancers*⁶¹. Los componentes genéticos no actúan solos ya que componentes epigenéticos también participan en la regulación génica.

Los componentes epigenéticos están asociados con regiones promotoras

La transcripción no depende solamente de los elementos genéticos sino que también depende de los elementos epigenéticos. La arquitectura de la cromatina en las regiones promotoras favorece la transcripción, ya que se caracteriza por presentar a las variantes de histonas H3.3 y H2A.Z⁶³. Estas variantes presentan poca estabilidad en comparación con la H3 y H2A canónicas⁶⁴, lo que facilita la apertura de la cromatina, el acceso de la RNA Pol II a la región promotora y el inicio de la transcripción.

Además de contar con la presencia de una isla CpG⁵⁷, algunas regiones promotoras poseen otros elementos epigenéticos asociados con la apertura de la cromatina y el inicio de la transcripción. Entre ellos se encuentran las modificaciones post-traduccionales de las histonas tales como la acetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me) y la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3)⁶⁵.

Las islas CpG y su asociación con promotores

La densidad de las islas CpG en la que se pueden encontrar los promotores se divide en alta, intermedia y baja⁵⁷. Los promotores con alta densidad de islas CpG se encuentran en aproximadamente el 65% de los promotores y se caracterizan por encontrarse no metilados en condiciones normales y ser silenciados principalmente por metilación del DNA. Los promotores con densidad intermedia se encuentran en el 12% de los promotores y han sido poco estudiados. La represión transcripcional de estos genes se da por medio de la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas. Finalmente, los promotores con densidad baja se encuentran en el 23% de los promotores y generalmente se encuentran hipermetilados. No obstante, la metilación no afecta su expresión ya que la represión transcripcional se da por modificaciones post-traduccionales de las histonas⁵⁷.

Los microRNAs (miRNAs)

Definición de microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son genes que transcriben RNAs de cadena sencilla con un tamaño de 18 a 22 nucleótidos y tienen la capacidad de regular la expresión génica^{66,67}. Los miRNAs se unen por complementariedad de bases a las regiones no traducidas del extremo 3' (3' UTR) del RNA mensajero (mRNA) blanco induciendo la inhibición de su traducción y su degradación⁶⁸⁻⁷⁰. Los miRNAs son capaces de expresarse de manera ubicua, tejido-específica e incluso temporal dependiendo de la etapa del desarrollo en la que se encuentre la célula o el tejido⁷¹.

El microRNA *miR-125b1*

El *miR-125b1* pertenece a la familia *miR-125*, la cual está formada por los miRNAs *miR-125a*, *miR-125b1* y *miR-125b2*⁷². En humano, el *miR-125b1* es un miRNA que se expresa de manera ubicua y presenta su expresión más alta en cerebro y ovario, seguidos de la glándula tiroideas, glándula pituitaria, epidídimo, bazo, testículos, próstata, útero, placenta e hígado⁷³.

El gen del *miR-125b1* se localiza en el cromosoma 11q24.1 y una de sus funciones principales es la regulación de genes involucrados en la apoptosis⁷⁴, ciclo celular⁷⁵ y

proliferación⁷⁶. Este miRNA tiene como blancos génicos a *BAK1*⁷⁷, *ERBB2* y *ERBB3*⁷⁸, *p53*⁷⁵ y a factores transcripcionales como *EST1*⁷⁹ y *Myc*⁷⁶, entre otros.

La desregulación de los miRNAs por medio de defectos genéticos y epigenéticos ha sido relacionado con el desarrollo de cáncer⁸⁰. Cabe mencionar que algunos miRNAs pueden desempeñar el papel de gen supresor de tumores u oncogen dependiendo del contexto en el que se encuentren^{81,82}.

El *miR-125b1* se encuentra desregulado en una amplia variedad de tumores⁸³. El aumento significativo de su expresión se ha observado en varios tipos de cáncer tales como próstata⁸⁴, tiroides⁸⁵ e hígado⁸⁶. La disminución significativa de su expresión se ha visto en vejiga⁸⁷, osteosarcoma⁸⁸, glioma⁷⁴, ovario^{89,90} y mama^{90,91}.

En 2012 se observó que el *miR-125b1* cuenta con una isla CpG asociada a su región promotora. En líneas celulares de cáncer de mama, el silenciamiento transcripcional de este miRNA se debe a la ganancia de marcas represivas de histonas y metilación del DNA. En líneas no neoplásicas, el *miR-125b1* es protegido de la metilación por una proteína conocida como CTCF⁹⁰.

CTCF

La proteína CTCF se localiza principalmente en el núcleo celular y se estima que es capaz de unirse a 77,000 sitios génicos de 19 líneas celulares⁹². Se ha observado que CTCF recluta proteínas reguladoras a través de su dominio de unión al DNA compuesto por 11 dedos de zinc. En lugar de utilizar diferentes combinaciones de los dedos de zinc⁹³, se ha demostrado que CTCF recluta proteínas con los dedos de zinc 1 a 3, reconoce la secuencia del DNA a la cual debe unirse con los dedos 4 a 7 y se estabiliza uniéndose con secuencias aleatorias del DNA con los dedos 9 a 11⁹⁴. Las proteínas que pueden ser reclutadas por CTCF incluyen las proteínas de unión a DNA, remodeladoras de la cromatina y las que poseen múltiples funciones⁹⁵. Asimismo, CTCF actúa como *insulator* y participa en la formación de interacciones cromáticas de largo alcance, bloqueo de *enhancers* y regulación de la activación o la represión de promotores^{96,97} (Figura 2). Estas funciones dependen del contexto en el que CTCF se encuentre y de las interacciones que establezca con otras proteínas^{95,98}.

En el proceso de desmetilación del DNA, se ha descrito que la 5-metilcitosina puede sufrir un proceso de oxidación que genera una molécula conocida como 5-hidroximetilcitosina (5hmC). La 5hmC es producida por las enzimas *Ten Eleven Translocation* (TET), las cuales pueden desmetilar el DNA de manera activa⁹⁹⁻¹⁰² o pasiva¹⁰³⁻¹⁰⁵. La hidroximetilación del DNA podría formar nucleosomas lábiles y facilitaría la unión de diversos factores de transcripción¹⁰⁶. Recientemente se ha descubierto que CTCF participa en la hidroximetilación del DNA al interactuar con las TET¹⁰⁷. Este fenómeno es relevante debido a que CTCF no es capaz de unirse a regiones de DNA metilado^{92,108}.

En el proceso de metilación del DNA, se ha observado que CTCF puede formar un complejo con la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) y la DNMT1. CTCF se une a PARP1, la cual se activa y añade grupos ADP-ribosa a DNMT1. DNMT1 se inactiva y no puede realizar su función de metiltransferasa, por lo tanto, las regiones CpG del DNA están libres de metilación¹⁰⁹⁻¹¹¹ y se puede llevar a cabo la transcripción génica.

La función de *insulator* que presenta CTCF evita el silenciamiento de regiones promotoras y otros elementos reguladores impidiendo la propagación de la metilación¹¹² y modificaciones de las histonas asociadas con silenciamiento¹¹³ (Figura 3), es por ello que se ha propuesto que la desregulación de CTCF podría derivar en el silenciamiento epigenético de genes (como genes supresores de tumores) y contribuir al desarrollo de cáncer.

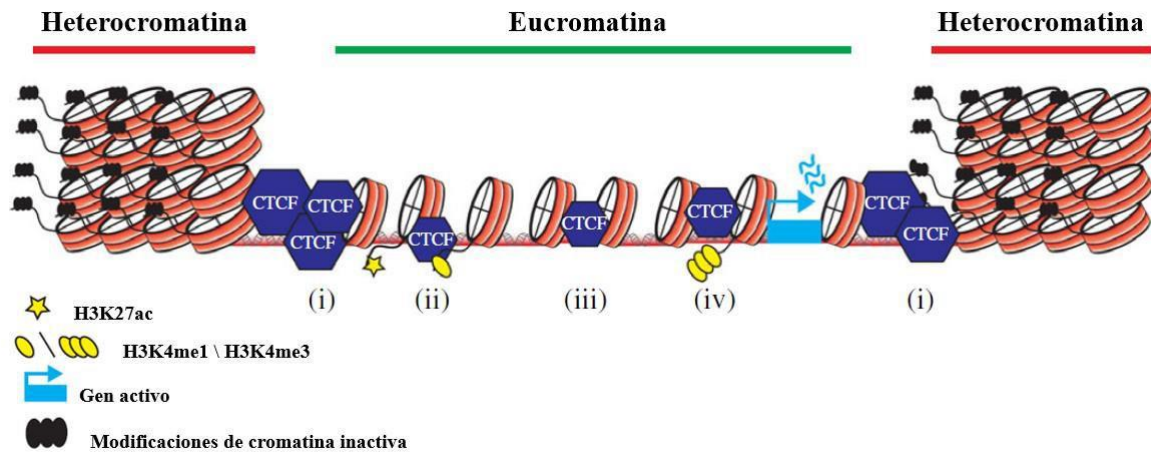


Figura 3. CTCF y la regulación de la cromatina. Los sitios de unión de CTCF se encuentran en las regiones que separan a los dominios transcripcionalmente activos de los inactivos (i). CTCF también puede unirse a regiones donde se encuentren *enhancers* (ii) y promotores génicos (iv) para fomentar su unión y permitir la transcripción del gen blanco o para impedir su interacción e inhibir la transcripción (iii).

CTCF-L (BORIS)

CTCF-Like (CTCF-L) es un gen parálogo de *CTCF* generado a partir de una duplicación génica¹¹⁴. En mamíferos, el dominio de dedos de zinc de *CTCF-L* tiene un porcentaje de identidad de 80.4% comparado con el de *CTCF* mientras que los dominios N y C- terminal tienen un porcentaje menor del 35%. Estas diferencias explicarían por qué realizan funciones diferentes aún cuando comparten el dominio de 11 dedos de zinc¹¹⁴.

CTCF-L codifica a la proteína conocida como *Brother of the Regulator of the Imprinted Sites (BORIS)*. BORIS presenta 23 isoformas (transcritas a partir de los tres promotores alternativos que presenta el gen)^{115,116} que se conforman por extremos N- y C- alternativos combinados con un número variable de dedos de zinc en el dominio de unión al DNA y su abundancia varía entre células germinales y tumorales¹¹⁷.

En un inicio se sugería que *CTCF-L* se expresaba únicamente en testículo (específicamente en espermatoцитos primarios) durante el desarrollo de la línea germinal masculina donde participa en el restablecimiento de marcas de metilación durante la diferenciación^{115,118,119}. Estudios posteriores demostraron que los niveles de transcripción de *CTCF-L* son bajos comparados con los de *CTCF* en el resto de las células somáticas¹²⁰ pero los niveles de proteína son fácilmente detectables en el nucléolo¹²¹ y el ciclo celular¹²².

BORIS está implicado en el inicio de la serie de eventos de metilación en la línea germinal masculina por lo cual se ha considerado que su desregulación puede ser importante

para el desarrollo de cáncer^{123,124} ya que esta proteína está presente en diferentes tipos de tumores y líneas celulares cancerosas^{115,118,125,126}.

CTCF y BORIS pueden estar desempeñando un papel diferente en el establecimiento de la metilación. El ejemplo más claro es el gen improntado más estudiado: el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (*Igf2*) cuya expresión es alelo-específica y solamente se da en el alelo derivado del padre¹²⁶⁻¹²⁹. Localizado río abajo de *Igf2* está el gen *H19*, el cual se expresa solamente en el alelo derivado de la madre^{130,131}. La expresión improntada de *Igf2/H19* depende de la región de control de impronta (ICR) y un *insulator* localizado entre estos dos genes¹¹⁴. El ICR es metilado durante la espermatogénesis, específicamente marcando el alelo derivado del padre¹³². CTCF se une al ICR en el alelo derivado de la madre, el cual no está metilado¹¹⁴. CTCF realiza varias funciones que incluyen impedir la metilación del ICR¹³³⁻¹³⁵, bloquear el acceso de *Igf2* a un *enhancer* río abajo (lo cual resulta en el silenciamiento de *Igf2* en *cis*)^{136,137} y la activación simultánea de la expresión de *H19*¹³⁵. Por su parte, BORIS se une al ICR metilado derivado del padre¹¹⁸ a través de su dominio de dedos de zinc permitiendo la activación de *Igf2*. De esta manera, CTCF evita que se establezcan las marcas de metilación mientras que BORIS establece dichas marcas en el ICR durante la gametogénesis¹¹⁴ (Figura 4).

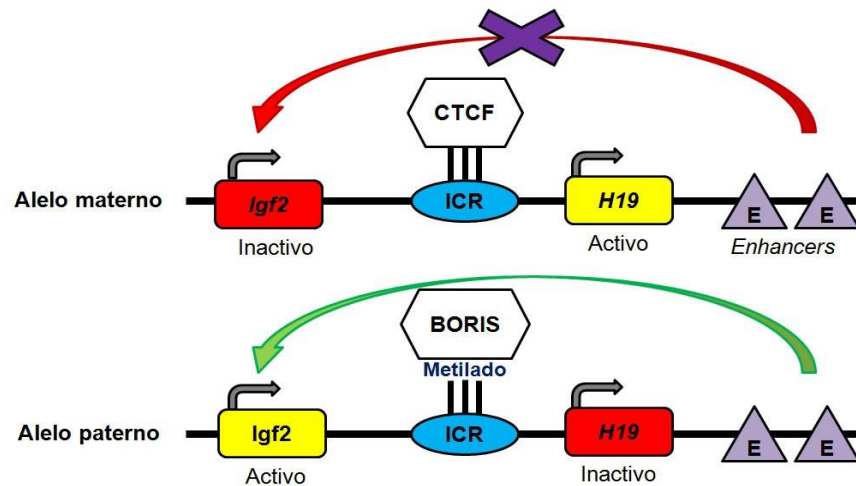


Figura 4. CTCF y BORIS regulan el funcionamiento del locus *Igf2/H19*. BORIS y CTCF se unen al ICR a través del dominio de dedos de zinc aunque actúan de manera diferencial. Mientras BORIS se une al ICR de *Igf2/H19* al momento que esta región es metilada, CTCF evita que se establezcan dichas marcas. Estas interacciones derivan en la expresión diferencial de *Igf2/H19*.

Debido al porcentaje de identidad que presentan CTCF y BORIS se ha propuesto que BORIS está implicado en el inicio de la serie de eventos de metilación diferencial. Se ha considerado que puede ser importante para el desarrollo de cáncer pues ha sido detectado en varios tumores y líneas celulares cancerosas. Ha existido cierta controversia sobre el papel de BORIS en cáncer. Se ha sugerido que BORIS es capaz de ocupar sitios de unión de CTCF y permitir el desarrollo de cáncer¹¹⁸. Varios estudios apoyan esta hipótesis debido a que se ha observado que BORIS se une a los promotores y se ha asociado con la expresión de ciertos genes que provocan cáncer de testículo^{138,139}. Hines y colaboradores reportaron que BORIS no se encontraba ni en tumores y ni en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de mama¹⁴⁰. No obstante, la detección de BORIS en diferentes tipos de cáncer comenzó a documentarse^{115,117,120,125,126,138,139,141-143}. La sobre-expresión de *CTCF-L* se correlacionó con la hipometilación de su promotor en pacientes con cáncer de testículo, próstata y tejidos

epiteliales de ovario^{125,141,142} mientras que la pérdida parcial de metilación se detectó en cáncer de ovario, colon, pulmón y líneas celulares de leucemia^{116,139}.

Muchos de los estudios se han enfocado en analizar la expresión de *CTCF-L* en cáncer de mama. BORIS se ha detectado en tejido tumoral y leucocitos aislados de la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama. En este estudio se observaron mayores niveles de mRNA, donde la abundancia de la proteína correlacionó con el tamaño del tumor^{143,144}. También se encontró que la proteína se presentaba en el núcleo y citoplasma de líneas celulares de cáncer de mama e, interesantemente, activaba los promotores de los genes propios de los receptores de estrógeno y progesterona¹⁴³. La unión de BORIS a regiones promotoras podría favorecer el silenciamiento génico por medio de los dedos de zinc, interactuando con proteínas relacionadas con la metilación del DNA⁴⁹. Esto sugiere que BORIS también podría participar en el establecimiento de la metilación ya que una de sus funciones es restablecer las marcas de metilación durante la diferenciación de la línea germinal masculina^{115,118,119}.

ANTECEDENTES

CTCF se encuentra involucrado en la regulación de la región promotora del *miR-125b1* y su disociación de esta región resulta en la metilación y la pérdida de expresión de este miRNA en líneas celulares de cáncer de mama⁹⁰. El gen parálogo de *CTCF* codifica para una proteína conocida como BORIS y se ha propuesto que podría ocupar los mismos sitios de unión de CTCF debido a que comparten el dominio de 11 dedos de zinc¹⁴⁵. BORIS ha sido asociado con el establecimiento de la metilación^{115,118,119} y su unión a regiones promotoras favorecería su silenciamiento génico al actuar en conjunto con las DNMTs *de novo*. Las DNMTs son proteínas que participan en el establecimiento y el mantenimiento de la metilación en mamíferos y se ha sugerido que éstas pueden ser dirigidas a regiones específicas del genoma a través de interacciones con otras proteínas y reprimir la transcripción de un gen específico mediante la metilación del DNA. Antecedentes del laboratorio mostraron que BORIS se encuentra unido al promotor del *miR-125b1* en la línea celular neoplásica MCF7, por lo tanto, se sugiere que esta proteína está involucrada en la pérdida de expresión del *miR-125b1*, cuya región promotora se encuentra metilada.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La presencia de BORIS y las metiltransferasas *de novo* DNMT3A y DNMT3B y la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1, fomentan la pérdida de expresión del *miR-125b1* en líneas celulares neoplásicas de mama?

HIPÓTESIS

La presencia de BORIS y las metiltransferasas *de novo* DNMT3A y DNMT3B y la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1 en la región promotora del *miR-125b1* fomenta su pérdida de expresión en líneas celulares neoplásicas de mama en comparación con una línea celular no neoplásica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia de BORIS y las metiltransferasas *de novo* DNMT3A y DNMT3B y la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1 en la región promotora del *miR-125b1*.

Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión del transcrito maduro del *miR-125b1* en líneas celulares neoplásicas y no neoplásica de mama.
2. Determinar el estado de metilación de la región promotora del *miR-125b1* en líneas celulares neoplásica y no neoplásicas de mama.
3. Determinar la localización de CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 en líneas celulares neoplásicas y no neoplásicas de mama.

4. Evaluar la expresión de *CTCF*, *CTCF-L*, *DNMT3A*, *DNMT3B* y *DNMT1* en líneas celulares neoplásicas y no neoplásicas de mama.
5. Determinar la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 en la región promotora del *miR-125b1* en líneas celulares neoplásicas y no neoplásica de mama.

METODOLOGÍA

PCR en tiempo real (RT-PCR) con sondas TaqMan.

Con el objetivo de evaluar la expresión del transcrito maduro del *miR-125b1*, se realizó RT-PCR cuantitativo con sondas TaqMan (Applied Biosystems, números de catálogo ID002378 para el *miR-125b1* e ID001093 para *U6*) en una línea celular no neoplásica (MCF 10A) y tres líneas neoplásicas (MCF7, MDA-MB-231 y HeLa). Los análisis se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

PCR sensible a metilación (MS-PCR).

La disminución de la expresión del *miR-125b1* se ha relacionado con la metilación de la isla CpG que contiene a la región promotora de este miRNA. Con el propósito de determinar el estado de metilación del DNA de la región promotora de este miRNA, se realizó la modificación de DNA con bisulfito de sodio para análisis de metilación y PCR sensible a metilación (MS-PCR) en las cuatro líneas celulares. Los análisis se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes y se analizaron por el método de doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).

Inmunofluorescencias de las proteínas CTCF y BORIS.

Con el objetivo de evaluar la localización de CTCF y BORIS se utilizaron dos anticuerpos primarios (que reconocen a la proteína de interés) y dos anticuerpos secundarios (que se encuentran marcados por el fluoróforo y reconocen a los primarios) en la misma célula. Estos experimentos se conocen como inmunofluorescencias dobles y se realizaron en la línea celular no neoplásica MCF 10A y las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa.

Por otra parte, con el objetivo de determinar la localización de DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 se realizaron inmunofluorescencias en la línea celular no neoplásica MCF 10A y las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa.

Los análisis se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Las figuras muestran imágenes representativas de los resultados. Las inmunofluorescencias se observaron en el microscopio Zeiss Axio Imager A2 (Carl Zeiss®, número de catálogo 490022-0007-000) y las imágenes se analizaron con el software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss®, número de catálogo, 410130-2302-000).

RT-PCR cuantitativo.

Con el propósito de evaluar la expresión de *CTCF*, *CTCF-L*, *DNMT3A*, *DNMT3B* y *DNMT1* se realizó un ensayo de RT-PCR cuantitativo en muestras de DNA complementario

(cDNA) provenientes de una línea no neoplásica (MCF 10A) y tres líneas neoplásicas (MCF7, MDA-MB-231 y HeLa). Los análisis se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Con el propósito de evaluar la presencia de CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 en la región promotora del *miR-125b1* se realizó una inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en la línea celular no neoplásica MCF 10A y las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. Las muestras se analizaron por PCR en punto final. Los análisis se realizaron por triplicado técnico. Se muestran imágenes representativas de los resultados.

RESULTADOS

Estudio de la expresión relativa del transcrito maduro del *miR-125b1* por RT-PCR cuantitativo con sondas TaqMan.

Los datos mostraron que la expresión del *miR-125b1* disminuyó en las tres líneas celulares neoplásicas en comparación con la línea celular no neoplásica (Figura 5A).

Estudio del estado de metilación de la región promotora del *miR-125b1* por PCR sensible a metilación (MS-PCR) en cuatro líneas celulares.

Los resultados mostraron que la región promotora del *miR-125b1* se encuentra no metilada (U) en la línea celular MCF 10A mientras que se encuentra metilada (M) en las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. Una muestra de DNA metilado *in vitro* (IVD) (Zymo Research®, número de catálogo E2010) fue utilizada como control positivo (Figura 5B).

En conclusión, la expresión del *miR-125b1* disminuyó en las tres líneas celulares neoplásicas en comparación con la línea celular no neoplásica, encontrándose una relación entre el estado de metilación y su expresión.

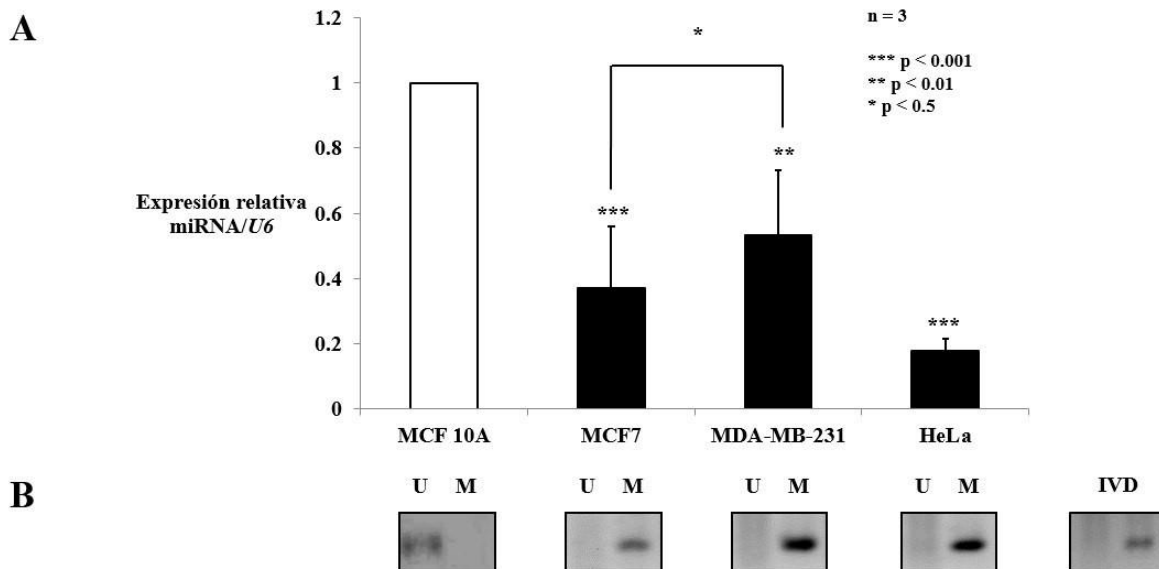


Figura 5. Expresión relativa del transcrito maduro del *miR-125b1* y estado de metilación de su región promotora. **A.** Evaluación de la expresión del transcrito maduro del *miR-125b1* en la línea celular no neoplásica MCF 10A (barra blanca) y las tres líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa (barras negras) por medio de RT-PCR cuantitativo con sondas TaqMan utilizando a *U6* como RNA de expresión constitutiva. De acuerdo a la prueba *t* de Student *** p < 0.001 y ** p < 0.01 indican diferencias significativas entre MCF 10A y las tres líneas neoplásicas mientras que * p < 0.5 indica diferencias no significativas entre MCF7 y MDA-MB-231. **B.** Evaluación del estado de metilación de la región promotora del *miR-125b1* en las mismas líneas celulares. Una muestra de DNA metilado *in vitro* (IVD) fue utilizada como control positivo.

Estudio de la presencia y la localización de las proteínas CTCF y BORIS por medio de inmunofluorescencias en cuatro líneas celulares.

En MCF 10A se observó que CTCF está presente en el núcleo y ausente en el nucléolo mientras que BORIS se localiza principalmente en el nucleolo. En las tres líneas celulares neoplásicas, CTCF está presente en el núcleo y ausente en el nucléolo. No obstante, BORIS se localizó tanto en el nucleolo como en el núcleo (Figura 6).

En conclusión, CTCF presenta una localización nuclear mientras que BORIS una localización nuclear y nucleolar en las tres líneas celulares neoplásicas.

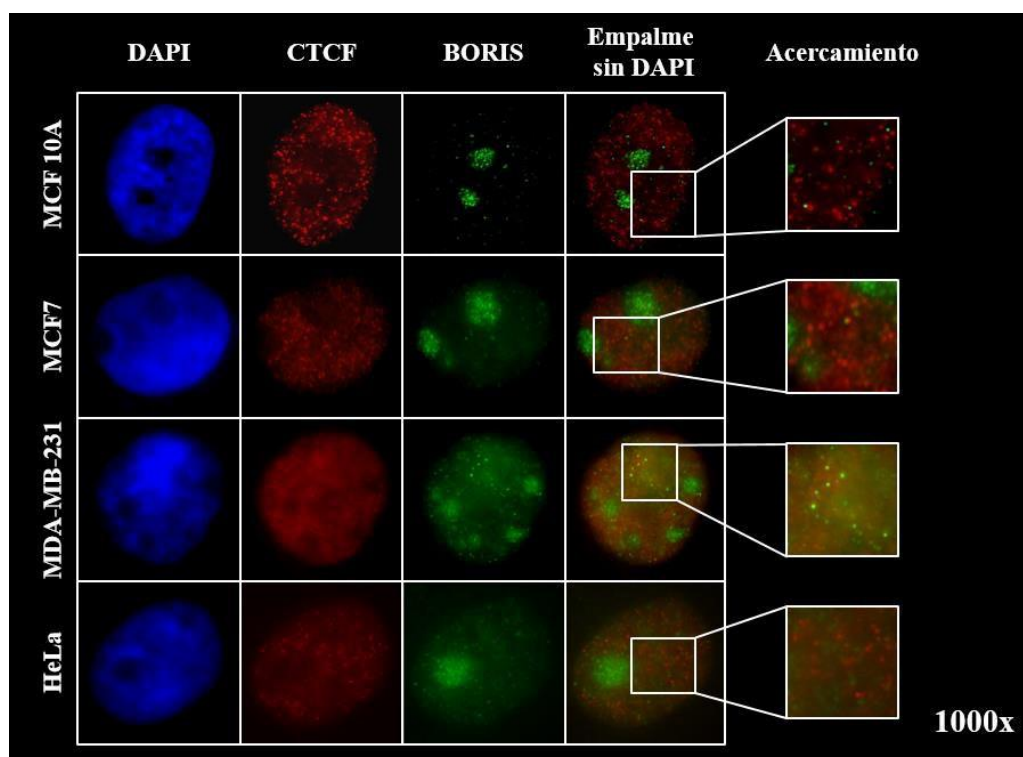


Figura 6. Localización y presencia de las proteínas CTCF y BORIS. Inmunofluorescencias dobles de CTCF y BORIS en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. El DNA se tiñó con DAPI, CTCF se muestra en color rojo (AlexaFluor® 568) y BORIS en color verde (AlexaFluor® 488).

Determinación de la expresión relativa de los genes *CTCF* y *CTCF-L* por medio de RT-PCR cuantitativo en cuatro líneas celulares.

Los datos mostraron que *CTCF* presentó un mayor nivel de expresión en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 en comparación con MCF 10A. Cabe destacar que existen diferencias de expresión entre estas dos líneas celulares neoplásicas de mama donde los niveles de MCF7 se encontraron por debajo de los de MDA-MB-231. No obstante, no se observaron diferencias de expresión significativas de *CTCF* en la línea celular HeLa en comparación con la línea celular MCF 10A (Figura 7). Por otra parte, *CTCF-L* también tuvo un incremento en su expresión en las tres líneas celulares neoplásicas en comparación con la línea celular no neoplásica (Figura 8).

En conclusión, *CTCF* aumentó su expresión dos veces en MCF7 y seis veces en MDA-MB-231 en comparación con la línea no neoplásica MCF 10A, mientras que HeLa no presentó diferencias. Por su parte, *CTCF-L* se encontró incrementado 600 veces en MCF7, 2,700 veces en MDA-MB-231 y 1,300 veces en HeLa en comparación con MCF 10A.

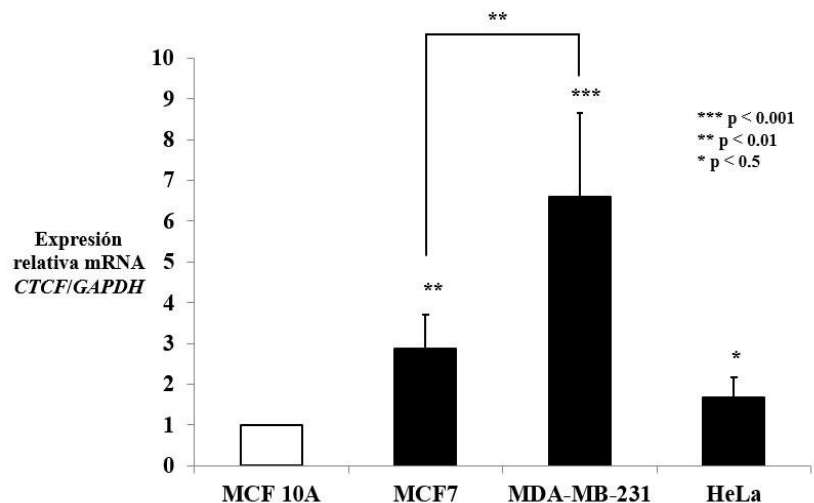


Figura 7. Expresión relativa de CTCF. Evaluación de la expresión de *CTCF* en la línea celular no neoplásica MCF 10A (barra blanca) y las tres líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa (barras negras) por medio de RT-PCR cuantitativo utilizando a *GAPDH* como gen de referencia. De acuerdo a la prueba *t* de Student *** $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$ indican diferencias significativas entre MCF 10A, MCF7 y MDA-MB-231 mientras que * $p < 0.5$ indica diferencias no significativas entre MCF 10A y HeLa. También se muestran diferencias significativas entre MCF7 y MDA-MB-231.

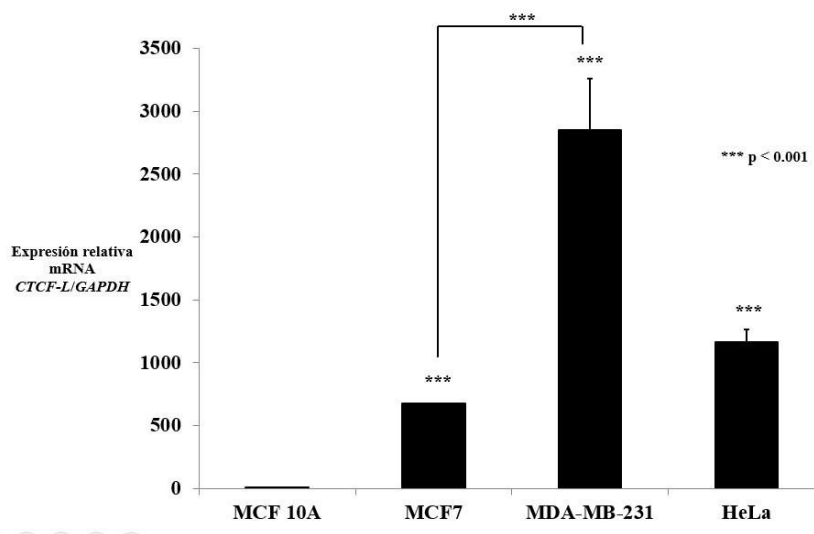


Figura 8. Expresión relativa de CTCF-L. Evaluación de la expresión de *CTCF-L* en la línea celular no neoplásica MCF 10A (barra blanca) y las tres líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa (barras negras) por medio de RT-PCR cuantitativo utilizando a *GAPDH* como gen de referencia. De acuerdo a la prueba *t* de Student *** $p < 0.001$ indica diferencias significativas entre MCF 10A y las tres líneas neoplásicas. También se muestran diferencias significativas entre MCF7 y MDA-MB-231.

Estudio de la presencia y la localización de las proteínas DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 por medio de inmunofluorescencias y estudio de la expresión relativa de los genes *DNMT3A* y *DNMT3B* por medio de RT-PCR cuantitativo en cuatro líneas celulares.

DNMT3A se localizó en el núcleo de MCF 10A y las tres líneas celulares neoplásicas (Figura 9). DNMT3B no se detectó en el núcleo de MCF 10A pero sí se localizó en el núcleo de las tres líneas neoplásicas (Figura 11). De igual manera se evaluó a la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1 y se observó que está presente en el núcleo de MCF 10A y las tres líneas celulares neoplásicas (Figura 13).

En conclusión, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 son proteínas con localización nuclear las cuales se encuentran presentes en las tres líneas celulares neoplásicas.

Se ha sugerido que la expresión de las metiltransferasas *de novo* aumenta en células neoplásicas. Con el propósito de determinar la expresión de *DNMT3A* y *DNMT3B* (que codifican a las metiltransferasas *de novo*) se realizó RT-PCR cuantitativo en una línea celular no neoplásica (MCF 10A) y tres líneas neoplásicas (MCF7, MDA-MB-231 y HeLa). Los análisis se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

Los resultados mostraron que *DNMT3A* se sobreexpresa en las tres líneas celulares neoplásicas en comparación con la línea celular no neoplásica (Figura 10). *DNMT3B* también se sobreexpresó en las tres líneas neoplásicas en comparación con la línea no neoplásica (Figura 12), sugiriendo que la expresión de las metiltransferasas *de novo* aumenta en cáncer.

Asimismo, se analizó la expresión de *DNMT1* (que codifica a la metiltransferasa de mantenimiento) y se observó un aumento de expresión en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 en comparación con la línea celular MCF 10A. Cabe destacar que no existen diferencias de expresión entre estas dos líneas celulares neoplásicas de mama. En contraste, no se observaron diferencias de expresión en la línea celular HeLa (Figura 14).

En conclusión, *DNMT3A* y *DNMT3B* se sobreexpresan en las tres líneas celulares neoplásicas. Por su parte, *DNMT1* aumenta su expresión en las líneas celulares neoplásicas MCF7 y MDA-MB-231 mientras que en la línea celular HeLa no presenta diferencias al compararse con la línea no neoplásica MCF 10A.

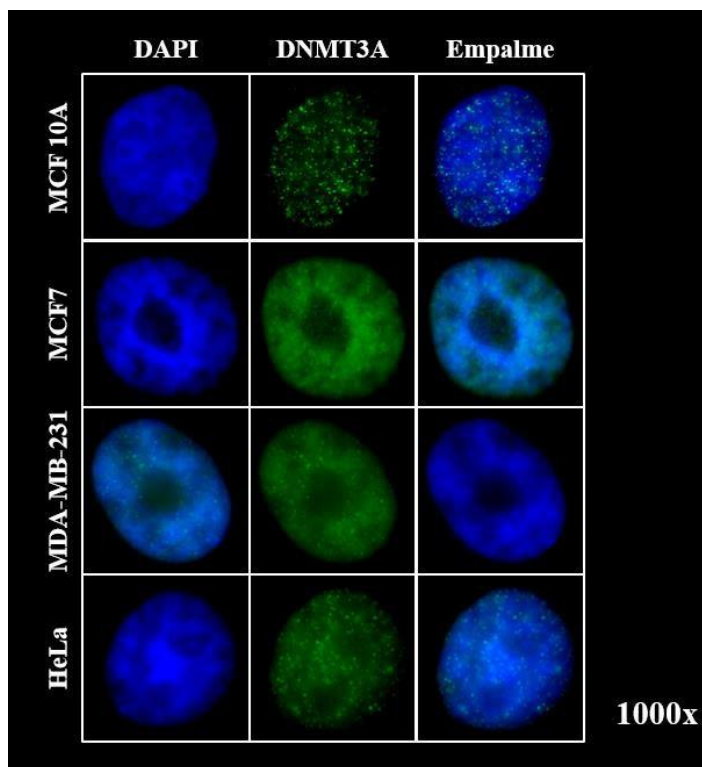


Figura 9. Localización y presencia de la proteína DNMT3A. Inmunofluorescencias de DNMT3A en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. El DNA se tiñó con DAPI mientras que DNMT3A se muestra en color verde (AlexaFluor® 488).

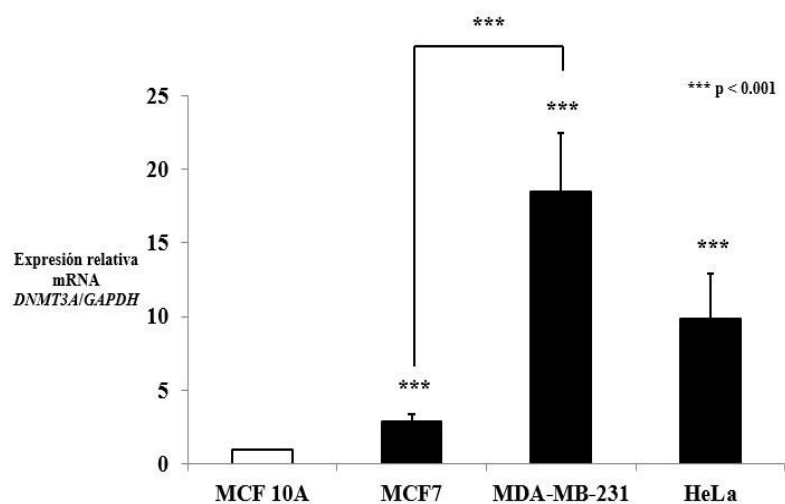


Figura 10. Expresión relativa de DNMT3A. Evaluación de la expresión de DNMT3A en la línea celular no neoplásica MCF 10A (barra blanca) y las tres líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa (barras negras) por medio de RT-PCR cuantitativo utilizando a GAPDH como gen de expresión constitutiva. De acuerdo a la prueba *t* de Student *** $p < 0.001$ indica diferencias significativas entre MCF 10A y las tres líneas neoplásicas. También se muestran diferencias significativas entre MCF7 y MDA-MB-231.

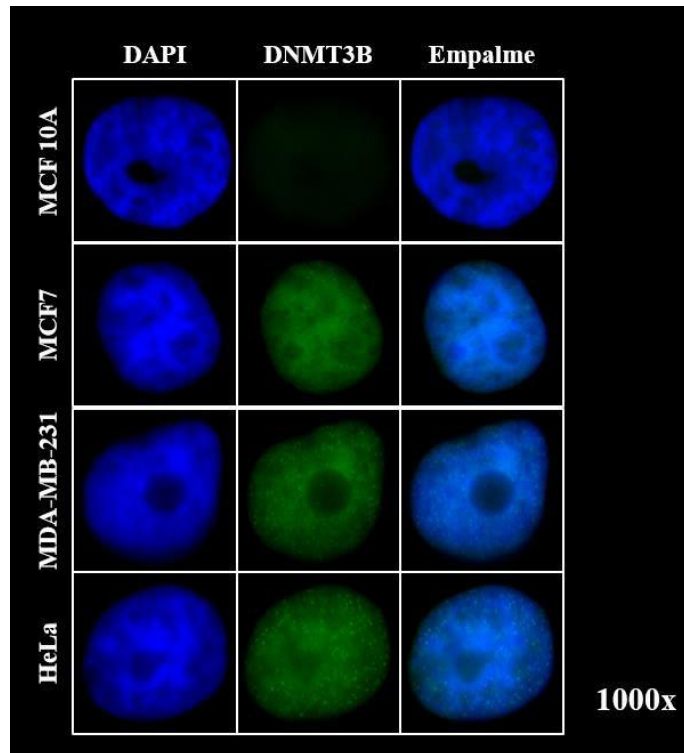


Figura 11. Localización y presencia de la proteína DNMT3B. Inmunofluorescencias de DNMT3B en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. El DNA se tiñó con DAPI mientras que DNMT3B se muestra en color verde (AlexaFluor® 488).

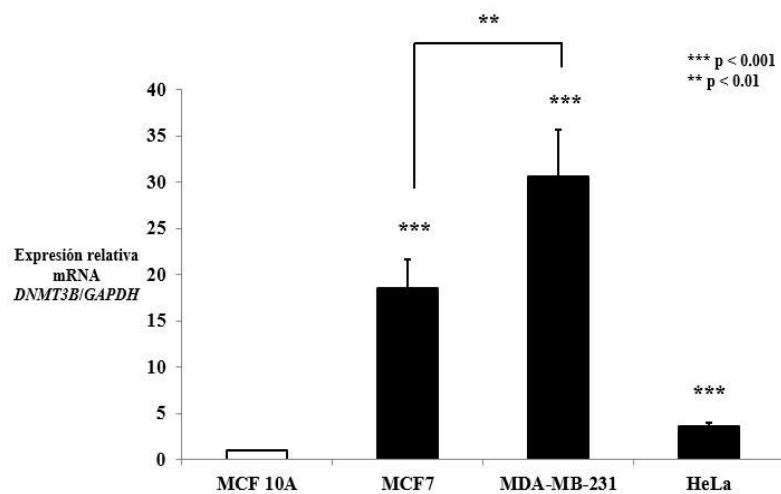


Figura 12. Expresión relativa de DNMT3B. Evaluación de la expresión de *DNMT3B* en la línea celular no neoplásica MCF 10A (barra blanca) y las tres líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa (barras negras) por medio de RT-PCR cuantitativo utilizando a *GAPDH* como gen de expresión constitutiva. De acuerdo a la prueba *t* de Student *** $p < 0.001$ indica diferencias significativas entre MCF 10A y las tres líneas neoplásicas mientras que ** $p < 0.01$ indica diferencias significativas entre MCF7 y MDA-MB-231.

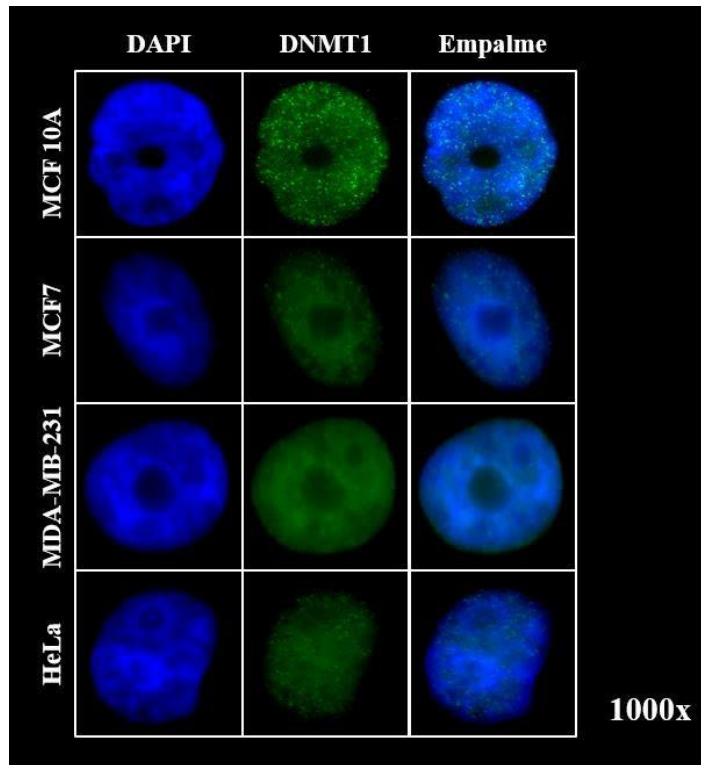


Figura 13. Localización y presencia de la proteína DNMT1. Inmunofluorescencias de DNMT1 en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. El DNA se tiñó con DAPI mientras que DNMT1 se muestra en color verde (AlexaFluor® 488).

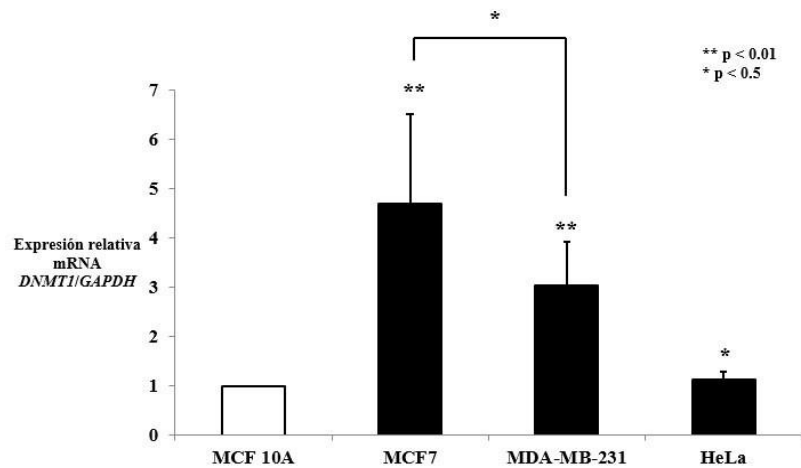


Figura 14. Expresión relativa de DNMT1. Evaluación de la expresión de *DNMT1* en la línea celular no neoplásica MCF 10A (barra blanca) y las tres líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa (barras negras) por medio de RT-PCR cuantitativo utilizando a *GAPDH* como gen de expresión constitutiva. De acuerdo a la prueba *t* de Student ** $p < 0.01$ indica diferencias significativas entre MCF 10A, MCF7 y MDA-MB-231 mientras que * $p < 0.05$ indica diferencias no significativas entre MCF 10A y HeLa. También se muestran diferencias no significativas entre MCF7 y MDA-MB-231.

Estudio de la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 en la región promotora del *miR-125b1* por medio de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en cuatro líneas celulares.

En el gel de agarosa se observó la amplificación del *miR-125b1* en las muestras correspondientes al Input (una muestra de DNA que no fue inmunoprecipitada) diluido al 0.1%, 1% y 10% y las muestras inmunoprecipitadas con los anticuerpos correspondientes a CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1, la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3), IgG que es el control positivo ya que es una amplificación de DNA no asociado a la inmunoprecipitación y el control negativo de la reacción de PCR en punto final (Figura 15). La curva de amplificación con diluciones conocidas y crecientes (0.1%, 1% y 10%) de Input se realizó para demostrar la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos y verificar la ausencia de saturación en la reacción de PCR.

Posteriormente se realizó el análisis por densitometría de las imágenes de los geles de agarosa con el programa ImageJ (National Institutes of Health, versión 1.49). Las muestras fueron normalizadas con el control de IgG (valor igual a 1) por lo que los valores mayores a 1 indican la presencia de la proteína en la región de interés.

Los resultados mostraron que el gradiente de Input se realizó de manera adecuada. En la línea celular MCF 10A, se observó que CTCF está presente de la región promotora del *miR-125b1*. BORIS tiene menor presencia en comparación con CTCF, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 no están presentes mientras que la H3K9me3 (una marca de silenciamiento que se observa en regiones de DNA metilado) no está presente (Figura 16).

Los resultados en la línea MCF7, CTCF está ausente de la región promotora del miRNA. BORIS, DNMT3A, DNMT1 y H3K9me3 predominan en dicha región. No se observó la presencia de DNMT3B (Figura 17).

En la línea MDA-MB-231, se observó que CTCF no se encuentra en la región promotora del *miR-125b1*. BORIS, DNMT3B, DNMT1 y H3K9me3 se encuentran en dicha región. No se observó la presencia de DNMT3A (Figura 18).

En la línea HeLa, se observó que CTCF está ausente de la región promotora del miRNA. BORIS, DNMT3A, DNMT1 y H3K9me3 predominan en dicha región. No se observó la presencia de DNMT3B (Figura 19).

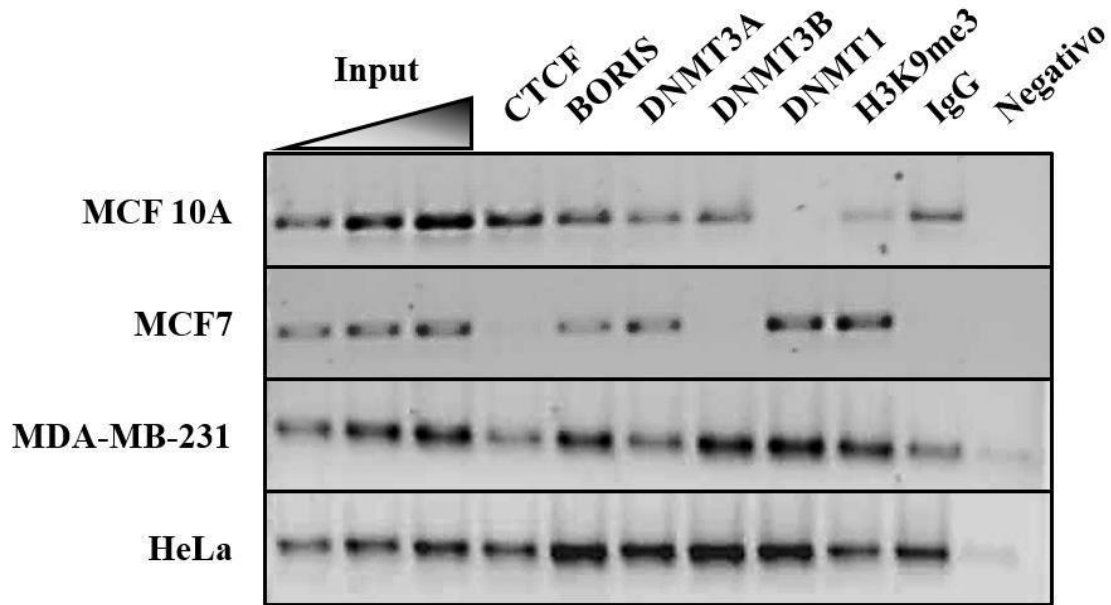


Figura 15. Presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 en la región promotora del *miR-125b1* en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) donde se determinó que CTCF se encuentra presente en la región promotora del *miR-125b1* en la línea celular no neoplásica MCF 10A. En contraste, se observó que BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y H3K9me3 se encuentran en la región promotora del *miR-125b1* en las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa.

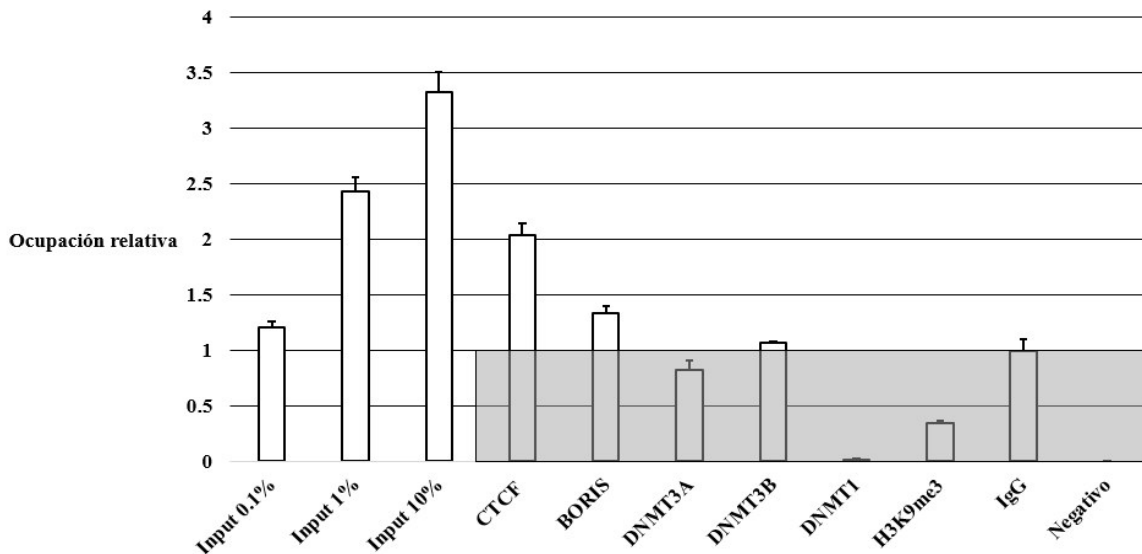


Figura 16. Cuantificación por densitometría para evaluar la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y la marca de silenciamiento H3K9me3 en la región promotora del *miR-125b1* de la línea celular MCF 10A. Análisis por densitometría donde se determinó el gradiente de Input, la presencia de CTCF y BORIS y la ausencia de DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y H3K9me3 en la región promotora del *miR-125b1* de la línea celular MCF 10A. También se muestra el control positivo de IgG y el control negativo de la reacción de PCR punto final. Las muestras fueron normalizadas con el control de IgG.

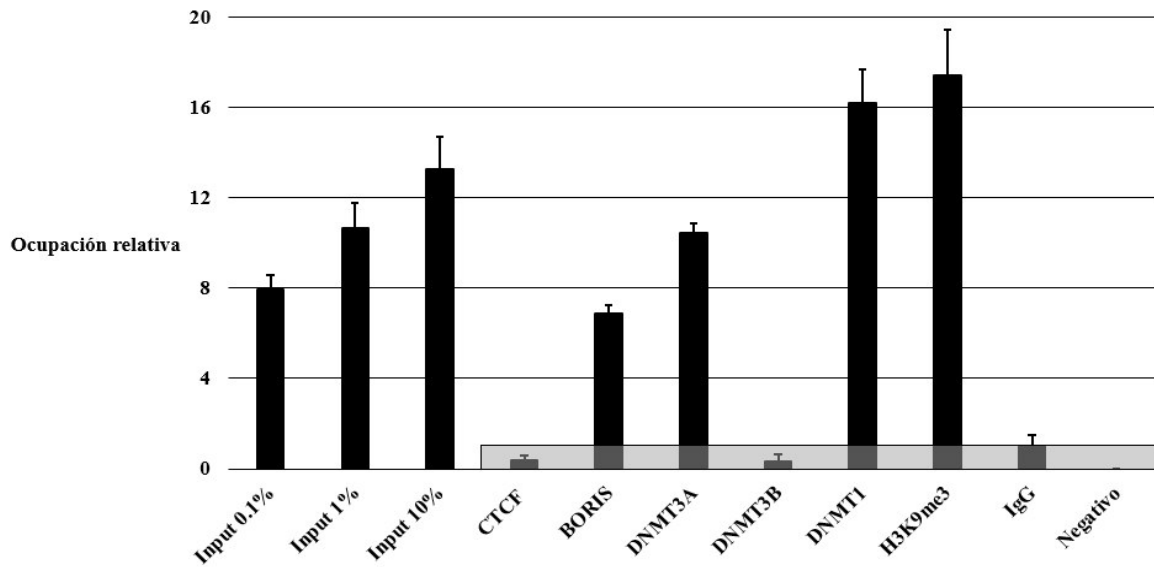


Figura 17. Cuantificación por densitometría para evaluar la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y la marca de silenciamiento H3K9me3 en la región promotora del *miR-125b1* de la línea celular MCF7. Análisis por densitometría donde se determinó el gradiente de Input, la ausencia de CTCF y DNMT3B y la presencia de BORIS, DNMT3A, DNMT1 y H3K9me3 en la región promotora del *miR-125b1* de la línea celular MCF7. También se muestra el control positivo de IgG y el control negativo de la reacción de PCR punto final. Las muestras fueron normalizadas con el control de IgG.

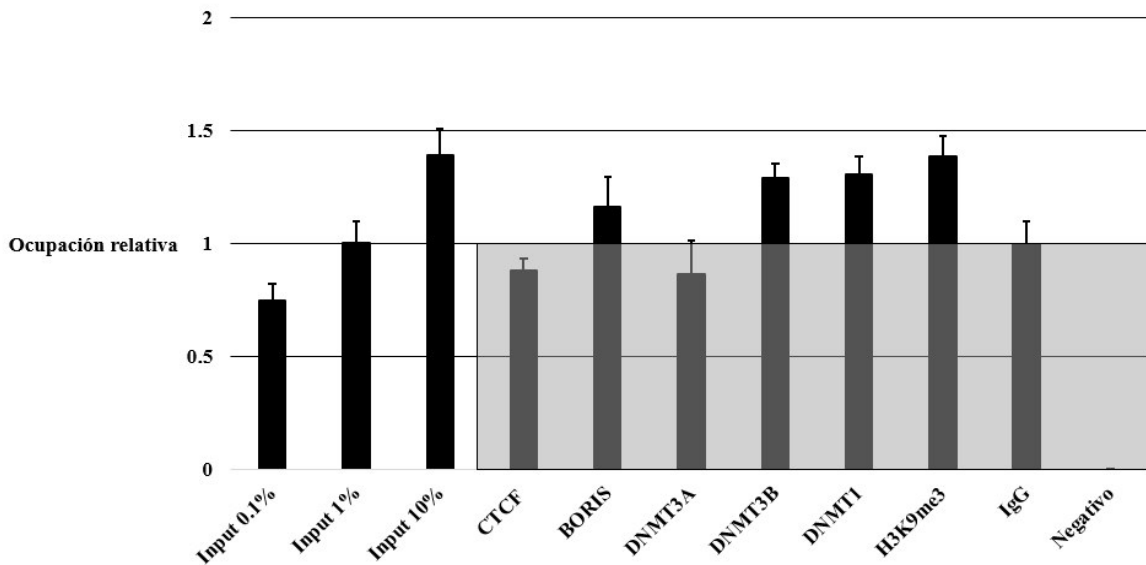


Figura 18. Cuantificación por densitometría para evaluar la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y la marca de silenciamiento H3K9me3 en la región promotora del *miR-125b1* de la línea celular MDA-MB-231. Análisis por densitometría donde se determinó el gradiente de Input, la ausencia de CTCF y DNMT3B y la presencia de BORIS, DNMT3A, DNMT1 y H3K9me3 en la región promotora del *miR-125b1* de la línea celular MDA-MB-231. También se muestra el control positivo de IgG y el control negativo de la reacción de PCR punto final. Las muestras fueron normalizadas con el control de IgG.

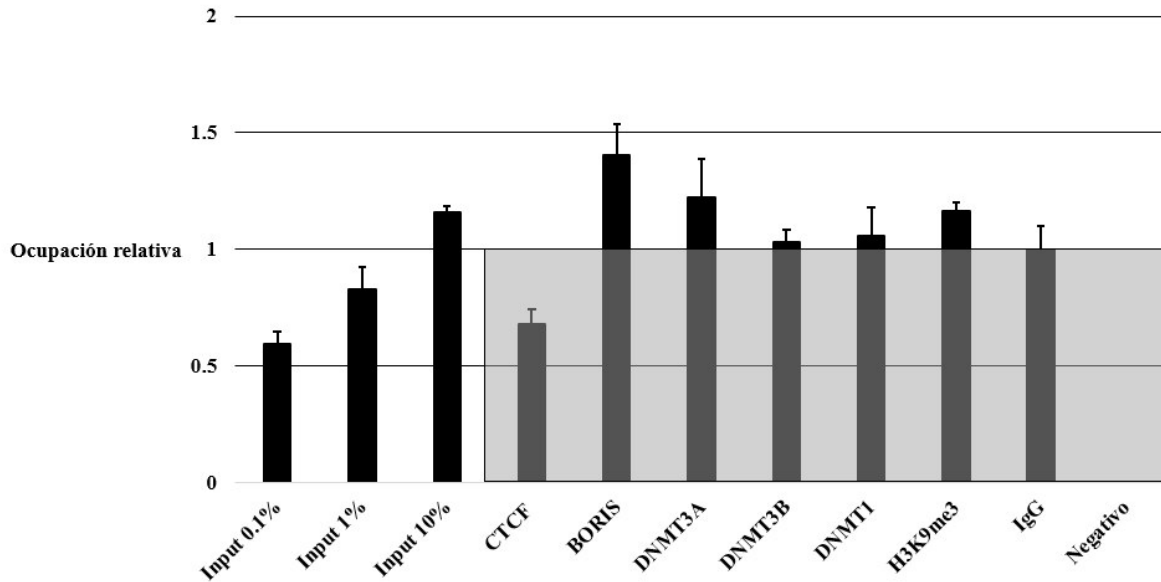


Figura 19. Cuantificación por densitometría para evaluar la presencia de las proteínas CTCF, BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y la marca de silenciamiento H3K9me3 en la región promotora del *miR-125b1* de la línea celular HeLa. Análisis por densitometría donde se determinó el gradiente de Input, la ausencia de CTCF y DNMT3B y la presencia de BORIS, DNMT3A, DNMT1 y H3K9me3 en la región promotora del *miR-125b1* de la línea celular HeLa. También se muestra el control positivo de IgG y el control negativo de la reacción de PCR punto final. Las muestras fueron normalizadas con el control de IgG.

DISCUSIÓN

La metilación del DNA es uno de los mecanismos epigenéticos de regulación génica más importantes en mamíferos. El establecimiento de la metilación se realiza por medio de las DNA metiltransferasas, entre las cuales destacan la DNMT1 (involucrada en el mantenimiento de la metilación), la DNMT3A y la DNMT3B (involucradas en el establecimiento de patrones nuevos de metilación). Los errores en el establecimiento o mantenimiento de la metilación provocan el desarrollo de diferentes enfermedades, entre las cuales se encuentran diferentes tipos de cáncer, donde se ha observado una hipometilación global del DNA y una hipermetilación local de islas CpG.

Las islas CpG son secuencias de DNA no metilado presentes en cerca del 70% de los promotores de genes constitutivos y aproximadamente el 40% de los genes tejido-específicos^{55,57}. La densidad de las islas CpG en la que se pueden encontrar los promotores se divide en alta, intermedia y baja. Las islas CpG altas se han relacionado con promotores de genes constitutivos, los cuales generalmente se encuentran no metilados. Por otra parte, las islas CpG bajas se asocian con promotores de genes tejido-específico las cuales, aparentemente pueden encontrarse metiladas sin que se afecte su regulación¹⁴⁶. No obstante, esta clasificación depende de la naturaleza de la isla CpG, pero no toma en cuenta las combinaciones diferentes de mecanismos epigenéticos que pueden participar en el proceso de silenciamiento^{57,147,148}. Por ejemplo, los promotores con una isla CpG alta frecuentemente son silenciados por metilación del DNA y la incorporación de modificaciones de las histonas asociadas con represión^{147,149}. En contraste, las islas CpG intermedias y bajas son silenciadas por modificaciones de las histonas asociadas con silenciamiento y no por metilación del

DNA¹⁴⁷. De esta manera, las modificaciones de las histonas y la metilación del DNA pueden ejercer un efecto independiente y sus promotores blanco pueden definirse por la cantidad de dinucleótidos CpG^{57,146–148}.

La isla CpG del promotor de *miR-125b1* se clasifica como una isla CpG alta y estudios recientes han demostrado que se encuentra metilada en células tumorales de mama. La disminución de su expresión ha sido asociada con la metilación de su isla CpG y la ganancia de modificaciones de histonas asociadas con silenciamiento. De igual manera, se observó que la represión transcripcional de este miRNA se debió a que su región promotora no contaba con la presencia de la proteína CTCF⁹⁰. La contribución del presente trabajo fue evaluar si BORIS es capaz de unirse a un sitio de unión propio de CTCF y observar la presencia de las DNMTs de mantenimiento y *de novo*, sugiriendo que el silenciamiento del *miR-125b1* puede ser provocado por un mecanismo epigenético.

CTCF es una proteína que cuenta con un dominio de 11 dedos de zinc altamente conservado en diferentes organismos, desde *Drosophila melanogaster* hasta humano^{150,151}. Se han reportado 77,000 sitios de unión de los cuales 46% se encuentran en secuencias intergénicas, 22% en intrónicas, 20% en regiones promotoras y 12% en exónicas⁹². Estos datos sugieren que CTCF está implicado en procesos celulares como: la regulación de la actividad de promotores, establecimiento de dominios génicos al interior del núcleo y *splicing* alternativo^{92,96,152,153}. Asimismo, se ha observado que CTCF está implicado en la organización de territorios cromosómicos por medio de la formación de asas de cromatina¹⁵⁴.

A nivel local, CTCF se asocia con promotores de genes supresores de tumores como *BRCA1*, *p16*, *p53*, *Rb* y el *miR125-b1*. En estas regiones, CTCF impide la propagación de la metilación del DNA y las marcas represivas de histonas^{90,146,155,156}. A nivel global, esta proteína puede mediar interacciones cromatínicas de largo alcance, permitiendo la regulación de la expresión génica de dominios completos. La disociación de CTCF está relacionada con el silenciamiento génico por fenómenos epigenéticos como: la hipermetilación local del DNA en promotores génicos y ganancia de modificaciones post-traduccionales de las histonas asociadas con represión transcripcional^{90,92,146,157}. El gen improntado *Igf2/H19* es el ejemplo más claro sobre el establecimiento de metilación del DNA. Se ha demostrado que la unión de CTCF es impedir la propagación de la metilación^{133,158}. Sin embargo, CTCF no es el que origina el estado no metilado, sino que otros cofactores provocan que tenga preferencia de unión a ciertas regiones y/o se encarga de reclutar las proteínas involucradas en impedir la propagación de la metilación^{93,159-163}. Por lo tanto, CTCF es un factor importante en la regulación génica.

CTCF se caracteriza por su dominio de 11 dedos de zinc. En un principio se pensaba que utilizaba combinaciones diferentes para unirse a la secuencia del DNA y reclutar proteínas⁹³. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que CTCF lleva a cabo estas funciones con determinados dedos de zinc⁹⁴. Es importante señalar que CTCF no es capaz de unirse a regiones de DNA metilado^{92,108}, por lo que CTCF debe valerse de mecanismos diferentes para unirse al DNA y la hidroximetilación del DNA podría formar nucleosomas lábiles que facilitarían la unión de diversos factores de transcripción, entre los cuales se encontraría CTCF¹⁰⁶. Recientemente se ha descubierto que CTCF interacciona con las enzimas TET¹⁰⁷, las cuales son capaces desmetilar el DNA de manera activa⁹⁹⁻¹⁰² o pasiva¹⁰³⁻

¹⁰⁵. Asimismo, CTCF puede formar un complejo con PARP1 y DNMT1. CTCF activa a PARP1, la que a su vez inactiva a DNMT1 provocando que las regiones CpG del DNA estén libres de metilación¹⁰⁹⁻¹¹¹.

El gen *CTCF* cuenta con un parálogo conocido como *CTCF-L*, el cual codifica una proteína llamada BORIS. Esta proteína posee el mismo dominio de 11 dedos de zinc pero difieren en los extremos N- y C-. Se ha sugerido que esta diferencia sería la responsable de determinar sus funciones celulares distintas. De manera interesante, *CTCF* y *CTCF-L* presentan patrones de expresión mutuamente excluyentes en células normales. *CTCF-L* se expresa en las células germinales masculinas y células de alto recambio (como en la epidermis) mientras *CTCF* tiene una expresión ubicua en células somáticas. Datos recientes han sugerido que BORIS tiene un papel importante en la expresión diferencial de los genes improntados, la regulación del centrosoma y la transcripción nucleolar^{121,122,139,164}.

BORIS está implicado en el inicio de la serie de eventos de metilación en la línea germinal masculina, por lo cual se ha considerado que su desregulación puede ser importante para el desarrollo de cáncer^{123,124}. Esto es debido a que CTCF y BORIS desempeñan un papel diferente en el establecimiento de la metilación. CTCF se une al ICR no metilado del alelo derivado de la madre en el gen improntado *Igf2/H19*¹¹⁴ e impide su metilación¹³³⁻¹³⁵. BORIS se une al ICR metilado del alelo derivado del padre^{118,123} a través del dominio de dedos de zinc que también presenta CTCF. De esta manera, CTCF evita que se establezcan las marcas de metilación diferenciadas mientras que BORIS establece dichas marcas en el ICR durante la gametogénesis¹¹⁴. De manera interesante, se ha observado que el ICR del alelo paterno es metilado por las metiltransferasas *de novo* DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L^{114,165-167}.

Aún no se sabe si CTCF y BORIS podrían estar compitiendo por los mismos sitios de unión al DNA^{115,119,168} y modificar la expresión de sus blancos génicos debido a que presentan el mismo dominio de dedos de zinc. BORIS participa en el establecimiento de patrones de metilación^{115,118,119} y si actúa junto con las metiltransferasas *de novo*, su unión a regiones promotoras favorecería el silenciamiento génico. Esta hipótesis se formuló a partir de estudios que demostraron la presencia de BORIS en diferentes tipos de tumores y líneas celulares cancerosas^{115,118,125,126}.

Los resultados referentes a la pérdida de expresión del *miR-125b1* en las líneas neoplásicas son congruentes con los reportados por Soto-Reyes y colaboradores, quienes observaron que la disminución de la expresión de este miRNA puede ser resultado de la metilación de su región promotora⁹⁰. CTCF impide la metilación de dicha región, situación que podría explicar la pérdida de expresión de este miRNA en líneas celulares de cáncer de mama⁹⁰.

La expresión de los genes *CTCF* y *CTCF-L* aumentó en las líneas celulares neoplásicas en comparación con la línea celular no neoplásica. El aumento de expresión de *CTCF* se observó de manera particular en la línea celular MDA-MB-231. Estos resultados son congruentes con los reportados por Docquier y colaboradores, quienes observaron que *CTCF* tiene mayor expresión en la línea celular MCF7 en comparación con MDA-MB-231¹⁶⁹. Hay datos importantes en la literatura que han demostrado que CTCF presenta modificaciones post-traduccionales importantes para que pueda llevar a cabo su función celular normal, entre las cuales destaca la poli-ADP-ribosilación. CTCF se presenta en dos

formas, una de 180-kiloDaltones (kDa) (CTCF-180) y otra de 130-kDa (CTCF-130)¹⁷⁰. La poli-ADP-ribosilación de CTCF-130 da origen a CTCF-180, la cual le confiere la función tipo *insulator* que protege regiones en contra del silenciamiento mediado por componentes represores epigenéticos^{169,171}. Se ha demostrado que múltiples neoplasias y líneas celulares, como MCF 7, carecen de la forma de CTCF-180 debido a que la actividad de la poli-ADP-ribosilación disminuye. De esta manera, se propone que la forma CTCF-130 se acumula paulatinamente dentro de la célula sin poder ejercer su papel de insulator y contribuyendo a la desregulación génica¹⁷⁰.

Respecto a *CTCF-L* existe discrepancia acerca de su expresión en neoplasias. El grupo de Hines reportó que *CTCF-L* no se expresa en líneas celulares y tumores de mama mientras que el grupo de D'Arcy^{140,143} reportó que este gen aumenta su expresión en este tipo de cáncer, resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo.

La expresión de los genes *DNMT3A* y *DNMT3B* aumentó en las líneas celulares neoplásicas en comparación con la línea celular no neoplásica. Aún cuando se comprobó que las dos proteínas muestran una distribución dispersa a través del núcleo, se ha sugerido que su localización no está asociada con los sitios de replicación, incluso durante la fase de síntesis¹⁷². Por otra parte, el aumento en la expresión de las DNMTs se ha reportado en diferentes tipos de cáncer como: colon¹⁷³, hígado¹⁷⁴, leucemia¹⁷⁵, mama^{176,177} y próstata¹⁷⁸. Asimismo, el gen *DNMT1* también aumentó su expresión en las líneas celulares neoplásicas, resultado que concuerda con los reportes que establecen que *DNMT1* aumenta su expresión en cáncer^{179,180}.

En estudios con fibroblastos humanos se observó el aumento en la expresión de *DNMT1* derivó en la hipermetilación de islas CpG¹⁸¹, situación que podría resultar en la metilación de promotores génicos. Cabe mencionar que la reducción de su expresión impedía el desarrollo de tumores¹⁸²⁻¹⁸⁵. Por lo tanto, los efectos coordinados y acumulativos de las tres metiltransferasas deben ser estudiados por su implicación en el desarrollo del cáncer.

Debido a que BORIS se asocia con el establecimiento de patrones de metilación¹¹⁴, su unión a regiones promotoras podría favorecer el silenciamiento génico. Parecer ser que BORIS está ocupando un sitio propio de CTCF en la región promotora del *miR125-b1* en una línea celular neoplásica. Una explicación para este fenómeno sería la pérdida de CTCF en la región promotora del miRNA⁹⁰ a la cual BORIS podría unirse. La metilación de estas regiones también desencadenaría la unión de proteínas específicas de DNA metilado a las islas CpG, al atraer enzimas modificadoras de histonas asociadas con el silenciamiento de la cromatina⁴⁹. Se ha sugerido que las DNMTs *de novo* pueden interactuar con factores tales como complejos remodeladores de la cromatina para acceder a la cromatina e interactuar con sus sitios blanco¹⁸⁶. Cabe recordar que el ICR del alelo paterno en el gen improntado *Igf2/H19* es metilado por las metiltransferasas *de novo* DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L^{114,165-167} y es la región en la cual BORIS también se encuentra presente¹¹⁴. Por lo tanto, se puede sugerir que BORIS puede interactuar con las DNMTs aunque aún no se puede establecer un modelo claro referente a si BORIS es quien recluta a las DNMTs o viceversa.

Se ha sugerido que BORIS debe presentarse en niveles comparables con CTCF para ser capaz de competir por los mismos sitios de unión¹⁴⁰. Sin embargo, también existe la posibilidad de que BORIS sólo tiene que ocupar unos cuantos sitios de CTCF para provocar

una desregulación génica. Incluso podría haber una posibilidad de que BORIS pudiera modificar la estructura de la cromatina como lo hace CTCF cuando establece dominios cromatínicos. Esto es importante pues el 12% de las asas de cromatina mediadas por CTCF contienen genes transcripcionalmente activos y marcas activadoras en la parte interna del asa y marcas represivas en la parte externa. El 11% de las asas contienen genes transcripcionalmente inactivos y marcas represivas en la parte interna del asa y genes activos en la parte externa. El 19% de las asas contienen marcas relacionadas con a elongación de la cadena del DNA en un extremo externo del asa. El 31% de las asas contienen genes transcripcionalmente activos y marcas activadoras en un extremo externo del asa y marcas represivas en el otro. Finalmente, el 27% de las asas no poseen expresión génica o modificaciones de histonas particulares¹⁸⁷.

Respecto a la marca de silenciamiento H3K9me3, se ha demostrado que la proteína UHRF1 reconoce a H3K9 y permite el mantenimiento de la metilación del DNA. Se ha propuesto un mecanismo donde UHRF1 facilita el mantenimiento de la metilación mediada por DNMT1 al unirse al DNA hemimetilado durante la replicación semi-conservativa¹⁸⁸. DNMT3A y DNMT3B son inestables cuando no están interactuando físicamente con la cromatina^{34,50}. Por lo tanto, se ha sugerido que su estabilidad y su actividad en el establecimiento de la metilación pueden asegurarse si son capaces de interactuar con otras proteínas¹⁸⁸. Por lo tanto, estas proteínas podrían mantener su estabilidad interactuando con BORIS y participar en el establecimiento de la metilación en los sitios de unión de dicha proteína.

CONCLUSIONES

En este trabajo, se observó que el *miR-125b1* disminuyó su expresión en las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa en comparación con la línea celular no neoplásica MCF 10A. Este fenómeno se atribuye a que la región promotora de este miRNA se encuentra metilada en las tres líneas celulares neoplásicas. Las proteínas CTCF, DNMT1, DNMT3A y DNMT3B tienen localización nuclear mientras que BORIS tiene localización nuclear y nucleolar en las tres líneas celulares neoplásicas. No obstante, la expresión de los genes que codifican a estas proteínas aumentó en las tres líneas celulares neoplásicas. Por otra parte, CTCF está ausente mientras que BORIS, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 y H3K9me3 están presentes en la región promotora del *miR-125b1* de MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. En contraste, CTCF está presente en la región promotora del *miR-125b1* en MCF 10A. Por lo tanto, se propone que un mecanismo epigenético es el responsable del silenciamiento del *miR-125b1*.

ANEXO 1

METODOLOGÍA EN EXTENSO

Aislamiento de ácidos nucleicos

Aislamiento de DNA en líneas celulares que crecen en monocapa

1. Añadir 2 mL del Mix I (Tris 200mM pH 8.5 + NaCl 400mM) en la caja de cultivo.
2. Recuperar las células con un gendarme y transferirlas a un tubo Falcon de 15 mL.
3. Agregar el doble del volumen agregado inicialmente de Mix II (EDTA 10mM + SDS 0.4%).
4. Adicionar 50 µg de proteinasa K. Incubar a 37° C durante 30 minutos.
5. Agregar 2 volúmenes de isopropanol al 100% y mezclar por inversión para que el DNA se precipite.

Nota: Si la hebra de DNA no se forma adecuadamente, mezclar con ayuda de un rotor a velocidad media durante 10 minutos.

6. Recuperar la hebra de DNA con una pipeta (con cuidado para no romperla). Transferirla a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
7. Añadir 1 mL de etanol al 70%.
8. Centrifugar a 19,000 x g durante 1 minuto.
9. Retirar el sobrenadante. Dejar secar el pellet.
10. Resuspender en agua bidestilada estéril (aproximadamente 50 µl dependiendo del tamaño del pellet).
11. Cuantificar y ajustar la concentración a 1 µg/µl.

Nota: Si la muestra está viscosa (debido a una alta concentración de DNA), incubar a 37° C durante toda la noche.

12. Almacenar a -20° C.

Aislamiento de RNA en líneas celulares que crecen en monocapa

- 1.** Retirar el medio de cultivo y lisar las células directamente en la caja de cultivo mediante la agregación de TRIzol (Ambion®, número de catálogo 15596018).
Nota: La cantidad de TRIzol utilizado está basada en el área del plato de cultivo (1 mL por 10 cm²) y no por el número de células presentes. El uso de una cantidad menor de TRIzol podría provocar la contaminación del RNA con DNA.
- 2.** Mezclar el TRIzol varias veces con ayuda de una pipeta para despegar las células por completo.
- 3.** Transferir la mezcla de TRIzol con las células a un tubo Falcon de polipropileno de 15 mL.
- 4.** Incubar durante cinco minutos a temperatura ambiente.
- 5.** Agregar 200 µl de cloroformo por cada mL de TRIzol utilizado.
- 6.** Agitar el tubo vigorosamente durante 15 segundos.
- 7.** Incubar durante cinco minutos a temperatura ambiente.
- 8.** Centrifugar a no más de 14,000 x g a una temperatura de 4°C durante 15 minutos.
Después de la centrifugación se obtienen tres fases: la fase superior es la fase acuosa, la media es la fase de fenol-cloroformo y la inferior es la fase roja. El RNA se encuentra exclusivamente en la fase acuosa.
- 9.** Transferir la fase acuosa a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

10. Añadir 500 μ l de alcohol isopropílico por cada mL utilizado de TRIzol para favorecer la precipitación del RNA.
11. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a no más de 14,000 x g a 4°C durante 10 minutos.
Nota: En ocasiones se puede observar el pellet con el RNA, si no es así entonces se deja un remanente pequeño en la parte inferior del tubo.
13. Remover el sobrenadante.
14. Lavar el pellet con 1 mL de etanol al 80% con agua libre de RNAsas.
15. Mezclar brevemente con ayuda de un vórtex.
16. Centrifugar a 5,500 x g a 4°C durante cinco minutos.
17. Retirar el sobrenadante.
18. Dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
19. Resuspender la muestra en 20 μ l de agua DEPC.
20. Incubar a 60°C en un baño maría durante 10 minutos.
21. Cuantificar la concentración de RNA en el NanoDrop (NanoDrop Technologies®, modelo ND-1000) y ajustar a 1 μ g/ μ l.
22. Determinar la integridad del RNA mediante un gel de formaldehído (FA) al 1.2%.
23. Almacenar a -20°C.

Determinación de la integridad de RNA mediante un gel de formaldehído (FA) al 1.2%

1. Mezclar 1.2 g de agarosa en 10 mL de buffer 10X para el gel FA en un matraz.
2. Aforar a 100 mL con agua libre de RNAsas.
3. Calentar el matraz en el horno de microondas para fundir la agarosa.

4. Dejar enfriar para poder adicionar 1.8 mL de formaldehído al 37%.
5. Equilibrar en buffer 1X para el gel FA durante toda la noche o, por lo menos, durante 30 minutos antes de correr el gel.

| Buffer 10X para el gel FA (pH 7) | |
|---|----------------------|
| Componente | Concentración |
| MOPS (libre de ácidos) | 200 mM |
| Acetato de sodio | 50 mM |
| EDTA | 10 mM |

| Buffer de corrida | |
|----------------------------------|----------------|
| Componente | Volumen |
| Buffer 10X para el gel FA | 100 mL |
| Formaldehído al 37% | 20 mL |
| Agua libre de RNAsas | 880 mL |

| Buffer de carga 5X | |
|--|----------------|
| Componente | Volumen |
| Azul de bromofenol acuoso | 16 μ l |
| EDTA 500 mM (pH 8) | 80 μ l |
| Formaldehído al 37% | 720 μ l |
| Glicerol al 100% | 2 mL |
| Formamida | 3.084 mL |
| Buffer 10X para el gel FA | 4 mL |
| Agua libre de RNAsas | 10 mL |
| Estabilidad aproximada de 3 meses a 4°C | |

6. Cargar aproximadamente 200 ng de RNA por pozo.
7. Adicionar 2 μ l de buffer de carga.
8. Llevar todas las muestras al mismo volumen con agua libre de RNAsas.
9. Incubar a 65°C durante cinco minutos.
10. Correr el gel FA a 95 volts durante 45 minutos.

Nota 1: Si la muestra presenta contaminación con DNA entonces tratar con DNAsa. Este tratamiento consiste en agregar 1 unidad de la enzima por cada μ g de RNA, incubar a 37°C durante una hora, agregar 2 μ l de EDTA 50 mM e incubar durante 20 minutos a 65°C.

Nota 2: En el gel desnaturalizante de FA deben identificarse las subunidades 18S y 28S para comprobar la integridad de la muestra de RNA extraído.

Inmunodetección de proteínas por microscopía fluorescente

Inmunofluorescencias en células que crecen en monocapa

1. Sembrar 100,000 células sobre cubreobjetos dispuestos en el fondo de cajas con pozos. Dejar proliferar en la incubadora durante 24 horas.
Nota: Los cubreobjetos deberán ser radiados con luz ultravioleta para esterilizarlos y evitar contaminación.
2. Al día siguiente, enjuagar cuidadosamente con PBS 1X.
3. Retirar el PBS 1X. Añadir 1 mL de formaldehído al 4% para fijar las células.
4. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Hacer tres lavados con PBS 1X de cinco minutos cada uno.
6. Permeabilizar con 1 mL de Tritón X-100 al 2%.
7. Hacer tres lavados con PBS 1X de cinco minutos cada uno.
8. Bloquear con 1 mL de suero bovino fetal al 1%.
9. Incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente.
10. Diluir el anticuerpo primario en suero bovino fetal, añadir 20 μ l de la dilución y homogeneizar con un pedazo de parafilm cortado del tamaño del cubreobjetos.
11. Incubar durante 40 minutos a 37°C.
12. Hacer un lavado con PBS 1X, uno con Tritón X-100 al 2% y dos lavados con PBS 1X de cinco minutos cada uno.
13. Diluir el anticuerpo secundario en suero bovino fetal, añadir 20 μ l de la dilución y homogeneizar con un pedazo de parafilm cortado del tamaño del cubreobjetos.
14. Incubar durante 40 minutos a 37°C.
15. Hacer tres lavados con PBS 1X de cinco minutos cada uno.

16. Para montar los cubreobjetos sobre las laminillas y teñir el DNA, agregar una gota de medio de montaje (VECTASHIELD® con DAPI, Vector Laboratories®, número de catálogo H-1200), colocar un cubreobjetos sobre la gota y dejarlo caer con cuidado para no formar burbujas. Apretar levemente con un papel para quitar el exceso de medio de montaje y sellar las orillas del cubreobjetos con barniz de uñas transparente. Dejar secar para poder observar en el microscopio de fluorescencia.

| Anticuerpo | Dilución utilizada | Origen | Marca | Número de catálogo | Tipo |
|-------------------------|---------------------------|-------------------|--------------|---------------------------|-------------|
| Anti-BORIS | 1:50 | Rata | Abcam | ab111255 | Monoclonal |
| Anti-CTCF | 1:100 | Ratón | Santa Cruz | sc-271514 | Monoclonal |
| Anti-DNMT3A | 1:100 | Conejo | Santa Cruz | sc-20703 | Policlonal |
| Anti-DNMT3B | 1:100 | Conejo | Santa Cruz | sc-20704 | Policlonal |
| Anti-DNMT1 | 1:100 | Cabra | Santa Cruz | sc-10222 | Policlonal |
| Alexa Fluor® 488 | 1:200 | Cabra anti-Ratón | Invitrogen | A-11001 | Policlonal |
| Alexa Fluor® 488 | 1:200 | Cabra anti-Conejo | Invitrogen | A-11008 | Policlonal |
| Alexa Fluor® 488 | 1:200 | Conejo anti-Cabra | Invitrogen | A-11078 | Policlonal |
| Alexa Fluor® 568 | 1:200 | Cabra anti-Ratón | Invitrogen | A-11004 | Policlonal |

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

- 1. Células.** Cultivar las células en tres cajas de Petri (125 mm x 25 mm) hasta tener una confluencia aproximada al 80%. Revisar que el volumen del medio de cultivo en cada caja sea de 18 mL.
- 2. Reacción de entrecruzamiento.** Adicionar 2 mL de buffer de entrecruzamiento directamente al medio de cultivo. El volumen total de cada caja deber ser de 20 mL para que las células permanezcan en formaldehído al 1%. Agitar moderadamente durante 10 minutos.

| Buffer de entrecruzamiento | |
|----------------------------|---------------|
| Componente | Concentración |
| Formaldehído | 11% |
| NaCl | 100 mM |
| EGTA | 0.5 mM |
| HEPES (pH 8) | 50 mM |

- 3. Detener la reacción de entrecruzamiento.** Adicionar 1 mL de glicina (2.5 M). Agitar moderadamente durante cinco minutos.

| Glicina 2.5 M | |
|-------------------------------------|---------|
| Componente | Volumen |
| Glicina | 9.38 g |
| Aforar a 50 mL con agua bidestilada | |

- 4. Lavado.** Retirar el medio de cultivo y hacer tres lavados con PBS 1X frío de cinco minutos cada uno.

| PBS 1X (1 litro a pH 7.4) | |
|--------------------------------------|----------------|
| Componente | Volumen |
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0.2 g |
| Na₂HPO₄ | 1.44 |
| KH₂PO₄ | 0.24 g |

5. **Lisis.** Remover el PBS, adicionar 1 mL de buffer de lisis con inhibidores de proteasas (Cell Signaling, número de catálogo 5871) a cada una de las cajas e incubar a 4°C durante cinco minutos. Recuperar las células con un gendarme y pasarlas a un tubo Falcon de 50 mL. Posteriormente, el tubo puede almacenarse a 4°C.

| Buffer de lisis | |
|---|----------------------|
| Componente | Concentración |
| SDS | 1% |
| EDTA (pH 8) | 10 mM |
| Tris-HCl (pH 8) | 50 mM |
| Agregar inhibidores de proteasas | |

6. **Sonicación.** Colocar el tubo en un recipiente con hielo para mantenerlo frío y evitar que genere espuma. El programa de sonicación es de 30 segundos, pulso 5.0 – 3.0, amplitud 37% utilizándose el Ultrasonic Processor (GENEQ®, modelo GEX5000, número de catálogo SOVC505-00). La cromatina sonicada puede almacenarse a 4°C durante un periodo máximo de tres meses.
7. **Evaluación de la cromatina.** Es necesario determinar el grado de fragmentación de la cromatina para que la inmunoprecipitación pueda realizarse de manera eficiente. El tamaño adecuado de los fragmentos de cromatina debe oscilar entre los 500 y 300 pares de bases (pb). Después de realizar la sonicación, tomar 100 µ l de muestra y colocarla en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Añadir 0.5 µ l de RNAsa A (5 mg/mL) e

incubar a 37°C durante una hora. Posteriormente, agregar de 2 a 3 μ l de proteinasa K (20 mg) e incubar a 65°C durante toda la noche.

- 8. Estandarización de la cromatina.** Llevar las muestras a 300 μ l con agua destilada. Agregar 300 μ l de fenol-cloroformo y mezclar cada una de las muestras con ayuda de un vórtex durante cinco minutos (o hasta no observar una bicapa y adquirir una mezcla de color blanco). Centrifugar a 17,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Recuperar el sobrenadante con una pipeta y colocar en un tubo nuevo teniendo cuidado de recuperar solamente la primera fase (fase acuosa). Repetir el procedimiento dos veces más. Posteriormente, agregar un volumen de etanol frío al 100%, 0.66 volúmenes de acetato de amonio (5M) y 1 μ l de glucógeno (20 mg). Guardar la muestra a -20°C durante toda la noche o a -80°C durante dos horas. Cargar la muestra en un gel de agarosa al 1% para evaluar que el tamaño de la cromatina se encuentre entre los 500 y 300 pares de bases (pb).
- 9. Número de células por inmunoprecipitación.** La inmunoprecipitación de la cromatina se realizó con el OneDay ChIP Kit (Diagenode®, número de catálogo C01010081). Se necesita usar el mismo número de células en cada inmunoprecipitación. Se necesita un millón y medio de células como mínimo y dos millones como máximo en 60 μ l por cada inmunoprecipitación.
- 10. Inmunoselección.** Este paso consiste en la adición del anticuerpo a la cromatina sonicada.
 - a. Preparar el ChIP buffer 1X y almacenar a 4°C.
 - b. Colocar en hielo la cromatina sonicada, el inhibidor de proteasas y los anticuerpos que van a ser usados en el ChIP.

- c. Añadir 12 mL de CHIP buffer 1X en un tubo Falcon de 15 mL (uno por cada inmunoprecipitación). Mantener los tubos en hielo.
- d. Agregar 25 μ l de inhibidores de proteasas a 5 mL de CHIP buffer 1X (volumen necesario para realizar 20 inmunoprecipitaciones).
- e. Repartir la cromatina en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Añadir 280 μ l de la solución del paso anterior a cada tubo. Mezclar con ayuda de un vórtex durante cinco segundos a potencia media.
- f. Mantener en hielo el resto de la cromatina pues corresponderá a la muestra del Input.
- g. Añadir 4 μ g de anticuerpo a cada inmunoprecipitación. Mezclar con ayuda de un vórtex durante cinco segundos a potencia media.

Nota: La cantidad de anticuerpo a utilizar dependerá de la calidad del mismo.

| Anticuerpo | Origen | Marca | Número de catálogo | Tipo |
|-------------|--------|-----------|--------------------|------------|
| Anti-BORIS | Rata | Abcam | ab111255 | Monoclonal |
| Anti-CTCF | Conejo | Millipore | 07-729 | Policlonal |
| Anti-DNMT3A | Ratón | Abcam | ab13888 | Monoclonal |
| Anti-DNMT3B | Ratón | Abcam | ab13604 | Monoclonal |
| Anti-DNMT1 | Conejo | Diagenode | CS-077-100 | Policlonal |

- h. Incubar durante 16 horas (toda la noche) durante a 4°C en un rotor girando a velocidad media.

Nota: El tiempo de incubación dependerá de la calidad del anticuerpo.

- i. Durante la inmunoselección se realizará el lavado de las perlas. Tomar 840 μ l de perlas (volumen necesario para realizar 20 inmunoprecipitaciones) y transferirlos a un tubo Falcon de 15 mL. Agregar 10.5 mL de CHIP buffer 1X

e invertir el tubo dos veces. Centrifugar a 500 x g durante tres minutos a 4°C.

Remover el sobrenadante sin perturbar el pellet. Realizar un lavado más.

- j. Tomar 500 μ l de perlas lavadas y repartirlos en tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- k. Centrifugar a 500 x g durante dos minutos a 4°C. Revisar que todos los tubos tengan la misma cantidad de perlas. Quitar el sobrenadante sin perturbar el pellet de perlas y mantener los tubos en hielo. Las perlas están listas para realizar la inmunoprecipitación de la cromatina.
- l. Después de la incubación para la inmunoselección, centrifugar los tubos que contienen los complejos anticuerpo-cromatina a 14,000 x g durante 10 minutos a 4°C.

11. Inmunoprecipitación. Este paso consiste en la adición del complejo anticuerpo-cromatina y su inmunoprecipitación con ayuda de las perlas.

- a. Transferir 250 μ l del sobrenadante del paso anterior al tubo que contiene las perlas sin perturbar el pellet ya que contiene los agregados inespecíficos.
- b. Incubar durante una hora a 4°C en un rotor girando a velocidad media.
- c. Durante la inmunoprecipitación se realizará la precipitación del Input. Tomar 6 μ l de input y añadir 30 μ l de etanol al 100%. Incubar en hielo durante 10 minutos. Centrifugar a 10,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Remover el sobrenadante sin perturbar el pellet. Agregar 50 μ l de etanol al 75% al pellet. Centrifugar a 10,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Remover el sobrenadante sin perturbar el pellet. Dejar secar el pellet dejando abierta la tapa del tubo.

Nota: 6 μ l de cromatina sonicada corresponden al 10% de la cantidad utilizada por cada inmunoprecipitación.

- d. Después de la incubación para la inmunoprecipitación, añadir 1 mL de ChIP buffer 1X a los tubos que contienen los complejos anticuerpo-cromatina-perlas. Invertir los tubos dos veces.
- e. Centrifugar durante dos minutos a 500 x g a 4°C.
- f. Remover el sobrenadante sin perturbar el pellet.
- g. Añadir 1 mL de ChIP buffer 1X a los tubos que contienen los complejos.
- h. Resuspender la muestra y transferirla a los tubos Falcon de 15 mL con 12 mL de ChIP buffer 1X (paso 10c).
- i. Incubar en hielo durante cinco minutos.
- j. Centrifugar durante tres minutos a 500 x g a 4°C. Al finalizar, revisar que el pellet de perlas esté presente en el fondo de cada tubo.
- k. Remover 12 mL de buffer, de esta manera, aproximadamente 1 mL de buffer quedará en el tubo.
- l. Resuspender la muestra y transferirla a tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- m. Centrifugar durante dos minutos a 500 x g a 4°C. Al finalizar, revisar que el pellet de perlas esté presente en el fondo del tubo.
- n. Remover el sobrenadante sin perturbar el pellet.

Nota: A partir de este punto se trabajará a temperatura ambiente y con puntas con filtro.

12. Purificación del DNA. Este paso consiste en purificar el DNA recuperado a partir de la cromatina inmunoprecipitada.

- a. Poner agua a hervir.
- b. Resuspender el pellet del input (paso 11c) en 100 µl de agua.

- c. Añadir 100 μ l de DNA purifying slurry a las perlas y al Input. Invertir los tubos dos veces.

Nota: Mezclar el DNA purifying slurry de manera constante mientras se añade a las muestras.

- d. Incubar las muestras en agua hirviendo durante 10 minutos.
- e. Durante la incubación de las muestras, programar un baño en seco a 37°C. Colocar la RNAsa A y la proteinasa K en hielo.
- f. Después de la incubación, esperar que las muestras se enfríen.
- g. Añadir 1 μ l de RNAsa A. Mezclar durante dos segundos con ayuda de un vórtex a potencia media.
- h. Incubar las muestras en un baño en seco durante una hora a 37°C en agitación.
- i. Una vez transcurrido el tiempo, añadir 1 μ l de proteinasa K. Mezclar durante dos segundos con ayuda de un vórtex a potencia media.
- j. Incubar las muestras en un baño en seco durante una hora a 55°C en agitación.

Nota: La incubación con proteinasa K puede dejarse toda la noche.

- k. Una vez transcurrido el tiempo, incubar las muestras en agua hirviendo durante 10 minutos.
- l. Centrifugar durante un minuto a 14,000 x g a 4°C.
- m. Transferir 70 μ l del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
- n. Añadir 130 μ l de agua al pellet.
- o. Mezclar durante 10 segundos con ayuda de un vórtex a potencia media.
- p. Centrifugar durante un minuto a 14,000 x g a 4°C.
- q. Recuperar 130 μ l del sobrenadante y mezclarlo con el sobrenadante anterior (paso 12m).

Nota: El volumen total de la muestra es de 200 μ l.

r. Almacenar a -20°C.

13. Análisis de las muestras por PCR punto final.

a. Agregar por cada reacción de PCR:

| Componente | Volumen |
|----------------------|-----------------------------|
| 10X Buffer | 2 μ l |
| Magnesio (2.5 mM) | 1 μ l |
| dNTPs | 0.2 μ l |
| Oligonucleótido FWD | 1 μ l |
| Oligonucleótido RVS | 1 μ l |
| Taq Polimerasa | 0.1 μ l |
| H ₂ O | 9.7 μ l |
| DNA | 5 μ l |
| Volumen final | 20 μl |

| Oligonucleótidos | Región | Dilución | Secuencia en DNA (5' – 3') | T _m (°C) | Ciclos | Tamaño esperado en DNA (pb) |
|----------------------|----------|----------|----------------------------|---------------------|--------|-----------------------------|
| <i>miR-125b1</i> FWD | Promotor | 1:10 | GGGATCAGGTGACCAGAGA | 58 | 38 | 161 |
| <i>miR-125b1</i> RVS | Promotor | 1:10 | GCGTGTTGCTCTCAAGGAAT | 58 | 38 | 161 |

Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de mama y una línea no transformada: MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10A, respectivamente. Las primeras dos líneas fueron cultivadas con medio RPMI 1640 (GIBCO®, número de catálogo 11875-119) adicionado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO®, número de catálogo 10270-106) y 1% de antibiótico/antimicótico (GIBCO®, número de catálogo 15240-062). La línea celular MCF 10A fue cultivada con medio DMEM/F12 en dilución 3:1 (GIBCO®, número de catálogo 11320-082) adicionado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO®, número de catálogo 10270-106), 2 mM de L-glutamina (GIBCO®, número de catálogo 25030-032), 1% de antibiótico/antimicótico (GIBCO®, número de catálogo 15240-062), 10 ng/mL de EGF (factor de crecimiento epidermal) (Invitrogen®, número de catálogo PHG0311L), 120 mu/mL de insulina recombinante humana (Sigma Aldrich®, número de catálogo I3536-100MG) y 1 μ g/mL de hidrocortisona (Sigma Aldrich®, número de catálogo H4001-25G). Por otra parte, también se utilizó la línea celular HeLa correspondiente a cáncer de cérvix. Esta línea fue cultivada con medio DMEM (GIBCO®, número de catálogo 11995-073) adicionado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO®, número de catálogo 10270-106) y 1% de antibiótico/antimicótico (GIBCO®, número de catálogo 15240-062). Todas las líneas se mantuvieron a 37°C con 5% de CO².

Los cánceres de mama pueden clasificarse en subtipos moleculares en función de sus perfiles de expresión génica. Hasta ahora se han propuesto cinco subtipos: luminal A, luminal B, HER2, basal y sin clasificar (Tabla 1). Las líneas celulares MCF 10A y MDA-MB-231 se

han clasificado como subtipo basal mientras MCF7 se considera como un subtipo luminal A (Tabla 2).

El subtipo luminal A se caracteriza por presentar tumores diferenciados que se detectan frecuentemente en pacientes mayores y tiene el mejor pronóstico comparado con otros subtipos. El subtipo luminal B tienen una mayor expresión de genes asociados con proliferación y tiene un peor pronóstico que el luminal A. El subtipo HER2 generalmente se asocia con metástasis nodal. El subtipo basal se presenta en pacientes jóvenes, se asocia con metástasis en órganos viscerales y tiene un pronóstico pobre¹⁸⁹. Se considera que un tumor no se puede clasificar cuando tiene una correlación baja con los subtipos anteriores y la definición de genes no es uniforme¹⁸⁹.

| Subtipo | ER y/o PR | Sobre-expresión de HER2 | EGFR y/o CK5/6 |
|-----------------------|-----------|-------------------------|----------------|
| Luminal A | + | - | + ó - |
| Luminal B | + | + | + ó - |
| HER2 | - | + | + ó - |
| Basal | - | - | + |
| Sin clasificar | - | - | - |

Tabla 1. Definición de cada subtipo basado en la expresión molecular del receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR) y CK5/6. (Modificado de Subik, *et al.*, 2010).

| Línea celular | ER | PR | HER2 | CK5/6 | EGFR | Ki-67 | AR | Subtipo |
|-------------------|----|----|------|-------|------|-------|----|-----------|
| MCF 10A | 0 | 0 | 0-1+ | + | 2+ | 30% | 0 | Basal |
| MCF7 | 6 | 6 | 0-1+ | - | 1+ | 90% | 7 | Luminal A |
| MDA-MB-231 | 0 | 0 | 0-1+ | - | 1+ | 100% | 8 | Basal |

Tabla 2. Definición del subtipo molecular en base a los patrones de expresión de ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 y el receptor de andrógenos (AR) por análisis inmunohistoquímico en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF7 y MCF 10A. Para ER, PR y AR se utilizó la puntuación Allred; para HER 2 y EGFR se usó la puntuación para HER2; para CK5/6 toda tinción citoplásmica se consideró como positiva; para Ki-67 se manejó el porcentaje de tinción nuclear de cualquier intensidad (modificado de Subik, *et al.*, 2010).

Análisis de metilación del DNA

Modificación de DNA con bisulfito de sodio para análisis de metilación

- 1 La modificación de DNA con bisulfito de sodio para el análisis de metilación se realizó con el EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research®, número de catálogo D5002). Añadir 5 μ l de M-Dilution Buffer a la muestra de DNA y ajustar con agua el volumen total a 50 μ l. Mezclar la muestra pipeteando arriba y abajo.
- 2 Incubar la muestra a 37°C durante 15 minutos.
- 3 Añadir 100 μ l de CT Conversion Reagent a cada muestra y mezclar.
- 4 Incubar la muestra en oscuridad a 50°C de 12 a 16 horas.
- 5 Incubar la muestra en hielo durante 10 minutos.
- 6 Añadir 400 μ l de M-Binding Buffer a una columna Zymo-Spin® IC. Colocar la columna en un tubo de recuperación.
- 7 Cargar la muestra (obtenida en el paso 5) en la columna Zymo-Spin® IC con M-Binding Buffer. Invertir el tubo para mezclar.
- 8 Centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante.
- 9 Añadir 100 μ l de M-Wash Buffer a la columna. Centrifugar a 14,000 x g durante 30 segundos.
- 10 Agregar 200 μ l de M-Desulphonation Buffer a la columna e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, centrifugar a 14,000 x g durante 30 segundos.
- 11 Añadir 200 μ l de M-Wash Buffer a la columna. Centrifugar a 14,000 x g durante 30 segundos. Agregar otros 200 μ l de M-Wash Buffer y centrifugar durante 30 segundos.

- 12 Colocar la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Añadir 10 μ l de M-Elution Buffer directamente al filtro de la columna. Centrifugar durante 30 segundos a velocidad máxima para eluir el DNA.
- 13 Almacenar a -20°C.

Metilación *in vitro* de DNA

1. Para la metilación *in vitro* de DNA se utilizó CpG Methylase (M. SssI) (Zymo Research, número de catálogo E2010). Agregar por cada reacción de metilación *in vitro* de DNA:

| Componente | Volumen |
|---|------------|
| 10X CpG Reaction Buffer | 2 μ l |
| 20X SAM (S-adenosylmethionine) (12 mM) | 1 μ l |
| CpG Methylase (4 unidades/ μ l) | 1 μ l |
| DNA a 100-250 ng/ μ l | 4 μ l |
| H ₂ O | 12 μ l |

2. Incubar a 30°C durante dos horas.
3. Incubar a 65°C durante 20 minutos para inactivar la enzima.

PCR sensible a metilación (MS-PCR)

1. Agregar por cada reacción de MS-PCR:

| Componente | Volumen |
|-------------------|-------------|
| 10X Buffer | 2.5 μ l |
| Magnesio (2.5 mM) | 1 μ l |
| dNTPs | 0.5 μ l |

| | |
|----------------------------|---------------|
| Oligonucleótido FWD | 0.5 μ l |
| Oligonucleótido RVS | 0.5 μ l |
| Taq Polimerasa | 0.15 μ l |
| H₂O | 18.85 μ l |
| DNA | 1 μ l |
| Volumen final | 25 μ l |

| Oligonucleótidos | Dilución | Secuencia en DNA (5' – 3') | Tm (°C) | Ciclos | Tamaño esperado en DNA (pb) |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|----------------|---------------|------------------------------------|
| <i>miR-125b1</i> MET FWD | 1:10 | TGGTGTATCGTTTTTTGTTTTTC | 62 | 45 | 270 |
| <i>miR-125b1</i> MET RVS | 1:10 | ACCCATTCGAAACGAAAC | 62 | 45 | 270 |
| <i>miR-125b1</i> UNMET FWD | 1:10 | ATTTGGTGTATTGTTTTTTGTTTTT | 62 | 45 | 270 |
| <i>miR-125b1</i> UNMET FWD | 1:10 | CTCACCCATTCAAAACAAAAC | 62 | 45 | 270 |

Reacción de retrotranscriptasa reversa para la obtención de cDNA

1. Para la obtención del cDNA se utilizó el GeneAmp RNA PCR Kit (Applied Biosystems®, número de catálogo N808-0017). Agregar por cada reacción de retrotranscripción:

| Componente | Volumen | Concentración final |
|--------------------------|--------------|---------------------|
| MgCl ₂ | 4 µl | 5 mM |
| 10X Buffer II para PCR | 2 µl | 1X |
| dATP | 2 µl | 1 mM |
| dCTP | 2 µl | 1 mM |
| dGTP | 2 µl | 1 mM |
| dTTP | 2 µl | 1 mM |
| Inhibidores de RNAsas | 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 |
| H ₂ O | 2 µl | |
| Volumen final | 20 µl | |

2. Programar el termociclador a 42°C durante 30 minutos (temperatura óptima para la enzima), 99°C durante 5 minutos (inactivación de la enzima) y 5°C durante 5 minutos.
3. Cuantificar el cDNA en el NanoDrop y diluirlo para que el cDNA de todas las muestras se encuentre a la misma concentración (20 ng/µl).
4. Almacenar a -20°C.

PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

1. Proteger el SYBR-Green (Fermentas®, número de catálogo K0222) de la reacción de la luz.
2. Agregar por cada reacción de PCR:

| Componente | Volumen |
|----------------------|-----------------------------|
| SYBR-Green | 10 μ l |
| Oligonucleótido FWD | 1 μ l |
| Oligonucleótido RVS | 1 μ l |
| cDNA | 5 μ l |
| H ₂ O | 3 μ l |
| Volumen final | 25 μl |

| Oligonucleótidos | Promotor | Dilución | Secuencia en DNA (5' – 3') | T _m (°C) | Ciclos | Tamaño esperado (pares de bases) |
|--------------------------|--------------|----------|----------------------------|---------------------|--------|----------------------------------|
| <i>CTCF</i> FWD | Exón 5 – 6 | 1:10 | GAGAAGCCATTCAAGTGTTCCAT | 62 | 45 | 85 pb en cDNA 399 pb en DNA |
| <i>CTCF</i> RVS | Exón 5 – 6 | 1:10 | CTCCAGTATGAGAGCCGAATGTGA | 62 | 45 | |
| <i>CTCF-L</i> FWD | Exón 5 – 6 | 1:10 | AAAACCTTCCGTACGGTCACTCT | 62 | 45 | 84 pb en cDNA 3,093 pb en DNA |
| <i>CTCF-L</i> RVS | Exón 5 – 6 | 1:10 | TGTTGCAGTCGTTACACTTGTAGG | 62 | 45 | |
| <i>DNMT3A</i> FWD | Exón 18 – 19 | 1:10 | CAATGACCTCTCCATCGTCAAC | 65 | 45 | 89 pb en cDNA 278 en DNA |
| <i>DNMT3A</i> RVS | Exón 18 – 19 | 1:10 | CATGCAGGAGGCGGTAGAA | 65 | 45 | |
| <i>DNMT3B</i> FWD | Exón 19 – 20 | 1:10 | CCATGAAGGTTGGCGACAA | 65 | 45 | 69 pb en cDNA 1,027 en DNA |

| | | | | | | |
|--------------------------|-----------------|------|---------------------------|----|----|--------------------------------------|
| <i>DNMT3B</i> RVS | Exón 19 – 20 | 1:10 | TGGCATCAATCATCACTGGATT | 65 | 45 | |
| <i>DNMT1</i> FWD | Exón 33 | 1:10 | CGGTTCTTCCTCCTGGAGAATGTCA | 63 | 45 | 101 pb en cDNA 101 en DNA |
| <i>DNMT1</i> RVS | Exón 33 | 1:10 | CACTGATAGCCCATGCGGACCA | 63 | 45 | |
| <i>GAPDH</i> FWD | Exón 5 | 1:50 | TGCACCACCAACTGCTTAGC | 62 | 45 | 95 pb en cDNA 95 epb en DNA |
| <i>GAPDH</i> RVS | Exón 5 | 1:50 | GGCATGGACTGTGGTCATGAG | 62 | 45 | |

Reacción de retrotranscriptasa reversa para la obtención de cDNA con sondas TaqMan

- 1 Usar de 1 a 10 ng de RNA total por cada 15 μ l de reacción.
- 2 Descongelar los oligonucleótidos y los componentes del kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®, número de catálogo 4366596) en hielo. Mezclar gentilmente con ayuda de un vórtex y bajar la muestra con una nanofuga.
- 3 Agregar por cada reacción de *Master Mix*:

| Componente | Volumen |
|---|----------------------------|
| 100 mM dNTPs (con dTTP) | 0.15 μ l |
| MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μ l) | 1 μ l |
| 10x Reverse Transcriptor Buffer | 1.50 μ l |
| RNAse Inhibitor (20 U/ μ l) | 0.19 μ l |
| Agua libre de nucleasas | 4.16 μ l |
| Volumen final | 7 μl |

- 4 Cada 15 μ l de reacción de retrotranscripción comprenderán de:
 - 7 μ l de *Master Mix*.
 - 3 μ l de oligonucleótidos.
 - 5 μ l de muestra de RNA.
- 5 Mezclar gentilmente con un vórtex y bajar la muestra con una nanofuga.
- 6 Incubar en hielo durante 5 minutos.
- 7 Establecer el programa siguiente en el termociclador:

| Paso | Tiempo | |
|------|-----------------------|----|
| | Temperatura (minutos) | |
| HOLD | 30 | 16 |
| HOLD | 30 | 42 |
| HOLD | 5 | 85 |
| HOLD | - - - | 4 |

PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) con sondas TaqMan

1. Proteger los componentes de la reacción de la luz.
2. Mezclar el TaqMan Universal PCR *Master Mix* (Applied Biosystems®, número de catálogo 4304437) muy suavemente con la punta de una pipeta y sin resuspender.
3. Por cada reacción de PCR agregar:

| Componente | Volumen |
|---|-----------------------------|
| TaqMan MicroRNA Assay (20X) | 1 μ l |
| Producto de la reacción de RT | 1.33 μ l |
| TaqMan 2X Universal PCR <i>Master Mix</i> | 10 μ l |
| Agua libre de nucleasas | 7.67 μ l |
| Volumen final | 20 μl |

4. Establecer el programa siguiente en el termociclador:

| Parámetro | Valor |
|-------------------------------------|---|
| Modo de corrida | 9600 emulation |
| Volumen de la muestra | 20 μ l |
| Parámetros del termociclador | Paso AmpliTaq Gold Enzyme Activation PCR HOLD: 40 ciclos Desnaturalización: 10 minutos a 95°C Anidado: 15 segundos a 95°C Extensión: 60 segundos a 60°C |
| Ajuste de autoincremento | Default (0) |
| Ajuste de rampa | Default (Estándar) |
| Datos | Default (60°C) |

BIBLIOGRAFÍA

1. Waddington, C. H. The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* **41**, 10–13 (2012).
2. Waddington, C. H. Towards a Theoretical Biology. *Nature* **218**, 525–527 (1968).
3. Dupont, C., Armant, D. R. & Brenner, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin. Reprod. Med.* **27**, 351–357 (2009).
4. Wu Ct, null & Morris, J. R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* **293**, 1103–1105 (2001).
5. Kaikkonen, M. U., Lam, M. T. Y. & Glass, C. K. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc. Res.* **90**, 430–440 (2011).
6. Li, X.-Q., Guo, Y.-Y. & De, W. DNA methylation and microRNAs in cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* **18**, 882–888 (2012).
7. You, J. S. & Jones, P. A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* **22**, 9–20 (2012).
8. Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 245–254 (2003).
9. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21 (2002).
10. Prokhortchouk, E. & Defossez, P.-A. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 2167–2173 (2008).
11. Liu, K., Wang, Y. F., Cantemir, C. & Muller, M. T. Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2709–2719 (2003).

12. Hermann, A., Gowher, H. & Jeltsch, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **61**, 2571–2587 (2004).
13. Heyn, H. & Esteller, M. An Adenine Code for DNA: A Second Life for N6-Methyladenine. *Cell* **161**, 710–713 (2015).
14. Fang, G. *et al.* Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic *Escherichia coli* using single-molecule real-time sequencing. *Nat. Biotechnol.* **30**, 1232–1239 (2012).
15. Greer, E. L. *et al.* DNA Methylation on N6-Adenine in *C. elegans*. *Cell* **161**, 868–878 (2015).
16. Fu, Y. *et al.* N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell* **161**, 879–892 (2015).
17. Zhang, G. *et al.* N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell* **161**, 893–906 (2015).
18. Chen, T. & Li, E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **301**, 179–201 (2006).
19. Robertson, K. D. *et al.* The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2291–2298 (1999).
20. Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H. U. & Bestor, T. H. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**, 865–873 (1992).
21. Qin, W. *et al.* DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination. *Cell Res.* (2015). doi:10.1038/cr.2015.72

22. Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P. & Jeltsch, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* **12**, 206–222 (2011).
23. Rountree, M. R., Bachman, K. E. & Baylin, S. B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* **25**, 269–277 (2000).
24. Ding, F. & Chaillet, J. R. In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14861–14866 (2002).
25. Chuang, L. S. *et al.* Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* **277**, 1996–2000 (1997).
26. Cardoso, M. C. & Leonhardt, H. DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. *J. Cell Biol.* **147**, 25–32 (1999).
27. Easwaran, H. P., Schermelleh, L., Leonhardt, H. & Cardoso, M. C. Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO Rep.* **5**, 1181–1186 (2004).
28. Cross, S. H., Meehan, R. R., Nan, X. & Bird, A. A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat. Genet.* **16**, 256–259 (1997).
29. Lau, N. C. *et al.* Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* **313**, 363–367 (2006).
30. Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S. & Jeltsch, A. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J. Mol. Biol.* **309**, 1189–1199 (2001).

31. Zimmermann, C., Guhl, E. & Graessmann, A. Mouse DNA methyltransferase (MTase) deletion mutants that retain the catalytic domain display neither de novo nor maintenance methylation activity in vivo. *Biol. Chem.* **378**, 393–405 (1997).
32. Margot, J. B., Ehrenhofer-Murray, A. E. & Leonhardt, H. Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Mol. Biol.* **4**, 7 (2003).
33. Goll, M. G. & Bestor, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 481–514 (2005).
34. Jeong, S. *et al.* Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5366–5376 (2009).
35. Bachman, K. E., Rountree, M. R. & Baylin, S. B. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J. Biol. Chem.* **276**, 32282–32287 (2001).
36. Chen, T., Tsujimoto, N. & Li, E. The PWWP domain of Dnmt3a and Dnmt3b is required for directing DNA methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9048–9058 (2004).
37. Ge, Y.-Z. *et al.* Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 25447–25454 (2004).
38. Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R. & Kouzarides, T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2305–2312 (2003).
39. Viré, E. *et al.* The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**, 871–874 (2006).

40. Karetka, M. S., Botello, Z. M., Ennis, J. J., Chou, C. & Chédin, F. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *J. Biol. Chem.* **281**, 25893–25902 (2006).
41. Robertson, K. D. *et al.* DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.* **25**, 338–342 (2000).
42. Aapola, U., Liiv, I. & Peterson, P. Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3602–3608 (2002).
43. Burgers, W. A., Fuks, F. & Kouzarides, T. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet. TIG* **18**, 275–277 (2002).
44. Feinberg, A. P., Ohlsson, R. & Henikoff, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 21–33 (2006).
45. Issa, J.-P. J. Methylation and prognosis: of molecular clocks and hypermethylator phenotypes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 2879–2881 (2003).
46. Sidransky, D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 210–219 (2002).
47. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 415–428 (2002).
48. Herman, J. G. & Baylin, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2042–2054 (2003).
49. Issa, J.-P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 988–993 (2004).

50. Sharma, S. *et al.* Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Res.* **29**, 3759–3768 (2009).
51. Thon, N. *et al.* IDH1 mutations in grade II astrocytomas are associated with unfavorable progression-free survival and prolonged postrecurrence survival. *Cancer* **118**, 452–460 (2012).
52. Hegi, M. E. *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 997–1003 (2005).
53. Ahluwalia, M. S. American Society of Clinical Oncology 2011 CNS tumors update. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **11**, 1495–1497 (2011).
54. Reifenberger, G. *et al.* Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **131**, 1342–1350 (2012).
55. Illingworth, R. S. & Bird, A. P. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* **583**, 1713–1720 (2009).
56. Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010–1022 (2011).
57. Weber, M. *et al.* Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 457–466 (2007).
58. Illingworth, R. S. *et al.* Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet.* **6**, e1001134 (2010).
59. Anastasiadou, C., Malousi, A., Maglaveras, N. & Kouidou, S. Human epigenome data reveal increased CpG methylation in alternatively spliced sites and putative exonic splicing enhancers. *DNA Cell Biol.* **30**, 267–275 (2011).
60. Liu, H. *et al.* Quantitative epigenetic co-variation in CpG islands and co-regulation of developmental genes. *Sci. Rep.* **3**, 2576 (2013).

61. Maston, G. A., Evans, S. K. & Green, M. R. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7**, 29–59 (2006).
62. Butler, J. E. F. & Kadonaga, J. T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* **16**, 2583–2592 (2002).
63. Hartley, P. D. & Madhani, H. D. Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell* **137**, 445–458 (2009).
64. Jin, C. & Felsenfeld, G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.* **21**, 1519–1529 (2007).
65. Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707–719 (2007).
66. Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343–349 (2004).
67. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 102–114 (2008).
68. Lujambio, A. *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 1424–1429 (2007).
69. Schoof, C. R. G., Botelho, E. L. da S., Izzotti, A. & Vasques, L. D. R. MicroRNAs in cancer treatment and prognosis. *Am. J. Cancer Res.* **2**, 414–433 (2012).
70. Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S. & Kauppinen, S. Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence* **3**, 1 (2012).
71. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).

72. Wojtowicz, E. E. *et al.* MicroRNA-125 family members exert a similar role in the regulation of murine hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **42**, 909–918.e1 (2014).
73. Banzhaf-Strathmann, J. & Edbauer, D. Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer. *Cell Commun. Signal. CCS* **12**, 30 (2014).
74. Xia, H.-F. *et al.* MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **23**, 347–358 (2009).
75. Le, M. T. N. *et al.* MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev.* **23**, 862–876 (2009).
76. Bueno, M. J. *et al.* Combinatorial effects of microRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway. *Blood* **117**, 6255–6266 (2011).
77. Zhou, M. *et al.* MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 21496–21507 (2010).
78. Scott, G. K. *et al.* Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J. Biol. Chem.* **282**, 1479–1486 (2007).
79. Zhang, Y. *et al.* miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. *Cancer Res.* **71**, 3552–3562 (2011).
80. Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S. J. & Shimizu, K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* **278**, 1598–1609 (2011).
81. Shenouda, S. K. & Alahari, S. K. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 369–378 (2009).

82. Sun, Y.-M., Lin, K.-Y. & Chen, Y.-Q. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J. Hematol. Oncol.* **6**, 6 (2013).
83. Xie, B., Ding, Q., Han, H. & Wu, D. miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **29**, 638–644 (2013).
84. Shi, X.-B. *et al.* An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19983–19988 (2007).
85. Vriens, M. R. *et al.* MicroRNA expression profiling is a potential diagnostic tool for thyroid cancer. *Cancer* **118**, 3426–3432 (2012).
86. Liang, L. *et al.* MicroRNA-125b suppressed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2. *Hepatol. Baltim. Md* **52**, 1731–1740 (2010).
87. Huang, L. *et al.* MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **128**, 1758–1769 (2011).
88. Liu, L. *et al.* miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 31–38 (2011).
89. Guan, Y., Yao, H., Zheng, Z., Qiu, G. & Sun, K. MiR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **128**, 2274–2283 (2011).
90. Soto-Reyes, E. *et al.* Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in gynecological cancers. *BMC Cancer* **12**, 40 (2012).

91. Hannafon, B. N., Sebastiani, P., de las Morenas, A., Lu, J. & Rosenberg, C. L.
Expression of microRNA and their gene targets are dysregulated in preinvasive breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **13**, R24 (2011).
92. Wang, H. *et al.* Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res.* **22**, 1680–1688 (2012).
93. Ohlsson, R., Lobanekov, V. & Klenova, E. Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **32**, 37–50 (2010).
94. Nakahashi, H. *et al.* A genome-wide map of CTCF multivalency redefines the CTCF code. *Cell Rep.* **3**, 1678–1689 (2013).
95. Zlatanova, J. & Caiafa, P. CTCF and its protein partners: divide and rule? *J. Cell Sci.* **122**, 1275–1284 (2009).
96. Phillips, J. E. & Corces, V. G. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* **137**, 1194–1211 (2009).
97. Holwerda, S. J. B. & de Laat, W. CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120369 (2013).
98. Weth, O. & Renkawitz, R. CTCF function is modulated by neighboring DNA binding factors. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **89**, 459–468 (2011).
99. Delatte, B., Deplus, R. & Fuks, F. Playing TETris with DNA modifications. *EMBO J.* **33**, 1198–1211 (2014).
100. Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. & Song, H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145**, 423–434 (2011).

101. Kohli, R. M. & Zhang, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **502**, 472–479 (2013).
102. Wossidlo, M. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.* **2**, 241 (2011).
103. Hackett, J. A. *et al.* Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* **339**, 448–452 (2013).
104. Inoue, A. & Zhang, Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* **334**, 194 (2011).
105. Yamaguchi, S. *et al.* Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell Res.* **23**, 329–339 (2013).
106. Teif, V. B. *et al.* Nucleosome repositioning links DNA (de)methylation and differential CTCF binding during stem cell development. *Genome Res.* **24**, 1285–1295 (2014).
107. Dubois-Chevalier, J. *et al.* A dynamic CTCF chromatin binding landscape promotes DNA hydroxymethylation and transcriptional induction of adipocyte differentiation. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10943–10959 (2014).
108. Feldmann, A. *et al.* Transcription factor occupancy can mediate active turnover of DNA methylation at regulatory regions. *PLoS Genet.* **9**, e1003994 (2013).
109. Yu, W. *et al.* Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat. Genet.* **36**, 1105–1110 (2004).
110. Guastafierro, T. *et al.* CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. *J. Biol. Chem.* **283**, 21873–21880 (2008).
111. Zampieri, M. *et al.* ADP-ribose polymers localized on Ctfp-Parp1-Dnmt1 complex prevent methylation of Ctfp target sites. *Biochem. J.* **441**, 645–652 (2012).

112. Ehrlich, M. & Lacey, M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics* **5**, 553–568 (2013).
113. Weth, O. *et al.* CTCF induces histone variant incorporation, erases the H3K27me3 histone mark and opens chromatin. *Nucleic Acids Res.* **42**, 11941–11951 (2014).
114. Hore, T. A., Deakin, J. E. & Marshall Graves, J. A. The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCF in amniotes. *PLoS Genet.* **4**, e1000169 (2008).
115. Klenova, E. M., Morse, H. C., Ohlsson, R. & Lobanenkoy, V. V. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin. Cancer Biol.* **12**, 399–414 (2002).
116. Renaud, S. *et al.* Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7372–7388 (2007).
117. Pugacheva, E. M. *et al.* The structural complexity of the human BORIS gene in gametogenesis and cancer. *PloS One* **5**, e13872 (2010).
118. Loukinov, D. I. *et al.* BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6806–6811 (2002).
119. Martin-Kleiner, I. BORIS in human cancers -- a review. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **48**, 929–935 (2012).
120. Jones, T. A. *et al.* Widespread expression of BORIS/CTCF in normal and cancer cells. *PloS One* **6**, e22399 (2011).

121. Ogunkolade, B. W. *et al.* BORIS/CTCF is an RNA-binding protein that associates with polysomes. *BMC Cell Biol.* **14**, 52 (2013).
122. Rosa-Garrido, M. *et al.* A cell cycle role for the epigenetic factor CTCF-L/BORIS. *PLoS One* **7**, e39371 (2012).
123. Jelinic, P., Stehle, J.-C. & Shaw, P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol.* **4**, e355 (2006).
124. Jelinic, P. & Shaw, P. Loss of imprinting and cancer. *J. Pathol.* **211**, 261–268 (2007).
125. Hoffmann, M. J., Müller, M., Engers, R. & Schulz, W. A. Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1577–1588 (2006).
126. Risinger, J. I. *et al.* Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 1713–1719 (2007).
127. Ogawa, O. *et al.* Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* **362**, 749–751 (1993).
128. Rainier, S. *et al.* Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* **362**, 747–749 (1993).
129. Dindot, S. V. *et al.* Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived Bos gaurus/Bos taurus hybrid fetuses. *Biol. Reprod.* **71**, 470–478 (2004).
130. Rachmilewitz, J. *et al.* Parental imprinting of the human H19 gene. *FEBS Lett.* **309**, 25–28 (1992).

131. Bartolomei, M. S., Zemel, S. & Tilghman, S. M. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* **351**, 153–155 (1991).
132. Tremblay, K. D., Duran, K. L. & Bartolomei, M. S. A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4322–4329 (1997).
133. Schoenherr, C. J., Levorse, J. M. & Tilghman, S. M. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat. Genet.* **33**, 66–69 (2003).
134. Pant, V. *et al.* The nucleotides responsible for the direct physical contact between the chromatin insulator protein CTCF and the H19 imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. *Genes Dev.* **17**, 586–590 (2003).
135. Engel, N., Thorvaldsen, J. L. & Bartolomei, M. S. CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2945–2954 (2006).
136. Hark, A. T. *et al.* CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**, 486–489 (2000).
137. Bell, A. C. & Felsenfeld, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* **405**, 482–485 (2000).
138. Vatolin, S. *et al.* Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res.* **65**, 7751–7762 (2005).
139. Hong, J. A. *et al.* Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res.* **65**, 7763–7774 (2005).

140. Hines, W. C., Bazarov, A. V., Mukhopadhyay, R. & Yaswen, P. BORIS (CTCFL) is not expressed in most human breast cell lines and high grade breast carcinomas. *PLoS One* **5**, e9738 (2010).
141. Woloszynska-Read, A. *et al.* DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCFL expression in ovarian cancer. *Cancer Immun.* **7**, 21 (2007).
142. Kosaka-Suzuki, N. *et al.* Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) directly induces expression of a cancer-testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter. *J. Biol. Chem.* **286**, 27378–27388 (2011).
143. D’Arcy, V. *et al.* BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. *Br. J. Cancer* **98**, 571–579 (2008).
144. D’Arcy, V. *et al.* The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 5978–5986 (2006).
145. de Necochea-Campion, R. *et al.* Expression of the epigenetic factor BORIS (CTCFL) in the human genome. *J. Transl. Med.* **9**, 213 (2011).
146. Soto-Reyes, E. & Recillas-Targa, F. Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene* **29**, 2217–2227 (2010).
147. Kondo, Y. *et al.* Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat. Genet.* **40**, 741–750 (2008).
148. Meissner, A. *et al.* Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**, 766–770 (2008).

149. McGarvey, K. M. *et al.* Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res.* **66**, 3541–3549 (2006).
150. Heger, P., Marin, B., Bartkuhn, M., Schierenberg, E. & Wiehe, T. The chromatin insulator CTCF and the emergence of metazoan diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 17507–17512 (2012).
151. Moon, H. *et al.* CTCF is conserved from Drosophila to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO Rep.* **6**, 165–170 (2005).
152. Kim, T. H. *et al.* Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* **128**, 1231–1245 (2007).
153. Kornblihtt, A. R. CTCF: from insulators to alternative splicing regulation. *Cell Res.* **22**, 450–452 (2012).
154. Handoko, L. *et al.* CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. *Nat. Genet.* **43**, 630–638 (2011).
155. Butcher, D. T. & Rodenhiser, D. I. Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **43**, 210–219 (2007).
156. Witcher, M. & Emerson, B. M. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol. Cell* **34**, 271–284 (2009).
157. De La Rosa-Velázquez, I. A., Rincón-Arano, H., Benítez-Bribiesca, L. & Recillas-Targa, F. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res.* **67**, 2577–2585 (2007).

158. Pant, V. *et al.* Mutation of a single CTCF target site within the H19 imprinting control region leads to loss of Igf2 imprinting and complex patterns of de novo methylation upon maternal inheritance. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3497–3504 (2004).
159. Chernukhin, I. *et al.* CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1631–1648 (2007).
160. Donohoe, M. E., Zhang, L.-F., Xu, N., Shi, Y. & Lee, J. T. Identification of a Ctfc cofactor, Yy1, for the X chromosome binary switch. *Mol. Cell* **25**, 43–56 (2007).
161. Donohoe, M. E., Silva, S. S., Pinter, S. F., Xu, N. & Lee, J. T. The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctfc and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature* **460**, 128–132 (2009).
162. Parelho, V. *et al.* Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* **132**, 422–433 (2008).
163. Wendt, K. S. *et al.* Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* **451**, 796–801 (2008).
164. Herold, M., Bartkuhn, M. & Renkawitz, R. CTCF: insights into insulator function during development. *Dev. Camb. Engl.* **139**, 1045–1057 (2012).
165. Kaneda, M. *et al.* Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**, 900–903 (2004).
166. Bourc'his, D. & Bestor, T. H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* **431**, 96–99 (2004).
167. Kato, Y. *et al.* Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2272–2280 (2007).

168. Recillas-Targa, F., De La Rosa-Velázquez, I. A., Soto-Reyes, E. & Benítez-Bribiesca, L. Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **10**, 554–568 (2006).
169. Docquier, F. *et al.* Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis. *Cancer Res.* **65**, 5112–5122 (2005).
170. Docquier, F. *et al.* Decreased poly(ADP-ribosyl)ation of CTCF, a transcription factor, is associated with breast cancer phenotype and cell proliferation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 5762–5771 (2009).
171. Furlan-Magaril, M. *et al.* An insulator embedded in the chicken α -globin locus regulates chromatin domain configuration and differential gene expression. *Nucleic Acids Res.* **39**, 89–103 (2011).
172. Xu, G. L. *et al.* Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402**, 187–191 (1999).
173. el-Deiry, W. S. *et al.* High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3470–3474 (1991).
174. Oh, B.-K. *et al.* DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *Int. J. Mol. Med.* **20**, 65–73 (2007).
175. Melki, J. R., Warnecke, P., Vincent, P. C. & Clark, S. J. Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia. *Leukemia* **12**, 311–316 (1998).
176. Girault, I., Tozlu, S., Lidereau, R. & Bièche, I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 4415–4422 (2003).

177. Girault, I. *et al.* Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 1259–1266 (2003).
178. Patra, S. K., Patra, A., Zhao, H. & Dahiya, R. DNA methyltransferase and demethylase in human prostate cancer. *Mol. Carcinog.* **33**, 163–171 (2002).
179. Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Baylin, S. B. & Issa, J. P. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4045–4050 (1996).
180. Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M. & Issa, J. P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **72**, 141–196 (1998).
181. Vertino, P. M., Yen, R. W., Gao, J. & Baylin, S. B. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4555–4565 (1996).
182. MacLeod, A. R., Rouleau, J. & Szyf, M. Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 11327–11337 (1995).
183. MacLeod, A. R. & Szyf, M. Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 8037–8043 (1995).
184. Ramchandani, S., MacLeod, A. R., Pinard, M., von Hofe, E. & Szyf, M. Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 684–689 (1997).
185. Rountree, M. R., Bachman, K. E., Herman, J. G. & Baylin, S. B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* **20**, 3156–3165 (2001).

186. Di Croce, L. *et al.* Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* **295**, 1079–1082 (2002).
187. Espinoza, C. A. & Ren, B. Mapping higher order structure of chromatin domains. *Nat. Genet.* **43**, 615–616 (2011).
188. Rothbart, S. B. *et al.* Association of UHRF1 with methylated H3K9 directs the maintenance of DNA methylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1155–1160 (2012).
189. Subik, K. *et al.* The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* **4**, 35–41 (2010).