



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“PAPEL DE CTCF EN EL RECLUTAMIENTO DE LA
DESMETILASA DE HISTONAS KDM4A EN UN
MODELO DE CÁNCER DE MAMA”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. LISSANIA XIMENA GUERRA CALDERAS

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

DRA. MARIA EGUENIA GONSEBATT BONAPARTE

Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

DR. MIGUEL ANGEL ZARAIN HERZBERG

Facultad de Medicina- UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis, a cargo del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología con la asesoría del Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, el Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra y el Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo. Tesis apoyada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IN213311), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 83959 y 182997), Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSSIS 0261181)

Los estudios de maestría de la Q.F.B. Lissania Ximena Guerra Calderas fueron apoyados por una beca de maestría otorgada por el programa nacional de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con numero de CVU 588391. Los congresos a los que asistió Lissania Guerra fueron apoyados por el Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado.

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas por ISC E. Nydia Hernández-Ríos, Técnico Académico Titular "A", en la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología UNAM

ÍNDICE

1.RESUMEN.....	5
1.1ABSTRACT.....	6
2.ANTECEDENTES.....	7
2.1 LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA.....	7
2.2 LAS DESMETILASAS DE HISTONAS.....	8
2.3 ESTRUCTURA PROTÉICA DE KDM4A.....	10
2.5 EL PAPEL DE KDM4A EN EL DESARROLLO DE CÁNCER.....	13
2.5.1 <i>Cáncer de prostata</i>	13
2.5.2 <i>Cáncer de vejiga</i>	14
2.5.3 <i>Cáncer colorrectal</i>	14
2.5.4 <i>Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello</i>	14
2.5.5 <i>Cáncer de mama</i>	15
2.5.6 <i>Cáncer de pulmón</i>	16
2.6 EL GEN <i>CHD5</i>	17
2.7 PARTICIPACIÓN DE H3K36ME3 EN LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.....	19
2.8 REGULACIÓN DE LAS DESMETILASAS DE HISTONAS.....	20
2.8.1 <i>El factor multifuncional CTCF</i>	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
6. RESULTADOS.....	26
6.1 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES mRNA DE <i>CHD5</i> , <i>KDM4A</i> Y <i>CTCF</i> EN LÍNEAS CELULARES DE ESTIRPE MAMARIO.....	26
6.2 ESTUDIO DE LA PRESENCIA, LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS <i>CHD5</i> , <i>KDM4A</i> Y <i>CTCF</i> EN LÍNEAS CELULARES NEOPLÁSICAS Y UNA NO NEOPLÁSICA.....	28
6.3 EVALUACIÓN DE LA COLOCALIZACIÓN DE <i>CTCF</i> Y <i>KDM4A</i> EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ESTIRPE MAMARIO.....	30
6.4 ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE <i>KDM4A</i> , <i>CTCF</i> EN LA REGIÓN +741PB EN EL GEN <i>CHD5</i>	31
7.DISCUSIÓN.....	36
8. CONCLUSIONES.....	43
9. PERSPECTIVAS.....	44
10 INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	45
10.1 EVALUACIÓN DE LA ABUNDANCIA DE LAS PROTEINAS <i>CTCF</i> Y <i>KDM4A</i> EN LOS MODELOS CELULARE.....	45
10.2 EVALUAR LA PRESENCIA Y LOCALIZACIÓN DE <i>KDM4A</i> EN CORTES DE TEJIDO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.....	47
10.3 ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS H3K36ME3, H3K36ME2, H3K9ME3 Y H3K9ME2.....	48
10.4 OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS EMPLEADOS.....	50
10.4.1 <i>Análisis de expresión</i>	50
10.4.2 <i>ChIP</i>	51

10.5 ANTICUERPOS UTILIZADOS	51
10.5 LÍNEAS CELULARES	52
11.MÉTODOS EN EXTENSO	54
11.1 EXTRACCIÓN DE RNA	54
11.2. REACCIÓN DE TRASNCRIPTASA REVERSA PARA OBTENER EL cDNA	56
11.3. INMUNOFLUORESCENCIAS (IF)	58
11.4. PROTOCOLO DE WESTERN BLOT	60
11.5 ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACION DE LA CROMATINA (CHIP)	64
11.6 INMUNOHISTOQUIMICAS (IHQ)	70
12. REFERENCIAS	73

1.RESUMEN

La desregulación de metilación y desmetilación de histonas se encuentra involucrada en cáncer, como un ejemplo se ha observado la expresión anormal de *KDM4A* en cáncer de mama, sugiriendo que este gen se encuentra involucrado en esta enfermedad. *KDM4A* es una desmetilasa que remueve los grupos metilo de los residuos H3K9me3, asociado con la estructuración de heterocromatina, y H3K36me3, relacionado con el proceso de elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II. Uno de los genes blanco de *KDM4A* es el gen *CHD5*, el cual se ve inactivado en cáncer de mama; se ha documentado que bajos niveles de expresión de *CHD5* se relacionan con el desarrollo y progresión de este cáncer. *KDM4A* se une a la región localizada a +741 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *CHD5*; la disociación de esta desmetilasa provoca un aumento en la expresión de dicho gen. Por otra parte, resulta poco claro cuáles son los mecanismos de reclutamiento de estas enzimas a sus sitios blanco, sin embargo, estudios recientes proponen que los factores de transcripción pueden tener un papel importante en el reclutamiento de las desmetilasas de histonas sus sitios blanco en la cromatina. Particularmente se ha estudiado al factor nuclear multifuncional CTCF, donde ensayos *in vitro* encontraron que la capacidad de desmetilación de *KDM4A* se incrementa en presencia de CTCF hasta en un 80%, sugiriendo que *in vivo* pudiera existir alguna interacción entre CTCF y *KDM4A*. Por lo tanto el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el papel de CTCF en el reclutamiento de *KDM4A* en la región localizada a +741 pb en el gen *CHD5*. Nuestros hallazgos muestran que los niveles de mRNA de *KDM4A* y *CTCF* aumentan en las líneas celulares neoplásicas de mama MCF7, MDA-MB-231 y la línea celular derivada de cáncer cervico-uterino, HeLa, en comparación con una línea celular no neoplásica MCF 10A, contrario a lo que paso con *CHD5* en donde encontramos una subexpresión en las líneas celulares derivadas de cáncer en comparación con la línea celular no neoplásica. Por inmunofluorescencias (IF) se observó la presencia de la proteína *KDM4A* en las líneas celulares neoplásicas y no en MCF 10A; en cambio, la proteína *CHD5* se encontró en la línea celular MCF 10A, en cuanto a CTCF encontramos este factor en todas las líneas celulares. Estos datos sugieren una relación entre la presencia de *KDM4A* y la ausencia de *CHD5*. Mediante IF dobles se encontraron algunos loci de co-localización de CTCF y *KDM4A*, en las células neoplásicas. Por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se demostró la presencia de *KDM4A* y CTCF a la región localizada a +741 pb en el gen *CHD5* en las líneas celulares neoplásicas, mas no en MCF 10A En conclusión nuestros datos sugieren que el factor nuclear CTCF puede participar reclutando a la desmetilasa de histonas *KDM4A* hacia la región situada a +741 pb en el gen *CHD5*.

1.1 ABSTRACT

Deregulation of histone methylation and demethylation is involved in cancer, as an example it has been reported that the lysine demethylase *KDM4A*, has an abnormal expression in breast cancer, suggesting that this enzyme may be involved in this disease. *KDM4A* removes the methyl groups of H3K9me3, associated with heterochromatin and H3K36me3, related to the process of transcription elongation by RNA polymerase II. One of the target genes of *KDM4A* is the *CHD5* gene which is inactivated in breast cancer; it has been reported that low levels of *CHD5* are associated to the development and progression of this cancer. *KDM4A* is located at the first intron of the *CHD5* gene, more exactly to the region located at +741 bp relative to the start site of transcription (TSS) of *CHD5*; the dissociation of this demethylase causes an increase in the expression of *CHD5* gene. Moreover, it is still unclear how the histone demethylases can be recruited to their target sites, however, recent studies propose that transcription factors may play an important role in the recruitment of histone demethylases to their target sites in chromatin. Particularly it has been studied the multifunctional nuclear factor, CTCF, *in vitro* assays found that the demethylation ability of *KDM4A* increases in the presence of CTCF up to an 80%, suggesting that *in vivo* could be an interaction between CTCF and *KDM4A*. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the role of CTCF in the recruitment of *KDM4A* in the region located at +741 bp in the *CHD5* gene. In our study we demonstrated that the mRNA levels of CTCF and *KDM4A* increase in the breast cancer cell lines MCF7, MDA-MB-231 and a cell line derived from cervical cancer, HeLa, compared to a non-neoplastic cell line MCF 10A, contrary to the *CHD5* gene, where we find a subexpression in all cell lines derived from cancer. By immunofluorescence assays we found the presence of the *KDM4A* protein in the neoplastic cell lines but we did not find this protein in the MCF 10A cells; in contrast, the *CHD5* protein was found only in the cell line MCF 10A. In the case of the multifunctional nuclear factor CTCF, we found it in all cell lines. These data suggest an association between the presence of *KDM4A* and absence of *CHD5*. By double immunofluorescence assays we found some *loci* of co-localization between *KDM4A* and CTCF, in cancer cells but not in the MCF10A cells. By chromatin immunoprecipitation assays we found the presence of CTCF and *KDM4A* in the region located at +741 bp in the *CHD5* gene in cancer cell lines was shown, but not in MCF 10A. In conclusion our data suggest that the nuclear factor CTCF can participate in the recruitment of the histone demethylase *KDM4A* to the region located at +741 bp in the *CHD5* gene.

2. ANTECEDENTES

2.1 LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

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

La metilación de lisinas de las histonas es otra modificación ampliamente estudiada, esta modificación epigenética puede ser reconocida por al menos 4 dominios proteicos: *i)* cromodominio, *ii)* dominios tipo TUDOR, *iii)* dominios PHD y *iv)* dominios WD40; por lo que las proteínas que contienen estos dominios son reclutadas de manera específica por las lisinas metiladas. Particularmente, las lisinas pueden presentar distinto grado de metilación, mono, di o trimetilación (Bannister *et al.* 2002). En este sentido, los grupos metilo son establecidos por enzimas denominadas metil-transferasas de histonas (conocidos como escritores de marcas histónicas “writers”), y posteriormente se requiere que sean reconocidos por proteínas que tengan los dominios proteicos antes mencionados para ser leídos (“readers”). Así mismo, la unión de algunas proteínas lectoras es influenciada por las modificaciones epigenéticas adyacentes, sugiriendo un “código de histonas” (Rea *et al.* 2000; Lachner *et al.* 2001; Rando 2012). Un ejemplo de este código de histonas, resulta en

la interferencia de la fosforilación de la serina 10 de la histona 3, debido al proceso de metilación de la lisina en la posición 9 de la misma histona 3 (Rea *et al.* 2000).

Anteriormente, se pensaba que la metilación de histonas constituía un mecanismo de modificación bioquímica estable e irreversible ya que la vida media de las histonas canónicas e histonas metiladas es muy similar (Byvoet *et al.* 1972), sin embargo, desde la década de 1960, y hasta la fecha la búsqueda de proteínas que tuvieran la capacidad de desmetilar residuos de lisinas metiladas, ha permitido la identificación y caracterización funcional de poco más de 20 enzimas capaces de remover esta modificación química covalente (Guerra-Calderas *et al.* 2015).

2.2 LAS DESMETILASAS DE HISTONAS

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

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

Actualmente, la desmetilación de las lisinas que se encuentran en las histonas es llevada a cabo por dos familias de enzimas, las amino oxidasas y las oxigenasas (VER TABLA 1). La primera familia realiza la desmetilación de residuos mono y dimetilados, utilizando FAD como aceptor de electrones (Shi *et al.* 2004; Anand y Marmorstein 2007). La segunda familia puede desmetilar residuos mono, di y trimetilados, donde las oxigenasas utilizan como co-sustratos O₂ y α- cetoglutarato (Klose *et al.* 2006; Schneider y Shilatifard, 2006; Whetstine *et al.* 2006; Shi y Whetstine, 2007; Klose y Zhang, 2007; Hou 2010; Mosammaparast y Shi, 2010; Arrowsmith *et al.* 2012; Kooistra y Helin, 2012).

TABLA 1: Lista de las distintas desmetilasas de histonas conocidas a la fecha agrupadas por familia y subfamilia.

FAMILIA	SUBFAMILIA	NOMBRE	ESTRUCTURA
OXIDASAS	KDM1	KDM1A	
		KDM1B	
OXIGENASAS	KDM2	KDM2A	
		KDM2B	
	KDM3	KDM3A	
		KDM3B	
	KDM4	KDM4A	
		KDM4B	
		KDM4C	
		KDM4D	
		KDM4E	
	KDM5	KDM5A	
		KDM5B	
		KDM5C	
		KDM5D	
	KDM6	KDM6A	
		KDM6B	
	KDM7	KDM7A	
	KDM8	KDM8	
	PHF	PHF2	
		PHF8	
	MNA	MNA	
	NO66	NO66	

Clave: AOL-N, región amino terminal que contiene el dominio amino-oxidasa-like; AOL-C, AOL-N, región carboxilo terminal que contiene el dominio amino-oxidasa-like; N-term, región amino terminal; SWIRM, dominio con una hélice alfa pequeña; ARID, dominio de interacción rico en AT; C5HC2-ZF, C5HC2 dominio de dedo de Zinc; CXXC-ZF, CXXC dominio de dedo de Zinc; FBox, dominio con una caja F; JmjC, dominio que contiene Jumonji-C; JmjN, dominio que contiene Jumonji-N; LRR, dominio rico en repeticiones de leucinas; TPR, dominio de tetratricopeptido; Tudor, dominio tipo Tudor; PHD, Homeodominio de planta.

2.3 ESTRUCTURA PROTÉICA DE KDM4A

La desmetilasa de histonas KDM4A, pertenece a la familia de las oxigenasas y a la subfamilia KDM4 (anteriormente JMJD2); fue la primera enzima reportada que desmetila a residuos trimetilados. Esta desmetilasa contiene un dominio Jmj-C y otro un dominio Jmj-N, que constituyen su sitio catalítico compuesto, así como dos dominios PHD y dos dominios híbridos tipo TUDOR. (Figura 1A; Couture *et al.* 2007; Patel y Wang 2013). La función de los dominios PHD de KDM4A aun no ha sido elucidada (Berry y Janknecht 2013), en contraste con los dominios que están contenidos en otras proteínas, por ejemplo los dominios PHD presentes en las proteínas del complejo NURF que se unen a la H3K4me3 (Kwon *et al.* 2009). Los dominios híbridos tipo TUDOR forman una estructura bilobulada, cada lóbulo asemeja un dominio TUDOR canónico, estos dominios se estructuran por el intercambio de las cadenas $\beta 3$ y $\beta 4$, debido a esto, el segundo dominio posee un mayor potencial electronegativo comparado con el primero (Chen *et al.* 2006; Whetstine *et al.* 2006). Adicional a ello, como consecuencia del plegamiento de los dominios TUDOR; se ha demostrado KDM4A se une, mas no desmetila, a las modificaciones H3K4me3 y H4K20me2/3, por esta razón se ha propuesto que KDM4A puede reconocer diversas regiones en la cromatina (Lee *et al.* 2005; Kim *et al.* 2006; Lee *et al.* 2008). Mientras que, KDM4A si desmetila a los residuos trimetilados de las lisinas 9 y 36 de la histona 3 “H3K9me3” y “H3K36me3” (Klose *et al.* 2006). En este sentido se ha demostrado que *in vivo* KDM4A no puede desmetilar residuos dimetilados y monometilados y presenta mayor afinidad hacia H3K9me3 que H3K36me3 (Chen *et al.* 2006; Whetstine *et al.* 2006). La capacidad de KDM4A de reconocer dos regiones con secuencias distintas de aminoácidos, se explica porque las interacciones entre la enzima y los péptidos de las histonas se encuentran gobernadas por puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones con los péptidos base de los sustratos. Además, los residuos N-terminales de H3K9me3 y H3K36me3 comparten una conformación esteroquímica similar y ambos péptidos se unen en la misma dirección dentro del sitio de unión al sustrato en la desmetilasa, permitiendo que la trimetil-lisina se deposite en el sitio catalítico, el cual contiene un átomo de Fe que es fundamental para la actividad catalítica de la enzima (Klose *et al.* 2006; Yamane *et al.* 2006).

El mecanismo de reacción propuesto es muy similar al que llevan a cabo las ferroxidrilasas dependientes de α -cetoglutarato (Hausinger *et al.* 2004), el cual consta de 5 pasos que a continuación se describen: El átomo de Fe activo, se encuentra en un estado de oxidación +2 y está coordinado por dos residuos de histidina, uno de glutamato y tres

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

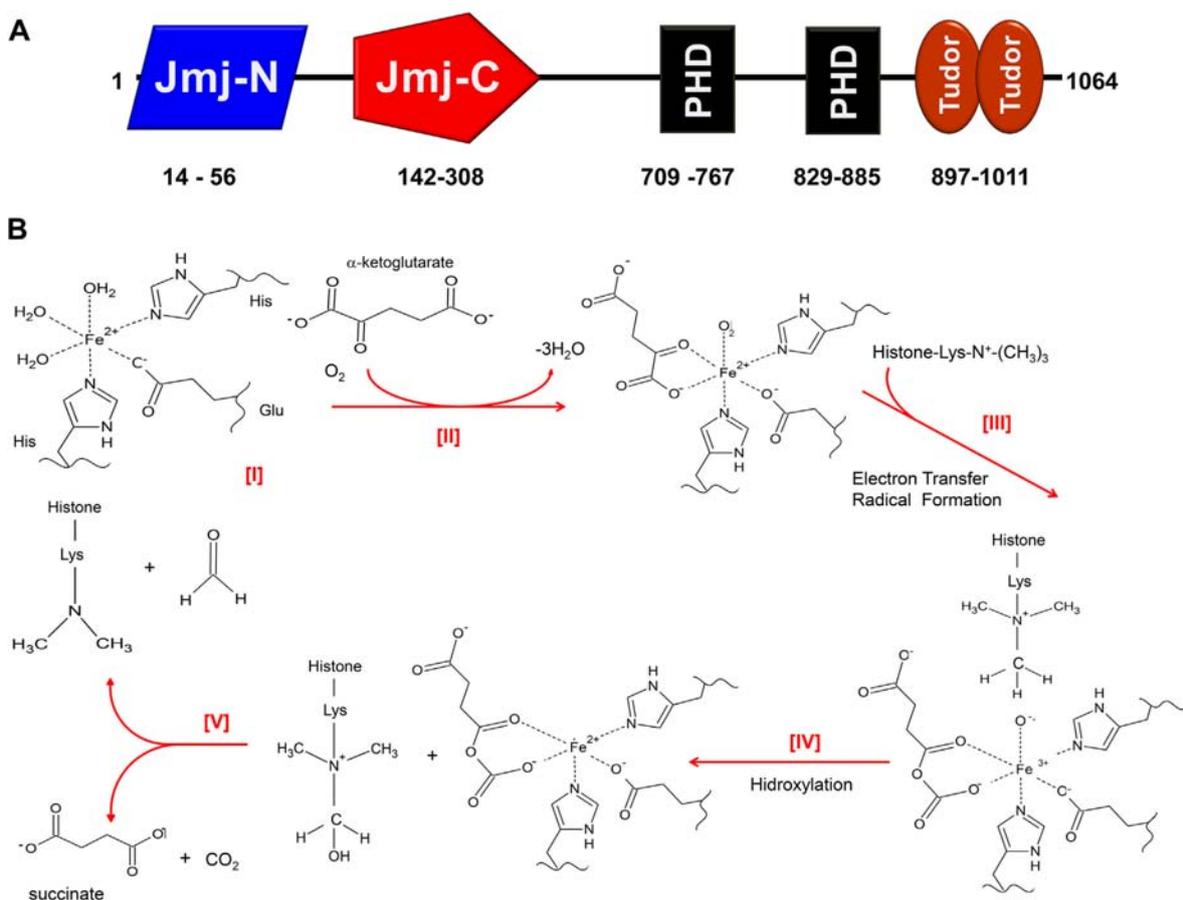


Figura 1. Estructura y mecanismo de la desmetilasa de histonas KDM4A. (A) La proteína KDM4A consiste en 1064 residuos de aminoácidos (a.a.), los cuales se conforman en diferentes dominios, un dominio Jmj-N (en azul) abarca de los 14 al 56 a.a, un dominio Jmj-C (en rojo) el cual ocupa los 142-308 a.a, dos dominios PHD (en negro) los cuales abarcan del 709 al 767 a.a y del 829 al 885 a.a, y dos dominios híbridos tipo TUDOR, los cuales ocupan los 897-1011 a.a respectivamente. (B) El mecanismo de reacción propuesto es muy similar al que llevan a cabo las ferro-hidroxilasas dependientes de α -cetoglutarato, se puede dividir en

5 pasos, primeramente el átomo de Fe se encuentra coordinado por dos residuos de histidina, uno de glutamina y 3 moléculas de agua, posteriormente se activa el Fe mediante la coordinación del α -cetoglutarato y O_2 (II), a continuación se transfiere un electrón del Fe^{2+} al O_2 y se forma un radical (III), después, la trimetil-lisina es atacada por este radical resultando en la hidroxilación de un grupo metilo (IV), después, se pierde espontáneamente el grupo carbonilo (V), finalmente se regenera el sitio catalítico de la enzima mediante la coordinación de 3 moléculas de H_2O al ion Fe^{2+} (Hausinger *et al.* 2004). Las estructuras fueron elaboradas con el programa ChemSketch.Ink de ACDLABS FREEWARE. (Guerra-Calderas *et al.* 2015).

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

2.4 FUNCIÓN DE KDM4A

En *C. elegans*, KDM4A está involucrada en la disminución de H3K36me3 en el cromosoma X, sugiriendo que esta proteína es importante en el desarrollo de células germinales (Reinke *et al.* 2000; Kelly *et al.* 2002; Reuben y Lin 2002). Esta enzima es importante en la replicación celular y en la estabilidad genómica. La sobreexpresión de *KDM4A* en células humanas, se asocia con un relajamiento de la estructura de la cromatina, favoreciendo un paso más rápido por la fase S, por el contrario mutaciones en el gen que codifica para la proteína ortóloga en *Caenorhabditis elegans* conduce al aumento en el tiempo de replicación y del daño al DNA, induciendo la muerte celular programada dependiente de p53 (Black *et al.* 2010). Los niveles de la proteína KDM4A son dependientes del ciclo celular, así mismo, KDM4A antagoniza con las funciones de la proteína de heterocromatina 1 gamma (HP1 γ) (Black *et al.* 2010), estos resultados sugieren un modelo en el KDM4A regula la replicación del DNA controlando la accesibilidad de la cromatina (Black *et al.* 2010).

También se conoce que KDM4A se encuentra involucrada en la represión del gen *Achaete-Scute Complex Homolog 2 (ASCL2)*, ya que actúa como co-factor del co-represor N-CoR, para lo cual requiere de su actividad de desmetilasa (Zhang *et al.* 2005; Klose *et al.* 2006). Por otro lado, KDM4A también se asocia con desacetilasas de histonas y la proteína de retinoblastoma, pRb, para reprimir los promotores regulados por E2F, pero en este caso el papel de esta proteína como desmetilasa no ha sido estudiado (Gray *et al.* 2005; Neault *et al.* 2016), estos resultados proponen que KDM4A puede regular la transcripción de distintos genes.

En el caso de *Drosophila melanogaster*, se encontró que, la mayoría de los genes regulados por KDM4A de *Drosophila melanogaster* (dKDM4A), no presentan cambios en

las modificaciones H3K36me3 y H3K9me3, además, en algunos casos, los genes afectados por esta enzima, se encuentran cercanos, sugiriendo que gran parte de los genes controlados por dKDM4A no son regulados por los niveles de H3K36me3 y H3K9me3, y que otras funciones que dependen de dKDM4A están involucradas (Crona *et al.* 2013). Una probable explicación de los cambios encontrados en las mutantes estudiadas por este grupo de investigación, podría ser la interacción con otras proteínas como, pRb (Gray *et al.* 2005; Neault *et al.* 2016) y el represor N-CoR (Zhang *et al.* 2005).

Así mismo, KDM4A coactiva el gen *NANOG* en células troncales (Agger *et al.* 2007; Lan *et al.* 2007 y Loh *et al.* 2007), mientras que la isoforma Δ N-KDM4A lleva a cabo la desmetilación de H3K9me3 del promotor del gen *Myog*, durante la diferenciación del músculo esquelético de mioblastos a miotubos (Verrier *et al.* 2011), esto datos sugieren que algunas isoformas de KDM4A pueden tener una función importante en la regulación de la expresión génica.

2.5 EL PAPEL DE KDM4A EN EL DESARROLLO DE CÁNCER

En resumen las modificaciones post-traduccionales de las histonas resultan importantes en la estructura de la cromatina; cambios locales y globales en esta arquitectura cuyas alteraciones son encontradas comúnmente en cáncer (Jovanovic *et al.* 2010, Cloos *et al.* 2008); también, se ha reportado que los patrones de expresión de *KDM4A* son alterados en múltiples tipos de cáncer, esta expresión alterada puede resultar en cambios en las modificaciones post-traduccionales de las histonas conduciendo a cambios en los perfiles de expresión genética probablemente asociado a progresión clínica o tipos histológicos. A continuación se describen algunas evidencias sobre la participación de KDM4A en el desarrollo de distintos tipos de neoplasias malignas de origen epitelial.

2.5.1 CÁNCER DE PROSTATA

Estudios del año 2007 determinaron que *KDM4A* se encuentra sobreexpresado en cáncer de próstata. La proteína KDM4A actúa como co-activador del receptor de andrógenos (RA) y en presencia de bajos niveles de ligandos para el RA, y KDM4A puede activar la transcripción basal del antígeno específico prostático (PSA, por sus siglas en inglés "prostate specific antigen"), estos resultados sugieren que la sobre-expresión de *KDM4A* puede ser una causa por la que los tumores de próstata se vuelvan refractarios a la terapia de abatimiento de andrógenos (Shin y Janknecht 2007).

2.5.2 CÁNCER DE VEJIGA

Contrario a lo observado en cáncer de próstata, los niveles de KDM4A y KDM1 en cáncer de vejiga son bajos con relación a tejido normal y su regulación no depende del receptor de andrógenos "RA" (Kauffman *et al.* 2011). La disminución de KDM4A y RA en tumores primarios y avanzados sugiere que estas proteínas no son necesarias para la iniciación y/o progresión de la enfermedad, y hace sugiere que estas proteínas puedan tener un papel potencial en retardar la carcinogénesis, sin embargo, el significado fisiológico de los bajos niveles del RA y de KDM4A con respecto a la señalización de andrógenos aún se desconoce (Kauffman *et al.* 2011). Sin embargo, la pérdida de KDM4A correlaciona con pobre pronóstico, estas evidencias proponen el empleo de KDM4A como un probable nuevo indicador molecular para la estratificación de riesgo en los pacientes con cáncer de vejiga (Kauffman *et al.* 2011).

No obstante, un estudio reciente demostró que los niveles de expresión de KDM4A aumentan en tejidos neoplásicos de vejiga en comparación con tejido normal, además de ausencia significativa entre los diferentes subtipos tumorales. Estos resultados sugieren que el aumento de los niveles de mRNA de KDM4A podrían estar participando en etapas tempranas de la carcinogénesis o progresión histopatológica del cáncer de vejiga (Kogure *et al.* 2013).

2.5.3 CÁNCER COLORRECTAL

Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) Kim y colaboradores, demostraron que las proteínas KDM4A y p53 son reclutadas al promotor de *p21*, después de estimular células derivadas de cáncer de colon con doxorrubicina, agente que ocasiona daño al DNA (Kim *et al.* 2012). Adicionalmente, la disminución de KDM4A, mediada por siRNAs resulto en el aumento de p21 y a la proteína pro-apoptótica PUMA, induciendo la apoptosis de las células derivadas de cáncer colorrectal HCT116, este decremento también derivó en la disminución de la proliferación en diversas líneas celulares neoplásicas de colon, mientras que la expresión exógena de *KDM4A* aumento la proliferación de HCT116 en medio con baja concentración de suero (Kim *et al.* 2012). Estos hallazgos indican que KDM4A promueve la proliferación y sobrevivencia de las células derivadas de cáncer de colon (Kim *et al.* 2012).

2.5.4 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEZA Y CUELLO

El factor de transcripción AP-1 (Activating Protein 1, por sus siglas en inglés), participa en el desarrollo de tumores y en procesos de metástasis. Este factor es un heterodímero compuesto principalmente por las proteínas JUN y FOS, la formación de AP-1 puede estar

mediada por la transcripción de los genes *JUN* y *FOS*, que presentan a su vez sitios de unión a AP-1 en sus promotores, lo cual deriva en una cascada de retroalimentación positiva promoviendo la formación de AP-1 (Angel *et al.* 1988; Ozanne *et al.* 2000; López-Bergami *et al.* 2010).

Un estudio en líneas celulares derivadas de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, demostró que la activación transcripcional *JUN* y *FOS* es mediada por la desmetilación de la modificación represiva H3K9me3, la cual es característica de represión transcripcional, esta desmetilación es llevada a cabo por KDM4A (Ding *et al.* 2013). En este mismo estudio se mostró que la proteína AP-1 no es capaz de unirse a las regiones promotoras de *JUN* y *FOS* que contienen la modificación H3K9me3 (Ding *et al.* 2013). Adicionalmente, la abundancia de esta desmetilasa correlaciona con la abundancia en las proteínas JUN y FOS.

En conjunto, estos resultados sugieren que KDM4A puede estar involucrada en los procesos de invasión y metástasis del carcinoma de células escamosas (Ding *et al.* 2013).

2.5.5 CÁNCER DE MAMA

Por otro lado, se ha reportado la sobreexpresión de *KDM4A* en cáncer de mama tanto lobulillar, ductal así como en tumores triple negativo a receptores (como el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progestágeno (PR) y Her2/Neu). Esta sobreexpresión se relaciona con la pérdida de la modificación postraducciona de histonas, H3K9me3, la cual de manera normal esta enriquecida en la región pericentromérica. La pérdida de esta modificación, en los cromosomas 5 y 7 puede contribuir al desarrollo de aneuploidías e inestabilidad cromosómica (Slee *et al.* 2012). No obstante, pueden existir causas diferentes del aumento de KDM4A, que pudieran originar inestabilidad cromosómica debido a la falta de H3K9me3 en las regiones pericentroméricas, tales como la disminución de la expresión de las metiltransferasas SUV39H1/2 que incorporan dicha modificación postraducciona (Peters *et al.* 2001), o complejos que ayudan a la correcta segregación cromosómica y a la supresión tumoral como son pRb (Gonzalo *et al.* 2005), SWI/SNF (Bourgo *et al.* 2009) y mSds3 (David *et al.* 2003; David *et al.* 2006).

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

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

Así mismo también se propone que KDM4A funciona como un co-activador del receptor de estrógenos (RE) debido a que forman un complejo, KDM4A-RE. La sobreexpresión de *KDM4A* deriva en un incremento de la transcripción dependiente de estrógenos, mientras que su abatimiento, mediado por siRNAs, causa una disminución transcripcional de los genes blanco del RE. Entre los genes afectados por KDM4A, se encontró a *CCND1* (que codifica para la cíclica D1), el cual se ve aumentado en cáncer de mama (Altucci *et al.* 1996; Cicatiello *et al.* 2004). De manera interesante, la expresión de *JUN* es independiente de señalización hormonal y también se ve disminuida después del abatimiento de KDM4A. La proteína JUN tiene funciones importantes en tejidos cancerosos, donde su sobreexpresión estimula la invasión, la migración y la formación de tumores y su inactivación causa el arresto del ciclo celular (Berry *et al.* 2012). En conjunto, estos datos sugieren que KDM4A puede coactivar genes tanto dependientes como independientes del RE, y que pudiera estar regulando el crecimiento y Cáncer deproliferación de las células de cáncer de mama promoviendo la expresión de al menos dos oncogenes, *JUN* y *CCND1* (Berry *et al.* 2012).

2.5.6 CÁNCER DE PULMÓN

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

En el 2012, Mallette y colaboradores observaron que *KDM4A* se sobreexpresa en líneas celulares neoplásicas de pulmón de ratón y humano, por el contrario tras una disminución de esta desmetilasa en la línea celular derivada de cáncer de pulmón, A549, dispara la senescencia (Mallette y Richard 2012). Esta desmetilasa parece estar implicada en la regulación del gen supresor de tumores *CHD5*, el cual se encuentra implicado en la ruta de ubiquitinación de p53 (Serrano 1997; Bagchi 2007). Los resultados obtenidos por

este grupo de investigación proponen que el aumento de los niveles de KDM4A en cáncer de pulmón podría estar cooperando con otros factores para promover la transformación de celular, bloqueando la senescencia dependiente de p53 vía *CHD5* (Mallette y Richard 2012).

2.6 EL GEN *CHD5*

El gen *CHD5* está localizado en el cromosoma 1 en el *locus* 1p36.31 y codifica para una enzima que pertenece a la familia de las helicasas (chromodomain helicase DNA-binding protein 5, por sus siglas en inglés) (Thompson *et al.* 2003), la proteína *CHD5* está conformada por dos dominios PHD, dos cromodominios, un dominio con actividad de helicasa y un dominio de unión a DNA, el cual se encuentra conservado en la familia (Figura 2B) (Thompson *et al.* 2003). *CHD5* es el quinto miembro de una familia de proteínas remodeladoras de la cromatina, algunas evidencias sugieren que *CHD5* puede funcionar formando un complejo con NuRD (nucleosome remodeling and deacetylation, por sus siglas en inglés), el cual regula la transcripción de genes específicos. *CHD5* se expresa principalmente en el sistema nervioso así como los testículos. Se sabe que la proteína *CHD5*, puede funcionar como supresora de tumores, ya que controla la proliferación, apoptosis y senescencia celular por la vía de p19^{Arf}/p53 (Bagchi, 2007; Serrano, 1997). *CHD5* regula de manera positiva a p19^{Arf}, que codifica para una proteína que secuestra a Mdm2 (Murine double minute 2), la cual se encarga de ubiquitinar a p53 para su posterior degradación. La deficiencia de p19^{Arf} y de *CHD5* compromete a p53 y sus funciones de supresor de tumores tales como la inducción de senescencia (Bagchi, 2007; Serrano, 1997).

Se han descrito al menos dos mecanismos por los cuales es modulada la transcripción del gen *CHD5*, epromotor del gen *CHD5* encuentra embebido en una isla CpG clasificada como alta ya que presenta una densidad de 180 CpGs, en dicha región (Figura 2A). Principalmente, se ha observado que la inactivación de los promotores embebidos en islas CpG altas (HCP, high CpG promoter), se lleva a cabo por la hipermetilación del DNA y el enriquecimiento de las modificaciones postraduccionales asociadas con represión transcripción como H3K9me3 y H3K27me3 (Soto-Reyes *et al.* 2012), mientras que los promotores embebidos en islas CpG bajas (LCP, low CpG promoter) no son inactivados por la hipermetilación del DNA sino por las modificaciones postraduccionales de las histonas (Weber *et al.* 2007).

CHD5 se encuentra inactivado en varios tipos de cáncer, entre ellos cáncer de mama (Mulero-Navarro y Esteller 2008). Hasta ahora se han encontrado 2 mecanismos de inactivación del gen *CHD5*: el primero es por un proceso genético donde se ha reportado la delección del gen en neuroblastomas.

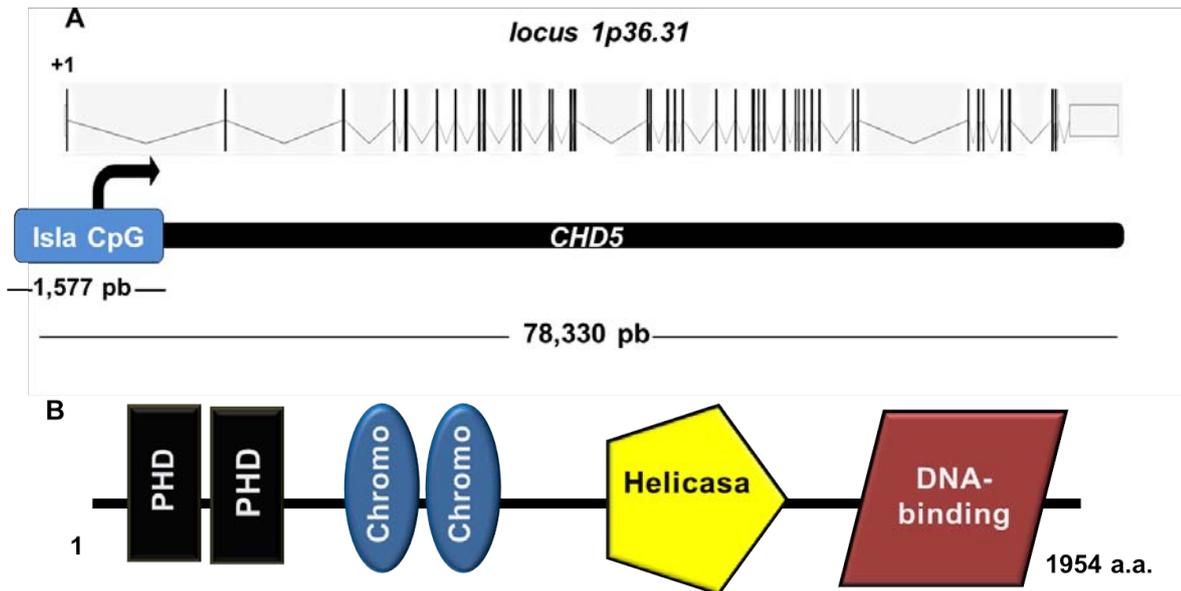


Figura 2. Estructura del gen y de la proteína CHD5 (A) El gen *CHD5*, se encuentra en el locus 1p36.31, su promotor se encuentra embebido en una la isla CpG de 1577 pb con 180 sitios CpGs, **(B)** La proteína *CHD5* está compuesta por 1954 a.a los cuales están organizados en dos dominios tipo PHD, dos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

El segundo es la hipermetilación del DNA del promotor, la cual se presenta en gliomas y cáncer colorrectal (Mulero-Navarro y Esteller 2008). En el caso particular de cáncer de mama, se ha detectado que la hipermetilación del DNA del promotor de esta helicasa es específica de tumor y que bajos niveles proteicos de *CHD5* se relacionan con el desarrollo y progresión de este tipo de cáncer (Mulero-Navarro y Esteller 2008). Así mismo, se han encontrado bajos niveles de *CHD5* en tumores de mama en comparación con tejido de mama normal, este fenómeno se observa también en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF7, en ambas líneas celulares no hay delección del gen, y se ha encontrado hipermetilación del promotor en MDA-MB-231, sin embargo cuando tratan estas células con 5-aza-2-deoxicitidina, fármaco que inhibe la metilación del DNA, no se observa una reactivación completa de la expresión de *CHD5* (Mulero-Navarro y Esteller 2008); lo anterior sugiere que hay otros mecanismos de inactivación del gen *CHD5* que no dependen exclusivamente de inicio de la transcripción.

Por medio de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina y microarreglos (técnica conocida como ChIP-on-ChIP), se identificó que el gen *CHD5* es un blanco génico

de KDM4A. En este estudio se observó que KDM4A se une a la región localizada a +741 pb con respecto al TSS de dicho gen (Figura 3A; Mallette y Richard 2012). La expresión de *KDM4A* conduce a una reducción del transcrito y la proteína de *CHD5*, por el contrario, el abatimiento de KDM4A aumenta los niveles de CHD5 y desencadena la senescencia en la línea celular de cáncer de pulmón A549 (Fig. 3B, 3C, 3D, 3E; Mallette y Richard 2012).

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

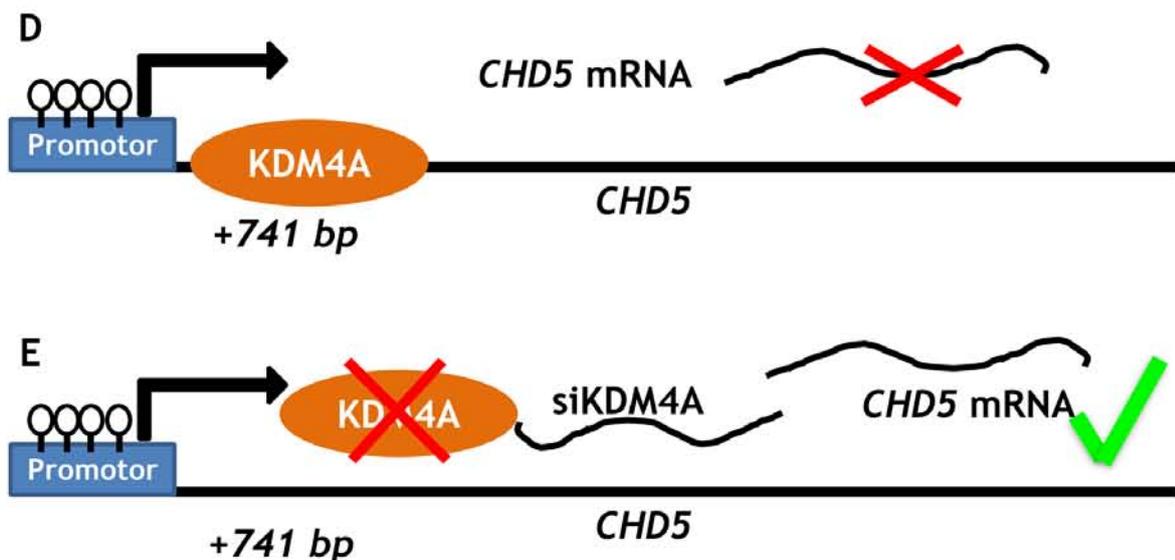


Figura 3. Papel de KDM4A en la regulación del gen *CHD5*. (A) Inmunoprecipitación de la cromatina evaluada por PCR cuantitativo (qPCR) donde se observa que KDM4A se une a la región +741 del gen *CHD5*. (B) Determinación de la expresión del gen *CHD5* por qPCR en el cual se demuestra que el abatimiento de KDM4A conlleva a un aumento de la expresión de este gen. (C) Determinación de la abundancia de la proteínas por Western blot, se muestra la presencia de CHD5 y KDM4A, post-transfección de siGFP y siKDM4A (Modificado de Mallette y Richard 2012). (D) Esquema de la unión y efecto de KDM4A en el gen *CHD5*, se muestra que KDM4 tiene un efecto negativo en la transcripción del gen *CHD5*, y (E) Esquema de la unión y efecto de KDM4A en el gen *CHD5*, después del abatimiento de KDM4A mediante un RNA de interferencia, se observa que *CHD5* es transcrito.

2.7 PARTICIPACIÓN DE H3K36ME3 EN LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.

Alguno de estos mecanismos diferentes no asociados con el inicio de la transcripción, pudiera estar mediado por la pérdida de la modificación H3K36me3, la cual, es establecida por la enzima Set2. Esta modificación postraduccional es importante debido a que se encuentra asociada con el proceso de elongación de la transcripción por RNA polimerasa II (Li *et al.* 2007; Vavouri y Lehner 2012). Se ha reportado que la presencia de H3K36me3 en el cuerpo del gen, correlaciona con altos niveles de transcripción mientras

que H3K36me2 en el cuerpo del gen se relaciona con niveles bajos de transcripción (Li *et al.* 2007; Vavouri y Lehner 2012).

Numerosos estudios en múltiples sistemas apoyan un papel para la metilación de H3K36 en la activación transcripcional, se ha observado que en general hay un cambio progresivo desde la monometilación hasta la trimetilación de H3K36 entre las regiones promotoras y los extremos 3' de los genes (Wagner y Carpenter 2012), pero el significado funcional de esto aún es desconocido. Por otra parte, en el pez cebra, las células somáticas también muestran un sesgo para la H3K36me3 en el extremo 3' de genes activamente transcritos, aunque, se ha encontrado esta modificación en las regiones 5' del promotor de genes quiescentes que son regulados durante el desarrollo de la espermatogénesis (Wagner y Carpenter 2012).

Múltiples evidencias en levadura mostraron que Set2, enzima responsable de las tres formas de metilación de H3K36, se encuentra acoplada a la elongación de la transcripción. Se sabe que Set2 se asocia con la forma hiperfosforilada de la RNA pol II y trimetila H3K36 durante la elongación de la transcripción en varios sistemas como levadura y humano.

Esta interacción, se encuentra mediada por los residuos fosforilados del CTD (Carboxy terminal domain) de la subunidad grande de la RNA polimerasa II, RBP1, la fosforilación de la serina dos del CTD es característica del proceso de elongación de la transcripción por la RNA pol II. Se ha sugerido que las proteínas SET2 humanas también se pueden unir a la RNA pol II y metilar H3K36 (Wagner y Carpenter 2012).

Estudios recientes mostraron que KDM4A media la desmetilación de H3K36me3, provocando la pérdida de reclutamiento de la RNA pol II en regiones exónicas del gen *GFAP* (*Glial Fibrillary Acid Protein*) de esta manera KDM4A regula la diferenciación de los astrocitos controlando diferencialmente la elongación de la transcripción por la RNA pol II (Cascante *et al.* 2014).

2.8 REGULACIÓN DE LAS DESMETILASAS DE HISTONAS

Reportes *in vitro* han demostrado que la simple asociación de las desmetilasas de histonas con su sustrato es suficiente para que la reacción de desmetilación se lleve a cabo, sugiriendo que estas enzimas son moduladas por mecanismos regulatorios *in vivo* con el fin de prevenir la desmetilación anormal (Lan *et al.*, 2008).

Se ha propuesto que la regulación de la expresión de los genes que codifican para las desmetilasas es importante para modular la actividad biológica de estas enzimas, lo cual se refleja en que los patrones de expresión encontrados son tejido específico y que además se conoce que algunas desmetilasas están presentes en tejido hematopoyético, órganos reproductores, células del sistema inmune, células madre embrionarias, testículos, entre otros (Lan *et al.*, 2008), estos datos sugieren que las desmetilasas de histonas pueden tener un papel importante en el desarrollo y diferenciación de distintos tejidos.

Otra manera de regular a las desmetilasas, es mediante el control de su actividad catalítica; la unión de diversos factores de transcripción a estas enzimas y las modificaciones postraduccionales pueden disminuir la especificidad de las desmetilasas por sus sustratos, así como su actividad catalítica. Además, se ha sugerido que el ambiente cromatínico proporciona cierta selectividad a las desmetilasas ya que controla la accesibilidad de estas proteínas a sus sitios blanco (Lan *et al.*, 2008).

El grupo de Shi plantea que la actividad de las desmetilasas es controlada de forma modular y por etapas, involucrando las modificaciones postraduccionales de las desmetilasas, dichos cambios afectan su actividad catalítica; las interacciones con factores de unión a DNA, así como otras enzimas remodeladoras de la cromatina y el reconocimiento del ambiente cromatínico, por ejemplo, modificaciones específicas en las histonas pueden ser distinguidas por dominios contenidos en las desmetilasas (Lan *et al.*, 2008).

Así mismo se ha sugerido que los mecanismos de reclutamiento de las desmetilasas tienen un papel crítico en la regulación de estas enzimas, no obstante aún no se entiende claramente cómo es que las desmetilasas son dirigidas hacia sitios específicos en la cromatina evitando la desmetilación aberrante (Lan *et al.*, 2008).

Recientemente se ha propuesto que los factores transcripcionales pudieran tener una función importante en mediar el reclutamiento de distintos componentes epigenéticos como las desmetilasas de histonas. Uno de los factores que se ha comenzado a estudiar es el factor nuclear CTCF.

2.8.1 EL FACTOR MULTIFUNCIONAL CTCF

La proteína CTCF, es una proteína multifuncional con 11 dedos de zinc que se encuentra conservada en diversos organismos. Inicialmente CTCF fue caracterizado

como un regulador transcripcional, posteriormente fue descrito como una proteína que participa en diversas funciones que tienen los insulador, también conocidos como elementos frontera. Estudios han demostrado que CTCF juega un papel central en mediar las interacciones cromatínicas a larga distancia y en la dinámica nuclear (Burgess-Beusse *et al.*, 2002; Recillas-Targa *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2008; Phillips y Corces, 2009).

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

A su vez, la ausencia de dicho factor se ha vinculado con múltiples síndromes como Silver-Russell, el síndrome de Beckwith-Wiedemann y también con el desarrollo del cáncer (Aulmann *et al.*, 2003; Butcher, *et al.*, 2004; Butcher y Rodenhiser, 2007).

2.8.1.1 CTCF EN EL DESARROLLO DE CÁNCER.

CTCF también participa en la regulación de genes involucrados en el control del ciclo celular como *BRCA1*, *Rb* y *p16* donde se ha observado una localización citoplasmática anormal en el 77% de los carcinomas mamarios lo que correlaciona con la hipermetilación del DNA en el promotor del gen *BRCA1* (Butcher *et al.*, 2004; Butcher y Rodenhiser, 2007; De la Rosa-Velázquez *et al.*, 2007; Witcher y Emerson, 2009).

Se ha encontrado que la proteína CTCF puede inhibir el crecimiento celular de células cancerosas así como la clonogenicidad. Así mismo, las mutaciones que afectan a CTCF, incluyen mutaciones sin sentido y mutaciones con sentido erróneo que afectan al dominio de los 11 dedos de Zinc, que inhiben la unión de CTCF a sitios específicos.

La localización de *CTCF* dentro de una región que sufre deleciones en cáncer de mama y próstata hizo surgir la hipótesis de que CTCF podría ser un candidato a gen supresor de tumores (Filippova *et al.*, 1998). La hipótesis fue respaldada por el hallazgo de un reordenamiento de los exones de *CTCF* en tumores y por varias mutaciones relacionadas con interferir con la unión de la proteína en cáncer (Filippova, *et al.*, 1998 y 2002). No obstante, un estudio de los niveles de RNA mensajero (mRNA) de *CTCF* en carcinomas mamarios no reveló una pérdida significativa asociada al tumor o una disminución en la expresión (Rakha, *et al.*, 2004). Asimismo, el nivel de CTCF se encontró elevado en tumores y líneas celulares de cáncer de mama en comparación con células normales sugiriendo que CTCF no es un gen supresor de tumor, aunque se planteó la

hipótesis de que la regulación de CTCF podría estar relacionada con resistencia a la apoptosis (Docquier, *et al.*, 2005). Esto se justificó mediante la demostración de que la sobre-expresión de *CTCF* protege parcialmente a las células de la apoptosis mientras que la falta de CTCF derivó en la muerte celular por apoptosis (Docquier, *et al.*, 2005).

Los experimentos anteriores sugieren que CTCF se comporta más como un regulador de otros genes asociados con la tumorigénesis que como un gen supresor de tumores clásico lo cual concuerda con la observación de que los blancos génicos de CTCF incluyen diversos genes con funciones reguladoras (Nikolaev, *et al.*, 2009; Recillas-Targa, *et al.*, 2006; 2011).

Como ya se había mencionado, CTCF evita el silenciamiento de regiones promotoras y otros elementos reguladores al evitar la propagación de la metilación en las islas CpG (Schatten, 2008). Evidencia reciente sugiere que la metilación aberrante del DNA podría iniciarse lejos de las regiones promotoras en los llamados “centros de metilación” que frecuentemente corresponden a secuencias repetidas (Issa, 2004). Dado que CTCF está encargado de regular a un gran número de genes que, curiosamente, están silenciados en tumores, se ha propuesto que la desregulación de CTCF podría llevar al silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores y contribuir a la tumorigénesis. CTCF no actuaría solamente en contra de la metilación del DNA sino también en otras modificaciones epigenéticas relacionados con silenciamiento génico como la modificación post-traducciona de histonas (Schatten, 2008).

2.8.1.2 PAPEL DE CTCF EN EL RECLUTAMIENTO DE KDM4A.

Por otra parte, la proteína de CTCF puede homodimerizarse, para organizar estructuras cromatínicas de orden superior conocidas como asas de cromatina o “loops”, también es capaz de heterodimerizarse con un numeroso grupo de proteínas, entre las que destacan proteínas de unión a DNA como YY1; proteínas multifuncionales como PARP1; y proteínas asociadas a cromatina como CHD8, SIN3A y desacetilasas de histonas (Ladomery y Delleire 2002, Caiafa, Zlatanova 2009, Fig. 4). La formación de los homodímeros de CTCF es dependiente de los dedos de zinc, mientras que la asociación con otras proteínas depende de tanto la interacción de diversas proteínas con los dedos de zinc como con los extremos amino y carboxilo (Caiafa y Zlatanova 2009).

También, se ha postulado que en células madre embrionarias, la unión de la desmetilasa de DNA conocida como TET1 promueve la conversión de la 5-meti-citocina

a 5- Hidroximetil-citosina, y se ha propuesto que esta conversión permite la unión de CTCF, esto nos podría indicar que existe una posible interacción entre las desmetilasas de DNA y CTCF (Teif *et al.*, 2014). Además, estudios recientes, muestran que la unión de CTCF a una región heterocromatinica, promueve la rápida desmetilación de H3K27me3, sugiriendo que CTCF pudiera reclutar *in vivo* desmetilasas de histonas (Weth *et al.* 2014), adicionalmente, estudios *in vitro* mostraron que la capacidad de desmetilación de KDM4A se incrementa en presencia de CTCF hasta en un 80% (Jeong *et al.* 2011), sugiriendo que *in vivo* pudiera existir alguna interacción entre CTCF y KDM4A.

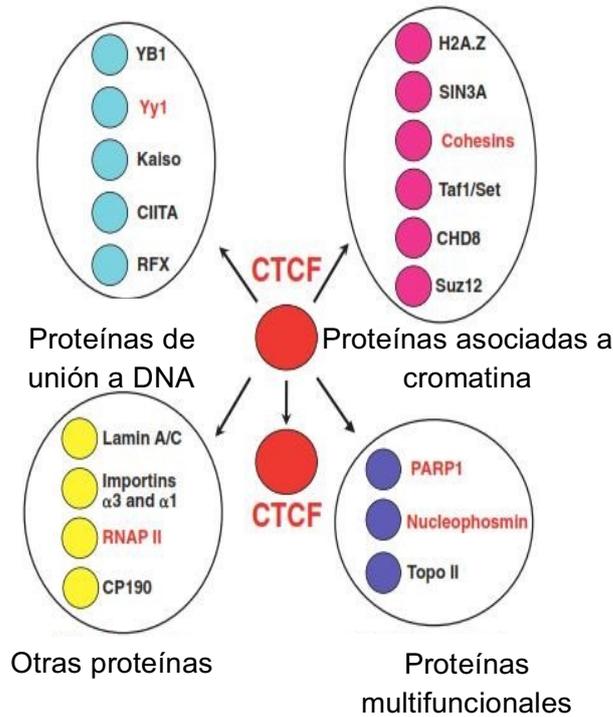


Figura 4: Interacciones de CTCF. Proteínas que interaccionan con CTCF agrupadas de acuerdo a su función. (Modificado de Caiafa, Zlatanova 2009).

Ya que CTCF puede interactuar con diversos remodeladores de la cromatina, resulta sumamente interesante considerar al factor nuclear CTCF como un posible mediador del reclutamiento de las desmetilasas de histonas, como KDM4A, a sus sitios blanco.

Asi mismo, se ha reportado que el 29% de los sitios de unión a CTCF están localizados en intrones, mientras que solo el 8% de esos sitios se han encontrado en promotores (Wang *et al.* 2012), ya que KDM4A está localizada en el primer intrón del gen CHD5, es probable que CTCF pueda estar mediando el reclutamiento de KDM4A a la región localizada a +741pb en el gen CHD5.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es el papel de CTCF en el reclutamiento de la desmetilasa de histonas KDM4A en un modelo de cáncer de mama?

4. HIPÓTESIS

El factor nuclear CTCF funciona como una proteína guía en el reclutamiento de la desmetilasa de histonas KDM4A en la región situada a +741 pb en *CHD5*.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de CTCF en la función y reclutamiento de la desmetilasa de histonas KDM4A.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

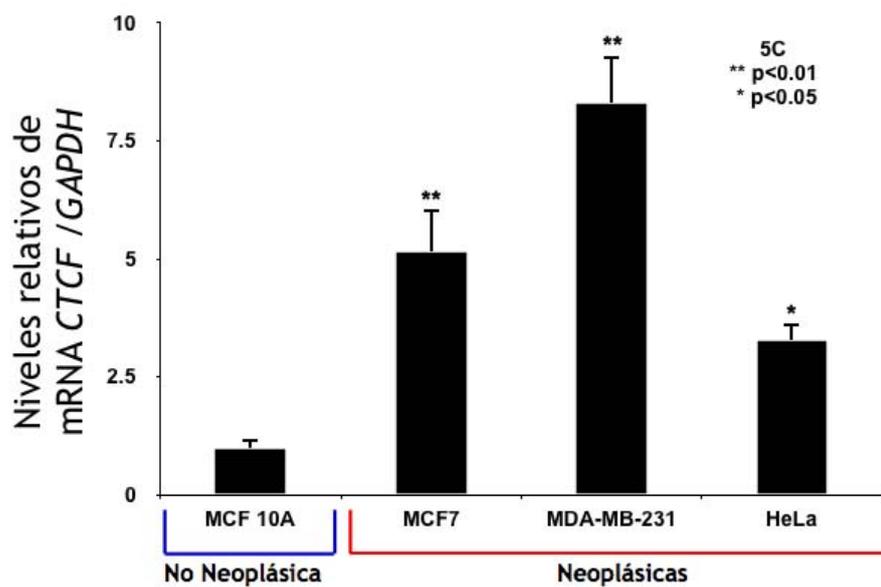
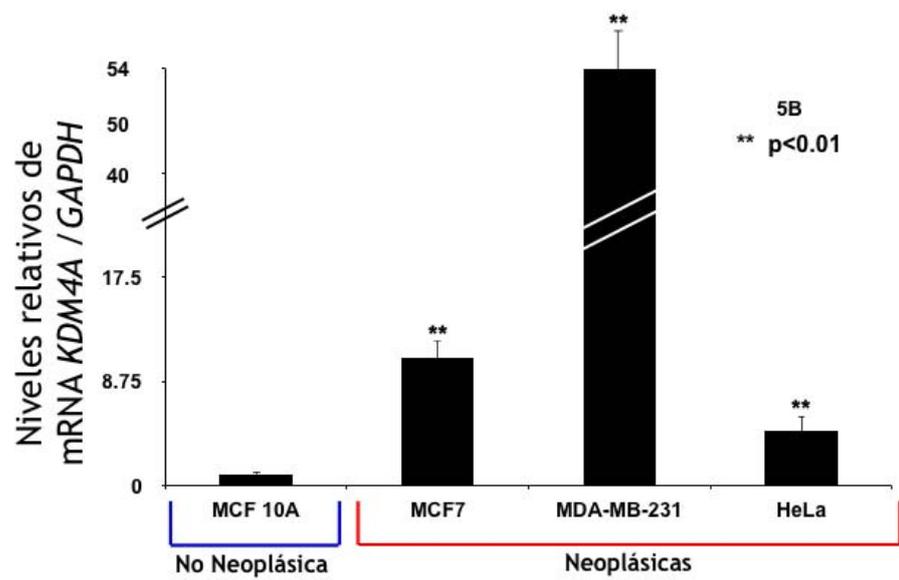
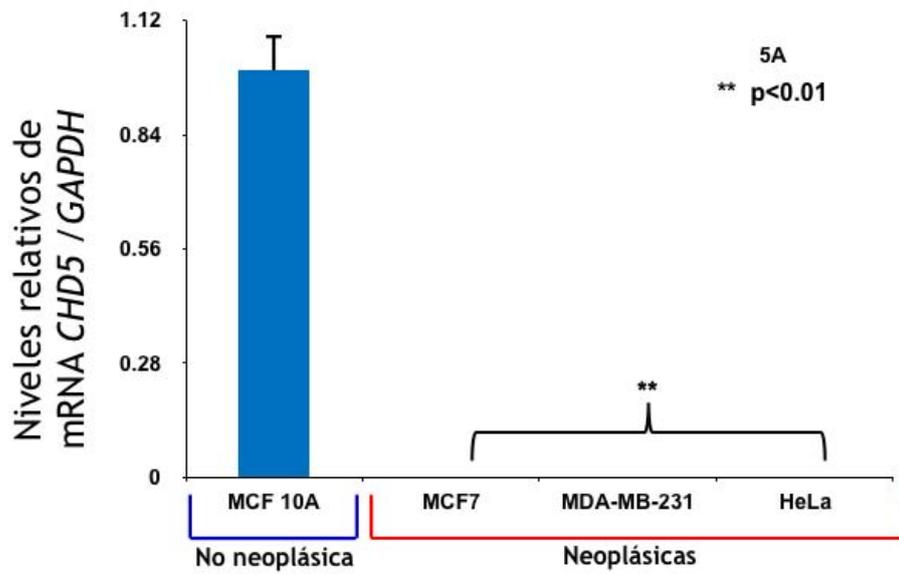
1. Determinar los patrones de expresión de *CHD5*, *KDM4A* y *CTCF* en líneas celulares derivadas de cáncer de mama y una no neoplásica.
2. Caracterizar la presencia, localización de KDM4A, CHD5 y CTCF en líneas celulares derivadas de cáncer de mama y una no neoplásicas.
3. Determinar la posible interacción de CTCF y KDM4A en los modelos celulares propuestos.
4. Determinar el efecto que tiene la presencia CTCF y KDM4A sobre las modificaciones postraduccionales de las histonas H3K36me3, H3K36me2, H3K9me3 y H3K9me2, en los modelos celulares

6. RESULTADOS

6.1 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES mRNA DE *CHD5*, *KDM4A* Y *CTCF* EN LÍNEAS CELULARES DE ESTIRPE MAMARIO

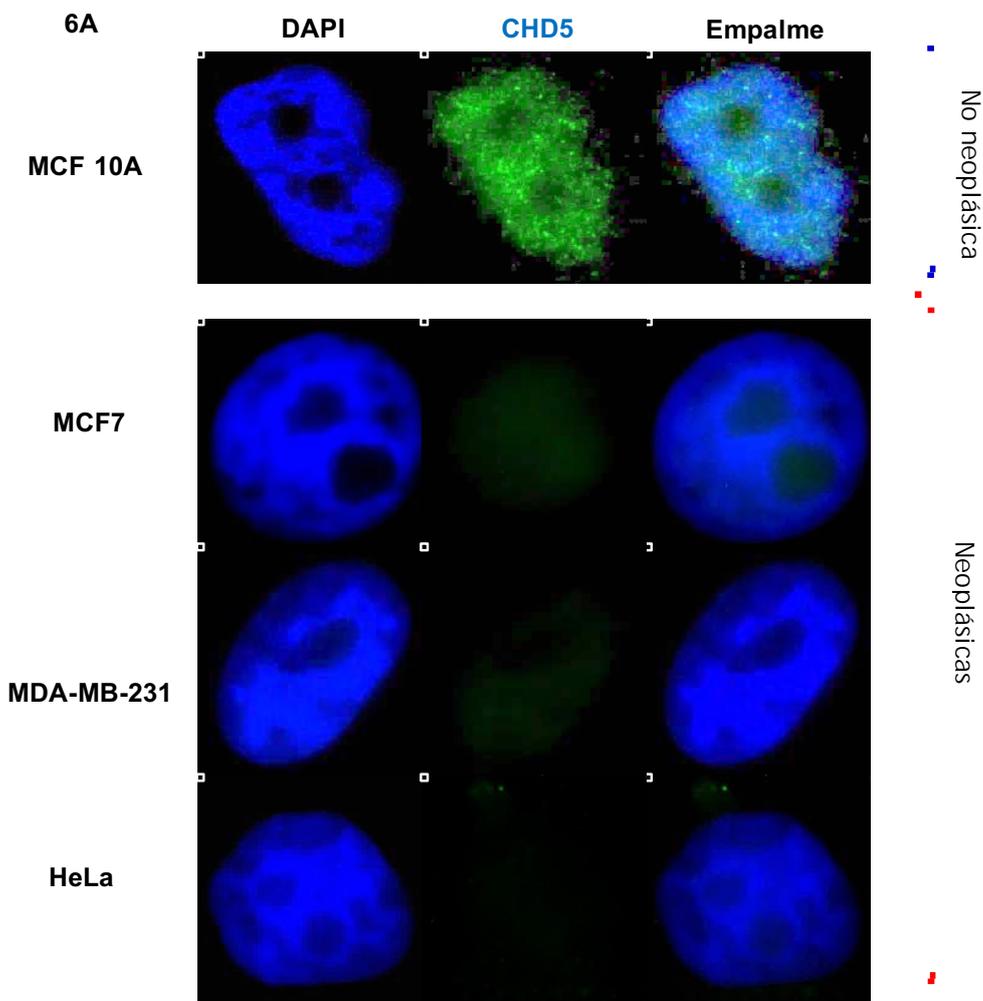
Con el fin de conocer los niveles de mRNA de *CHD5*, *KDM4A* y *CTCF* se realizó una retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR) en las líneas celulares neoplásicas de mama MCF7 y MDA-MB-231. Como control positivo se empleó la línea celular HeLa la cual previamente se ha reportado que sobre-expresa al gen *KDM4A* (Zhang *et al.* 2005). Se utilizó a *GAPDH* como control de expresión constitutiva y los datos fueron normalizados con respecto a la línea celular no neoplásica MCF 10A. Para *CHD5*, encontramos que hay una expresión basal en las líneas celulares neoplásicas, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa en comparación con la línea celular no neoplásica (Fig. 5A). Para *KDM4A*, los resultados mostraron que las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 presentan un incremento significativo de 10.77 ± 1.38 y 54 ± 11.55 veces, respectivamente, en los niveles de mRNA de *KDM4A* comparándolas con MCF 10A. A su vez, se observa que la línea celular derivada de cáncer cervico-uterino, HeLa, mostró un nivel de mRNA de *KDM4A* 5.63 ± 1.18 veces mayor en comparación con la línea MCF 10A (Fig. 5B). En el caso de *CTCF*, los resultados mostraron que las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 presentan un incremento significativo de 5.16 ± 0.88 y 8.29 ± 1 veces, respectivamente, en la expresión de *CTCF* comparando con MCF 10A, también se observa que la línea celular, HeLa, mostró un nivel de expresión de *CTCF* 3.28 ± 0.33 veces mayor en comparación con la línea MCF 10A la cual presenta una subexpresión (Fig. 5C). Estos resultados sugieren que los genes *CTCF* y *KDM4A* se sobre-expresan en líneas celulares de neoplásicas mientras que en la línea MCF 10A hay una expresión basal, en contraste para el gen *CHD5* encontramos el fenómeno contrario, la sub-expresión en las líneas celulares neoplásicas en comparación con la línea celular no neoplásicas. Conjuntando los datos, indican que hay una relación entre altos niveles de mRNA de *KDM4A* y *CTCF* y bajos niveles de *CHD5*.

Figura 5. Evaluación de los niveles de expresión por medio de RT-qPCR de *CHD5* (A), *KDM4A* (B) y *CTCF* (C) en líneas celulares neoplásicas y no neoplásicas. Los niveles de mRNA de *CHD5*, *KDM4A* y *CTCF* se normalizaron con respecto a la línea celular MCF 10A a la cual asignamos un valor relativo de 1. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ con respecto a la línea celular MCF 10A, como prueba estadística se utilizó *t*- student.



6.2 ESTUDIO DE LA PRESENCIA, LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CHD5, KDM4A Y CTCF EN LÍNEAS CELULARES NEOPLÁSICAS Y UNA NO NEOPLÁSICA.

Para de determinar la presencia y localización de las proteínas CHD5, KDM4A y CTCF en líneas celulares neoplásicas y no neoplásicas se realizaron ensayos de inmunofluorescencias (IF). Los resultados mostraron que la proteína CHD5 se encuentra en el núcleo de la línea celular MCF 10A mientras que no se detectó en las líneas celulares neoplásicas (Fig. 6A). Por el contrario KDM4A se observa principalmente en el núcleo y citoplasma de las células neoplásicas, MCF7, MDA- MB-231, y solamente en el núcleo de las células HeLa, comparando con la línea celular MCF 10A no se detectó esta desmetilasa (Fig. 6B). En el caso de CTCF, se encontró que este factor nuclear está localizado en el núcleo de todas las líneas celulares (Fig. 6C). Estos datos sugieren una relación entre la presencia de KDM4A y la ausencia de CHD5.



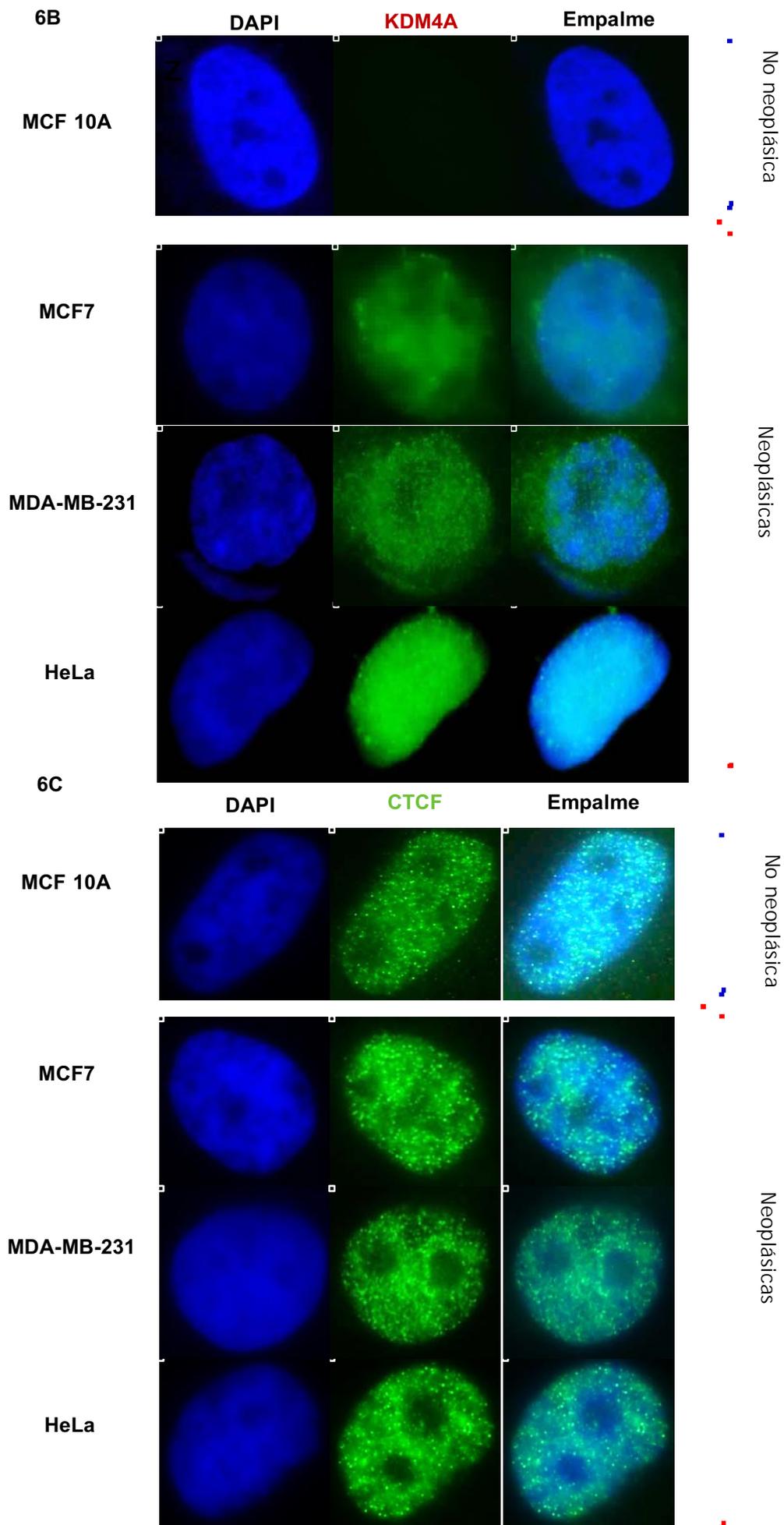
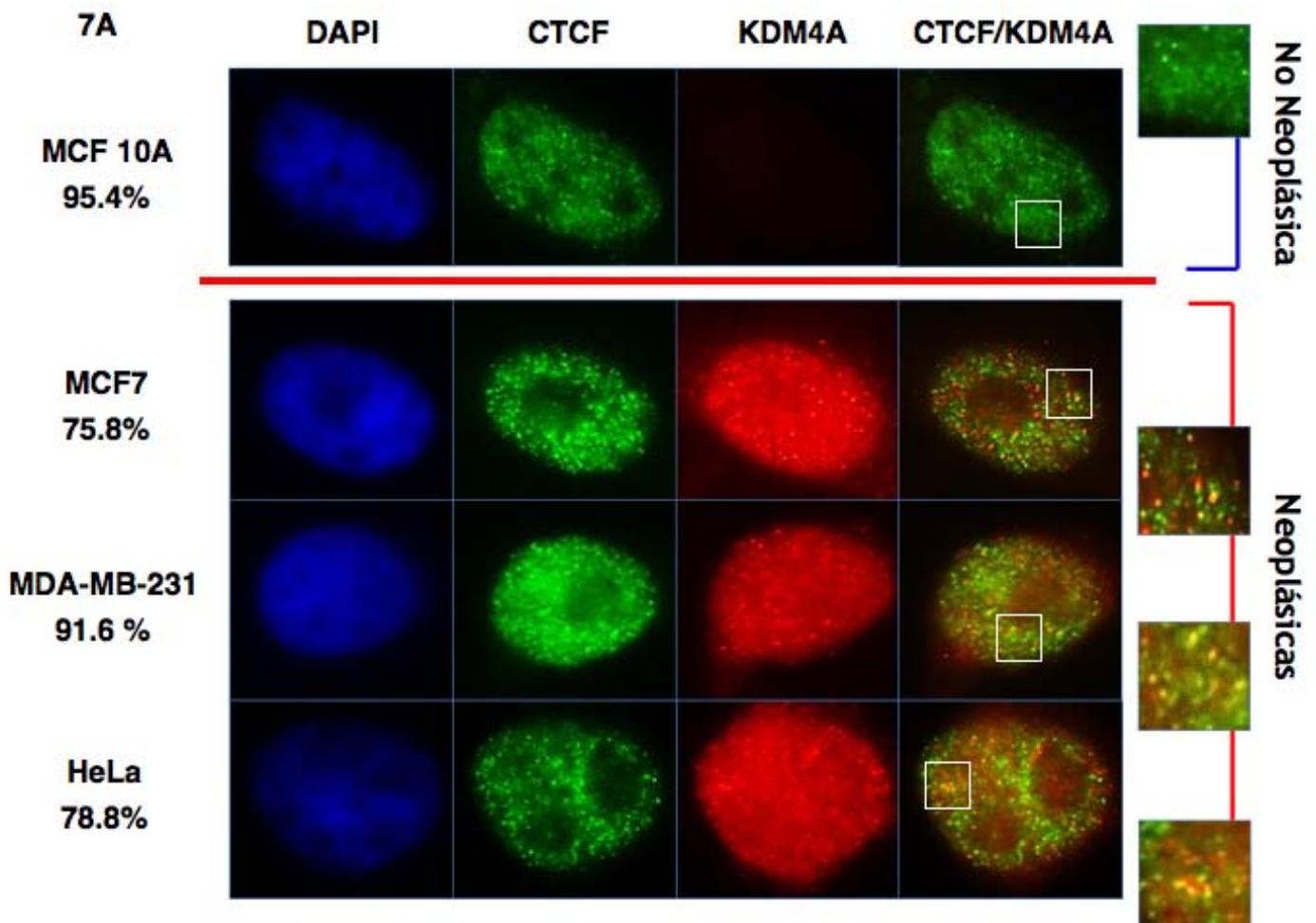


Figura 6. presencia y la localización por inmunofluorescencias, de la helicasa CHD5, la desmetilasa KDM4A, y el factor nuclear CTCF en líneas celulares (MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231, HeLa) (100 aumentos, se usó el microscopio de Epifluorescencia Axiolmager.A2 marca Zeiss). Detección de la proteína CHD5 (Fig. 6A), de KDM4A (Fig. 6B) y de CTCF (Fig. 6c). En el panel de la izquierda se observa el núcleo de las distintas líneas celulares teñido con DAPI, en el panel central se observa la detección de CTCF mediante un anticuerpo primario monoclonal, el cual es específico para este factor y que fue detectado por un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (ALEXA 488). En el panel de la derecha se observa el empalme de las dos columnas anteriores.

6.3 EVALUACIÓN DE LA COLOCALIZACIÓN DE CTCF Y KDM4A EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ESTIRPE MAMARIO

Con la finalidad de determinar la posible co-localización de ambas proteínas, realice inmunofluorescencias dobles con anticuerpos dirigidos contra KDM4A y CTCF (Fig. 7A y 7B), los resultados mostraron que hay colocalización de ambas proteínas en las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa, en algunos *loci*. Este fenómeno no fue encontrado en la línea celular MCF 10A ya que en esta línea no está presente KDM4A.



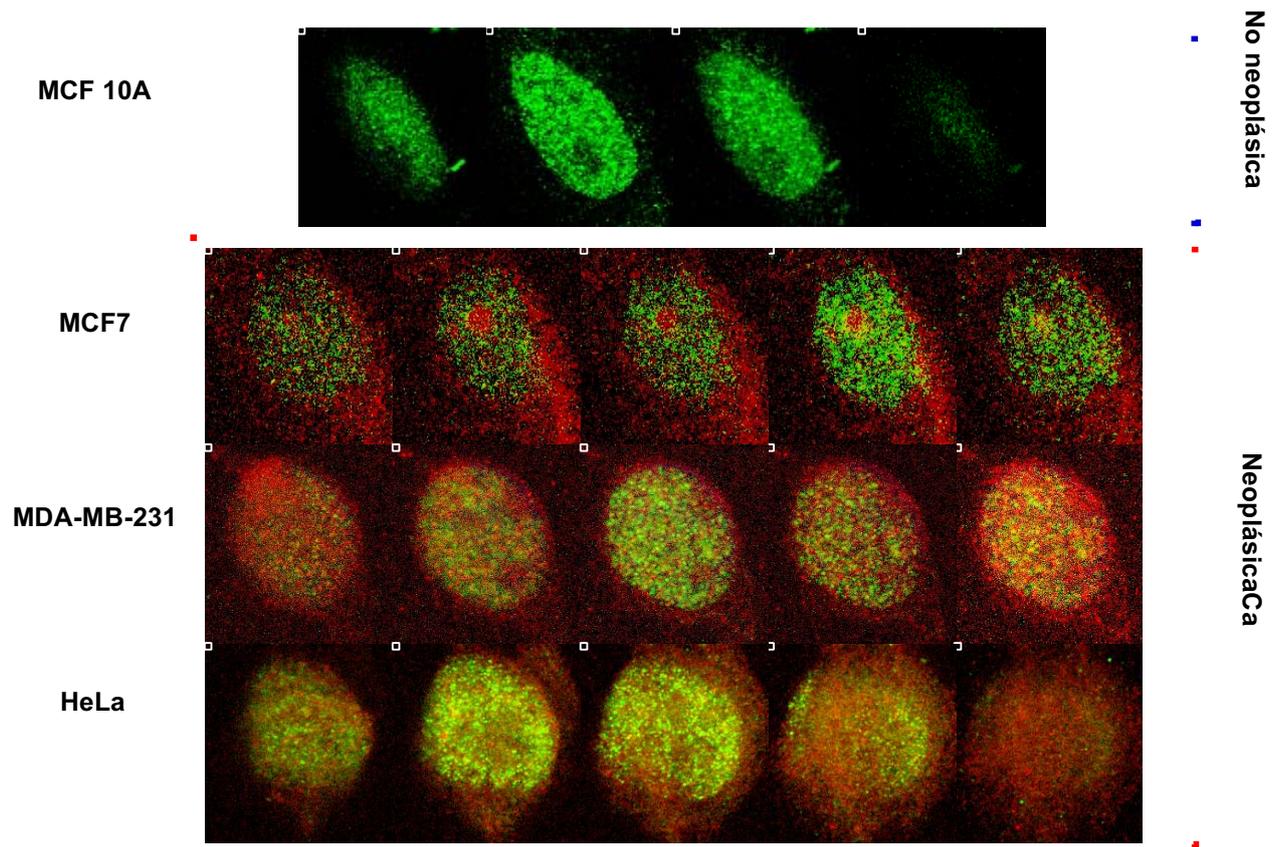


Figura 7. Detección de la presencia y la localización por inmunofluorescencias dobles, del factor nuclear CTCF y de la desmetilasa de histonas KDM4A en las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa y una no neoplásica MCF 10A (100 aumentos, se usó el microscopio de Epifluorescencia Axiolmager.A2 marca Zeiss). (7A) Microscopía de epifluorescencia, en el panel de la izquierda se observa el núcleo celular teñido con DAPI, en segundo panel de izquierda a derecha, se observa la detección de CTCF, en el tercer panel observamos la detección de KDM4A. En el siguiente panel se muestra el empalme de KDM4A y CTCF. Los porcentajes se obtuvieron por medio del conteo de 100 células por laminilla. (7B) Microscopía confocal, cortes en Z de las inmunofluorescencias dobles, en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa, sólo se muestra el empalme de las señales pertenecientes a CTCF en verde y a KDM4A en rojo.

6.4 ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE KDM4A, CTCF EN LA REGIÓN +741PB EN EL GEN CHD5.

Actualmente, esta poco claro cuales son los mecanismos de reclutamiento de las desmetilasas de histonas como KDM4A, son dirigidas a sus sitios blanco, uno de los candidatos potenciales podría ser el factor nuclear CTCF, se ha postulado que en células madre embrionarias, la unión de la desmetilasa de DNA conocida como TET1 promueve la conversión de la 5-meti-citocina a 5- Hidroximetil-citosina, y se ha propuesto que esta conversión permite la unión de CTCF, esto nos indica que existe una posible interacción entre las desmetilasas de DNA y CTCF (Teif *et al.*, 2014). Estudios recientes, muestran que la unión de CTCF a una región heterocromatínica, promueve la rápida desmetilación de H3K27me3, sugiriendo que CTCF pudiera reclutar *in vivo* desmetilasas de histonas (Weth

et al. 2014), adicionalmente, estudios *in vitro* mostraron que la de desmetilación de KDM4A se incrementa en presencia de CTCF hasta en un 80% (Jeong *et al.* 2011), sugiriendo que *in vivo* pudiera existir alguna interacción entre CTCF y KDM4A.

Con el objetivo de determinar la posible relación entre CTCF y KDM4A se realizaron ensayos de ChIP, en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. Los resultados revelaron que en las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa, la localización del factor nuclear CTCF coincide con la presencia de KDM4A, en la región situada a +741pb con respecto al TSS de *CHD5*, contrario a lo observado en MCF 10A donde no se encontraron ni KDM4A ni CTCF (Figura 8). Los datos obtenidos proponen que hay una relación entre KDM4A y CTCF, y que posiblemente CTCF esté mediando el reclutamiento de la desmetilasa de histonas KDM4A a su sitio blanco en el gen *CHD5*.

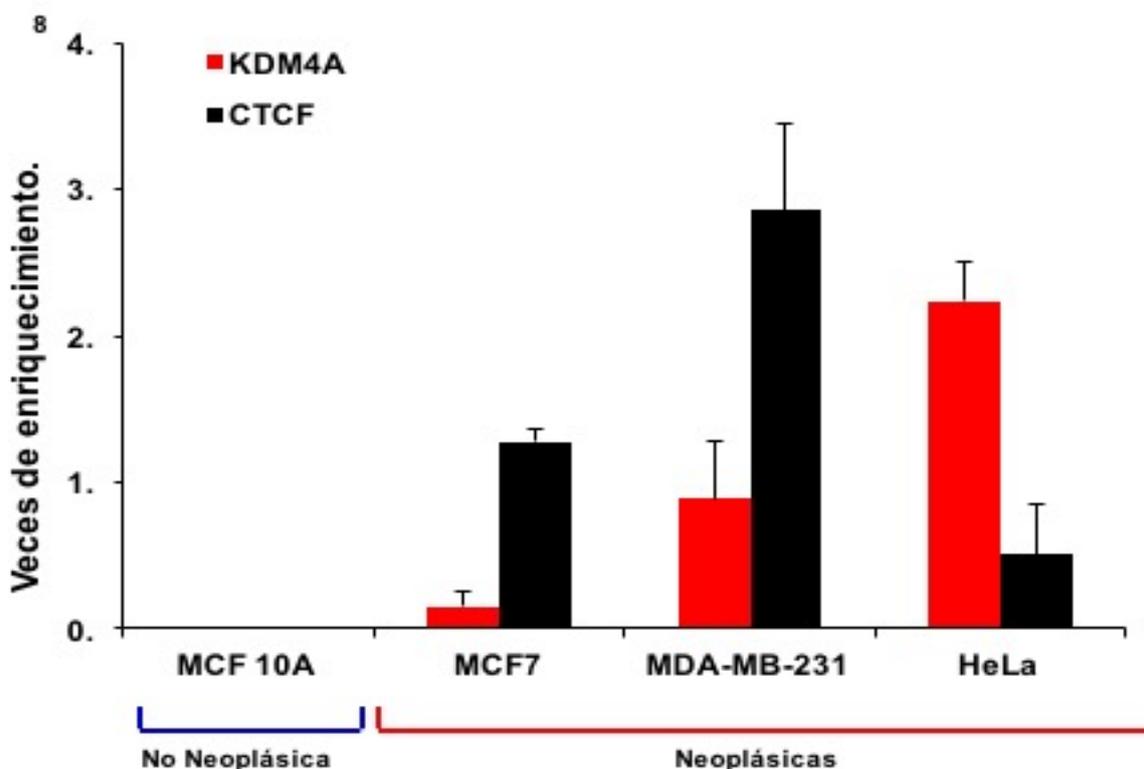


Figura 8: Análisis de la presencia de KDM4A y CTCF en la región localizada a +741pb con relación TSS del gen *CHD5*. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de la región +741 pb en *CHD5*, en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. Los resultados se presentan en veces de enriquecimiento de las inmunoprecipitaciones con respecto al anticuerpo inespecífico (IgG). Las barras negras indican la inmunoprecipitación de CTCF y las rojas la inmunoprecipitación de KDM4A. Los resultados se normalizaron con respecto al valor de IgG de cada línea celular.

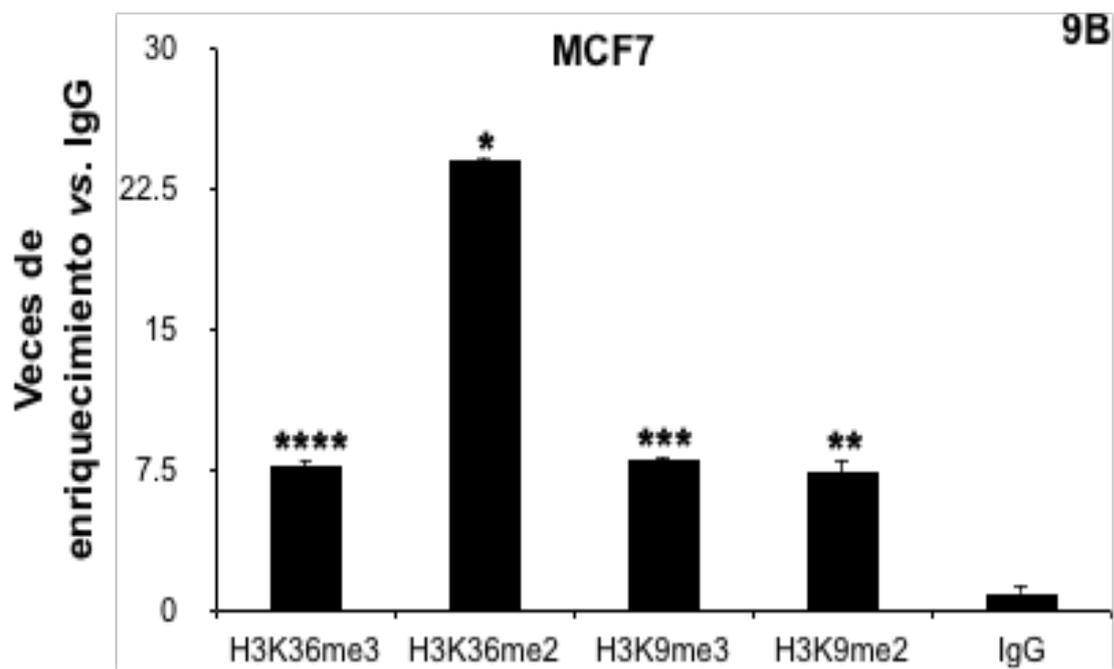
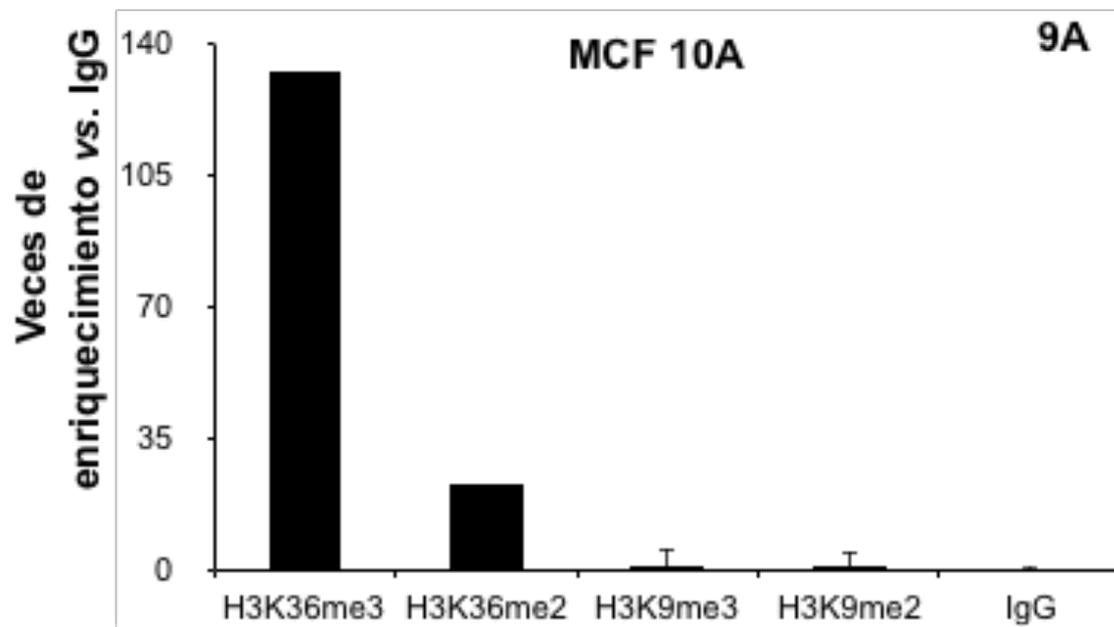
7.5 ANÁLISIS LOCAL DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS H3K9me3/2 y H3K36me2 EN LA REGIÓN +741pb EN EL GEN *CHD5*.

Estudios recientes llevados a cabo en la línea celular derivada de osteosarcoma U2OS, indican que *CHD5* es un gen blanco de esta desmetilasa, la cual se une a la región localizada a +741 pb con respecto al TSS de *CHD5* (Malette y Richard 2012); el abatimiento de esta KDM4A provoca un aumento en la expresión de *CHD5* en la línea celular de osteosarcoma U2OS sugiriendo que dicha desmetilasa se relaciona con la represión de dicho gen (Malette y Richard 2012); sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual KDM4A regula negativamente a *CHD5*.

Por lo tanto con el objetivo de analizar el efecto de la presencia de KDM4A y CTCF en la región localizada a +741 pb en el gen *CHD5*, para ello se analizaron mediante ChIP, las modificaciones de las histonas H3K36me3/2 y H3K9me3/2. en las líneas celulares neoplásicas MCF7, MDA-MB-231 y HeLa, y la línea celular no neoplásica MCF 10A. Las inmunoprecipitaciones se evaluaron por medio de qPCR, los datos obtenidos están reportados en veces de enriquecimiento de las inmunoprecipitaciones con respecto al IgG.

En la línea celular no neoplásica MCF 10A, las modificaciones H3K9me3 y H3K9me2 se presentan poco enriquecidas con respecto a las líneas celulares neoplásicas, lo cual apunta que la conformación de la cromatina en dicha región es laxa. También, se observó el enriquecimiento de H3K36me3 con respecto a H3K36me2 lo cual pudiera relacionarse con una mejor procesividad de la RNA Polimerasa II (Fig. 9A).

En cuanto a las líneas celulares neoplásicas (Fig. 10B, 10C y 10D), la presencia de CTCF y KDM4A coincide con la disminución de las modificaciones H3K36me3 y H3K9me3 en comparación con las formas dimetiladas esto sugiere que KDM4A pudiera estar desmetilando a los residuos trimetilados. También se observa un enriquecimiento de las modificaciones represivas H3K9me3 y H3K9me2, lo cual sugiere que la cromatina de esta región se encuentra transcripcionalmente inactiva además la pérdida de H3K36me3 pudiera alterar la elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II.



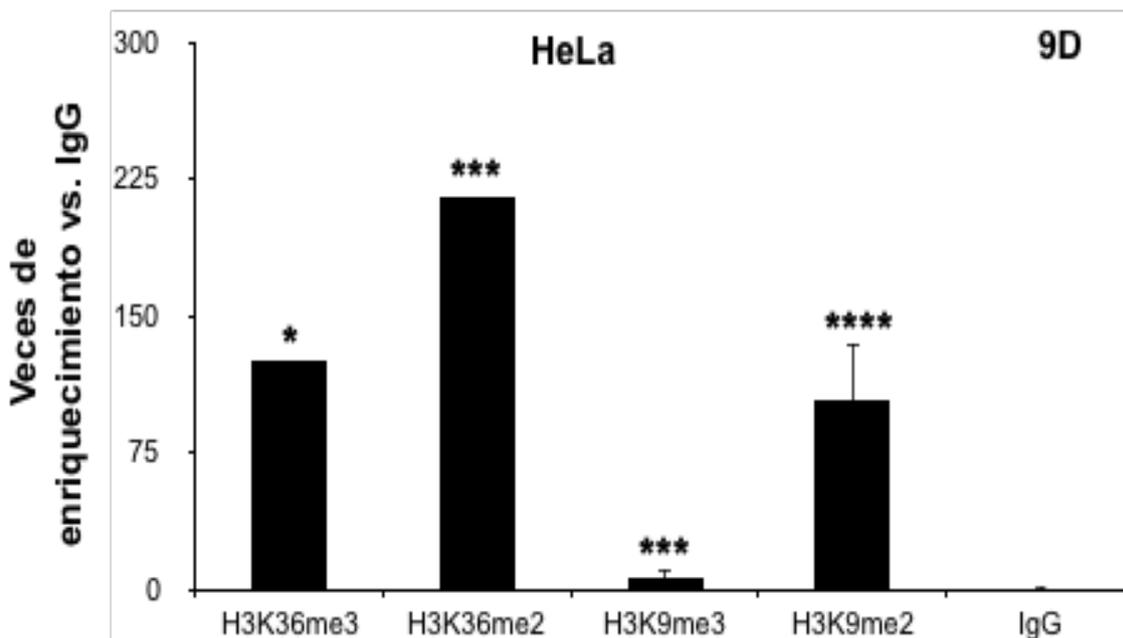
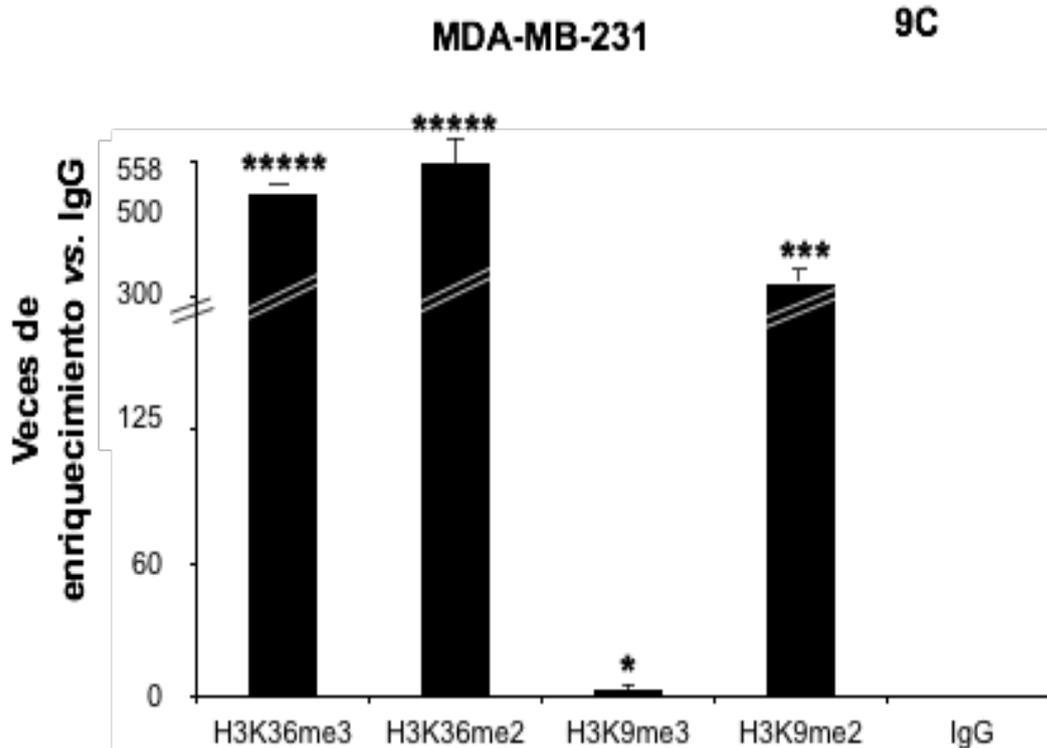


Figura 9: Análisis local de la presencia de las modificaciones postraduccionales de las histonas H3K36me3/2 y H3K9me3/2 en la región localizada a +741pb con relación al TSS del gen *CHD5*. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de la zona situada a +741pb en *CHD5*, en las líneas celulares MCF 10A (A), MCF7 (B), MDA-MB-231 (C) y HeLa (D). Se realizó una inmunoprecipitación de la cromatina en contra de H3K36me3, H3K36me2, H3K9me3 y H3K9me2. H3K36me3 se asocia con la elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II, H3K36me2 está relacionada con la alteración de la procesividad de la RNA polimerasa II y H3K9me3/2 están relacionadas con heterocromatina. Como control de las inmunoprecipitaciones se utilizó el anticuerpo inespecífico IgG. El enriquecimiento que se observa por arriba del anticuerpo igG se considera como inmunoprecipitación significativa. (*) p 0.5 (**), p <0.005, (***) p 0.0005 (****), p <0.00005, (*****), p 0.000005, Comparado con la línea celular MCF 10A, las diferencias estadísticas fueron determinadas por una prueba *t* de Student.

7.DISCUSIÓN

En eucariontes, la estructura de la cromatina tiene varias funciones, entre ellas regula el acceso de la maquinaria transcripcional a diversos elementos genéticos, teniendo un papel importante en la regulación de la expresión génica en un tiempo, espacio y tejido determinados. La relajación o compactación de la cromatina es controlada, por varios componentes, entre ellos la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas, entre otros (Jenuwein y Allis 2001; Teperino *et al.* 2013). En cáncer, la arquitectura de la cromatina se ve modificada tanto local como globalmente, y se ha propuesto que la desregulación de metilación y desmetilación de histonas esta involucrada en la alteración de la estructura de la cromatina (Cloos *et al.* 2008; Jovanovic *et al.* 2010).

Los distintos patrones de metilación y desmetilación de histonas contribuyen a regular la actividad transcripcional en un tiempo y espacio determinados, por lo que la desregulación en los genes que codifican para las enzimas que desmetilan a las histonas, entre otros eventos, pudiera derivar en el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Black *et al.* 2013), como ejemplo, se ha visto la sobreexpresión de *KDM4A* en diversos tipos de cáncer, entre ellos cáncer de mama, indicando que *KDM4A* pudiera estar involucrada en este tipo de cáncer neoplasia (Berry *et al.* 2012; Li *et al.* 2013).

La desmetilasa de histonas *KDM4A* remueve los grupos metilo de la lisina 9 (H3K9me3) y 36 (H3K36me3) de la histona 3. La modificación postraducciona H3K9me3/2 se encuentra asociada a la estructuración de heterocromatina vía el reclutamiento de la proteína de heterocromatina 1 (HP1) (Caro *et al.* 2012), mientras que la modificación H3K36me3 se relaciona con el proceso de elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II y con un estado de cromatina transcripcionalmente activa (Li *et al.* 2007; Vavouri y Lehner 2012). Entre los blancos génicos que se conocen de *KDM4A*, se encuentra el gen supresor de tumores *CHD5*.

CHD5 codifica para una enzima que pertenece a la familia de las helicasas (chromodomain helicase DNA-binding protein 5, por sus siglas en inglés) (Thompson *et al.* 2003), la proteína *CHD5* puede funcionar como supresora de tumores, ya que controla la proliferación, apoptosis y senescencia celular por la vía de p19^{Arf}/p53 (Bagchi, 2007; Serrano, 1997). *CHD5* regula de manera positiva a p19^{Arf}, que codifica para una proteína que secuestra a Mdm2 (Murine double minute 2), la cual se encarga de ubiquitinar a p53 para su posterior degradación. La deficiencia de p19^{Arf} y de *CHD5* compromete a p53 y sus

funciones de supresor de tumores tales como la inducción de senescencia (Bagchi, 2007; Serrano, 1997).

CHD5 se encuentra inactivado en varios tipos de cáncer (Wu *et al.* 2012). Hasta ahora se han encontrado 2 mecanismos de inactivación del gen *CHD5*: el primero es por un proceso genético donde se ha reportado la delección del gen en neuroblastomas, y el segundo es la hipermetilación del DNA del promotor, la cual se presenta en gliomas y cáncer colorrectal (Mulero-Navarro y Esteller 2008). En el caso de cáncer de mama, se ha detectado que la hipermetilación del DNA del promotor de esta helicasa es específica de tumor (Mulero-Navarro y Esteller 2008). Así mismo, se han encontrado bajos niveles de *CHD5* en tumores de mama en comparación con mama normal, lo cual relaciona con el desarrollo y progresión de este tipo de cáncer, este fenómeno se observa también en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF7, en ambas líneas celulares no hay delección del gen, y solo se encontró hipermetilación del promotor en la línea celular MDA-MB-231, sin embargo cuando tratan estas células con 5-azacitidina, no se reactiva por completo la expresión de *CHD5*; lo anterior sugiere que hay otros mecanismos diferentes de regulación del gen *CHD5* que no dependen del inicio de la transcripción (Mulero-Navarro y Esteller 2008).

En estos mecanismos alternativos pudiera estar involucrada la desmetilasa de histonas KDM4A, ya que un estudio previo reportó que KDM4A se une a la zona localizada +741 pb con respecto al TSS de *CHD5*. El abatimiento de esta desmetilasa provoca un aumento en la expresión de *CHD5* en la línea celular de osteosarcoma U2OS sugiriendo que dicha desmetilasa se relaciona con la represión de dicho gen (Mallette y Richard 2012); sin embargo, actualmente se desconoce el mecanismo por el cual KDM4A es reclutada a su sitio blanco +741 pb en *CHD5*. Estudios recientes proponen que los factores de transcripción pueden tener un papel importante en guiar a estas enzimas a sus sitios blanco en la cromatina. Particularmente se ha estudiado al factor CTCF, reportes *in vitro* mostraron que la capacidad de desmetilación de KDM4A se incrementa en presencia de CTCF hasta en un 80% (Jeong *et al.* 2011), sugiriendo que *in vivo* existe alguna interacción entre CTCF y KDM4A. Estudiamos a CTCF ya que hay evidencias que en células madre embrionarias, la unión de la desmetilasa de DNA conocida como TET1 promueve la conversión de la 5-metil-citocina a 5-Hidroximetil-citosina, y se ha propuesto que esta conversión permite la unión de CTCF, esto podría indicar que existe alguna interacción entre las desmetilasas de DNA y CTCF (Teif *et al.*, 2014), aunado a a esto, estudios recientes, muestran que la

unión de CTCF a una región heterocromatínica, promueve la rápida desmetilación de H3K27me3, sugiriendo que CTCF pudiera reclutar *in vivo* desmetilasas de histonas (Weth *et al.* 2014).

Resulta interesante considerar al factor nuclear CTCF como un posible mediador del reclutamiento de las desmetilasas de histonas, como KDM4A, a sus sitios blanco. El objetivo principal de este proyecto fue determinar el papel de CTCF en la función y reclutamiento de la desmetilasa de histonas KDM4A.

Con el fin de caracterizar nuestro modelo, se realizaron reacciones de retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR) en las líneas celulares neoplásicas de mama MCF7 y MDA-MB-231. Como control positivo se empleó la línea celular HeLa la cual previamente se ha reportado que sobreexpresa al gen *KDM4A* (Zhang *et al.* 2005). Se utilizó a *GAPDH* como control de expresión constitutiva y los datos fueron normalizados con respecto a la línea celular no neoplásica MCF 10A. *CHD5* se encontró sub-expresado en las líneas celulares neoplásicas, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa en comparación con la línea MCF 10A (Fig. 5A). Para *KDM4A* y *CTCF*, los resultados mostraron que las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y HeLa presentan un incremento en los niveles de mRNA de *KDM4A* y *CTCF* comparándolas con MCF 10A (Fig. 5B y 5C). Estos resultados proponen que los genes *CTCF* y *KDM4A* se sobreexpresan en líneas celulares neoplásicas mientras que en la línea MCF 10A hay una expresión basal, en contraste para el gen *CHD5* encontramos el fenómeno contrario, la sub-expresión en las líneas celulares neoplásicas en comparación con la línea celular no neoplásicas. Estos datos se ven reforzados con lo reportado en la literatura donde se ha observado que los niveles de mRNA de *KDM4A* son mayores en tumores y líneas celulares de cáncer de mama comparados con mama normal (Berry *et al.* 2012; LI *et al.* 2013) y proponen que KDM4A podría estar involucrada en el inicio o progresión del cáncer. Los datos obtenidos, indican que hay una relación entre altos niveles de mRNA de *KDM4A* y *CTCF* y bajos niveles de *CHD5*.

Con el objetivo de caracterizar la presencia y localización de las proteínas CHD5, KDM4A y CTCF, se llevaron a cabo ensayos de IF. Los resultados mostraron que la proteína CHD5 se encuentra en el núcleo de la línea celular MCF 10A, y no se detectó esta proteína en las líneas celulares neoplásicas (Fig. 6A). Por el contrario KDM4A se observa principalmente en el núcleo y citoplasma de las células neoplásicas, MCF7, MDA- MB-231, y solamente en el núcleo de las células HeLa, comparando con la línea celular MCF 10A no se detectó esta desmetilasa (Fig. 6B). Estudios recientes también han reportado la

localización de KDM4A en citoplasma, se demostró que KDM4A interacción con la maquinaria de traducción y regula la síntesis de proteínas (Van Rechem et al. 2015); así mismo, KDM4A esta involucrada en la dinámica microtubular, ya que al desmetilar la lisina 40 de los microtúbulos evita la despolimerización de los microtubulos (Datos no publicados Cheryl Walker 2015). Para CTCF, se encontró que este factor está localizado en el núcleo de todas las líneas celulares (Fig. 6C), estos datos están fortalecidos por los reportados en la literatura, los cuales demostraron la baja presencia de CHD5 en diversas líneas celulares neoplásicas comparadas con células no neoplásicas (Mulero-Navarro y Esteller 2008).

Los resultados obtenidos del análisis de los niveles de mRNA y de los ensayos de IF de CHD5, KDM4A y CTCF, indican una relación inversa entre altos niveles de mRNA tanto de KDM4A y CTCF y bajos niveles de CHD5, además existe una asociación entre la presencia de KDM4A y la ausencia de CHD5.

Para conocer si existe o no colocalización de CTCF y KDM4A, realizamos IF dobles con anticuerpos dirigidos contra KDM4A y CTCF (Fig. 7A y 7B), los resultados obtenidos por microscopía de epifluorescencia y microscopio confocal mostraron que hay colocalización de ambas proteínas en algunos *loci* en más del 75% de las tres líneas celulares neoplásicas, este fenómeno se presentó en más del 50 % de las células, sin embargo no fue encontrado en la línea celular MCF 10A ya que en esta línea no está presente KDM4A.

Para determinar si CTCF y KDM4A pudieran estar ocupando la región localizada a +741 pb del TSS de *CHD5* se realizaron ensayos de ChIP para todos los modelos de estudio. De manera interesante, se encontró que la presencia de KDM4A en la región situada a +741pb en *CHD5* coincide con la presencia de CTCF en la misma región, en las líneas celulares neoplásicas mas no en MCF 10A. Esto pudiera sugerir una posible interacción entre CTCF y KDM4A (Figura 8). Existen pocos estudios donde se ha reportado que CTCF puede actuar como un represor transcripcional. Se han propuesto varios mecanismos, uno de ellos es la asociación con el co-represor SIN3A y HDACs (Lutz *et al.* 2000). Por otro lado *c-MYC*, *Bax*, *hTERT*, son ejemplos de genes que están regulados de manera negativa por la unión de CTCF-P (CTCF- fosforilado) a regiones localizadas río abajo del TSS. Esta unión impide el reconocimiento de diversos factores de transcripción (Filippova *et al.* 1996; Renaud *et al.* 2005; Méndez-Catalá *et al.* 2013). También, hay evidencias de que la represión de los genes ribosomales, depende, en parte, de la poli-ADP-ribosilación de CTCF, modificación postraducciona que ayuda en a la translocación

de CTCF en el nucléolo y se ha sugerido que CTCF-poli-ADP-ribosilado reprime la transcripción del rDNA (Torrano *et al.* 2006; Caiafa y Zlatanova 2009). Otros estudios han demostrado que CTCF juega un papel muy relevante en la inactivación del cromosoma X, ya que se une al promotor del RNA no codificante *Jpx*, la transcripción de *Jpx* es indispensable para la transcripción de *Xist* el cual es necesario para llevar a cabo la inactivación del cromosoma X en hembras (Sun *et al.* 2013).

Aunado a esto, estudios recientes, muestran que la unión de CTCF a una región heterocromatínica, promueve la rápida desmetilación de H3K27me₃, sugiriendo que CTCF pudiera reclutar *in vivo* desmetilasas de histonas (Weth *et al.* 2014). En el 2014 el grupo de Liu reportó que CTCF y KDM5B, (también conocida como JARID1B) forman un complejo, y que la formación de este complejo conlleva a una disminución de H3K4me₃ (Yamamoto *et al.* 2014). Adicionalmente, estudios *in vitro* mostraron que la capacidad de desmetilación de KDM4A se incrementa en presencia de CTCF hasta en un 80% (Jeong *et al.* 2011), sugiriendo que *in vivo* pudiera existir alguna interacción entre CTCF y KDM4A.

Con la finalidad de analizar la presencia de las modificaciones H3K9me₃, H3K36me₃, H3K9me₂ y H3K36me₂ a nivel celular, (ver información suplementaria), se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en las líneas celulares neoplásicas MDA-MB-231, MCF7, HeLa y en la línea celular no neoplásica, MCF 10A. Los resultados sugieren que no hay cambios en la presencia de las modificaciones postraduccionales de las histonas relacionadas con KDM4A, lo cual propone que estos cambios pudieran presentarse a nivel local.

Con el propósito de evaluar el efecto de la presencia de CTCF y KDM4A en la región localizada a +741 pb del TSS de *CHD5*, se procedió a realizar ensayos de ChIP en líneas celulares MCF10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa (Fig. 9A, 9B, 9C, 9D).

La presencia de KDM4A y CTCF *in vivo* en la región localizada a +741 pb en el gen *CHD5* coincidió con la disminución de la modificación postraducciona H3K36me₃ en comparación con H3K36me₂ en las líneas celulares neoplásicas MCF7 (9B) y HeLa (9D) en comparación de MCF 10A (9A), se observaron altos niveles de H3K36me₃ y H3K36me₂ en la línea neoplásica MDA-MB-231 (9C), en comparación con la línea celular MCF 10A. Estos datos indican que KDM4A se encuentra desmetilando sus sustratos.

En cuanto a las modificaciones H3K9me_{3/2}, estas se encontraron enriquecidas en las líneas celulares neoplásicas. Estas modificaciones se asocian con represión

transcripcional y heterocromatina (Hahn *et al.* 2011, Lienert *et al.* 2011, Caro *et al.* 2012), sin embargo en MCF 10A se encontraron niveles muy bajos (alrededor de 1.2 veces de enriquecimiento) de estas modificaciones, lo cual sugiere que la cromatina en la región localizada a +741 pb en *CHD5* de las células neoplásicas se encuentra estructurada en heterocromatina y no así para la línea celular no neoplásica MCF 10A. Por otro lado, se distingue una disminución de H3K9me3 con respecto H3K9me2 en las líneas celulares MDA-MB-231 y HeLa (Fig. 9D y 8E), estos resultados apuntan a que KDM4A pudiera estar desmetilando de trimetilado a dimetilado (Chen *et al.* 2006; Huang *et al.* 2006; Whetstone *et al.* 2006).

Conjuntando los resultados obtenidos; en la línea celular MCF 10A (Fig. 9A y 8) no se encuentran ni KDM4A ni CTCF y a su vez, las modificaciones represivas H3K9me3 y H3K9me2 se encuentran muy poco enriquecidas en comparación con las células neoplásicas (1.26 y 1.20 veces de enriquecimiento respectivamente). Así mismo, H3K36me2 se encuentra en un valor menor, 22.84 veces de enriquecimiento, con respecto a las células neoplásicas, por el contrario se encontró enriquecida alrededor de 132 veces H3K36me3, modificación que esta asociada con el proceso de elongación de la transcripción por RNA polimerasa II. Estos datos sugieren que la cromatina de esta región está transcripcionalmente activa y correlacionan con la presencia del transcrito de *CHD5* y de la proteína CHD5 en el núcleo de MCF 10A.

En la línea celular MCF7 (Fig. 9B y 8) se encontraron a KDM4A y CTCF ocupando la región localizada a +741 pb en el gen *CHD5*, esto correlacionó con un incremento en los niveles de H3K9me3 (8.14 veces de enriquecimiento) con respecto a H3K9me2 (7.51 veces de enriquecimiento), éstos datos pudieran ser interpretados como una desmetilación de H3K9me2 a la forma monometilada, H3K9me1. Este mecanismo podría estar mediado por enzimas que sean capaces de desmetilar H3K9me2 como las desmetilasas KDM3A y KDM1 (Kuroki *et al.* 2013, Metzger *et al.* 2005). A su vez, H3K36me2 se encuentra enriquecida 24.10 veces y H3K36me3 7.86 veces. Estos resultados proponen que la cromatina de esta región se encuentra transcripcionalmente inactiva donde la pérdida de H3K36me3 altera la elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II, sugiriendo que la ausencia de tanto la proteína como el transcrito CHD5 en MCF7 puede ser debido a éste mecanismo.

En la línea celular derivada de cáncer de mama MDA-MB-231 (Fig. 9C y 8), se encontró a KDM4A y CTCF en la región localizada a +741 pb en el gen *CHD5*, las

modificaciones represivas H3K9me3 y H3K9me2 (con 4.38 y 267.86 veces de enriquecimiento), se observó un aumento de las modificaciones H3K36me3 y H3K36me2 (con 526.08 y 559.64 veces de enriquecimiento) con respecto a MCF 10A, la disminución de los niveles de transcrito y de proteína CHD5, puede ser posible debido a la presencia de modificaciones de represión (como H3K9me3, H3K9me2 y la hipermetilación del promotor; (Mulero-Navarro y Esteller 2008).

Finalmente, en la línea celular HeLa (Fig. 9D y 8) encontramos a KDM4A y CTCF en la región localizada a+741 pb en el gen *CHD5*, las modificaciones represivas H3K9me3 y H3K9me2 (con 7.33 y 104.67 veces de enriquecimiento), H3K36me3 en un valor menor (125.59 veces de enriquecimiento) que H3K36me2 (214.54 veces), esto nos indica que la cromatina de esta región se encuentra transcripcionalmente inactiva, y se relaciona con la ausencia de CHD5 en la línea celular HeLa.

Los datos obtenidos aquí se ven reforzados por la literatura ya que un estudio reciente, demostró que KDM4A media la desmetilación de H3K36me3, provocan la pérdida de reclutamiento de la RNA pol II en regiones transcritas del gen, característico de astrocitos, GFAP, de esta manera regulan la diferenciación de los astrocitos controlando diferencialmente la elongación de la transcripción por la RNA pol II (Cascante *et al.* 2014).

Nuestros datos indica que el factor nuclear CTCF funcionara como un regulador negativo de la expresión del gen *CHD5*, donde el posible mecanismo de CTCF seria inhibir la transcripción vía la interacción con la desmetilasa de histonas KDM4A, alterando así la procesividad de la RNA Polimerasa II.

8. CONCLUSIONES

- Los genes *KDM4A* y *CTCF* se encuentran sobre-expresados en líneas celulares neoclásicas en comparación con una línea celular no neoplásica.
- El gen *CHD5* se encuentra subexpresado en las líneas neoplásicas en comparación con la línea celular no neoplásica.
- Las tres proteínas presentaron una localización nuclear, *KDM4A* se encontró en las líneas celulares neoplásicas mas no en MCF 10A, en el caso de la proteína *CHD5* encontramos el fenómeno contrario, sugiriendo una relación entre la presencia de *KDM4A* y la disminución de *CHD5*.
- Hay un aumento de H3K36me2, H3K9me3 y H3K9me2 en las líneas celulares neoplásicas, cuando lo comparas con una línea celular no neoplásica.
- Se encontró la colocalización de *KDM4A* y *CTCF* en las células MCF7, MDA-MB-231 y HeLa mas no en MCF 10A, tanto por microscopía confocal como de epifluorescencia.
- Observamos que hay una relación entre la presencia de *CTCF* y *KDM4A* en el primer intron del gen *CHD5*, esto indica que el que el factor nuclear *CTCF* puede tener un papel relevante en el reclutamiento y función de *KDM4A* a la región

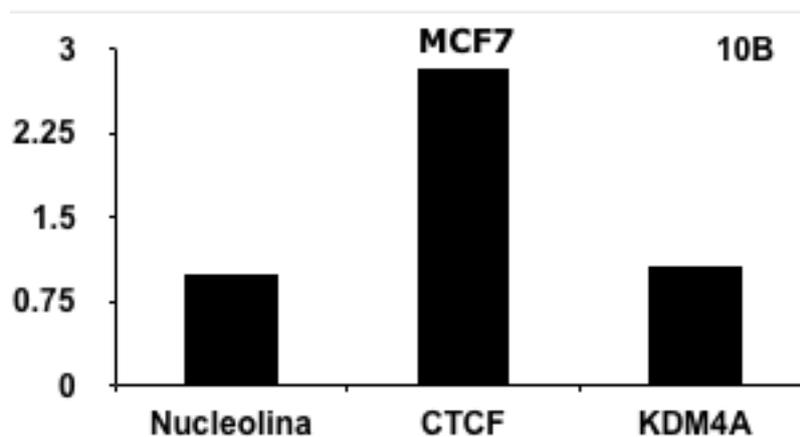
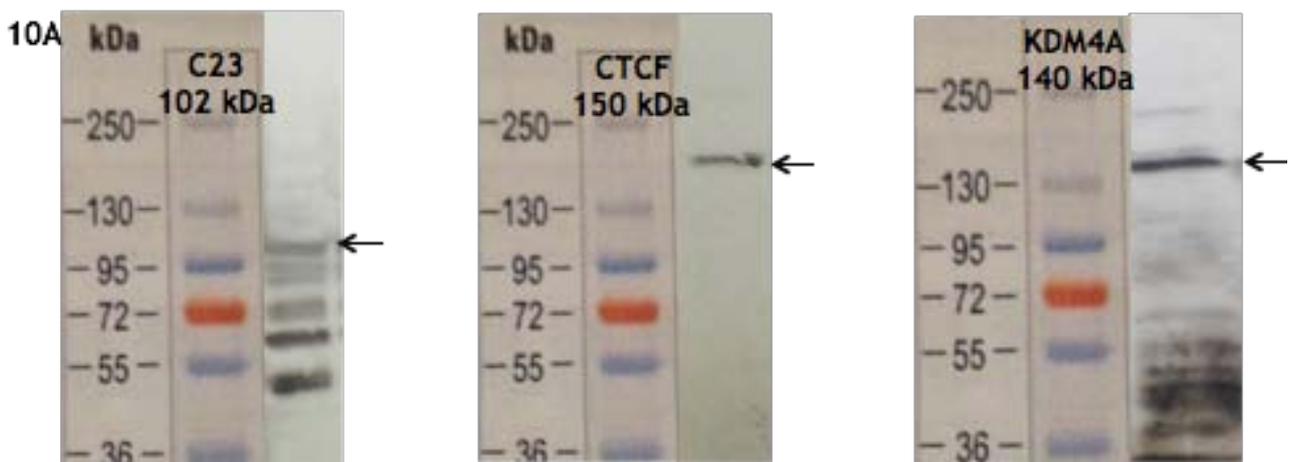
9. PERSPECTIVAS

1. Determinar la interacción *in vivo* de KDM4A y CTCF en células derivadas de cáncer de mama usando como control una línea celular no neoplásica.
2. Determinar las regiones en el genoma que son ocupadas por el complejo CTCF-KDM4A, así como los genes regulados por este complejo
3. Determinar los dominios de interacción de ambas proteínas.

10 INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

10.1 EVALUACIÓN DE LA ABUNDANCIA DE LAS PROTEINAS CTCF Y KDM4A EN LOS MODELOS CELULARES

Para evaluar la abundancia de la desmetilasa de histonas KDM4A y el factor multifuncional CTCF, se llevaron a cabo ensayos de Western Blot en las líneas celulares MCF7 (Fig. 10A y 10B), MDA-MB-231 (Fig. 10C y 10D) y HeLa (Fig. 10E y 10F). Para CTCF, se observó una banda única en las tres líneas celulares, para KDM4A, se observó además de una banda de 140 kDa, bandas inespecíficas en todas las líneas celulares. Como control de carga se usó C23, debido a que esta proteína presenta un peso mayor a los comúnmente utilizados, (Actina 47kDa y GAPDH 36kDa) sin embargo para la nucleolina se observaron además de la banda de 102 kDa bandas inespecíficas pero estas se encuentran reportadas por la ficha técnica. Los análisis de las densitometrías resuelven que, en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, tanto KDM4A como CTCF son más abundantes que la nucleolina. Para la línea celular HeLa, se observó que CTCF es menos abundante que la nucleolina, sin embargo, KDM4A presentó una mayor abundancia que C23.



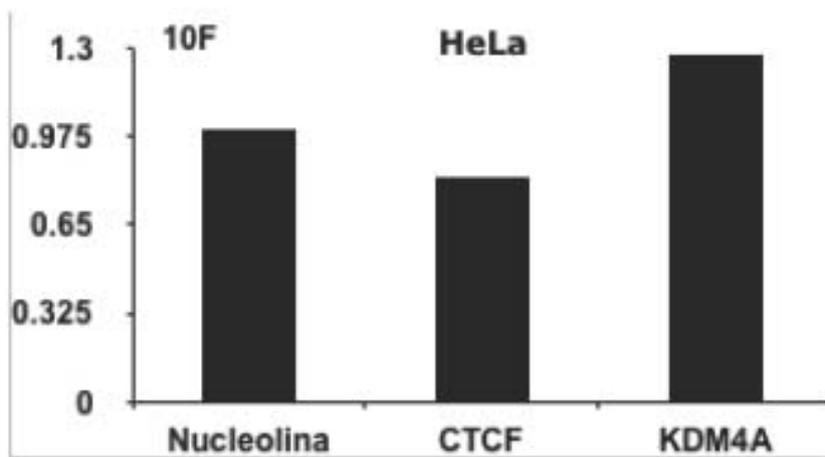
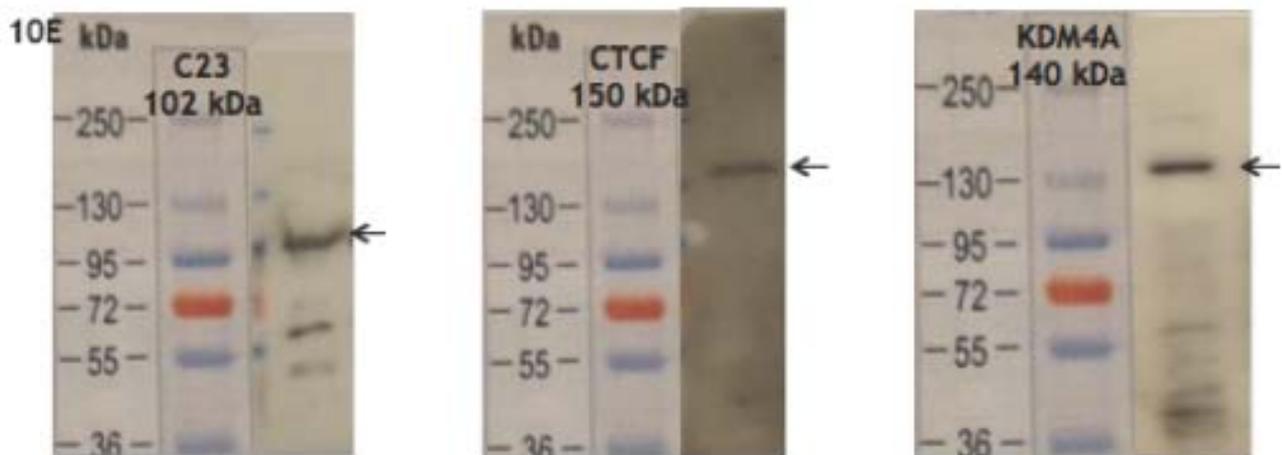
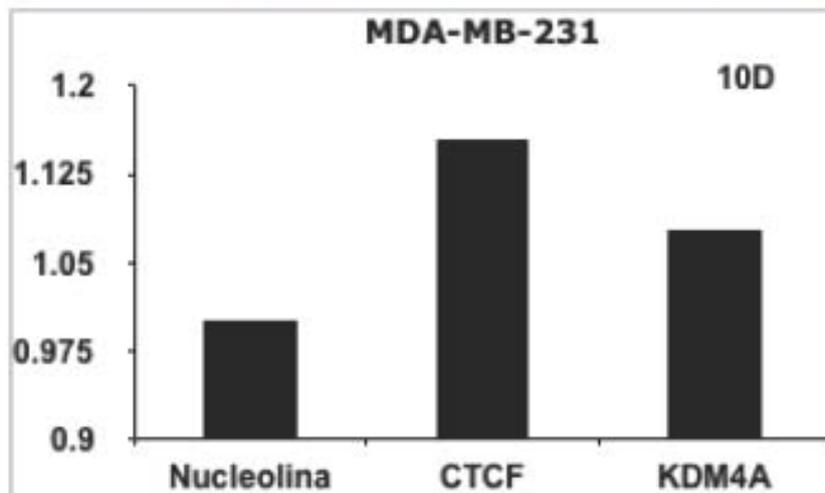
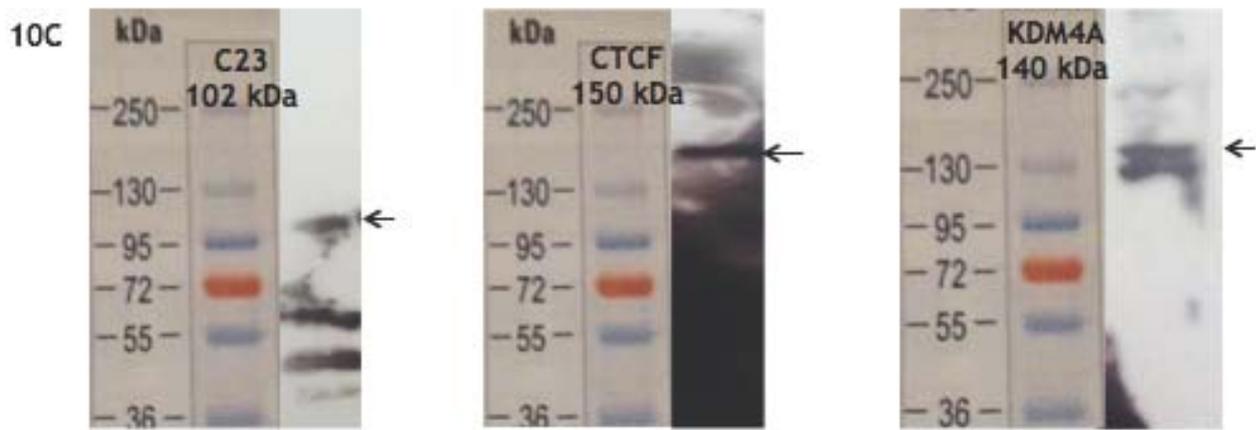


Figura 10. Caracterización de la abundancia proteica de CTCF y KDM4A por medio de Western Blot. (10A) Detección de la proteínas CTCF y KDM4A, en la línea celular MCF7, en la columna izquierda se observa el control de carga la nucleolina, este anticuerpo presentó varias bandas inespecíficas, sin embargo éstas están reportadas en la hoja técnica del anticuerpo. Para el caso de la proteína CTCF, columna de en medio, se puede apreciar una banda única de alrededor de 150kDa. Para KDM4A, columna derecha se observa una banda en 140kDa, y se observan varias bandas inespecíficas de menor peso que no están reportadas en la hoja técnica del anticuerpo. (10B) Densitometría de las p, se puede observar que tanto KDM4A como CTCF son mas abundantes que la nucleolina. (10C) Detección de la proteínas CTCF y KDM4A, en la línea celular MDA-MB-231, en la columna izquierda se observa el control de carga la nucleolina, la banda correspondiente a la nucleolina es de 102 kDa. Para el caso de la proteína CTCF, columna de en medio, se aprecia una banda única de 150kDa columna izquierda. Para KDM4A, columna derecha se observa una banda en 140kDa. (10D) Densitometría de las placas anteriores, se puede observar que tanto KDM4A como CTCF son mas abundantes que la nucleolina. (10E) Detección de la proteínas CTCF y KDM4A, en la línea celular HeLa, en la columna izquierda se observa el control de carga la nucleolina, la banda correspondiente a la nucleolina es de 102 kDa. Para el caso de la proteína CTCF, columna de en medio, se aprecia una banda única de 150kDa columna izquierda. Para KDM4A, columna derecha se observa una banda en 140kDa y se observan varias bandas inespecíficas de menor pes (7D) Densitometría de las placas anteriores, se puede observar que solo KDM4A es mas abundante que nucleolina mientras que CTCF tiene una abundancia menor que este control.

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

Con el objetivo de determinar la presencia y localización de las proteínas KDM4A y CHD5 en muestras de pacientes con cáncer de mama se realizó ensayos de inmunohistoquímica de cortes histológicos de muestras de cáncer de mama (Figura 7).

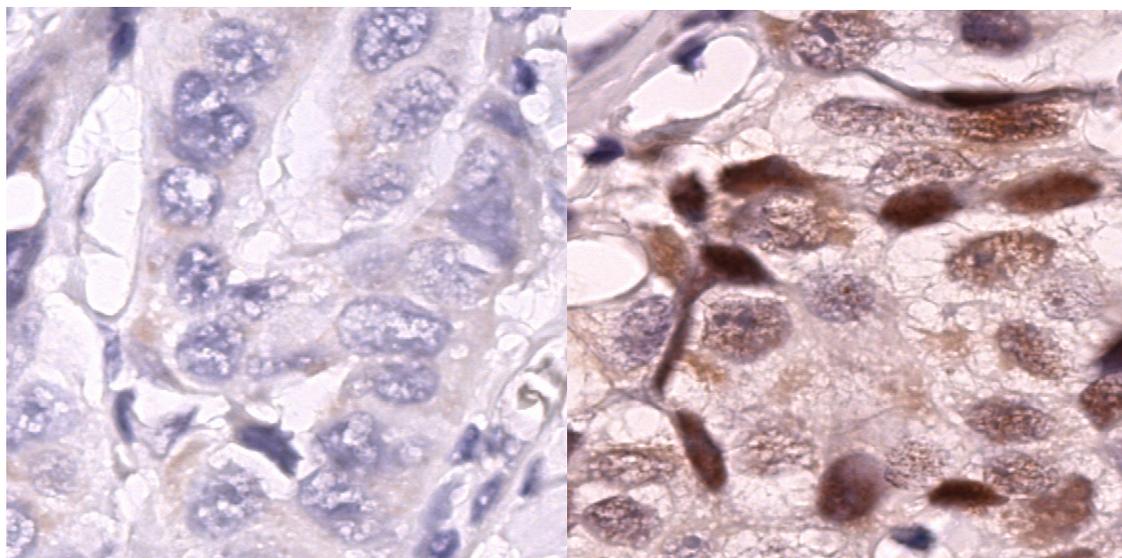
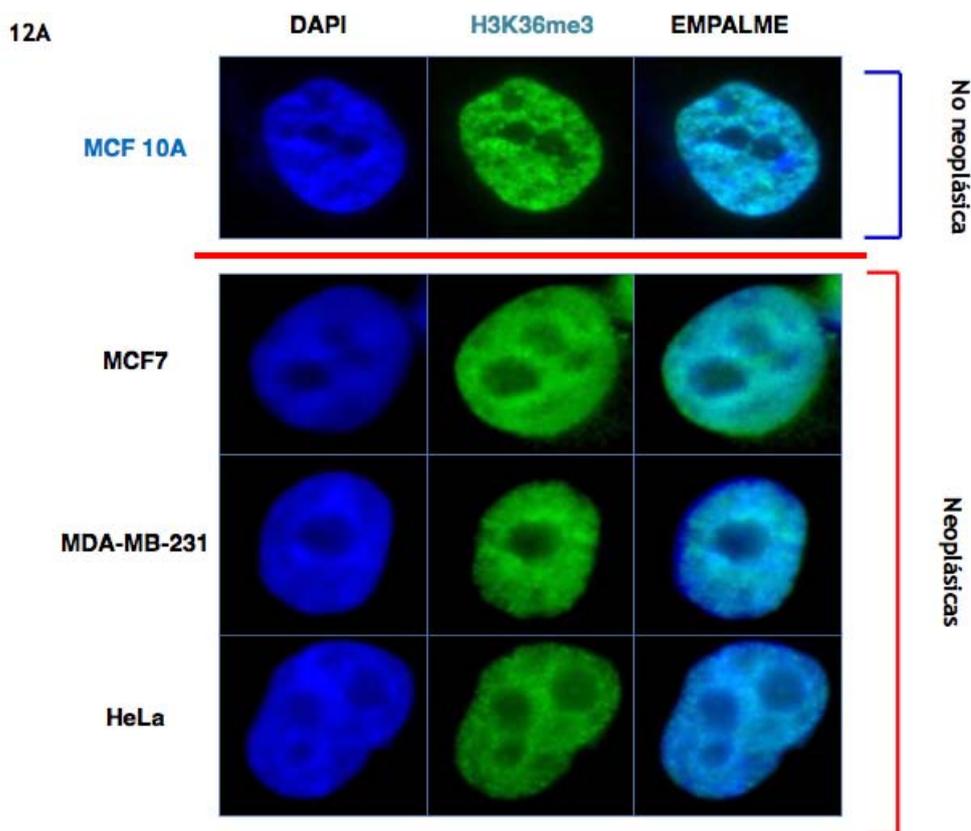
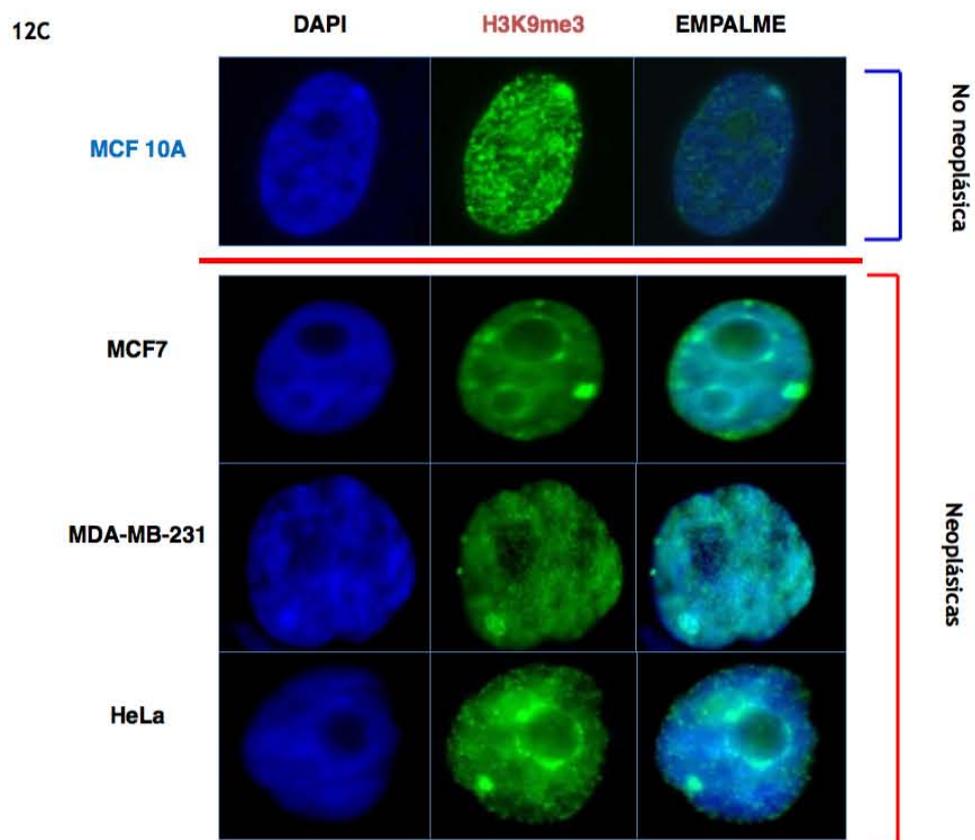
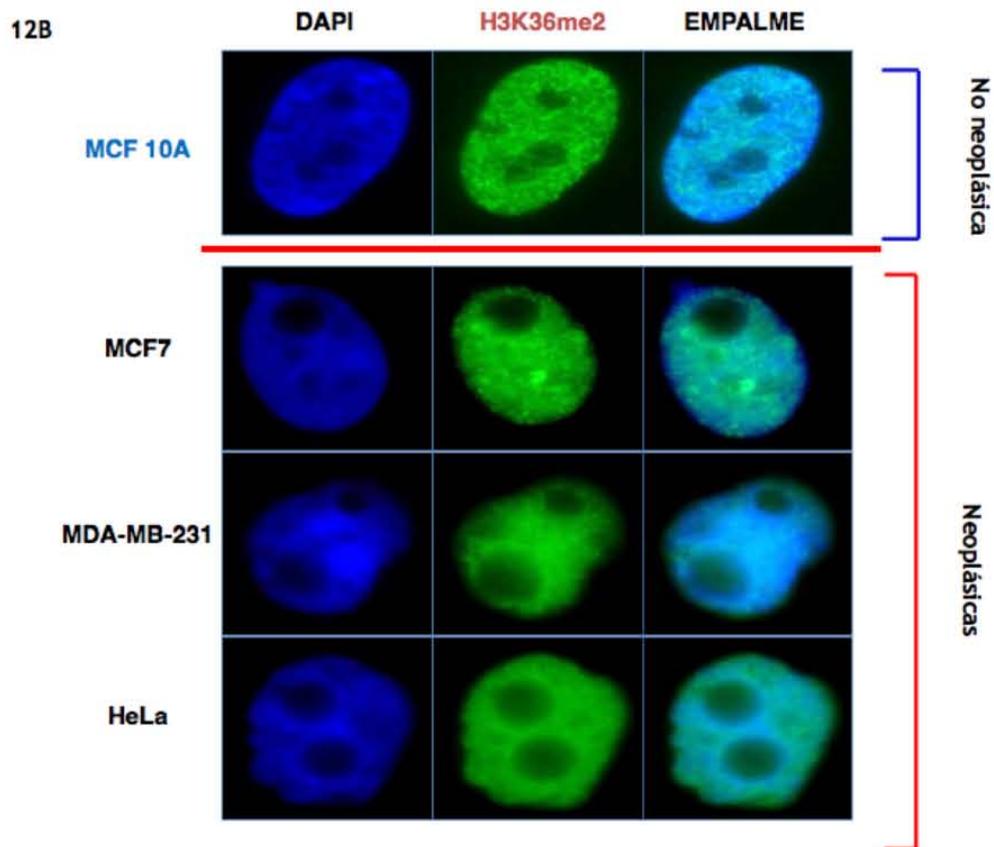


Figura 11. Presencia y localización de KDM4A en muestras de pacientes con cáncer de mama. A. control negativo (sin anticuerpo primario) B, Localización nuclear de la proteína KDM4A en una muestra de cáncer de mama. (100 aumentos).

10.3 ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS H3K36ME3, H3K36ME2, H3K9ME3 Y H3K9ME2.

Con la finalidad de analizar la presencia de las modificaciones H3K9me3, H3K36me3, H3K9me2 y H3K36me2 a nivel celular, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en las líneas celulares neoplásicas MDA-MB-231, MCF7, HeLa y en la línea celular no neoplásica MCF 10A. La localización de las modificaciones H3K36me3, principalmente nuclear (Fig. 12A, 12B y 12D), así mismo, el análisis de la modificación de histonas H3K9me3 se asocia con la heterocromatina nuclear, encontrándose en las regiones perinucleolares, perinucleares y corpúsculos de Barr (Figura 12C). Los resultados sugieren que no hay cambios en la presencia de las modificaciones postraduccionales de las histonas relacionadas con KDM4A, lo cual propone que estos cambios pudieran presentarse a nivel local.





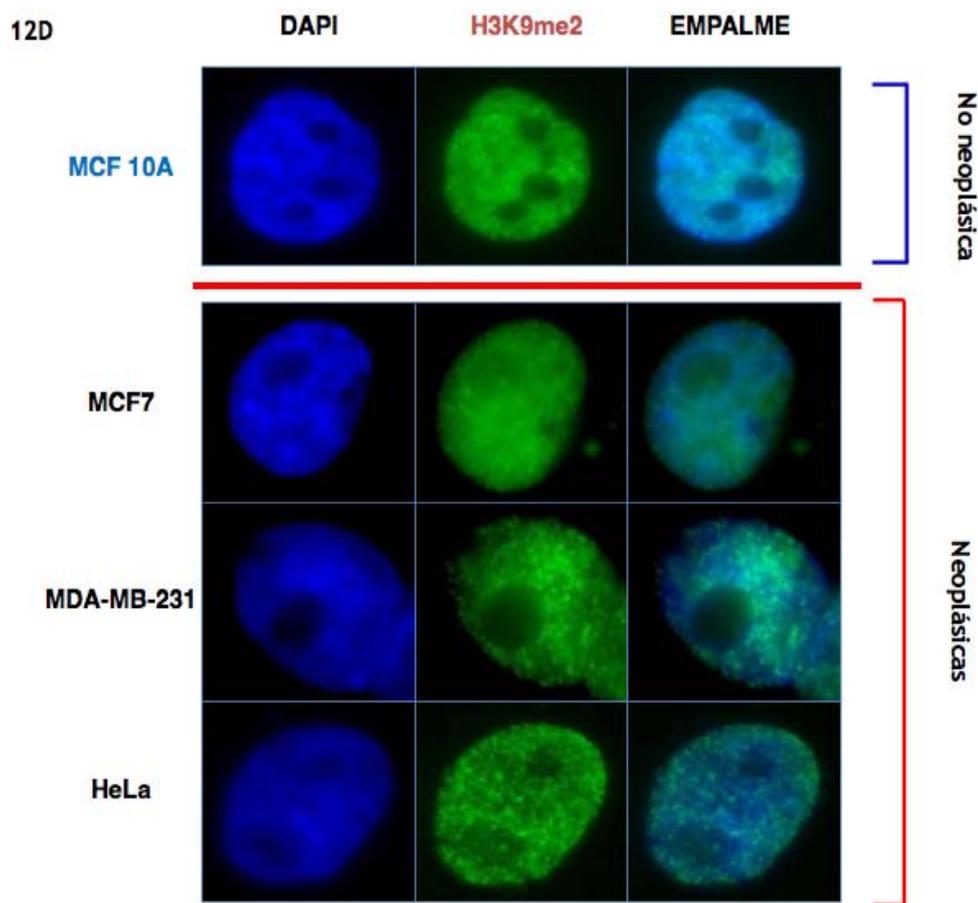


Figura 12. Presencia de las modificaciones H3K36me3 (A), H3K36me2 (B), H3K9me3 (C) y H3K9me2 (D) en líneas celulares neoplásicas (MDA-MB-231, MCF7, HeLa) y una no neoplásica (MCF 10A) (100 aumentos). (A, B) En el panel de la izquierda se observa el núcleo de las distintas líneas celulares teñido con DAPI, en el panel central se observa la detección de las modificaciones mediante un anticuerpo primario específico para cada una de ellas, dicho anticuerpo fue detectado por un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (ALEXA 488). En el panel derecho se observa el empalme de las dos columnas anteriores.

10.4 OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS EMPLEADOS

10.4.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

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

GAPDH RVS (Exón 5) GGCTGGACTGTGGTCATGAG 62

Expresión <i>CHD5</i>	<i>CHD5</i> FWD (Exón 42)	TCGAGACTTCCCTGTGTTGC	62	127 pb	933 pb
----------------------------------	---------------------------	----------------------	----	--------	--------

CHD5 RVS (Exón 44) CTTTTTGTCCCAAGGTGGCG 62

Expresión <i>CTCF</i>	<i>CTCF</i> FWD (Exón 5-6)	GAGAAGCCATTCAAGTGTTCAT	66	85 pb	399 pb
----------------------------------	----------------------------	------------------------	----	-------	--------

CTCF FWD (Exón 20) CTCCAGTATGAGAGCGAATGTG
A 66

10.4.2 CHIP

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

10.5 ANTICUERPOS UTILIZADOS

	Anti-KDM4A	Anti-CTCF	Anti-CHD5	Anti-H3K36me3
Origen	Ratón	Conejo	Conejo	Conejo
Marca	Abcam	Millipore	Santa Cruz	Diagenode
Numero de catalogo	ab105953	07-729	sc-68389	C15410058
Tipo	Monoclonal	Policlonal	Policlonal	Policlonal
Dilución IF	1:50	1:100	1:50	1:200

ChIP(μL)	5	2	----	4
	Anti-H3K36me2	Anti-H3K36me2	Anti-H3K9me2	IgG
Origen	Conejo	Conejo	Ratón	Conejo
Marca	Diagenode	Diagenode	Abcam	Diagenode
Numero de catalogo	CS-127-100	CS-056-100	ab-1220	kch-oneDIP-180
Tipo	Policlonal	Policlonal	Monoclonal	Policlonal
Dilución IF	1:100	1:100	1:50	
ChIP(μL)	5	1	3.7	2
	Anti-KDM4A	Anti-CTCF	Anti-CTCF	Anti-KDM4A
Origen	Conejo	Cabra	Ratón	Conejo
Marca	Cell signaling	Santa Cruz BT	Santa Cruz BT	Diagenode
Numero de catalogo	C37E5	SC-5916	SC-398149	pAb-126-050
Tipo	Monoclonal	Policlonal	Monoclonal	Policlonal
Dilución IF	N/A	N/A	1:100	1:50
WB	1:1000	1:750	N/A	N/A

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

Para los WB se utilizaron los anticuerpos secundarios correspondientes de la marca Santa Cruz, a una dilución de 1:5000, como control positivo de carga se uso C23 a una concentración de 1:300.

10.5 LÍNEAS CELULARES

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

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

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

11.MÉTODOS EN EXTENSO

11.1 EXTRACCIÓN DE RNA

1. Retirar el medio de cultivo, lisar las células directamente en el frasco de cultivo mediante la adición de 3 mL de TRIZOL para cajas de 75 cm², y mezclar varias veces con una pipeta, con el fin de que las células se despeguen en su totalidad.
2. Trasladar el TRIZOL con células a un tubo Falcon ® de 15 mL, incubarlas a temperatura ambiente (15°C-30°C) por 5 minutos.
3. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada mL de TRIZOL agregado, agitar vigorosamente los tubos con la mano durante 15 segundos. Lo anterior se realiza con el fin de limpiar el RNA.
4. Centrifugar las muestras a 3,200 x g durante 15 minutos, a una temperatura de 2-8°C. Después de la centrifugación la mezcla se divide en tres fases: superior: fase acuosa; media: fase fenol-cloroformo; inferior: fase roja. El RNA se encuentra solamente en la fase acuosa.
5. Transferir, cuidadosamente la fase acuosa a un tubo Eppendorf etiquetado, perturbar la fase de fenol-cloroformo, de hacerlo centrifugar de nuevo.
6. Agregar 0.5 mL de alcohol isopropílico por cada mL utilizado de TRIZOL. Lo anterior ayuda a precipitar el RNA.
7. Incubar por 10 minutos a Temperatura ambiente y centrifugar a no más de 25,910 x g durante 15 minutos, a una temperatura de 2°C a 8°C. Después de esta centrifugación es posible que se vea el pellet de RNA, si no sucede esto dejar un pequeño remanente de líquido en la parte inferior del tubo.
8. Retirar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 mL de ET-OH al 80% en agua libre de RNAsas, mezclar vigorosamente, (con vortex), centrifugar la muestra durante 5 minutos a 16,580 x g con una temperatura de 2°C a 8°C.
9. Dejar secar el botón de RNA a temperatura ambiente, y resuspenderlo con 20 µL de agua DPEC, dependiendo del tamaño del pellet, incubar 10 minutos a 60°C.
10. Determinar la concentración de la muestra en el Nanodrop (A260/280).
11. Cuantificar la pureza e integridad del RNA mediante un gel de agarosa al 1.2 %.
12. Ajustar la concentración de RNA a 1µg/µL.
13. Conservar la muestra a -70°C.

Gel para determinar la integridad del RNA

Disoluciones

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

Preparación de la muestra

1. Cargar aproximadamente 200 ng de RNA por pozo.
2. Adicionar 2 µL de buffer de carga.
3. Llevar todas las muestras al mismo volumen.
4. Incubar a 65°C durante 5 minutos.
5. Correr el gel FA durante 45 minutos a 95 volts.
6. Si se presenta DNA, tratar con DNAsa, agregar 1 unidad de enzima por cada microgramo de RNA, incubar a 37°C durante una hora, para inactivar la enzima, agregar 2µL de EDTA 50mM e incubar 20 minutos a 65°C

11.2. REACCIÓN DE TRASNCRIPTASA REVERSA PARA OBTENER EL cDNA

1. Por cada reacción de retrotranscripción agregar:

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

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

2. Programar el termociclador a 42°C durante 30 minutos (temperatura óptima de la enzima), 99°C durante 5 minutos (inactivación de la enzima), 5°C durante 5 minutos más.
3. Cuantificar el cDNA con ayuda del nanodrop y diluirlo para que el cDNA de todas las muestras se encuentre a la misma concentración, 20 ng/μL.
4. Por cada reacción de qPCR agregar lo siguiente:

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

Para el análisis de expresión se empleó el método de doble delta CT (dΔCT). (Livak y Schmittgen 2001).

Fundamento teórico de las técnicas

El DNA complementario (cDNA) es sintetizado por la transcriptasa reversa, la cual utiliza como molde al RNA extraído. Los cebadores utilizados pueden ser oligo de T, el cual se alinea con el extremo 3' de la cadena de RNA que tiene un oligo de poli-adenina; o hexámeros random, los cuales se alinean a secuencias aleatorias del RNA; durante la síntesis se añaden deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), que la transcriptasa reversa incorpora al nascente cDNA. El proceso de síntesis ocurre en condiciones controladas de temperatura, pH y concentración de sales.

En la PCR cuantitativa, qPCR, el DNA amplificado es detectado al mismo tiempo que la reacción procede, es decir en tiempo real. Para detectar el DNA amplificado se utilizan moléculas fluorescentes que se unen a la doble cadena de DNA, en este caso se usó SYBR Green el cual se excita con luz azul (λ :488nm) y emite luz verde (λ :522nm). Después de cada ciclo los niveles de fluorescencia son medidos con el lector del termociclador para tiempo real, SYBR Green solo fluoresce cuando se encuentra unido a DNA de doble cadena.

El análisis de expresión se llevó a cabo con el método de doble delta CT ($\Delta\Delta$ CT), para esto se tomó como control interno a GAPDH, y como calibrador a la línea celular no neoplásica MCF 10A. El método de $\Delta\Delta$ CT, consiste en calcular:

- La diferencial de los CTs. el gen analizado menos el control interno en nuestro caso: $CT_{KDM4A} - CT_{GAPDH}$, esto se realiza para todas las líneas celulares analizadas.
- Posteriormente, se calcula el diferencial de las líneas celulares neoplásicas menos la no neoplásica (calibrador) $(CT_{KDM4A} - CT_{GAPDH})_{MCF7} - (CT_{KDM4A} - CT_{GAPDH})_{MCF\ 10A}$. Por último se utiliza esta ecuación: $2^{(CT_{KDM4A} - CT_{GAPDH})_{MCF7} - (CT_{KDM4A} - CT_{GAPDH})_{MCF\ 10A}}$.

El CT mide el número de ciclos en el que la señal fluorescente es mayor que un umbral definido durante la fase logarítmica de amplificación, ciclos umbral (por sus siglas en inglés cycle threshold).

11.3. INMUNOFLUORESCENCIAS (IF)

Disoluciones

Formaldehído 1 %

370 μ L de formaldehído al 37 %

Tritón

2.5 mL de tritón 100-X

Aforar a 50 mL con PBS (solución a 5 %)

Tomar 1 mL y llevarlo a 50 mL con PBS (solución al 0.1 %)

Glicina

PBS

0.375 g de glicina	8 g de NaCl.
Aforar a 50 mL con PBS	0.2 g de KCl.
	1.44 g de Na ₂ HPO ₄ .
	0.24 g de KH ₂ PPO ₄ .
	Ajustar pH a 7.4.
	Aforar a 1 L.

1. Sembrar aproximadamente 100000 células en cada pozo, con un cubreobjetos previamente limpio y radiado, se dejan el cultivo de 12 a 24 horas, dependiendo de la línea celular.
2. Agregar 1 mL de formaldehído al 1 % o al 4 % a cada pozo e incubar 10 minutos.
3. Retirar el formaldehído y realizar 3 lavados con PBS reposando por 5 minutos entre cada lavado con agitación.
4. Adicionar 1 mL de tritón, incubar durante 5 minutos.
5. Retirar el tritón y realizar 3 lavados con PBS 1 mL por 5 minutos, con agitación, cuidar que no se sequen las laminillas.
6. Agregar 1 mL de glicina 100 mM y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Eliminar la glicina y adicionar 25 µL de anticuerpo primario, cortar parafilm y colocarlo una vez que ya se haya agregado el anticuerpo primario con el fin de que el anticuerpo y las células se encuentren en contacto y las laminillas no se sequen, incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C.
8. Lavar de 3 a 5 veces con PBS durante 3 minutos.
9. Agregar 25 µL del anticuerpo secundario e incubar por una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y aislado de la luz.
10. Realizar tres lavados con PBS durante 3 minutos.
11. Previamente al montaje se limpian con alcohol, los portaobjetos.
12. Posteriormente, se agregan 15 µL de medio de montaje, Vectashield con DAPI diluido con 6.5µL con Vectashield sin DAPI (), (Vector Labs.) a cada inmunofluorescencia, se coloca el cubreobjetos procurando no dejar burbujas, se retira el excedente del medio de montaje.
13. Se sellan las muestras montadas con barniz de uñas. Las muestras se pueden conservar a 4°C tapadas con aluminio.

Fundamento teórico de la técnica:

En esta técnica los anticuerpos primarios reconocen y se unen específicamente a sus antígenos (proteínas blanco). El anticuerpo secundario que se encuentra acoplado a un fluoróforo reconoce al anticuerpo primario y se une a él. Para detectar el fluoróforo se utiliza un microscopio de fluorescencia, el cual excita a los fluoróforos y detecta la luz que estos emiten a determinada longitud de onda, por ejemplo, el fluoróforo Alexa 488 absorbe luz a una $\lambda=495\text{nm}$ y emite luz con una $\lambda=519\text{nm}$.

El 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) se une a regiones ricas en Adenina y Timina en el DNA, la longitud de onda de absorción es de $\lambda=358\text{nm}$ y de emisión es de $\lambda=461\text{nm}$.

11.4. PROTOCOLO DE WESTERN BLOT

Disoluciones

Ripa modificado	Buffer de corrida	Resolving buffer	Spacer buffer	TBS10X
NaCl 150mM NP-40 1% DOC 0.5% EDTA 5mM Hepes 50mM Para 500mL	TRIS-BASE 3g Gly 14.4g SDS(10%) 10mL Aforar a 1L	HCl 1M 48mL Tris-Base 36.3g pH:8.9 (HCl) Aforar a 100mL	Tris-Base 5.98g pH: 6.7 (HCl) Aforar a 100mL	NaCl 80g KCl 12g Tris-base 30g pH:7.4 Aforar a 1L
Hepes 5.96g 0.25M EDTA 10mL	Buffer de carga	PSA	TBS-Tween-leche (1x-0.1%-5%)	
NaCl 4.38g NP-40 (10%) 50mL DOC 2.5g Inhibidores 1X	Spacer buffer 5mL SDS(10%) 1mL Glycerol 4mL	PSA 0.1g Aforar a 1mL	TBS 10X 50mL Leche en polvo 25g Tween 20 500uL	
			Buffer de transferencia	

0.1M Na ₃ VO ₄ 0.1M PMSF	Azul de BF (5%) 0.4mL Geles desnat. β-mercapto. Concentración final: 5% DTT 1M 1/5 volúmenes.					Gly 192mM Tris-HCl 25mM Me-OH 10% pH: 8.3 guardar en frío.		
Geles de poliacrilamida	de	3%	7.5%	10%	12.5%	15%	30%	
Resolving buffer		-----	1.25mL	1.25mL	1.25mL	1.25mL	1.25mL	
Spacer buffer		1.25mL	-----	-----	-----	-----	-----	
Acrilamida		0.75mL	1.875mL	2.5mL	3mL	3.75mL	7.5mL	
SDS (10%)		100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	
H ₂ O		7.8mL	6.67mL	6.04mL	5.54mL	4.8mL	9.6mL	
PSA (10%)		100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	
TEMED		10uL	10uL	10uL	10uL	10uL	10uL	

1. 1.Preparación de los extractos proteicos.

- a. Obtener las células mediante tripsinización, lavar 2 veces con PBS, previo al conteo para retirar las proteínas que pudiesen estar en el medio.
- b. Por cada 10 millones de células, adicionar 100uL de RIPA modificado con inhibidores, resuspender perfectamente el botón de células, incubar en hielo de 10-15min, con el fin de completar la lisis y evitar las proteasas.
- c. Centrifugar 4000rpm (centrifuga refrigerada) (OJO! Poner a enfriar en el tiempo de incubación), por 10min a 4°C.
- d. Dividir los extractos en alícuotas de 20uL-50uL, y congelarlos a -70°C.
- e. Para celular en monocapa y cultivadas en cajas de cultivo
 - i. Lavar las células con PBS, agitar a lo mínimo durante 5 minutos, retirar el PBS cuidadosamente, repetir este paso una vez mas.

- ii. **IMPORTANTE**, retirar **TODO** el PBS en el segundo lavado.
 - iii. Agregar 1-1.5mL de buffer de lisis con inhibidores, asegurarse que el volumen agregado cubra la totalidad de la caja.
 - iv. Incubar a 4°C durante 10 min, posteriormente, scrappear y recolectar las proteínas en un tubo eppendorf etiquetado y con ayuda de una pipeta de 1mL.
 - v. Centrifugar 4000rpm (centrifuga refrigerada) (OJO! Poner a enfriar en el tiempo de incubación), por 10min a 4°C.
 - vi. Dividir los extractos en alícuotas de 50uL-100uL, y congelarlos a -70°C.
2. Cuantificación de los extractos proteicos mediante Bradford:
- a. Diluir el reactivo Bradford 1:5 en agua desionizada.
 - b. Preparar la curva estándar de albúmina por triplicado, como se muestra a continuación.
 - c.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR BRADFORD

Soluciones stock para la curva:

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

CURVA DE BSA:

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

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

- d. Añadir a cada pozo 200uL de la dilución de Bradford.
 - e. Para las muestras; adicionar 17-19uL de agua y 1-3uL de los extractos.
 - f. Emplear el lector de ELISA con el filtro o la absorbancia 570nm.
3. Elaborar los geles de poliacrilamida.
- a. Dependiendo del peso de la proteína será el porcentaje de los geles utilizados, en este caso, para KDM4A y DNMT3A, los respectivos pesos son 121KDa y 120KDa, utilizaremos 3% y 7.5%.
 - b. Verter primero el gel de mayor porcentaje, y agregar *i*-pr, para evitar irregularidades en el la parte superior del gel. Esperar a que polimerice.
 - c. Retirar con cuidado el *i*-pr, hacer dos lavados con H₂O, verter el gel de menor concentración de poliacrilamida, y colocar el peine para cargar.
 - d. En el tiempo de polimerización del segundo gel, preparar las muestras, de 15-50ug de muestra, agregar el volumen necesario de buffer Laemmli 5x con β-

mercaptoetanol, y calentar en agua hirviendo durante 10 min. Nota: después de la desnaturalización, no colocar las proteínelectroforesis en hielo, ya que se tornan viscosas.

- e. Colocar los geles en la cámara de electroforesis vertical, y llenar con buffer de corrida, cargar primero el marcador de peso molecular y posteriormente las muestras. Correr a 100mV durante una hora.

4. Transferencia semihúmeda:

- a. Activar la membrana de nitrocelulosa, previamente cortada, mediante su incubación en Me-OH, al activar la membrana esta se torna mas hidrofílica, terminado el tiempo de activación, realizar dos lavados con agua de 5min cada uno.
- b. Durante el tiempo de corrida, preparar la cámara de transferencia semihúmeda, colocar papel 3M previamente mojado con el buffer de transferencia y retirar las posibles burbujas mediante el uso de una pipeta de plástico.
- c. Colocar en forma sucesiva, la membrana, el gel y otro papel 3M, cuidando de retirar después de la membrana y del papel 3M las burbujas con ayuda de la pipeta.
- d. Transferir con una diferencia de potencial de 15Volts durante 45 min.

5. Anticuerpo primario.

- a. Durante el tiempo de transferencia, preparar la solución de bloqueo.
- b. Posterior al tiempo de transferencia, recortar la membrana del tamaño del gel, teñirla con rojo de Ponceau, para corroborar la presencia de las proteínas. Lavar la membrana dos veces con, TBS-TWEEN.
- c. Agregar la solución de bloqueo incubar en movimiento durante 1 hora.
- d. Durante la hora de bloqueo, preparar los anticuerpos en la solución de bloqueo, o según las especificaciones del anticuerpo a utilizar.
- e. Finalizada la hora de bloqueo, realizar dos lavados con TBS-TWEEN-LECHE, y un tercero con TBS1x, de 5 minutos cada uno, durante el tiempo de lavados elaborar las bolsas de incubación, para el anticuerpo primario usando el sellador. Después de los lavados, colocar las membranas en las bolsas y agregar los anticuerpos primarios correspondientes.
- f. Evitar la formación de burbujas en las membranas, incubar toda la noche a 4°C.

6. Anticuerpo secundario.

- a. Realizar 4 lavados con TBS-TWEEN de 5 minutos cada uno.
- b. Adicionar el anticuerpo secundario en solución de bloqueo una hora a temperatura ambiente.

7. Revelado de las membranas.

- a. Terminado el tiempo de incubación, realizar 4 lavados con TBS-TWEEN de 10 minutos cada uno y un ultimo con TBS.
- b. Al cuarto oscuro llevar:
 - i. Placas
 - ii. Kasette
 - iii. Revelador, fijador
 - iv. Contenedores

- v. Sanitas
- vi. Luminol, se prepara 1:1 y se cubre de la luz
- vii. Parafilm
- viii. Cinta adhesiva
- ix. Pipeta de 1mL y puntas.

11.5 ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACION DE LA CROMATINA (CHIP)

Disoluciones

Buffer de entrecruzamiento	Buffer de lisis
Formaldehído al 11 %.	SDS al 1 %.
NaCl 100 mM.	EDTA 10 mM con pH 8.0
EGTA 0.5 mM.	Tris-HCl 50 mM con pH 8.0
HEPES 50 mM con pH 8.0	Inhibidores de proteasas.
Glicina 2.5 M	PBS 1x
Pesar 9.38 g de glicina	8 g de NaCl.
Aforar a 50 mL con agua bidestilada.	0.2 g de KCl.
	1.44 g de Na ₂ HPO ₄ .
	0.24 g de KH ₂ PPO ₄ .
	Ajustar pH a 7.4.
	Aforar a 1 L.

1. **CÉLULAS:** Cultivar las células en 3 cajas de 150 mm a una confluencia del 80 %, checar el volumen del medio, tiene que ser 18 mL.
2. **ENTRECRUZAMIENTO O “CROSSLINKING”:** Añadir 2 mL de buffer “crosslinking. Mix” obtener una concentración final de formaldehído al 1 %. Agitar las células por 10 minutos.

3. **DETENER EL “CROSSLINKING”:** Añadir 1 mL de glicina 2.5 M para obtener una concentración final de 125 mM. Mantener las células en agitación constante durante 5 minutos.
4. **LAVADO DE LAS CÉLULAS CON PBS:** Retirar el medio lavar las células 3 veces con PBS frío (4°C).
5. **LISIS:** Remover el PBS y se adicionar 1 mL de Buffer de Lisis con inhibidores a cada una de las cajas, e incuba a 4°C de 5-10 minutos. Transcurrido el tiempo cosechar las células con un scraper y transferir la cromatina a un tubo Falcon de 50 mL.
6. **SONICACIÓN:** Colocar el tubo que contiene la cromatina en un vaso con hielo para que se mantenga frío, evitando generar mucha espuma. (PRESTAR ATENCIÓN AL PROGRAMA DEL SONICADOR). . El programa de sonicación es de 30 segundos, pulso 2.0 - 0.5, amplitud de 37% en un sonicador Ultrasonic Processor (marca GENEQ, modelo GEX500, número de catálogo SOVC505-00). La cromatina se puede guardar a 4°C. La cromatina sonicada se puede conservar durante 3 a 4 meses con un coctel apropiado de inhibidores, y a 4°C.
7. **EVALUACIÓN DE LA CROMATINA:** Determinar el grado de fragmentación de la cromatina, el tamaño adecuado para las Inmunoprecipitaciones es de 500-700 pb. Tomar una alícuota de 100 µL y agregar 5 µL de RNasa A e incubar a 37°C durante una hora, posteriormente agregar 5 µL de proteinasa K e incubar a 65°C, por lo menos 6 horas. Subsecuentemente realizar una extracción fenol/cloroformo (llevar la muestra a un volumen final de 400 µl con agua) y se precipita el DNA (añadir 1 volumen de ET-OH al 100 % y 0.66 volúmenes de acetato de amonio al 5 M e incubar a -20°C durante toda la noche o a -80°C durante 2 horas. Finalmente, realizar un gel de agarosa al 1 % para evaluar el tamaño de la cromatina.
8. **CUANTIFICACION DE LA CROMATINA:** Para el uso del One Day ChIP Kit se necesita usar la misma cantidad de cromatina para cada IP, para esta cuantificación se procede a determinar la concentración de las cromatinas deseadas por el método de Lowry.
 - a. **Preparación de los reactivos:** Agregar 20 µL de la solución S por cada mL de la solución A.
 - b. **Curva estándar de albúmina.** Partir de un stock de 1 mg/mL, realizar la curva estándar con las siguientes cantidades de albúmina, 0 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg.
 - c. **Cargar la placa de ELISA:** Con el fin de anular el ruido causado por los detergentes se utiliza la solución S, se agrega 20µL de solución S por cada mL de reactivo A. Por cada muestra agregar 165 µL del reactivo B de Lowry, 20µL del reactivo A, de 2 µL a 5 µL de

la muestra, ajustar el volumen final con agua a 200µL. Para los volúmenes de la curva estándar se pueden adicionar de 1 µL a 15 µL.

9. **INMUNOSELECCIÓN:** Preparar el ChIP buffer 1 x, adicionar 100 mL de ChIP Buffer a 400 mL de agua desionizada, almacenar el ChIP buffer 1 x a 4°C. Preparar 5 mL de ChIP Buffer 1x con 25 µL de inhibidores de proteasas. Diluir la cromatina con esta última mezcla de modo que el volumen de la cromatina no exceda de 28 %, por inmunoprecipitación. Repartir la cromatina en tubos de 1.5 mL.
 - a. **Anticuerpos:** Añadir los anticuerpos deseados (ver tabla), agitar vigorosamente con el vortex por 5 segundos a potencia media. Incubar durante 1 hora a 4°C en movimiento.
 - b. **Input:** Tomar una alícuota del mismo volumen que las inmunoprecipitaciones, esta alícuota se procesara más adelante.
 - c. **Perlas:** Resuspender perfectamente las perlas antes de cada uso, tomar una alícuota de 840 µL para 20 IP, transferir estos 840 µL a un tubo de 15mL agregar 10.5mL de ChIP buffer 1x, lavar las perlas mediante la inversión del tubo. Centrifugar a 500 x g durante 3 minutos a 4°C. Repetir esta operación una vez más. Alicuotar 500 µL las perlas en tubos nuevos de 1.5 mL, centrifugar a 500 x g durante 2 minutos a 4°C, checar que todos los tubos tengan la misma cantidad de perlas. Quitar el sobrenadante, sin perturbar el pellet de perlas, mantener en hielo las perlas alicuotadas.
10. **Inmunoprecipitación:** Cuando termina el tiempo de incubación de la inmunoselección centrifugar los tubos que contienen los complejos anticuerpo-cromatina, a 14,000 x g, durante 10 minutos a 4°C. Este paso se realiza con el fin de eliminar agregados inespecíficos, los complejos anticuerpo-cromatina se encuentran en el sobrenadante. Transferir el sobrenadante al tubo correspondiente que contiene las perlas, tener cuidado de no perturbar el pellet ya que este contiene los agregados inespecíficos. Incubar durante 1 hora a 4°C en movimiento.
 - a. **Input:** Agregar 1 mL de Et-OH al 100% a la alícuota tomada en el paso anterior. Mezclar de 2 a 3 veces por inversión, incubar durante 10 minutos en hielo, posteriormente centrifugar a 10,000 x g durante 10 minutos a 4°C. retirar el sobrenadante sin perturbar el pellet, lavar el pellet con 1 mL de Et-OH al 75 %, deshacer el pellet con ayuda de la pipeta y centrifugar a 10,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Mantener el pellet a temperatura ambiente.
 - b. **Aislamiento de las inmunoprecipitaciones:** Una vez terminado el tiempo de incubación agregar 1 mL de ChIP buffer 1x a los tubos de 1.5 que contienen los complejos perlas-anticuerpo-cromatina, mezclar los tubos por inversión 2 veces,

centrifugar los tubos a 500 x g, durante 2 minutos, a 4°C. Retirar el sobrenadante sin perturbar el pellet y agregar 1 mL más de ChIP buffer 1x, resuspender el pellet y transferirlo a un tubo Falcon de 15mL el cual contiene 12 mL de ChIP buffer 1 x frío, incubar durante 5 minutos en hielo y centrifugar a 500 x g durante 3 minutos a 4°C. Retirar 12mL de ChIP buffer 1x, resuspender el mililitro restante y trasladarlo a un tubo nuevo de 1.5 mL, centrifugar a 500 x g durante 2 minutos a 4°C, tirar el sobrenadante sin perturbar el pellet de perlas.

- 11. Purificación del DNA:** a partir de este paso ya no trabajar en hielo, calentar agua a punto de ebullición.
 - a. Input:** agregar 100 µL de agua para PCR y resuspender el pellet, incubar a temperatura ambiente.
 - b. Inmunoprecipitaciones:** sacar la suspensión de purificación del DNA, es importante que durante el uso de este reactivo la suspensión sea uniforme, hay que moverlo constantemente para conservar esta uniformidad. Añadir 100 µL de suspensión purificadora a cada inmunoprecipitación. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
 - c. Input:** Añadir 100 µL de suspensión purificadora a. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
 - d. Input e inmunoprecipitaciones:** mezclar por inversión, los tubos de los dos pasos anteriores, cerrar los tubos con pinzas.
 - e. Revertir el entrecruzamiento:** colocar los tubos en agua hirviendo durante 10 minutos. Terminado este tiempo agregar 1 µL de Proteinasa K, incubar en el termomixer a 55°C durante por lo menos 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación cerrar los tubos con pinzas e incubarlos durante 10 minutos en agua hirviendo. Y centrifugar a 14,000 x g durante 1 minutos 4°C
 - f. Recuperación del DNA:** sin perturbar el pellet, transferir 70 µL del sobrenadante a otro tubo de 1.5 mL, añadir 130 µL de agua para PCR al pellet, mezclar vigorosamente con ayuda del vortex y centrifugar a 14,000 x g, durante 1 minuto a 4°C. Sin perturbar el pellet, tomar 130 µL del sobrenadante y trasladarlo al tubo de 1.5 mL donde se encuentran los 70 µL previos, el volumen final de cada muestra es de 200 µL, conservar las muestras a -20°C.
- 12. Evaluación del ChIP por PCR en tiempo real y análisis de los datos.**
 - a. Por cada reacción de qPCR añadir:**

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

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

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

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

Dónde:

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

EA: eficiencia de amplificación.

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

$$\text{Ecuación 2} > \%Input = EA^{(Ct_{input} - Ct_{CHIP})} (FD)(100)$$

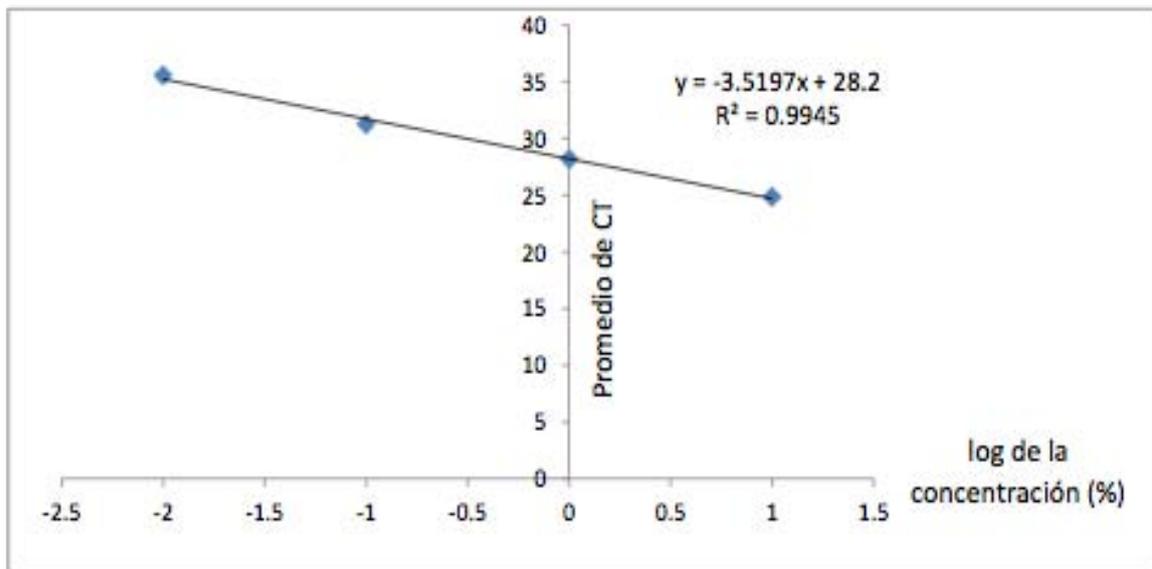
Dónde:

EA: eficiencia de amplificación.

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

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

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



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

Nota: Se empleó el kit **OneDay ChIP kit**, Cat. No. kch-oneDIP-060 / kch-oneDIP-180, de la marca Diagenode, así mismo, las ecuaciones aquí planteadas se extrajeron del manual de dicho Kit, para más información visitar la página: <http://www.diagenode.com/en/applications/chromatin-immunoprecipitation.php>, consultada 01/09/2015 a las 00:10 PM).

Fundamento teórico de la técnica:

Durante el entrecruzamiento el formaldehído forma un enlace covalente (-CH₂-) entre los grupos amino de las cadenas de DNA y los grupos amino de los aminoácidos que se encuentran en las histonas; los enlaces formados por el formaldehído son fácilmente reversibles. La reacción de entrecruzamiento se detiene mediante la adición de glicina, esto

evita que se formen enlaces donde no hay interacción. Después de que las células sean lisadas, es necesario romper la cromatina en fragmentos de aproximadamente 500-700pb, esto se realiza con el fin de minimizar las falsas interacciones. La inmunoselección se lleva a cabo ya que los anticuerpos se unen específicamente a las proteínas blanco. Posteriormente los complejos cromatina-anticuerpo son inmunoprecipitados con perlas de proteína A, la cual se acopla al anticuerpo. Después de lavar para quitar los agregados no específicos, se revierte el entrecruzamiento con calor y se eliminan las proteínas con proteinasa K. Finalmente se purifica el DNA y las inmunoprecipitaciones son evaluadas por una PCR cuantitativa.

11.6 INMUNOHISTOQUIMICAS (IHQ)

Disoluciones

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

Aforar a 200 mL con agua destilada.

Aforar a 50 mL con PBS 1 x.

1. **Preparación de las laminillas con el tejido mamario.** Desparafinar a 65°C durante 40 minutos en un horno de calor seco.
2. **Hidratación de las muestras.** Sumergir las laminillas, cuidando de que cada laminilla se cubra por completo de la solución respectiva.
- 3.

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

3. **Recuperación antigénica.** Precalear una olla a presión en el horno de microondas durante 6 a 7 minutos o hasta que suba el embolo. Añadir buffer de citratos a los *coplings* con las laminillas, cerrar y meter los *coplings* en la olla. Después de que la olla alcance la máxima presión, y comience a chillar contar un minuto. Extraer la olla del horno y colocarla debajo de agua corriente fría, enfriar los *coplings* del mismo modo. Incubar las laminillas con PBS 1 x frío durante 10 minutos y montar en una cámara húmeda.

4. **Inhibición de la peroxidasa endógena.** Realizar 3 lavados con 100 µL de peróxido de hidrógeno y metanol al 3% cada 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar, realizar 3 lavados con 100 µL de PBS 1x cada 3 minutos.
5. **Bloqueo de antígenos inespecíficos.** Adicionar 100 µL de albúmina de suero bovino (BSA) al 5%. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Realizar un recambio de BSA a los 30 minutos.
6. **Lavados.** Realizar 3 lavados con 100 µL de Tritón X-100 al 1% cada 3 minutos. Hacer un lavado con 100 µl de PBS 1x.
7. **Adición del anticuerpo primario.** Añadir 100 µL del anticuerpo primario para KDMA4A. Incubar a 4°C durante toda la noche.
8. **Lavados.** Al día siguiente, realizar 3 lavados con 100 µl de Tritón X- 100 al 1% cada 3 minutos.
9. **Adición del anticuerpo secundario.** Añadir de 4 a 5 gotas del anticuerpo secundario universal biotinilado (DAKO). Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. **Lavados.** Realizar 3 lavados con 100 µL de Tritón X- 100 al 1 % cada 3 minutos.
11. **Estreptavidina.** Añadir 4 o 5 gotas de estreptavidina – HRP (DAKO) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
12. **Lavados.** Realizar 3 lavados con 100 µL de Tritón X- 100 al 1 % cada 3 minutos.
13. **Revelado de la reacción.** Añadir cromógeno DAB (dilución: 1 gota por mL) e incubar a temperatura ambiente hasta observar la tinción positiva. Observar constantemente al microscopio para poder detener la reacción sumergiendo la laminilla en un *copling* con PBS 1 x.
14. **Contratinción con hematoxilina.** Sumergir las laminillas en un *copling* con hematoxilina de 5 a 10 segundos. Lavar en agua destilada y virar en un baño maría durante 10 minutos aproximadamente.
15. **Montaje de las laminillas.** Realizar el tren de hidratación pero de manera inversa.

Sustancia	Tiempo
Etanol al 70 %	10 minutos
Etanol 95 %	10 minutos

Etanol 100 %	10 minutos
Xilol 2	10 minutos
Xilol 1	12. inutos

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

12. REFERENCIAS

1. Agger, P.A. Cloos, J. Christensen, D. Pasini, S. Rose, J. Rappsilber, I. Issaeva, E. Canaani, A.E. Salcini, K. Helin, UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development, *Nature*, 449 (2007) 731-734.
2. Allis C.D., Berger S.L., Cote J., Dent S., Jenuwien T., Kouzarides T., Pillus L., Reinberg D., Shi Y., Shiekhatar R. , Shilatifard A., Workman J., Zhang Y., New nomenclature for chromatin-modifying enzymes, *Cell*. 131(2007) 633-636.
3. Altucci, R. Addeo, L. Cicatiello, S. Dauvois, M.G. Parker, M. Truss, M. Beato, V. Sica, F. Bresciani, A. Weisz, 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic

- stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells, *Oncogene*. 12 (1996) 2315-2324.
4. Aulmann S, Bläker H, Penzel R, Rieker RJ, Otto HF, y Sinn HP. CTCF gene mutations in invasive ductal breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 80 (2003) 347-352.
 5. Anand, R. Marmorstein, Structure and mechanism of lysine-specific demethylase enzymes. *J. Biol. Chem*. 282 (2007) 35425-35429.
 6. Angel, K. Hattori, T. Smeal, M. Karin, The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1, *Cell*. 55 (1988) 875-885.
 7. Arrowsmith C.H., Bountra C., Fish P.V., Lee K., Schapira M., Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery, *Nat. Rev. Drug. Discov*. 11 (2012) 384-400.
 8. Bagchi, C. Papazoglu, Y. Wu, D. Capurso, M. Brodt, D. Francis, M. Bredel, H. Vogel, A.A. Mills, CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36, *Cell*. 128 (2007) 459-475.
 9. Bannister A.J., Schneider R., Kouzarides T., Histone methylation: dynamic or static? *Cell*. 109 (2002) 801-806.
 10. Berry W.L., Shin S., Lightfoot S.A., Janknecht R., Oncogenic features of the JMJD2A histone demethylase in breast cancer, *Int. J. Oncol*. 41 (2012) 1701-1706.
 11. Berry WL, Janknecht R, KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. *Cancer Res*. 73 (2013) 2936-42.
 12. Black J.C., Allen A., Van Rechem C., Forbes E., Longworth M., Tschöp K. C. Rinehart, Qiton J., Walsh R., Smallwood A., N.J. Dyson, Whetstine J.R., Conserved antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1 γ during cell cycle progression, *Mol. Cell*. 40 (2010) 736-748.
 13. Black J.C., Manning A.L., Van Rechem C., Kim J., Ladd B., Cho J., Pineda C.M., Murphy N., Daniels D.L., Montagna C., Lewis P.W., Glass K., Allis C.D., Dyson N.J., Getz G., Whetstine J.R., KDM4A Lysine Demethylase Induces Site-Specific Copy Gain and Rereplication of Regions Amplified in Tumors, *Cell*. 154 (2013) 541-555.

14. N.J., Getz G., Whetstine J.R., KDM4A Lysine Demethylase Induces Site-Specific Copy Gain and Rereplication of Regions Amplified in Tumors, *Cell*. 154 (2013) 541-555.
15. Bourgo R.J., Siddiqui H., Fox S., Solomon D., Sansam C.G., Yaniv M., Muchardt C., Metzger D., Chambon P., Roberts C.W., Knudsen E.S, SWI/SNF deficiency results in aberrant chromatin organization, mitotic failure, and diminished proliferative capacity, *Mol. Biol. Cell*. 20 (2009) 3192-3199.
16. Burgess-Beusse B1, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F, Simpson M, West A, Felsenfeld G. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (2002) 16433-7.
17. Butcher DT, Mancini-DiNardo DN., Archer TK, y Rodenhiser DI. DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter. *Int J Cancer*. 111(2004) 669-678.
18. Butcher DT, y Rodenhiser DI. Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. *Eur J Cancer*. 43(2007)210-219.
19. Byvoet, G.R. Shepherd, J.M. Hardin, B.J. Noland. The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys*. 148 (1972) 558–567.
20. Caiafa P., Zlatanova J. CCCTC-binding factor meets poly(ADP-ribose) polymerase-1, *J Cell Physiol*. 2 (2009) 265-270.
21. Cascante A, Klum S, Biswas M, Antolin-Fontes B, Barnabé-Heider F, Hermanson O. Gene-specific methylation control of H3K9 and H3K36 on neurotrophic BDNF versus astroglial GFAP genes by KDM4A/C regulates neural stem cell differentiation. *J Mol Biol*. 426 (2014) 3467-77.
22. Caro E., Stroud H., Greenberg M.V., Bernatavichute Y.V., Feng S., Groth M., Vashisht A.A., Wohlschlegel J., Jacobsen S.E., The SET-domain protein SUV5 mediates H3K9me2 deposition and silencing at stimulus response genes in a DNA methylation-independent manner. *PLoS Genet*. 8 (2012) e1002995.

23. Chen Z., Zang J., Whetstine J., Hong X., Davrazou F., Kutateladze T.G., Simpson M., Mao Q., Pan C.H., Dai S., Hagman J., Hansen K., Shi Y., Zhang G., Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members, *Cell*. 125 (2006) 691–702.
24. Cicatiello L., Addeo R., Sasso A., Altucci L., Petrizzi V.B., Borgo R., Cancemi M., Caporali S., Caristi S., Scafoglio C., Teti D., Bresciani F., Perillo B., Weisz A., Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 7260-7274.
25. Cloos P.A., Christensen J., Agger K., Helin K., Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease, *Genes. Dev.* 22 (2008) 1115-1140.
26. Couture J.F., Collazo E., Ortiz-Tello P.A., Brunzelle J.S., Trievel R.C., Specificity and mechanism of JMJD2A, a trimethyllysine-specific histone demethylase, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 8 (2007) 689-695.
27. Crona, O. Dahlberg, L.E. Lundberg, J. Larsson, M. Mannervik, Gene regulation by the lysine demethylase KDM4A in *Drosophila*, *Dev. Biol.* 373 (2013) 453-463.
28. De La Rosa-Velázquez IA, Rincón-Arano H, Benítez-Bribiesca L, y Recillas-Targa F. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *CáncerRes.* 67(2007)2577-2585.
29. David, G.M. Turner, Y. Yao, A. Protopopov, R.A. Depinho, mSin3-associated protein, mSds3, is essential for pericentric heterochromatin formation and chromosome segregation in mammalian cells, *Genes. Dev.* 17 (2003) 2396-2405.
30. David, J.H. Dannenberg, N. Simpson, P.M. Finnerty, L. Miao, G.M. Turner, Z. Ding, R. Carrasco, R.A. Depinho, Haploinsufficiency of the mSds3 chromatin regulator promotes chromosomal instability and cancer only upon complete neutralization of p53, *Oncogene.* 25 (2006) 7354-7360.
31. Ding X., Pan H., Li J., Zhong Q., Chen X., Dry S.M., Wang C.Y., Epigenetic activation of AP1 promotes squamous cell carcinoma metastasis, *Sci. Signal.* 6 (2013) 1-13.

32. Felsenfeld G., Groudine M., Controlling the double helix, *Nature*. 421 (2003) 448-453.
33. Filippova G.N., Fagerlie S., Klenova E.M., Myers C., Dehner Y., Goodwin G., Neiman P.E., Collins S.J., Lobanenkov V.V., An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell Biol* 16 (1996) 2802–2813.
34. Gonzalo, M. García-Cao, M.F. Fraga, G. Schotta, A.H. Peters, S.E. Cotter, R. Eguía, D.C. Dean, M. Esteller, T. Jenuwein, M.A. Blasco, Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin, *Nat. Cell. Biol.* 7 (2005) 420-428.
35. Gray S.G., Iglesias A.H., Lizcano F., Villanueva R., Camelo S., Jingu H., Teh B.T., Koibuchi N., Chin W.W., Kokkotou E., Dangond F., Functional characterization of JMJD2A, a histone deacetylase- and retinoblastoma-binding protein, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 28507-28518.
36. Hahn M.A., Wu X., Li A.X., Hahn T., Pfeifer G.P., Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks. *PLoS One* 4 (2011) e18844.
37. Guerra-Calderas L, Rodrigo González-Barríos, Luis A. Herrera, David Cantú de León, Ernesto Soto-Reyes. The role of the histone demethylase KDM4A in cancer. *CáncerGenetics*. (2015), Vol. 208, Pag.215-224. doi:10.1016/j.cancergen.2014.11.001.
38. Hausinger R.P., Feil/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39 (2004) 21-68.
39. Hou, H. Yu, Structural insights into histone lysine demethylation, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20 (2010) 739-748.
40. Huang Y., Fang J., Bedford M.T., Zhang Y., Xu R.M., Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A, *Science*. 312 (2006) 748-751.
41. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 10 (2001) 1074-1080.

42. Jeong Y.S., Park J.S., Ko Y., Kang Y.K. JHDM3A module as an effector molecule in guide-directed modification of target chromatin, *J Biol Chem.* 6 (2011) 4461-4470.
43. Jovanovic, J.A. Rønneberg, J. Tost, V. Kristensen, The epigenetics of breast cancer, *Mol. Oncol.* 4 (2010) 242-254.
44. Kauffman E.C., Robinson B.D., Downes M.J, Powell L.G., Lee M.M., Scherr D.S., Gudas L.J., Mongan N.P., Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer, *Mol. Carcinog.* 50 (2011) 931-944.
45. Kelly W.G., Schaner C.E., Dernburg A.F., Lee M.H., Kim S.K., Villeneuve A.M., Reinke V., X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*. *Development.* 2 (2002) 479-492.
46. Kim S., Benoiton L., Paik W.K., Epsilon-alkyllysine. Purification and properties of the enzyme, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 3790-3796.
47. Kim T.D., Shin S., Berry W.L., Oh S., Janknecht R., The JMJD2A demethylase regulates apoptosis and proliferation in colon cancer cells, *J. Cell. Biochem.* 113 (2012) 1268-1276.
48. Kim, J. Daniel, A. Espejo, A. Lake, M. Krishna, L. Xia, Y. Zhang, M.T. Bedford, Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep.* 7 (2006) 397-403.
49. Klose R.J., Yamane K., Bae Y., Zhang D., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J., Zhang Y., The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature.* 42 (2006) 312-316.
50. Klose R.J., Zhang Y., Regulation of histone methylation by demethylase and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8 (2007) 307-318.
51. Kogure M, Takawa M, Cho HS, Toyokawa G, Hayashi K, Tsunoda T, Kobayashi T, Daigo Y, Sugiyama M, Atomi Y, Nakamura Y, Hamamoto R. Deregulation of the histone demethylase JMJD2A is involved in human carcinogenesis through regulation of the G(1)/S transition. *Cancer Lett.* 336 (2013) 76-84

52. Kooistra S.M., Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13 (2012) 297-311.
53. Kouzarides T., Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19 (2000) 1176–1179.
54. Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, Tachibana M. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. *Science.* 341 (2013)1106-1109.
55. Kwon SY, Xiao H, Wu C, Badenhorst P. Alternative splicing of NURF301 generates distinct NURF chromatin remodeling complexes with altered modified histone binding specificities. *PLoS Genet.* 7 (2009):e1000574.
56. Lachner, D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, T. Jenuwein, Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 410 (2001) 116-120.
57. Ladomery M1, Dellaire G. Multifunctional zinc finger proteins in development and disease. *Ann Hum Genet.* 66(2002) 331-42.
58. Lan Fei, Clair Nottke Amanda, and Shi Yang, Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases, *Curr Opin Cell Biol.* 20 (2008) 316-325
59. Lan, P.E. Bayliss, J.L. Rinn, J.R. Whetstine, J.K. Wang, S. Chen, S. Iwase, R. Alpatov, I. Issaeva, E. Canaani, T.M. Roberts, H.Y. Chang, Y. Shi, A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development, *Nature.* 449 (2007) 689-694.
60. Lee J., Thompson J.R., Botuyan M.V., Mer G., Distinct binding modes specify the recognition of methylated histones H3K4 and H4K20 by JMJD2A-tudor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (2008) 109-111.
61. Lee M.G., Wynder C., Cooch N., Shiekhattar R., An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation, *Nature.* 437 (2005) 432-435.
62. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 128 (2007):707-719.

63. Li B.X., Luo C.L., Li H., Yang P., Zhang M.C., Xu H.M., Xu H.F., Shen Y.W., Xue A.M., Zhao Z.Q., Effects of RNA interference-mediated gene silencing of JMJD2A on human breast cancer cell line MDA-MB-231. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* 30 (2011) 90.
64. Li B.X., Luo C.L., Li H., Yang P., Zhang M.C., Xu H.M., Xu H.F., Shen Y.W., Xue A.M., Zhao Z.Q., Effects of siRNA-mediated knockdown of jumonji domain containing 2A on proliferation, migration and invasion of the human breast cancer cell line MCF-7, *Exp. Ther. Med.* 4 (2012) 755-761.
65. Li B.X., Luo C.L., Zhang M.C., Li H., Li L.L., Xu H.F., Shen Y.W., Xue A.M., Zhao Z.Q., Expression of JMJD2A in infiltrating duct carcinoma was markedly higher than fibroadenoma, and associated with expression of ARHI, p53 and ER in infiltrating duct carcinoma, *Indian. J. Exp. Biol.* 51 (2013) 208-217.
66. Lienert F., Mohn F., Tiwari V.K., Baubec T., Roloff T.C., Gaidatzis D., Stadler M.B., Schübeler D., Genomic prevalence of heterochromatic H3K9me2 and transcription do not discriminate pluripotent from terminally differentiated cells. *PLoS Genet.* 7 (2011) e1002090.
67. Livak K.J., Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25 (2001) 402-408.
68. Lobanenkov, V. V., Nicolas, R. H., Adler, V. V., Paterson, H., Klenova, E. M., Polotskaja, A. V., and Goodwin, G. H.. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene*, 5 (1990) 1743 – 1753.
69. Loh Y.H., Zhang W., Chen X., George J., Ng H.H., Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells, *Genes. Dev.* 21 (2007) 2545-2557.
70. López-Bergami P., Lau E., Ronai Z., Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 10 (2010) 65-76.
71. Luger K., Hansen J.C., Nucleosome and chromatin fiber dynamics, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (2005) 188-196.

72. Lutz M., Burke L.J., Barreto G., Goeman F., Greb H., Arnold R., Schultheiss H., Brehm A., Kouzarides T., Lobanenkova V., Renkawitz R., Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases, *Nucleic Acids Res.* 15 (2000) 1707-1713.
73. Mallette F.A., Richard S., JMJD2A promotes cellular transformation by blocking cellular senescence through transcriptional repression of the tumor suppressor CHD5, *Cell Rep.* 2 (2012) 1233-1243.
74. Méndez-Catalá C.F., Gretton S., Vostrov A., Pugacheva E., Farrar D., Ito Y., Docquier F., Kita GX, Murrell A, Lobanenkova V, Klenova E., A novel mechanism for CTCF in the epigenetic regulation of Bax in breast cancer cells, *Neoplasia.* 15 (2013) 898-912.
75. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AH, Günther T, Buettner R, Schüle R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437 (2005) 436-439.
76. Mosammaparast, Y. Shi. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases, *Annu. Rev. Biochem.* 79 (2010) 155-179.
77. Mulero-Navarro S., Esteller M. Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer. *Epigenetics.* 4 (2008) 210-215.
78. Ohlsson, R., Renkawitz, R., and Lobanenkova, V.. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends. Genet.* 17 (2001) 520 – 527.
79. Ozanne B.W., McGarry L., Spence H.J., Johnston I., Winnie J., Meagher L., Stapleton G., Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme, *Eur. J. Cancer.* 36 (2000) 1640-1648.
80. Paik W.K., Kim S., Enzymatic demethylation of calf thymus histones, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51 (1973) 781-788.
81. Paik W.K., Kim S., Epsilon-alkyllysine. New assay method, purification, and biological significance, *Arch. Biochem. Biophys.* 165 (1974) 369-378.

82. Patani N., Jiang W.G., Newbold R.F., Mokbel K., Histone-modifier gene expression profiles are associated with pathological and clinical outcomes in human breast cancer, *Anticancer Res.* 31 (2011) 4115-4125.
83. Patel D.J., Wang Z., Readout of epigenetic modifications, *Annu. Rev. Biochem.* 82 (2013) 81-118.
84. Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J. Biomed. Biotechnol.* 10(2011)1155
85. Peters A.H., O'Carroll D., Scherthan H., Mechtler K., Sauer S., Schofer C., Weipoltshammer K., Pagani M., Lachner M., Kohlmaier A., Opravil S., Doyle M., Sibilia M., Jenuwein, T., Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability, *Cell* 107 (2001) 323-337.
86. Phillips, J. E., and Corces, V. G. 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137(2009)1194-1211.
87. Rando OJ. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2 (2012) 148-155.
88. Rea, F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis, T. Jenuwein. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406 (2000) 593-599.
89. Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, Bell AC, Litt MD, West AG, Gaszner M, Felsenfeld G. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (2002) 6883-8.
90. Reinke V., Smith H.E., Nance J., Wang J., Van Doren C., Begley R., Jones S.J., Davis E.B., Scherer S., Ward S., Kim S.K., A global profile of germline gene expression in *C. elegans*, *Mol Cell* (2000) 605-616.
91. Renaud S., Loukinov D., Bosman F.T., Lobanenko V., Benhattar J., CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 6850–6860.

92. Reuben M., Lin R., Germline X chromosomes exhibit contrasting patterns of histone H3 methylation in *Caenorhabditis elegans*, *Dev. Biol.* 245 (2002) 71-82.
93. Rubio ED, Reiss DJ, Welch PL, Distèche CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, Krumm A. CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 (2008) 8309-14.
94. Schneider J., Shilatifard A., Histone demethylation by hydroxylation: chemistry in action, *ACS. Chem. Biol.* 1 (2006) 75-81.
95. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88 (1997) 593–602.
96. Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y., Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1, *Cell* 119 (2004) 941-953.
97. Shi Y., Whetstine J.R., Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases, *Mol. Cell* 25 (2007) 1-14.
98. Shin S., Janknecht R., Activation of androgen receptor by histone demethylases JMJD2A and JMJD2D, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (2007) 742-746.
99. Slee R.B., Steiner C.M., Herbert B.S., Vance G.H., Hickey R.J., Schwarz T., Christian S., Radovich M., Schneider B.P., Schindelbauer D., Grimes B.R., Cancer-associated alteration of pericentromeric heterochromatin may contribute to chromosome instability, *Oncogene* 31 (2012) 3244-3253.
100. Soto-Reyes E, González-Barrios R, Cisneros-Soberanis F, Herrera-Goepfert R, Pérez V, Cantú D, Prada D, Castro C, Recillas-Targa F, Herrera LA. Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in gynecological cancers. *BMC Cancer.* 25 (2012) 12-40.
101. Sun S., Del Rosario B.C., Szanto A., Ogawa Y., Jeon Y., Lee J.T., Jpx RNA activates Xist by evicting CTCF. *Cell* 153 (2013) 1537-1551.
102. Teif V, Daria A. Beshnova, Yevhen Vainshtein, Caroline Marth, Jan-hilipp Mallm, Thomas Höfer and Karsten Rippe. Nucleosome repositioning links DNA

- (de)methylation and differential CTCF binding during stem cell development, *Genome Research*, (2014) [10.1101/gr.164418.113](https://doi.org/10.1101/gr.164418.113).
103. Teperino R., Lempradl A., Pospisilik J.A., Bridging epigenomics and complex disease: the basics. *Cell Mol Life Sci.* 70 (2013) 1609-1621.
 104. Thompson P.M., Gotoh T., Kok M., White P.S., Brodeur G.M., CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system. *Oncogene* 22 (2003) 1002-1011
 105. Torrano V, Navascués J, Docquier F, Zhang R, Burke LJ, Chernukhin I, Farrar D, León J, Berciano MT, Renkawitz R, Klenova E, Lafarga M, Delgado MD, Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribose)-dependent mechanism. *J Cell Sci.* 1 (2006) 1746-1759.
 106. Travers AA, Vaillant C, Arneodo A, Muskhelishvili G, DNA structure, nucleosome placement and chromatin remodelling: a perspective. *Biochem Soc Trans.* 40 (2012) 335-340.
 107. Vavouri T., Lehner B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. *Genome Biol.* 13 (2012) 110.
 108. Verrier L., Escaffit F., Chailleux C., Trouche D., Vandromme M., A new isoform of the histone demethylase JMJD2A/KDM4A is required for skeletal muscle differentiation, *PLoS Genet.* 7 (2011):e1001390.
 109. Wallace JA, Felsenfeld G. We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev.* 5 (2007) 400-7.
 110. Wagner EJ, Carpenter PB. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 23 (2012) 115-26. doi: 10.1038/nrm3274.
 111. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, y Schübeler D., Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 39 (2007) 457-466.
 112. Weth O, Paprotka C1, Günther K1, Schulte A1, Baierl M1, Leers J1, Galjart N2, Renkawitz R3. CTCF induces histone variant incorporation, erases the

- H3K27me3 histone mark and opens chromatin. *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 11941-51.
113. Whetstine J. R., Nottke A., Lan F., Huarte M., Smolikov S., Chen Z., Spooner E., Li E., Zhang G., Colaiacovo M., Shi Y., Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases, *Cell* 125 (2006) 467-481.
114. Witcher M, y Emerson BM. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell.* 34(2009) 271-84.
115. Wu X, Zhu Z, Li W, Fu X, Su D, Fu L, Zhang Z, Luo A, Sun X, Fu L, Dong JT. Chromodomain helicase DNA binding protein 5 plays a tumor suppressor role in human breast cancer. *Breast. Cancer. Res.* 8 (2012) 8-14
116. Yamane K., Toumazou C., Tsukada Y.I., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J., Zhang Y., JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor, *Cell* 125 (2006) 483-495.
117. Yamamoto S Wu Z2, Russnes HG, Takagi S, Peluffo G, Vaske C, Zhao X, Moen Volla HK, Maruyama R, Ekram MB, Sun H, Kim JH, Carver K, Zucca M, Feng J, Almendro V, Bessarabova M, Rueda OM, Nikolsky Y, Caldas C, Liu XS, Polyak K. JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer. *CáncerCell.* 25 (2014) 762-77.
118. Zhang, H.G. Yoon, J. Wong, JMJD2A is a novel N-CoR-interacting protein and is involved in repression of the human transcription factor achaete scute-like homologue 2 (ASCL2/Hash2), *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 6404-6414.

