



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

LA REGULACIÓN EPIGENÓMICA DEL GEN SUPRESOR
DE TUMOR XAF1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q.A. GEORGINA VICTORIA ACOSTA

TUTOR PRINCIPAL: DR. JORGE MELENDEZ ZAJGLA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA,
CD. DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria.

A mi mamá, Georgina Acosta Zarate

A mi papá Juan de Dios R. Victoria Murcio

Su fuerza, cariño y apoyo me han permitido continuar. Los amo.

A mis hermanos, Bibiana y Omar, su cariño me ha dado fuerzas. Los amo.

Agradecimientos

A Gustavo Ulises Martínez Ruíz por crecer juntos como investigadores y el apoyo durante este largo camino. Gracias.

Al Dr. Jorge Melendez Zajgla, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y el apoyo brindado. Gracias.

A Ariadna Aparicio Juarez, Marta Camacho, Marisú Ortega, G del Carmen Robles, Karla Vazquez, Laura Muñoz, Luis Hernandez, por su amistad. Gracias.

A los sinodales por sus valiosos comentarios en relación a esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios doctorales (número de becario 267949).

Al Instituto Carlos Slim de la Salud por el apoyo otorgado durante mis estudios de doctorales (número de folio S0922497).

El presente trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica como proyecto de tesis de doctorado. La dirección del mismo estuvo a cargo del Dr. Jorge Melendez Zajgla, siendo la parte experimental bajo la tutoría del Dr. Gustavo Ulises Martínez Ruíz.

Índice.

1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	10
2.1 Cáncer.....	10
2.2 Epigenética.....	10
2.3 Organización nuclear dependiente de mecanismos epigenéticos.....	11
2.3.1 Nucleosomas como unidad fundamental del empaquetamiento del ADN.....	11
2.3.2 Conformación de la fibra de cromatina.....	12
2.3.3 Complejos remodeladores de la cromatina.....	14
2.3.4 Metilación del ADN como mecanismo de regulación transcripcional.....	14
2.3.4.1 La maquinaria de metilación del ADN.....	15
2.3.5 Las modificaciones de histonas.....	16
2.3.6 Las proteínas moduladoras de la arquitectura de la cromatina.....	19
2.3.6.1 La proteína CTCF como regulador maestro.....	19
2.3.6.2 La regulación de CTCF.....	21
2.4 Epigenética y cáncer.....	21
2.4.1 La hipometilación y el cáncer.....	22
2.4.2 La hipermetilación como mecanismo de silenciamiento génico.....	23
2.4.3 La relación entre las modificaciones postraduccionales de histonas y el cáncer.....	23
2.4.4 La proteína CTCF y el cáncer.....	24
2.5 La carcinogénesis.....	25
2.6 La apoptosis.....	26
2.6.1 La regulación de la apoptosis.....	28
2.6.1.1 La regulación de la vía extrínseca.....	28
2.6.1.2 La regulación de la vía intrínseca y la familia de proteínas BCL-2.....	29
2.6.1.3 La regulación negativa de las caspasas y la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis.....	30
2.6.2 Los antagonistas de las PIAs fomentan la re-activación de la apoptosis.....	31
2.7 La proteína XAF1 como molécula pro-apoptótica.....	31
2.7.1 La estructura de XAF1.....	32
2.7.2 La expresión de XAF1 en cáncer.....	34
2.7.3 La actividad de XAF1 como gen supresor de tumor.....	34
2.7.4 Los reguladores transcripcionales del gen XAF1.....	35
2.7.5 La regulación epigenética de XAF1.....	36
3. Planteamiento del problema.....	38
4. Hipótesis.....	39
5. Objetivo general.....	40
5.1 Objetivos particulares.....	40
6. Materiales y métodos.....	41
6.1 Cultivo celular.....	41
6.1.1 Condiciones desmetilantes.....	41
6.2 Construcciones.....	41

6.2.1 Clonación de la secuencia promotora de XAF1 en el plásmido reportero peGFP.....	41
6.2.2 Clonación de la secuencia promotora de XAF1 en el plásmido reportero pSEAP2-Basic.....	42
6.2.3 Sistema de sobre-expresión de CTCF.....	42
6.3 Transfecciones transitorias.....	43
6.3.1 Transfección transitoria de ARN de interferencia (ARNi) contra CTCF....	43
6.3.2 Transfecciones del gen reportero SEAP.....	43
6.4 Transfecciones estables.....	44
6.4.1 Las células estables del sistema inducible de sobreexpresión de CTCF....	44
6.4.2 Las células estables del gen reportero GFP.	44
6.5 El análisis de la metilación del ADN.	44
6.6 El ensayo de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP de sus siglas en inglés).	45
6.7 El ensayo de Western-blot.....	46
6.8 El ensayo de inmunoprecipitación de la proteína.....	46
6.9 El ensayo de viabilidad celular.	47
6.10 La transcripción reversa del ARN mensajero acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa de modo cuantitativo (RT-PCRc).	47
6.11 El análisis estadístico.	48
7. Resultados.....	49
7.1 La activación transcripcional de XAF1 por agentes desmetilantes.	49
7.2 El patrón de metilación del promotor de XAF1.....	53
7.3 CTCF interacciona con el promotor de XAF1 cuando las células son estimuladas con TNF- α o IFN- α	54
7.4 La expresión de XAF1 es regulada por CTCF.....	59
7.4.1 Efecto de la ausencia de CTCF sobre la regulación de XAF1.	59
7.4.1.2 Efecto de la sobre-expresión de CTCF sobre la regulación de XAF1.....	63
7.5 CTCF protege al gen de XAF1 del silenciamiento epigenético.....	66
7.6 La expresión de XAF1 es regulada por CTCF en condiciones apoptóticas.....	71
8. Discusión.....	75
9. Conclusiones	82
10. Anexo	83
10.1 Tabla de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	83
11. Bibliografía.....	85
12. Artículo publicado.....	94

1. Resumen.

El cáncer se caracteriza por la evasión de la apoptosis o muerte celular programada. La activación de la apoptosis culmina con la activación de las caspasas. Uno de los mecanismos más importantes en la regulación de la apoptosis es llevado a cabo por la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (PIAs) las cuales inhiben las formas activas de las caspasas por interacción física con ellas. La proteína XIAP es el miembro más estudiado de las PIAs la cual presenta el mayor potencial inhibitorio sobre las caspasas. Sin embargo, la proteína XAF1 es capaz de interactuar con XIAP inhibiendo su actividad antiapoptótica y fomentando la culminación de la apoptosis. En diversos tipos tumorales la expresión de XAF1 es baja o ausente en comparación con los tejidos normales. Resultados obtenidos de ensayos *in vitro* e *in vivo* posicionan a XAF1 como un importante gen supresor de tumores. Actualmente, no se ha descrito en forma clara cuales son los mecanismos implicados en su silenciamiento. A nivel epigenético, se ha demostrado que el promotor de XAF1 en el cáncer se encuentra hipermetilado en los dinucleótidos CpG, contrario a lo observado en tejidos normales, y que el uso de agentes desmetilantes induce su reactivación transcripcional. Hasta el momento no existen reportes que expliquen un mecanismo por el cual el promotor de XAF1 se encuentre hipermetilado en cáncer. Teniendo presente lo anterior, esta tesis describe un mecanismo epigenético mediado por CTCF en la regulación de la metilación y la adquisición de un perfil de modificaciones de histonas en el promotor de XAF1 que explican su silenciamiento transcripcional y su incapacidad a responder a activadores transcripcionales previamente descritos.

Debido a que XAF1 se encuentra silenciado en células de cáncer, primero se estableció un modelo que fuera responsivo a los activadores transcripcionales conocidos de XAF1. Evaluamos la respuesta transcripcional de XAF1 ante el estímulo de los activadores transcripcionales en condiciones basales y en condiciones desmetilantes. Observamos que hay una mayor respuesta transcripcional de XAF1 en condiciones desmetilantes. Estos resultados nos llevaron a hacernos las siguientes preguntas: ¿Por qué los activadores transcripcionales son funcionales en condiciones desmetiladas? ¿La metilación de XAF1 evita la unión de proteínas necesarias para la activación transcripcional de XAF1?. Para resolverlas, se analizó la presencia de sitios de unión para factores de transcripción en la secuencia del promotor de XAF1.

Encontramos un posible sitio de unión para el factor CTCF. Por medio de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina validamos este sitio de unión. Así mismo, observamos que CTCF no se une al promotor de XAF1 cuando este se encuentra metilado. Demostramos que la unión de CTCF contribuye a la activación transcripcional de XAF1. Al disminuir la expresión de CTCF ó eliminar su sitio de unión del promotor de XAF1 observamos una disminución de la actividad transcripcional de XAF1 en un ensayo de gen reportero. De manera concordante, la sobre-expresión de CTCF induce un incremento de la expresión de XAF1. También se estudió el efecto de CTCF sobre la regulación del promotor de XAF1 en un contexto genómico integrado. A este respecto, observamos que la unión de CTCF al promotor de XAF1 favorece dos eventos: *a)* un enriquecimiento de la marca de histona H3K4-2me; *b)* un estado libre de metilación de los dinucleótidos CpG. Utilizando el mismo contexto integrado se estudió la regulación de XAF1 por CTCF en condiciones apoptóticas en presencia de los activadores transcripcionales de XAF1; observamos que la unión de CTCF es necesaria para la activación de XAF1 aun en presencia de los activadores transcripcionales de XAF1. Nuestros resultados muestran un mecanismo epigenético responsable del silenciamiento de XAF1. La unión de CTCF al promotor de XAF1 permite una configuración de cromatina abierta manteniendo un estado libre de metilación y un enriquecimiento marcas activas de histonas como H3K4-2me.

2. Introducción.

2.1 Cáncer.

El cáncer se desarrolla a través de una serie de sucesivas interrupciones en el control de la proliferación celular, angiogénesis, muerte celular y diferenciación que conducen a la invasión y metástasis [1]. Diversos mecanismos genéticos como mutaciones puntuales, alteración en el número de copias de genes, inserciones y deleciones son considerados los responsables del fenotipo maligno. Por ello el cáncer se ha considerado como una enfermedad genética. Aunque los eventos genéticos mencionados anteriormente no representan un medio eficiente para la transformación maligna debido a que ocurren en baja frecuencia; se ha propuesto que algunas células superan este obstáculo al adquirir defectos en los genes de reparación de ADN incrementando así la tasa de mutación [2, 3]. El origen genético del cáncer ha sido ampliamente aceptado, aunque este paradigma se ha expandido para incorporar la interrupción de mecanismos epigenéticos en cáncer [4, 5]. Tanto la visión genética como epigenética pueden involucrar expresión génica anormal. Las anomalías epigenéticas en cáncer comprenden múltiples aberraciones en casi todos los componentes de la cromatina involucrados en el empaquetamiento del genoma humano [4]. El estado de expresión de un gen se determina por el empaquetamiento de la cromatina en sus regiones regulatorias, como son: promotor, potenciadores, e insuladores, así como la presencia de factores de transcripción y enzimas modificadoras de la cromatina.

2.2 Epigenética.

La epigenética comprende los mecanismos que inician y mantienen los patrones heredables de regulación de un gen sin afectar la secuencia del genoma [4]. Los mecanismos involucrados en el campo de la epigenética ocurren sobre la estructura de la cromatina como son la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas y los complejos remodeladores de la cromatina implicados en el posicionamiento del nucleosoma a lo largo del ADN. Estos mecanismos ó marcas epigenéticas en conjunto

son referidas como el epigenoma y determinan la estructura de la cromatina [6].

2.3 Organización nuclear dependiente de mecanismos epigenéticos.

La hélice de ADN está plegada jerárquicamente formando estructuras de alto orden que eventualmente forman un cromosoma. Un cromosoma es la asociación de proteínas específicas con la hélice de ADN, y tiene diversas funciones biológicas. En primera instancia, el cromosoma tiene la función de compactar el ADN para mantenerlo dentro del núcleo celular. Dado que la cadena de ADN sin la asociación de proteínas es relativamente inestable, el ADN dentro del cromosoma aumenta radicalmente su estabilidad. Otra función biológica importante, es que solo el ADN asociado al cromosoma es eficientemente transmitido a las células hijas durante la división celular. Finalmente, el cromosoma confiere una organización al ADN de tal forma que regula la accesibilidad al mismo. Esta última característica tiene infinidad de consecuencias en la transcripción génica. Los cromosomas se encuentran altamente empacados en el núcleo dentro de territorios cromosómicos [7].

2.3.1 Nucleosomas como unidad fundamental del empaquetamiento del ADN.

Dentro de cada cromosoma, 147 pares de bases (pb) de ADN se encuentran enrollados en dos giros superhelicoidales alrededor del octámero de histonas (dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4); formando la unidad fundamental de la cromatina, el nucleosoma (Figura 1) [8]. El nucleosoma lleva a cabo dos funciones: la primera como un componente estructural de la fibra de cromatina, segundo como un modulador de la expresión génica [9]. Los nucleosomas están conectados entre si por un fragmento de ADN referido como ADN vinculante formando la fibra de 11 nm ó collar de perlas. En el caso de humanos el ADN vinculante es un fragmento de 38-53 pb.

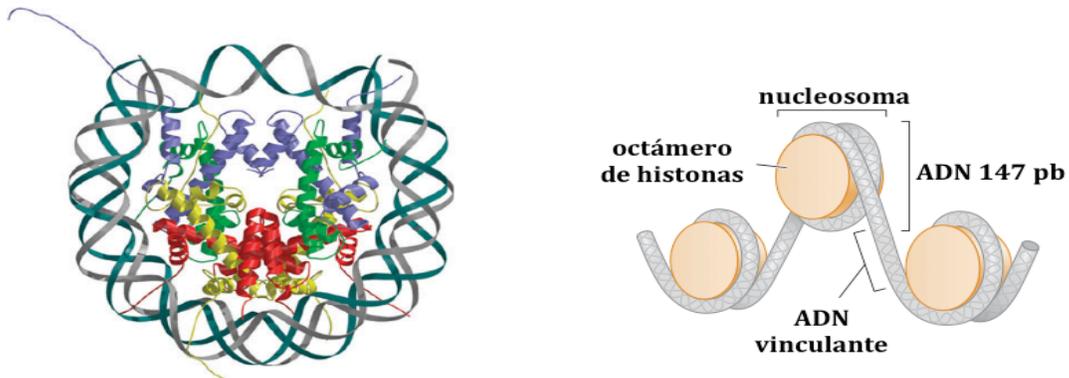


Figura 1. Empaquetamiento del ADN en el nucleosoma. (izquierda) El octámero de histonas alrededor del cual 147 pares de bases de ADN se encuentran enrollados (H3:azul; H4:verde; H2A:amarillo; H2B:rojo). (Modificado de Luger K., 1997). (derecha) Esquema que muestra los componentes del nucleosoma.

2.3.2 Conformación de la fibra de cromatina.

La fibra de 11 nm a su vez es organizada en una fibra más condensada, generalmente llamada como fibra de 30 nm, la cual es estabilizada por la unión de la histona vinculante H1.

Existen dos modelos que explican la estructura de la fibra de 30 nm. En el modelo de solenoide, los nucleosomas están organizados en una super-hélice compuesta por seis nucleosomas por vuelta. El ADN vinculante se encuentra en el centro de la hélice, sin pasar por el eje (Figura 2). Una variante de este modelo propuso que el ADN vinculante atraviesa el eje central de la fibra de 30 nm, de este modo los nucleosomas forman un zig-zag (Figura 2) [9].

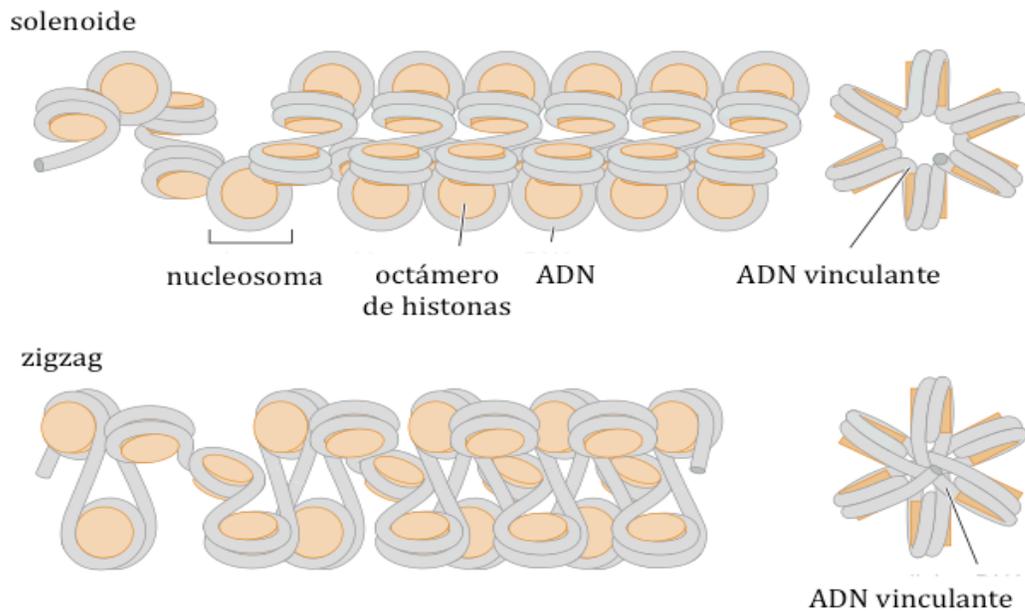


Figura 2. Modelos que explican la estructura de la fibra de 30 nm. a) el modelo de solenoide, b) el modelo de zigzag.

La fibra de 30 nm es plegada para compactar aún más el ADN. La fibra de 30 nm forma asas de 40 a 90 kilo bases que se mantienen unidas a través de estructura llamada adaptador nuclear. La estructura de la cromatina tiene un marcado efecto sobre como la secuencia de ADN es interpretada [10]. La estructura tridimensional de la cromatina dentro de los territorios cromosómicos es dinámicamente condensada y descondensada, dicha actividad está correlacionada con la actividad transcripcional. La transcripción requiere el ensamble de complejos proteicos, los cuales pueden formar contactos intra e intercromosomales que contribuyen al establecimiento de un arreglo tridimensional específico de la cromatina [7].

La cromatina se encuentra organizada en dos dominios distintos: eucromatina y heterocromatina, ambos son definidos de acuerdo al nivel de compactación y las funciones genómicas asociadas. La eucromatina tiene una relativa perdida de compactación, es transcripcionalmente permisiva; mientras que la heterocromatina es más condensada y transcripcionalmente represiva. La diferencia entre la estructura de la heterocromatina y la estructura de la eucromatina depende de cómo el nucleosoma se encuentra ensamblado en

estas diferentes regiones. Las regiones heterocromáticas están formadas por ADN nucleosomal ensamblado dentro de estructuras de alto orden que forman una barrera para la expresión génica. Mientras que los nucleosomas de las regiones de eucromatina se encuentran ensamblados en una estructura menos organizada.

2.3.3 Complejos remodeladores de la cromatina

La estructura de la cromatina puede ser alterada por remodelamiento del nucleosoma por complejos enzimáticos específicos dependientes de ATP. Estos complejos modulan las interacciones entre la secuencia de ADN y la carga de la superficie de los nucleosomas. A través de tres tipos de cambios sobre el nucleosoma: 1) deslizamiento del ADN a lo largo de la superficie del octámero de histonas, 2) movilidad del octámero de histonas, 3) intercambio de dímeros de las histonas como H2A/H2B que conforman al nucleosoma con variantes de dímeros de histonas H2A.X/H2B.

2.3.4 Metilación del ADN como mecanismo de regulación transcripcional.

Las secuencias de dinucleótidos CpG en donde una base citosina (C) se encuentra unida covalentemente a una base guanina (G) por un enlace fosfodiéster es un sitio aceptor de grupos metilo dentro del ADN de mamíferos. La metilación de la citosina en la posición 5 (5-metil-citosina) de los sitios CpG es la modificación más común en el genoma humano. Las secuencias CpG algunas veces se encuentran en el genoma como discretos agrupamientos llamados islas CpG, frecuentemente se localizan en la región 5' de los genes. Las islas CpG usualmente se ubican en la vecindad de genes y a menudo se encuentran cerca de los promotores de genes expresados ampliamente y típicamente se extienden dentro del primer exón. Las islas CpG pueden también encontrarse río abajo del sitio de inicio de la transcripción. En células normales se encuentran desmetiladas mientras que en cáncer son blanco de metilación de *novo* [11].

La ganancia de metilación puede silenciar genes al evitar o promover el reclutamiento de

proteínas reguladoras al ADN. Esto puede inhibir la activación transcripcional por el bloqueo de la unión de factores de transcripción a sus sitios blanco ó por el reclutamiento de proteínas con dominio de unión a dinucleótidos CpG metilados (DUM). Las proteínas DUM reclutan enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de cromatina [6, 12].

2.3.4.1 La maquinaria de metilación del ADN.

Los patrones y perfiles de metilación del ADN son mantenidos durante la embriogénesis y división celular por un grupo de enzimas llamadas ADN metiltransferasas. Las ADN metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B se encargan del mantenimiento de la metilación basal y de la metilación de *novo*. La primera ADN metiltransferasas descubierta fue la DNMT1, la cual se encarga del mantenimiento de los patrones de metilación ya preexistentes en el genoma. La DNMT1 actúa preferentemente sobre ADN hemimetilado, de este modo copia los patrones de metilación en la cadena de ADN recién sintetizada. La principal función de la DNMT1 es el mantenimiento de la metilación. Existe evidencia que demuestra que la enzima DNMT1 interacciona con la maquinaria de replicación, lo que refuerza su papel como encargada del mantenimiento de la metilación del ADN. También se ha demostrado que la enzima DNMT1 puede establecer un complejo represor transcripcional con la deacetilasa de histona 2 y la proteína 1 asociada a DNMT1 en la fosa de replicación. Estos datos sugieren que la enzima DNMT1 tiene múltiples funciones en la célula en además de su papel en el mantenimiento de metilación. DNMT1 participa en la embriogénesis, impronta genómica y la inactivación del cromosoma X.

Las enzimas DNMT3A y DNMT3B actúan de manera independiente de replicación y muestran una preferencia por el ADN no metilado y hemimetilado. También se encargan de la metilación de *novo* durante el desarrollo embrionario [13].

2.3.5 Las modificaciones de histonas.

Estructuralmente, las histonas están conformadas por un dominio globular en su extremo carboxilo terminal y un dominio flexible sin estructura en su extremo amino terminal el cual es llamado cola de histonas. Estas colas de histonas sobresalen de la estructura del nucleosoma por lo que pueden sufrir una variedad de modificaciones postraduccionales (MPTs) como: acetilación, fosforilación, metilación (Figura 3), sumoilación, ADP-ribosilación, biotilación, e isomerización de prolina mientras que la ubiquitinación ocurre en el extremo carboxilo terminal. Las MPTs ocurren en los residuos de lisina, arginina y serina. Las MPTs que ocurren en las colas de histonas son adicionadas o removidas por la acción catalítica de un grupo de sistemas enzimáticos asociados a la cromatina. Los principales complejos enzimáticos son: las acetiltransferasas de histonas (HATs) adicionan grupos acetilo sobre los residuos de lisina mientras que las desacetilasas de histonas (HDACs) los remueven. Las cinasas de histonas adicionan grupos fosfato sobre residuos específicos de serina ó treonina mientras que las fosfatasas los remueven. Las metiltransferasas de histonas (HMTs) adicionan grupos metilo sobre residuos de lisina ó sobre residuos de arginina, la metilación de ambos residuos es revertida por la acción de las desmetilasas de histonas (HDMs). Por ejemplo PR-Set7 que es una HMT monometila a la histona H4 en la lisina 20 (H4K20me1) mientras que la HDM llamada PHF8 es la responsable de remover dicha metilación [14]. Las HMTs pueden producir mono, di ó tri metilación.

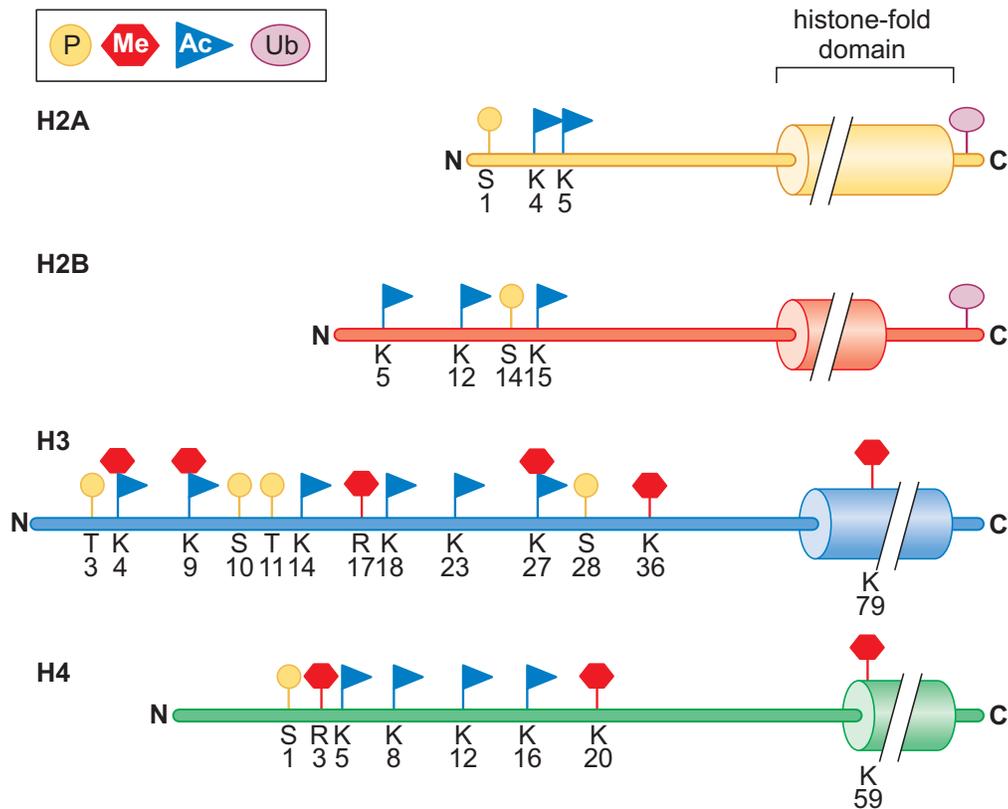


Figura 3. Modificaciones postraduccionales de histonas, fosforilación, metilación, acetilación y ubiquitinación.

A diferencia de la metilación del ADN, regularmente asociada al silenciamiento transcripcional, las MTPs de las histonas regulan procesos celulares fundamentales como la transcripción y la replicación [15]. Esto es a través de un complejo perfil de MTPs en la cola de las histonas. Conduciendo a la propuesta de un “código de histonas” [16, 17]. Este código propone que las combinaciones o secuencias de las MTPs resultan en un evento de señalización transcripcional por reclutamiento de inductores o represores transcripcionales [17]. Estas combinaciones tienen un impacto en la cromatina de alto orden ya que los dominios eucromáticos y heterocromáticos son dependientes de la concentración o combinación de las MTPs en el nucleosoma (Figura 4)

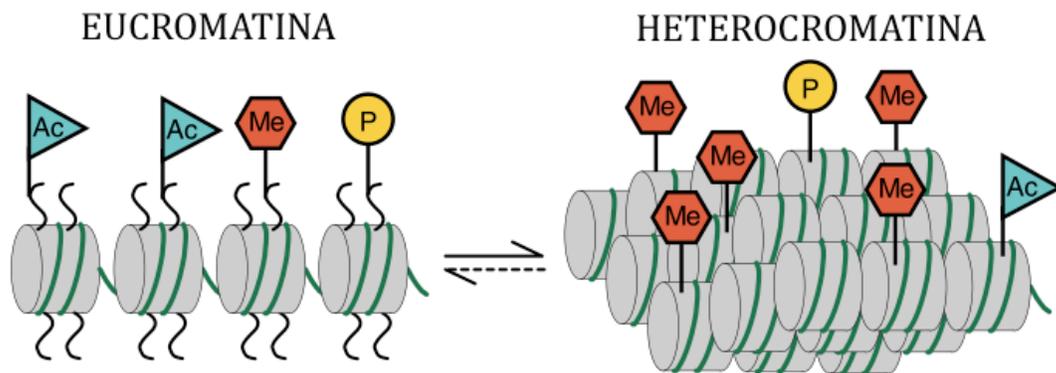


Figura 4. Modificaciones postraduccionales de histonas en dominios eucromáticos ó heterocromáticos (Modificado de Junuwein 2001).

Las MPTs pueden activar o reprimir dependiendo de cual es la modificación presente en la cola de histonas. La acetilación de los residuos de lisina alteran la carga cambiando las propiedades electrostáticas de los nucleosomas, mientras que la metilación provee sitios de unión para proteínas asociadas a la cromatina tales como la proteína 1 asociada a heterocromatina (HP1) [18]. Estudios de todo el genoma han mostrado que diferentes combinaciones de modificaciones postraduccionales de histonas en regiones genómicas específicas pueden abrir o cerrar la estructura de la cromatina [13]. Sin embargo, se ha correlacionado claramente algunas MPT con la expresión génica. Por ejemplo, la trimetilación de la lisina 4 sobre la histona H3 (H3K4me3) se ha asociado con genes transcripcionalmente activos [19], mientras que la trimetilación de H3K9 (H3K9me3) y de H3K27 (H3K27me3) son correlacionadas con promotores de genes reprimidos. Por otra parte las modificaciones que sufre la histonas 4 en la lisina (K) 16 y 20 tienen importantes papeles en la determinación de la estructura y función de la cromatina. La desacetilación de la K16 y trimetilación de la K20 son característicos de dominios heterocromaticos [20]. En general la hipoacetilación y la hipermetilación de histonas son características de secuencias de ADN metiladas y reprimidas en células normales, como es el caso del cromosoma X.

2.3.6 Las proteínas moduladoras de la arquitectura de la cromatina.

Adicional a la estructura de la cromatina, existe evidencia que sugiere un posicionamiento espacial del genoma dentro del espacio nuclear tridimensional, el cual tiene una importante influencia sobre la función del genoma. La cromatina no es estática dentro de los territorios, es dinámicamente condensada y descondensada de acuerdo a la actividad transcripcional. La observación de asas intracromosomales de amplio rango así como de contactos intercromosomales. Estos contactos cromatínicos de amplio rango se han vinculado a importantes procesos biológicos como son la expresión génica monoalélica e inactivación del cromosoma X. Estos descubrimientos sugieren que la proteína CTCF puede ser un componente heredable dentro del sistema epigenético regulando la compleja interacción entre la metilación del ADN, la estructura de alto orden de la cromatina, y la regulación de la expresión génica [21].

2.3.6.1 La proteína CTCF como regulador maestro.

El factor nuclear “CCCTC-binding protein” ó CTCF tiene una expresión ubicua y se encuentra altamente conservada entre diversas especies [21]. Esta proteína fue descrita originalmente como un “factor multivalente” debido a su capacidad de unirse a una amplia gama de secuencias de ADN por medio de sus once dedos de zinc [22]. Inicialmente fue descrita como un regulador negativo de la expresión de *Myc* [22], desde entonces se han descrito para CTCF una gran variedad de funciones biológicas. Esta proteína es capaz de regular la expresión génica debido a sus funciones como factor de transcripción, activador/represor transcripcional, bloqueador de elementos reguladores a distancia y/o barrera insuladora, regulador de la impronta genómica, y del silenciamiento de cromosoma X. Se ha postulado que todas las acciones antes descritas son secundarias a su principal función biológica, es considerado un organizador del genoma [21].

La proteína CTCF humana esta conformada por 727 aminoácidos, posee un dominio central de unión al ADN de once dedos de zinc (DZ) [21], el cual esta enmarcado por un segmento amino terminal y un carboxilo terminal sin estructura secundaria definida [23]. A través de

ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP por sus siglas en inglés), seguidos de secuenciación masiva del genoma (ChIP-seq) de diferentes líneas celulares [24, 25] y tejidos de diferentes especies [26] se ha podido mapear decenas de miles de sitios genómicos de unión a CTCF [24, 26]. Una porción de los sitios de unión de CTCF se encuentran en regiones en transición entre dominios de cromatina activa e inactiva [27]. La distribución en el genoma de los sitios de unión a CTCF es variada. Casi la mitad (46%) se encuentran en regiones intergénicas; cerca de un 20% se encuentran dentro de las 2 kilo bases (kb) del sitio de inicio de la transcripción mientras que el resto caen dentro de los genes; con una distribución del 22% en los intrones y un 12% en los exones [24]. A partir de estos estudios se ha identificado una secuencia consenso de alrededor de 20 pares de bases. Es importante resaltar que existen sitios experimentalmente validados que no reflejan la secuencia consenso obtenida.

CTCF se une a diversas secuencias de ADN por medio de diferentes combinaciones de sus 11 DZ. Se ha determinado que los DZ del 4 al 8 son biológicamente relevantes en la interacción de CTCF con el ADN [28]. Los complejos CTCF/ADN ensamblados son potencialmente funcionales en términos de su interacción con otras proteínas, quedando regiones expuestas de CTCF disponibles para interactuar con otras proteínas tales como la proteína helicasa CHD8. También interactúa con nucleofosmina [29] y Kaiso [30].

El mecanismo más estudiado por el cual la unión de CTCF al ADN puede ser alterada, es por la vía de la metilación de los dinucleótidos CpG dentro o alrededor de la secuencia consenso [28]. En el insuladot de β -globina de pollo, se ha determinado que la metilación de un solo dinucleótido CpG dentro de la secuencia consenso de CTCF afecta la unión de la proteína [28]. Adicionalmente, la unión de CTCF puede prevenir la propagación de la metilación del ADN manteniendo zonas libres de metilación [31].

2.3.6.2 La regulación de CTCF.

La proteína CTCF también es regulada por modificaciones postraduccionales, tales como: fosforilación, poli-(ADP)-Ribosilación, y SUMOilación, las cuales tienen efectos sobre las funciones de CTCF.

CTCF es fosforilado por la cinasa CK2 en 4 serinas localizadas en la región carboxilo terminal [32, 33]. La fosforilación de CTCF tiene efectos negativos sobre su función de bloqueador de potenciador, sin alterar su asociación al ADN. CTCF sufre poli-(ADP)-ribosilación por la polimerasa poli(ADP-ribosa)-1 (PARP-1) en región amino terminal. La marca de poli-(ADP)-ribosilación está involucrada en las propiedades de CTCF como insulador de la cromatina de loci improntados y no improntados [34]. CTCF también puede ser SUMOilada por SUMO 1, 2 y 3 en las lisinas 74 y 698 [35]. Estas modificaciones postraduccionales pueden afectar su función como insulador, así como su asociación con otras proteínas.

2.4 Epigenética y cáncer.

Un número creciente de reportes sugieren que las alteraciones epigenéticas tienen un papel fundamental en la promoción del evento carcinogénico [36].

Durante la transformación maligna se da lugar a la metilación de secuencias reguladoras de genes y la desmetilación masiva de ADN en forma general tanto en genes como en secuencias repetitivas [37]. Específicamente, se ha observado la hipermetilación e hipometilación de secuencias reguladoras en genes supresores de tumores y oncogenes, respectivamente. Esto puede resultar en silenciamiento génico en las células malignas y en su progenie. El silenciamiento de genes supresores de tumores en células de cáncer se ha asociado con una combinación particular de marcas de histonas: la desacetilación de las histonas H3 y H4, la pérdida de la trimetilación de las histonas H3 en la lisina 4 (H3K4), la ganancia de metilación en la lisina 9 (H3K9) y trimetilación en la lisina 27 (H3K27) [38].

Durante la progresión de un tumor, los niveles de silenciamiento epigenético de promotores incrementa con respecto a los determinantes de la cromatina que se encuentran

involucrados en la densidad de la metilación de las islas CpG, los patrones de modificaciones postraduccionales de las histonas, así como patrones alterados de expresión de enzimas moduladoras de la cromatina [13].

Existe evidencia que indica que el remodelamiento del nucleosoma puede conducir a un aberrante silenciamiento génico por vía de transmisión de marcas de cromatina represivas hacia genes supresores de tumor. Esto se ha visto en leucemias en donde el complejo NuRD facilita el reclutamiento de PRC2 y DNMT3A al promotor del gen PMLRARa llevando a su permanente silenciamiento [39].

2.4.1 La hipometilación y el cáncer.

La iniciación y progresión del cáncer están acompañados de profundos cambios en la metilación del ADN. Como se mencionó en el apartado anterior el epigenoma del cáncer se caracteriza por una hipometilación masiva del genoma. La cual ocurre en áreas genómicas donde hay una baja densidad de genes, incluyendo elementos repetitivos, retrotransposones, e intrones [4]. Se han propuesto tres mecanismos que explican la contribución de la hipometilación del ADN en la carcinogénesis: 1) la hipometilación del ADN conduce a la inestabilidad genómica. La baja metilación del ADN en secuencias repetidas puede favorecer a la recombinación, lo que da lugar a deleciones o translocaciones, promoviendo rearrreglos cromosomales. Se ha observado en pacientes que presentan mutaciones en la línea germinal de la enzima DNMT3B muestran numerosas alteraciones cromosomales [40]. 2) la hipometilación del ADN puede conducir a la activación de genes como R-Ras, ciclina D2 [12]. 3) la pérdida de grupos metilo en el ADN puede interrumpir la impronta genómica. La pérdida de la impronta de IGF2 resulta en un incremento de riesgo de cáncer colorectal [41].

2.4.2 La hipermetilación como mecanismo de silenciamiento génico.

La relación entre la metilación de las islas CpG y la inactivación de genes se ha observado en distintos contextos biológicos. Se observó que los genes confinados a silenciarse en el cromosoma X inactivo en las mujeres, adquieren metilación en las islas CpG [42]. Un fenómeno similar es observado en la impronta genómica o parental. Durante este proceso, la hipermetilación del gen a silenciarse ocurre en uno de los alelos de la línea germinal ya sea femenina o masculina produciendo una expresión monoalélica. Otra función de la metilación incluye la supresión de elementos potencialmente transponibles, tales como las secuencias Alu. Se ha demostrado que la metilación atrae a la proteína 2 de unión a CpG metilados (MeCP2). Esta proteína actúa como un represor transcripcional global además de actuar en el mantenimiento del estado de cromatina cerrada.

El mecanismo por el cual los promotores de genes específicos son blanco de hipermetilación en el proceso de tumorigénesis no es claro. Una posibilidad es que la hipermetilación de las islas CpG sea debida a que se encuentran en regiones genómicas que son objeto de reprogramación epigenética. Otra posibilidad es que algunos promotores de genes son blancos específicos de las enzimas DNMTs [43].

2.4.3 La relación entre las modificaciones postraduccionales de histonas y el cáncer.

Adicional al papel individual de la metilación del ADN y las MPT de las histonas ambas interaccionan en múltiples niveles, determinando la expresión de genes y la organización de la cromatina. Se ha descrito que HMTs como G9a y PRMT5 pueden reclutar directamente a las enzimas DNMTs a regiones genómicas específicas conduciendo al silenciamiento génico [44, 45]. Durante el desarrollo de la tumorigénesis, en las células ocurren cambios globales en las MTPs, los cuales pueden afectar el reclutamiento de proteínas remodeladoras de la cromatina, factores de transcripción contribuyendo al fenotipo maligno. La acetilación de los residuos de lisina presentes en las colas de las histonas son

generalmente asociadas a activación transcripcional. Un cambio que ocurre en la cromatina durante la tumorigénesis es la pérdida global de la acetilación de la lisina 16 (H4K16ac) y la trimetilación de la lisina 20 (H4K20me3) de la histona H4 [20]. Esta pérdida de acetilación es llevada a cabo por las HDACs da lugar a la represión de genes. HDADCs frecuentemente se encuentran sobre-expresadas en varios tipos de cáncer [46]. La monometilación de lisina 20 de la histona H4 está involucrada en cáncer. Esta modificación es hecha exclusivamente por la HMT PR-Set7. Se ha visto que la aberrante expresión y/o función de PR-Set7 tiene un impacto global en la abundancia de H4K20me1, la cual puede promover fenotipos aberrantes que promueven la progresión, desarrollo y metástasis de tumor [14]. Otra modificación de la histona H4 involucrada en cáncer es la pérdida de lisina monoacetilada y trimetilada 16 y 20 respectivamente. Esta alteración ocurre en secuencias repetidas de ADN que se encuentran hipometiladas en células transformadas [20]. Esto también se ha observado en cáncer de mama y de hígado [47, 48].

2.4.4 La proteína CTCF y el cáncer.

Como se mencionó anteriormente, un 20% de los sitios de unión de CTCF en el genoma se encuentran dentro de sitios de inicio de la transcripción, CTCF es asociado frecuentemente pero no exclusivamente con elementos reguladores de diversos genes. Lo anterior implica que CTCF puede ser parte de la regulación transcripcional de diversos genes, diversos trabajos indican que genes supresores de tumor se encuentran entre los genes que regula [31] Tales como Rb, ARF, BRCA1, MLH1 y p53 [31, 49, 50]. En el caso de la región promotora del gen BRCA1, CTCF protege contra la metilación creando una barrera entre los dominios genómicos metilados y no metilados localizados río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *BRCA1* [51]. Otro ejemplo es el caso del gen supresor de tumor Rb, CTCF se une a la región promotora del gen Rb, esta interacción crítica para proteger al promotor contra el silenciamiento epigenético. La unión de CTCF al promotor del gen Rb es sensible de metilación [50]. En el contexto genes supresores de tumor y el desarrollo del cáncer, CTCF tiene un papel fundamental en el mantenimiento de mecanismos encargados de proteger contra el silenciamiento epigenético.

2.5 La carcinogénesis.

El proceso carcinogénico está dividido en tres etapas: iniciación, promoción, y progresión. La iniciación comprende la inducción de una célula a un estado alterado irreversiblemente. La promoción ocurre cuando la célula iniciada se expande clonalmente y forma un tumor visible, formando una lesión benigna. En la progresión la lesión benigna adquiere características malignas.

Existen 4 modelos que explican la carcinogénesis: 1) multipasos/multigen, 2) fenotipo mutador, 3) Darwiniano, 4) el relacionado con el microambiente tumoral.

El modelo de multipasos/multigen indica la presencia de alteraciones genéticas heredables como son; mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, rearrreglos cromosómicos, amplificación génica, aneuploidía y modificaciones epigenéticas en un largo periodo de tiempo. Estas alteraciones afectan a genes supresores de tumor y oncogenes, los cuales regulan negativamente y positivamente la proliferación celular, respectivamente [52].

El modelo de fenotipo mutador, parte de la observación de que el número de mutaciones en células normales es muy bajo con respecto al elevado número de mutaciones en las células cancerosas [3]. Este modelo postula el concepto de “fenotipo mutador” el cual explica las causas de la inestabilidad genómica como consecuencia de la mutación en genes que controlan la fidelidad de la replicación, la reparación del ADN, la segregación cromosómica, el ciclo celular, la respuesta celular y el mantenimiento del epigenoma [3, 53]. Estas mutaciones pueden ser de diferentes clases como: mutaciones puntuales, inserciones, inestabilidad de microsatélites, y pérdida de heterocigosidad [53].

En el modelo Darwiniano el desarrollo de la carcinogénesis está basado en dos procesos: 1) la continua adquisición de variabilidad genética en células individuales y 2) una selección natural que actúa sobre la diversidad fenotípica resultante de la variabilidad genética [54].

El modelo relacionado con el microambiente tumoral propone que el cáncer es una

enfermedad ecológica debido a la interacción dinámica entre las células malignas y las células no malignas. El microambiente tumoral está compuesto por las señales producidas por las células malignas y células adyacentes no tumorales (células del sistema inmune y fibroblastos) presentes en la masa tumoral. Diferentes modelos tumorales *in vivo* han demostrado que la co-inoculación de células tumorales con fibroblastos asociados al tumor genera masas tumorales que recapitulan las características de los tumores humanos [55]. Por lo tanto, tal microambiente genera la señales necesarias para la iniciación, el crecimiento y progresión del tumor. Este modelo postula la formación de un nicho precanceroso en el cual las células no malignas pueden ser estimuladas por un insulto carcinogénico [56]. Sin embargo, su malignidad tumoral dependerá de la expansión del nicho tumoral y su posterior maduración [56].

Estos modelos no son excluyentes, por ejemplo: la selección natural de clonas en el proceso carcinogénico está ligada a una alta variación heredable la cual se puede deber a la inestabilidad genómica.

2.6 La apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo natural para eliminar células dañadas de este modo preservando la homeostasis de los tejidos y del organismo. La pérdida de balance de la apoptosis puede ser causa de diversas patologías, entre ellas el cáncer [57, 58]. Precisamente, la evasión de la apoptosis es una de las características que definen al cáncer [1, 59]. Este evento celular está altamente regulado a distintos niveles y ejecutado principalmente por las caspasas.

Dependiendo del estímulo existen dos principales vías por las cuales se puede activar la apoptosis: la vía extrínseca, la cual es efectuada por receptores de muerte, y la vía intrínseca ó mitocondrial. Ambas vías convergen en la activación de la familia de las proteasas cisteína ó caspasas. Las caspasas normalmente se encuentran en las células como precursores inactivos llamados zimógenos y son activadas por corte proteolítico. Las caspasas se dividen en dos tipos; las iniciadoras (-8, -9, -10 y -12) y las efectoras ó ejecutoras (-3, -6 y -7). Las cuales están involucradas en la activación y en la culminación

de apoptosis, respectivamente. Una vez activas las caspasas presentan actividad enzimática cisteín-proteasas. Se este modo, las caspasas degradan a sus sustratos específicos generándose así la morfología apoptótica.

La activación de la vía extrínseca es llevada acabo cuando un receptor de muerte es activado por la unión de su ligando específico. Los receptores de muerte son una super-familia de receptores que estructuralmente están compuestos por un dominio extracelular encargado del reconocimiento del ligando específico y por un dominio intracelular de muerte. La interacción del ligando con su receptor específico, como ocurre con TNF- α y TNFR-1, induce el reclutamiento dependiente de los dominios de muerte de proteínas adaptadoras como FADD ó TRADD. Esta asociación de proteínas da lugar a la formación del complejo de señalización inductor de muerte (CSIM). Una vez formado el CSIM, éste recluta a la caspasa iniciadora pro-caspasa-8 la cual se auto-activa por procesamiento proteolítico [60].

La vía intrínseca puede ser activada por estímulos tales como la hipoxia, irradiación, ausencia de factores de crecimiento, choque térmico y agentes antineoplásicos. Estos estímulos interrumpen el potencial transmembrana de la mitocondria, dando lugar a una distribución asimétrica de protones en ambos lados de la membrana interna mitocondrial [61]. Dando lugar a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial induciendo la salida de proteínas mitocondriales contenidas en el espacio intermembranal. Este colapso es llamado “el punto de no retorno” debido a la interrupción irreversible del potencial de membrana mitocondrial [62]. Permitiendo la liberación de proteínas mitocondriales a citoplasma como citocromo c. Una vez que citocromo c se encuentra en el citosol, se asocia al factor Apaf-1, ATP y a la caspasa iniciadora pro-caspasa-9 para formar el complejo llamado apoptosoma, el cual induce la auto-activación de la caspasa-9. La caspasa-9 activa induce la activación de las pro-caspasas efectoras 3 y 7 las cuales están encargadas de presentar los cambios fenotípicos de la apoptosis. Un número elevado de proteínas sufren proteólisis por las caspasas activas durante el proceso de apoptosis. El primer sustrato de las caspasas descrito fue la polimerasa poli-(ADP)-ribosa (PARP), la cual se ha utilizado como marcador de apoptosis en muchos tipos celulares [63].

Algunas de las proteínas mitocondriales que son liberadas al citoplasma en condiciones apoptóticas presentan efectos apoptóticos independientes de las caspasas. Estas proteínas son: el Factor-1 inductor de apoptosis (AIF-1), endonucleasa G, Smac/DIABLO, Omi/HTR2A. La proteína AIF-1 induce la condensación de cromatina y fragmentación el ADN a gran escala (50kb), a nivel de cromosoma. La endonucleasa G, también se ha asociado a la fragmentación del ADN [64].

2.6.1 La regulación de la apoptosis.

El proceso de apoptosis es regulado en múltiples niveles por varios mecanismos reguladores. Existen tres mecanismos que regulan negativamente al evento apoptótico: 1) la inhibición de la vía extrínseca por medio de la proteína FLIP, 2) La regulación de la vía intrínseca por la familia de las proteínas BCL-2, y 3) La inhibición de las caspasas activas por la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (PIAs).

2.6.1.1 La regulación de la vía extrínseca.

Como se mencionó anteriormente la activación de la vía extrínseca induce la formación del CSIM reclutando a la pro-caspasa-8 para su auto-activación. La proteína FLIP inhibe la auto-activación de la pro-caspasa-8 en el CSIM desconectando la señal del receptor de la maquinaria de muerte. La proteína FLIP realiza esta acción debido a que es estructuralmente homóloga a procaspasa-8 pero carece de actividad enzimática. FLIP posee 2 dominios efectores de muerte (DEM) lo que permite su interacción con la proteína adaptadora FADD compitiendo con caspasa 8 para unirse al CSIM [60].

2.6.1.2 La regulación de la vía intrínseca y la familia de proteínas

BCL-2.

La familia de proteínas BCL-2 tiene un papel crucial en la regulación de la apoptosis activada por la vía intrínseca. Esta familia de proteínas regula la salida de proteínas mitocondriales al citoplasma como el citocromo c. La familia de proteínas BCL-2 se caracteriza estructuralmente por poseer de uno a cuatro dominios de homología a BCL-2 (BH). Esta familia se subdivide en dos grupos: miembros anti-apoptóticos y pro-apoptóticos. El primer grupo lo conforman Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, NR-13 y DIVA los cuales poseen cuatro dominios BH (BH1, BH2, BH3 y BH4) adicionalmente la mayoría de los miembros de este grupo poseen un dominio transmembranal. Los miembros pro-apoptóticos a su vez se subdividen en dos subgrupos: proteínas pro-apoptóticas multi-región que estructuralmente poseen tres dominios BH (BH1, BH2 y BH3) como son Bax, Bak y Bok. La otra subfamilia de proteínas pro-apoptóticas contienen un solo dominio de homología BH3 las cuales son Bid, Bad, Bim, Bik/Blk, Bmf, NOXA, PUMA y Hrk/DP5.

El mecanismo molecular por el cual la familia de proteínas BCL-2 protege ó induce la permeabilización de la membrana mitocondrial es controversial. Se han descrito dos mecanismos de acción para la modulación de la liberación de proteínas mitocondriales. Uno de ellos describe que la familia BCL-2 ejerce efectos regulatorios sobre el complejo de poro de transición de permeabilidad (CPTP) el cual tiene puntos de contacto tanto en la membrana externa como en la membrana interna mitocondrial. El CPTP está conformado por un grupo de proteínas entre las cuales se encuentra la proteína translocadora de nucleótidos de adenina (ANT) que se encuentra en la membrana interna y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) localizado en la membrana externa y el receptor de benzodiazepina periférico [64]. Las proteínas BCL-2 y Bax regulan la permeabilidad de las membranas interna y externa de la mitocondria al interactuar con el CPTP [65].

El otro mecanismo describe que las proteínas anti-apoptóticas BCL-2 están asociadas a la membrana de la mitocondria mientras que las proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bid, Bad y Bim se encuentran en el citosol pero son translocadas a la membrana externa de la mitocondria ante estímulos inductores de la apoptosis.

2.6.1.3 La regulación negativa de las caspasas y la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis.

El tercer mecanismo de regulación de la apoptosis es realizado por la familia de las Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (PIAs). El blanco de regulación por parte de estas proteínas son las caspasas activas. Las PIAs ejercen sus efectos antiapoptóticos por medio de dos mecanismos: 1) inhiben la actividad enzimática de las caspasas activas por interacción física y 2) modifican postraduccionalmente a las caspasas activas por adición de residuos de ubiquitina para su posterior degradación mediada por el proteasoma [66, 67]. Las PIAs impiden la culminación de la apoptosis activada tanto por la vía intrínseca ó extrínseca, así como por la acción de miembros proapoptóticos de la familia BCL-2 y agentes quimioterapéuticos [68].

Las PIAs estructuralmente se caracterizan por poseer de 1 a 3 dominios baculovirales denominados BIR localizados en el extremo amino terminal, involucrados en el reconocimiento de las caspasas activas. Esta familia de proteínas está conformada por 8 miembros los cuales son XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Survivina, BRUCE/Apollon, ML-IAP/Livina y hILP2. Algunos miembros de las PIAs contienen un dominio RING situado en el extremo carboxilo terminal que les confiere una actividad E3 ubiquitin ligasa [69, 70]. La ubiquitinación es un proceso realizado por 3 enzimas: La enzima activadora de ubiquitina (E1), la enzima de conjugación de ubiquitina (E2) y la enzima ligasa de ubiquitina (E3) [66]. Por lo que al tener este dominio RING, las PIAs inducen la poli-ubiquitinación de sus proteínas blanco, entre ellas las caspasas, funcionando como una señal para su degradación vía proteasoma. Los miembros XIAP, cIAP1, cIAP2, ML-IAP/Livina y hILP2 poseen un dominio RING mientras que las proteínas NAIP, Survivina y BRUCE/Apollon carecen de este dominio [70, 71].

Específicamente, las proteínas XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 se unen e inhiben la actividad de las caspasas activas -3, -7 y a la pro-caspasa -9. XIAP es el miembro de la familia de las PIAs más estudiado; posee tres dominios BIR y un dominio RING por medio de los cuales inhibe a las caspasas iniciadoras y efectoras. XIAP por medio del dominio BIR2 junto con la región enlazadora entre los dominio BIR1 y BIR2 interacciona con la caspasa-3 y -7, mientras que por medio del dominio BIR3 interacciona con la caspasa-9 [71]. La proteína

XIAP es la PIA con mayor efecto inhibitorio de la actividad de las caspasas. Los niveles de expresión de la proteína XIAP se encuentran elevados en tejidos de cáncer de vejiga y carcinomas renales, esto también se ha detectado en diferentes líneas celulares de cáncer [72-74]. XIAP protege a las células tumorales de la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos [75].

2.6.2 Los antagonistas de las PIAs fomentan la re-activación de la apoptosis.

Las familias de las PIAs son reguladas negativamente por 2 clases de proteínas: 1) proteínas mitocondriales que son liberadas al citoplasma durante la apoptosis como Smac/DIABLO, Omi/HTRA2 y ARTS, y 2) la proteína XAF1 la cual tiene una localización nuclear y citosólica.

La proteína Smac/DIABLO presenta en su extremo amino terminal la secuencia de aminoácidos Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) los cuales son necesarios para interactuar específicamente con los dominios BIR de las PIAs [76]. La proteína Omi/HTRA2 que posee actividad proteasa serina expone en su extremo amino terminal el motivo AVPA, similar al de Smac/DIABLO, por el cual interactúa con las PIAs [64, 77]. La proteína ARTS a diferencia de las proteínas Smac/DIABLO y Omi/HTRA2 no posee una secuencia de unión definida a las PIAs. La unión de ARTS a XIAP se lleva a cabo por la interacción del extremo carboxilo terminal de ARTS [78].

2.7 La proteína XAF1 como molécula pro-apoptótica.

La proteína llamada el factor 1 asociado a XIAP (XAF1 por sus siglas en inglés) fue identificada en un ensayo del tipo de doble híbrido utilizando a XIAP como carnada [79]. La interacción física entre XAF1 con XIAP favorece la apoptosis al bloquear la actividad inhibitoria que XIAP ejerce sobre las caspasas -3 [79], -7 [80], y -9 [81], y relocalizando a XIAP de citosol a núcleo [79]. De esta forma, XAF1 favorece la activación de la apoptosis ante un umbral elevado de PIAs [79, 82]. A diferencia de las proteínas mitocondriales

Smac/Diablo y Omi/HTRA2 la proteína XAF1 no requiere de una activación previa. XAF1 a través de su extremo carboxilo terminal se une al dominio RING de XIAP [83].

La interacción XAF1-XIAP ha sido la más estudiada. La influencia de XAF1 sobre otros miembros de las PIAs ha sido poco estudiada. Se ha reportado que la proteína XAF1 interacciona directamente con los miembros de las PIAs: cIAP, cIAP2, Livina y NAIP, pero no con Survivina [83, 84]. Aunque XAF1 no interacciona directamente con Survivina; existe un estudio que describe el papel de XAF1 en la degradación de Survivina a través de la formación de un complejo terciario conformado por XIAP-Survivina-XAF1. En dicho complejo XAF1 induce la activación de la actividad E3 ligasa del dominio RING de XIAP, dando lugar a la modificación postraduccional de la Survivina por adición de residuos de ubiquitina, guiando a su degradación por el proteasoma [84]. Esto confirma el papel de XAF1 como antagonista de la función antiapoptótica de las PIAs. Por otra parte, existen dos estudios que demuestran que XAF1 evoca un efecto apoptótico en ausencia de interacción con XIAP [85, 86]. En el primero, utilizaron fibroblastos nulos de XIAP (XIAP^{-/-}), la expresión de XAF1 sensibiliza a estas células al estímulo de TNF- α [85]. Mientras que en el segundo, hicieron uso de una sublínea de la línea celular de cáncer de colon HCT116 nulas de XIAP (XIAP^{-/-}), en las cuales la expresión de XAF1 confiere sensibilidad al estímulo de 5-fluorouracilo [86]. Estos datos indican que XAF1 ejerce efectos pro-apoptóticos a través de un mecanismo independiente de XIAP.

2.7.1 La estructura de XAF1.

El gen de XAF1 está compuesto por 8 exones. Actualmente, se han descrito cinco transcritos de XAF1 (XAF1A-E) [86-88] (Figura 5). El transcritto XAF1A es el de mayor longitud, la región codificante de este transcritto es de 906 nucleótidos. Este transcritto codifica para una proteína de 310 aminoácidos con un peso molecular de 33.1 KDa. Posee siete dedos de zinc (DZ) [79], de los cuales hasta la fecha solo se conoce la función de los DZ 5, 6 y 7 [89]. XAF1 interacciona con el extremo amino terminal de p53 por medio de su DZ5, dicha interacción brinda estabilidad a p53. A través de los DZ 6 y 7 interacciona con las ubiquitin ligasas E3 Siah2 y ZNF313 respectivamente [89]. El transcritto XAF1A se

encuentra expresado abundantemente en tejidos normales, mientras que en diferentes tipos de tumor se encuentra inactivado; es la variante más estudiada (en este trabajo es referido como XAF1).

El transcripto XAF1B carece del exón 3, tiene una región codificante de 849 nucleótidos [86, 87]. El transcripto XAF1C tiene un marco de lectura de 495 nucleótidos; el cuál predice una proteína de 164 aminoácidos con un extremo carboxilo truncado [87]. La variante XAF1D carece de los exones 4b y 5, mientras que la variante XAF1E carece del exón 3, 4b y 5, tienen un marco de lectura abierto de 426 y 369 nucleótidos, respectivamente. El transcripto XAF1D codifica para una proteína de 141 aminoácidos mientras que el transcripto XAF1E codifica para una proteína de 122 aminoácidos, ambos trascriptos carecen del extremo carboxilo terminal [86]. La existencia de diferentes trascriptos de XAF1 ha hecho pensar que podrían tener una función distinta a la de la isoforma XAF1A ó podrían funcionar como un dominante negativo. De cualquier modo, no existen datos que soporten dicha conjetura.

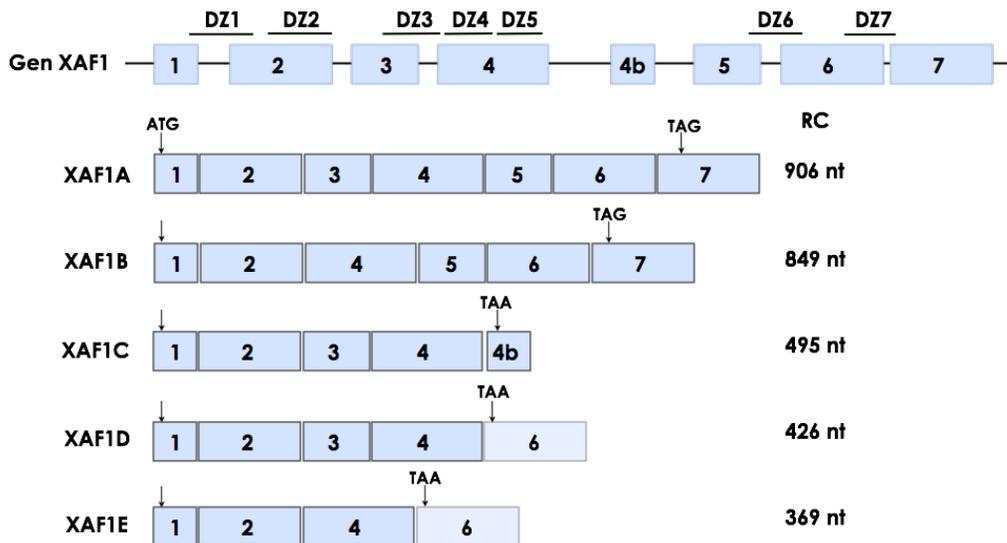


Figura 5. Representación esquemática del gen de XAF1 y sus 5 variantes de transcritos. El gen XAF1 está conformado por ocho exones (cajas). Diferentes combinaciones de exones dan lugar a cinco variantes de transcritos (XAF1A-E). El inicio de la transcripción (ATG) y codones de paro (TAA y TAG) están indicados con flechas. Los siete dominios de dedos de zinc (DZ1-7) se encuentran indicados. RC regiones codificantes.

2.7.2 La expresión de XAF1 en cáncer.

Tal como se describió previamente, la presencia de XIAP se ha asociado a resistencia a la muerte celular de células neoplásicas. Este efecto se ha observado en líneas celulares de hepatocarcinoma [90] y en células de carcinoma de ovario [91]. Dado a que XAF1 es un antagonista de la proteína antiapoptótica XIAP, se ha analizado su expresión en diferentes tipos de cáncer. En general, los niveles de expresión de XAF1 a nivel de ARN mensajero presentan una expresión ubicua en tejidos normales de adulto así como en tejidos fetales. Sin embargo, la expresión de XAF1 se encuentra reducida o es nula en diferentes tipos de cáncer como: el cáncer gástrico [92], de ovario [93], páncreas [94], de esófago [95] de colon [92], hepático [96], en melanoma [97] y cáncer urogenital [98, 99]. La misma tendencia se ha detectado en diferentes líneas celulares de cáncer [74]. Adicionalmente, la pérdida de la expresión de XAF1 correlaciona fuertemente con la progresión de tumor [86, 92, 100]. La reducida o ausente expresión de XAF1 parece ser un evento frecuente en tejidos cancerosos humanos.

2.7.3 La actividad de XAF1 como gen supresor de tumor.

Dado que XAF1 presenta acciones proapoptóticas dependientes e independientes del antagonismo que ejerce sobre la actividad supresora de apoptosis de XIAP; esto ha permitido posicionarla como una proteína inductora o restablecedora del evento apoptótico en cáncer. Se ha demostrado que el restablecimiento de la expresión XAF1 en células tumorales sensibiliza a las mismas a morir por apoptosis mediada por distintos agentes proapoptóticos como son; etopósido, 5-Fluorouracilo, TRAIL/IFN y TNF- α [85, 99, 101, 102]. Por otra parte, a través en modelos de xenoinjerto en ratones desnudos se evaluó el efecto de la sobre-expresión de XAF1 a través de un sistema retroviral tiene sobre el crecimiento tumoral. Se demostró que la sobre-expresión de XAF1 es suficiente para inhibir el crecimiento tumoral, y junto al tratamiento de TRAIL se erradica el crecimiento del tumor, prolongando la supervivencia de los animales tratados [80, 103]. Los datos obtenidos tanto de los ensayos *in vitro* como de los ensayos *in vivo* demuestran fuertemente que XAF1 es un gen supresor de tumor.

2.7.4 Los reguladores transcripcionales del gen XAF1.

Los interferones fueron las primeras proteínas humanas utilizadas en la terapia contra el cáncer [104]. El interferon al unirse a la porción extracelular de su receptor da lugar a la fosforilación de su porción intracelular por parte de las JAK. Permitiendo el reclutamiento de la familia de factores de transcripción STAT, las cuales son fosforiladas por las JAK. Una vez fosforiladas las STAT se disocian del receptor, ya sea en forma de homo ó hetero dímeros que se translocan al núcleo donde se unen a secuencias específicas de DNA, activando a los genes estimulados por IFN.

Los genes estimulados por IFN están implicados en la respuesta antiviral, antiangiogénica, inmunomodulatoria, y antiproliferativa. XAF1 se ha identificado como un gen estimulado por IFN a partir de microarreglos de expresión de células de melanoma tratadas con IFN α/β [102, 105]. Los interferones no son las únicas citosinas activadoras transcripcionales de XAF1, se ha reportado que TNF- α también tiene un efecto positivo sobre la activación transcripcional de XAF1 [102]. Hasta a fecha se han elucidado dos mecanismos por los cuales los IFN activan transcripcionalmente a XAF1. El IFN al unirse a su receptor inicia una cascada de fosforilación de tirosinas finalizando en la activación de Stat1, la cual una vez activa se transloca al núcleo donde se une al elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE) localizado en la región promotora de XAF1 en la región de -66 a -55 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción (SIT) [106]. Por otra parte, se ha demostrado que el efecto de IFN y TNF- α sobre la activación transcripcional de XAF1 es dependiente de JNK1. La cinasa JNK incrementa la expresión del factor-1 regulatorio de IFN (IRF-1) el cual se une al elemento de unión a IRF (IRF-E) localizado en la región que va de -38 a -30 pb río arriba del codón de inicio de la transcripción de XAF1 [107-109].

Por otra parte, se ha identificado al factor de transcripción de choque térmico (HSF1) y a la cinasa ERK1/2 como reguladores negativos de la expresión de XAF1. HSF1 ejerce un control negativo sobre la activación transcripcional de XAF1 al interactuar con un elemento de unión para HSF1 en la región que va de -862 a -821 en la región promotora de XAF1. En células de cáncer de colon, se encuentran elevados niveles de ERK1/2 activa, estas células presentan una elevada proliferación celular y evasión de la apoptosis, lo que permite mantener el fenotipo maligno. Se ha reportado que la inhibición de ERK1/2 con el

fármaco U0126, induce la expresión de XAF1 a través de un mecanismo de transcripción indirecto, el cual no ha sido esclarecido, aunque este efecto ocurre en las líneas celulares de cáncer de colon que presentan una expresión de p53 silvestre [110].

La proteína p53 interacciona con la región promotora de XAF1 y es capaz de actuar tanto como activador como represor de XAF1. La primera evidencia de la existencia de la relación entre XAF1 y p53 se obtuvo a partir de la observación de la pérdida de expresión de XAF1 en tumores gástricos primarios estos expresan p53 silvestre, mientras que tumores gástricos primarios con expresión de p53 mutante muestran una expresión normal de XAF1 [100], estos datos sugieren que probablemente p53 pudiera regular negativamente a XAF1. Este mecanismo de regulación negativa fue esclarecido al identificarse un elemento de respuesta a p53 (p53RE) en la región que va de -95 a -86 con respecto al sitio de inicio de la transcripción en el promotor de XAF1. La unión de p53 silvestre a este elemento suprime la expresión de XAF1 mientras que p53 mutante no es capaz de replicar dicho efecto [111, 112]. Por otra parte se ha identificado un segundo p53RE en la región de -1315 a -1295 con respecto al sitio de inicio de la transcripción en el promotor de XAF1. La interacción de p53 silvestre con este sitio activa positivamente la transcripción de XAF1 [89]. Estos datos sugieren que la relación de p53 con XAF1 tiene un papel dual sobre la activación transcripcional de XAF1, una posibilidad es que el efecto de p53 sobre XAF1 sea tejido específico.

2.7.5 La regulación epigenética de XAF1.

El gen de XAF1 está localizado en el cromosoma 17 en el brazo corto 13.2 [74]. Una región que frecuentemente está sujeta a pérdidas alélicas en diversos tipos de cáncer, como es el caso del cáncer de vejiga [74, 79]. A través de análisis citogenéticos llevado a cabo en tejidos tumorales se ha demostrado que la región 17p13.1 a 17p13.3 es una región rica en genes supresores de tumor, la cual se ha asociado con frecuente alteración genética de los genes p53, ROX/MNT, HIC-1, ALOX15, UBE2G1 [74, 113, 114]. Un evento temprano que frecuentemente se ha asociado a la ausencia de expresión génica en cáncer es la pérdida de la heterocigosidad (abreviatura del inglés como LOH) de marcadores polimórficos que

se encuentran alrededor del gen de interés. En un inicio, se pensó que el hecho de que el gen de XAF1 se encuentra localizado en una región cromosómica ligada a frecuentes LOH, y aproximadamente a una distancia telomérica de 3cM del gen supresor de tumor p53, el cuál es frecuentemente asociado con LOH; podría ser la explicación de la baja expresión de XAF1 en cáncer. Sin embargo, esta idea no resulto ser la explicación para la pérdida de la regulación de XAF1, existen reportes que muestran que la LOH en la región centromerica rara vez se extiende sobre el gen de XAF1 en cánceres gástricos y urogenitales [99, 100]. Además, tumores que presentan LOH en p53 muestran bajos niveles genómicos de p53 mientras que ninguno de esos tumores mostró una reducción detectable del gen XAF1, esto indica que la LOH de la región 17p13 se encuentra sujeta a deleción alélica de p53 pero no de XAF1 [99]. Por otra parte, en un panel de líneas celulares de cáncer de mama se evaluó la pérdida de material genético a través de ensayos de hibridación *in situ* fluorescente, concluyendo que la ausencia de la expresión de XAF1 no es atribuible a la deleción de su alelo [87].

Se encuentra ampliamente documentado que la hipermetilación de dinucleótidos CpG presentes en secuencias promotoras ó en regiones reguladoras de la transcripción de genes supresores de tumor está asociada con el silenciamiento de dichos genes en cáncer. En la región 5' del promotor de XAF1 no se encuentra presente una isla CpG. Sin embargo, existen estudios que demuestran que la metilación de los dinucleótidos CpG presentes en la región promotora de XAF1 conducen al silenciamiento de XAF1 [92, 95, 99]. Se ha descrito que el uso del agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (5-A-DC) induce a la reactivación de la expresión de XAF1 endógeno, lo cual incrementa la sensibilidad de las células tumorales al efecto de drogas inductoras de apoptosis [95, 96, 107, 115].

3. Planteamiento del problema

El gen supresor de tumor XAF1 se encuentra transcripcionalmente silenciado en distintos tipos tumorales. Diversos estudios han demostrado que la expresión ectópica de XAF1 en células neoplásicas induce la muerte celular a través de distintos mecanismos tales como la apoptosis y la modulación del ciclo celular. Estudios *in vivo* indican claramente que XAF1 inhibe el crecimiento tumoral y/o sensibiliza a las células malignas a morir por apoptosis ante el tratamiento con distintos agentes antineoplásicos. Por otra parte, existen estudios en los cuales al inducir la reactivación transcripcional de XAF1 endógeno con el uso de agentes desmetilantes se ve comprometida la viabilidad de las células neoplásicas. Tales estudios indican que el principal mecanismo involucrado en el silenciamiento de XAF1 es la hipermetilación de su promotor. Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado cuáles son los mecanismos epigenéticos involucrados en la adquisición de este estado de hipermetilación en el promotor de XAF1. Nuestra principal meta es esclarecer este mecanismo y la presencia de otras marcas epigenéticas asociadas al silenciamiento de XAF1 en cáncer.

4. Hipótesis.

El silenciamiento transcripcional del gen supresor de tumor XAF1 en cáncer es determinado por la ausencia de la unión de la proteína CTCF en su secuencia promotora, lo cual induce la metilación de los dinucleótidos CpGs y la adquisición de un perfil represor de modificaciones postraduccionales en las histonas.

5. Objetivo general.

Determinar el mecanismo epigenético mediante el cual CTCF regula la configuración epigenética del gen XAF1

5.1 Objetivos particulares

5.1.1. Establecer un modelo *in vitro* en el cual se recapitule el silenciamiento transcripcional de XAF1.

5.1.2 Determinar las condiciones, mediante el uso de agentes desmetilantes tales como 5-aza-2'-deoxicitidina y Tricostatina A, que permitan la re-activación transcripcional de XAF1.

5.1.3 Determinar cuáles son los dinucleótidos CpGs que diferencialmente se desmetilan en la región promotora de XAF1 tras el tratamiento con los agentes desmetilantes.

5.1.4 Identificar cuáles son los reguladores transcripcionales asociados a las regiones diferencialmente desmetiladas tras el tratamiento con los agentes desmetilantes.

5.1.5 Validar la interacción de CTCF con la secuencia promotora de XAF1 y determinar el papel de esta asociación en cuanto a la regulación transcripcional de XAF1.

5.1.6 Determinar si la interacción de CTCF en el promotor de XAF1 regula la metilación de los dinucleótidos CpG y el perfil de modificaciones de histonas en su secuencia promotora.

5.1.7 Determinar si la interacción de CTCF con el promotor de XAF1 tiene un papel en la inducción transcripcional mediada por activadores transcripcionales conocidos de XAF1.

6. Materiales y métodos

6.1 Cultivo celular.

Se trabajó con las líneas tumorales MCF-7, ACNH y Colo205 las cuales fueron adquiridas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC). La línea celular MCF-7 se creció en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) el cual fue suplementado con suero fetal bovino al 10%. La línea celular ACHN se creció en Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) el cual fue suplementado con 10% de suero fetal bovino. La línea celular Colo205 se creció en medio RPMI1460 el cual fue suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células fueron crecidas en una incubadora a 37°C con humedad controlada y con 5% de CO₂.

6.1.1 Condiciones desmetilantes.

Las líneas celulares tumorales fueron tratadas por 3 días con 5-aza-2'-deoxicitidina (5-A-DC) a una concentración de 5 μ M (SIGMA) y con tricostaina-A (TSA) a una concentración de 0.2 μ M. El medio de cultivo se cambió diariamente, para adicionar medio fresco con 5-A-DC y TSA.

6.2 Construcciones.

6.2.1 Clonación de la secuencia promotora de XAF1 en el plásmido reportero pEGFP.

El ADN genómico aislado de sangre humana periférica se utilizó como templado en reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar la región comprendida entre -1200 a +350 bp con respecto al sitio de inicio de la transcripción (SIT) del gen XAF1 (XAF1.2). Se diseñaron oligonucleótidos específicos que flanqueaban tal región genómica (Tabla 1). El producto obtenido por PCR fue clonado en el plásmido pTZ57r/t (Thermo). Posteriormente, XAF 1.2 fue subclonado en el plásmido de expresión

peGFP-N1 (Clontech) para generar la construcción peGFP-N1-XAF1-promotor. La delección del sitio de unión a CTCF en la construcción peGFP-N1-XAF1-promotor se realizó con el estuche comercial QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se generó la construcción peGFP-N1- Δ -CTCF-XAF1-promotor.

6.2.2 Clonación de la secuencia promotora de XAF1 en el plásmido reportero pSEAP2-Basic.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR la región genómica que va de -3000 a +350 pb con respecto al inicio de la transcripción del gen XAF1 (XAF1-promotor). El ADN genómico aislado de sangre humana periférica fue utilizado como templado para la reacción de PCR. El producto amplificado se clonó utilizando el estuche comercial GeneJET PCR cloning (Fermentas). Posteriormente, el inserto fue subclonado en el plásmido pSEAP2-Basic (Clontech) para producir la construcción silvestre-XAF1-promotor-SEAP. La delección del sitio de unión a CTCF en la construcción silvestre-XAF1-promotor-SEAP se realizó con el estuche comercial QuickChange Lightning Site Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). De esta forma, se generó la construcción llamada Δ -CTCF-XAF1-promotor-SEAP. Este plásmido reportero, pSEAP2-Basic, es un vector de expresión del gen reportero fosfatasa alcalina (SEAP de sus siglas en inglés).

6.2.3 Sistema de sobre-expresión de CTCF.

Se generó un sistema inducible para sobre-expresar la secuencia codificante del gen de CTCF. Utilizando la técnica de PCR, la secuencia codificante de CTCF fue amplificada por PCR utilizando la enzima polimerasa Pfu (Stratagene). A partir de ADN complementario (ADNc) proveniente de una reacción de transcriptasa reversa de sangre periférica. Posteriormente, el fragmento amplificado fue clonado en el plásmido pQCXIP (Clontech). El fragmento codificante para CTCF fue subclonado en el plásmido pTRE-Tight-Bi-AcGFP1 (Clontech) para producir el construcción llamada pTRE-Tight-Bi-AcGFP1-CTCF.

Todas las construcciones fueron confirmadas por secuenciación capilar.

6.3 Transfecciones transitorias.

6.3.1 Transfección transitoria de ARN de interferencia (ARNi) contra CTCF.

La línea celular ACHN fue sembrada en placas de 6 pozos un día antes de ser tratadas con agentes desmetilantes, como se ha indicó en la sección 5.1.1. Las células fueron transfectadas con 0.1 μ M de ARNi contra CTCF humano (Qiagen) o con un RNA de interferencia control. Después de 24 h, el medio de transfección fue cambiado por medio fresco con agentes desmetilantes. El ARN fue extraído 48h postransfección utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones de manufactura. El ARN fue cuantificado y 2 μ g fueron convertidos a ADN complementario (ADNc) utilizando el estuche comercial SuperScript(R) VILO (Invitrogen).

6.3.2 Transfecciones del gen reportero SEAP.

La línea celular MCF-7 fue sembrada en placas de 12 pozos el día anterior a la transfección con una confluencia del 80%. Las células fueron co-transfectadas con 0.625 μ g de las construcciones silvestre-XAF1-promotor-SEAP ó Δ -CTCF-XAF1-promotor-SEAP y con 0.625 pg del plásmido pMetLuc (Clontech). Este último plásmido posee el gen reportero luciferasa metridia, el cual es secretado al medio de cultivo y es utilizado como normalizador de la transfección. El medio fue cambiado por medio fresco 24h postransfección. Pasadas 48h el medio fue colectado para medir las actividades enzimáticas de los genes reporteros SEAP y luciferasa utilizando los siguientes estuches comerciales: Great EscAPe SEAP chemiluminescence (Clontech) y Ready-To-Glow-Secreted Luciferase Reporter Assay (Clontech) respectivamente.

6.4 Transfecciones estables.

6.4.1 Las células estables del sistema inducible de sobreexpresión de CTCF.

La línea celular MCF-7 fue sembrada al 80% de confluencia un día antes de la transfección. Se transfectaron con 2 µg del plásmido pTet-On (Clontech) el cual codifica para la proteína represora rTet. Las células fueron seleccionadas con 1000 µg/mL de G418 (SIGMA) durante 4 semanas. Las colonias resultantes fueron expandidas bajo la selección de G418 y co-transfectadas con 2 µg de la construcción pTRE-Tight-Bi-AcGFP1-CTCF con 1 µg del plásmido pQCXIP vacío. Las clonas estables fueron seleccionadas con puromicina durante 2 semanas.

6.4.2 Las células estables del gen reportero GFP.

La línea celular MCF-7 fue sembrada al 80% de confluencia un día antes de ser transfectadas en placas de 6 pozos. Se transfectaron con 2 µg de las construcciones peGFP-N1-XAF1-promotor ó peGFP-N1-Δ-CTCF-XAF1-promotor. Después de 48h, las células fueron seleccionadas con 1000 µg/mL G418 durante 4 semanas. Pasado este tiempo las células resistentes a G418 fueron analizadas por citometría de flujo. Las células resistentes fueron mantenidas en cultivo continuo en medio libre de antibiótico de selección durante 30 días; momento en el cual se determinó la expresión del gen reportero por citometría de flujo. Además se aislaron clonas independientes de cada construcción, las cuales fueron mantenidas en cultivo continuo en ausencia de antibiótico de selección durante 35 días; momento en el cual se midió la expresión del gen reportero GFP por citometría de flujo.

6.5 El análisis de la metilación del ADN.

El análisis de metilación se realizó mediante conversión del ADN genómico con bisulfito de sodio. Se extrajo ADN genómico de las líneas celulares MCF-7 ó de las líneas estables

MCF-7 GFP usando el estuche comercial FlexiGene DNA (Qiagen). Se realizó la conversión de 1.5 µg de ADN genómico con bisulfito utilizando el estuche comercial Zymo EZ DNA Methylation (Zymo Research) siguiendo las instrucciones de manufactura. El ADN convertido con bisulfito fue sujeto a amplificación por reacción de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el promotor endógeno XAF1-EnBis/XAF1-EnBia (ver Tabla 1) en el caso de las células MCF-7. Para amplificar el promotor del transgene se realizó PCR anidado utilizando oligonucleótidos específicos contra la secuencia del plásmido para evitar la amplificación del promotor endógeno 1.2GFPBis/1.2GFPBia en la primera reacción de PCR se evitó la amplificación del promotor endógeno. El producto obtenido fue utilizado como templado en una segunda ronda de amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos dirigidos contra el promotor endógeno de XAF1 mencionados anteriormente. Los productos obtenidos fueron purificados por gel y clonados utilizando el estuche comercial GeneJET PCR cloning (Fermentas). Las clonas obtenidas fueron secuenciadas por secuenciación de capilar.

6.6 El ensayo de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP de sus siglas en inglés).

Las células que fueron utilizadas para ChIP fueron tripsinizadas, centrifugadas, y resuspendidas (3×10^6) en 5 mL de medio libre de suero. Adicionando formaldehído a una concentración final del 1% se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción de entrecruzamiento se adicionó glicina a una concentración final de 0.125 M. Se centrifugaron las células para retirar el medio de entrecruzamiento. El botón celular fue lavado 3 veces con PBS frío antes de adicionar la solución amortiguadora de lisis (10 mM EDTA, 50 mM TRIS-HCl pH 8, SDS al 1%, e inhibidores de proteasas). El lisado celular fue sonificado para obtener un extracto de cromatina soluble con un tamaño aproximado de 400 pb. La inmunoprecipitación de la cromatina fue realizada utilizando un anticuerpo específico contra CTCF (C02-2899; Cell Signaling Technology ó 07-729; Millipore). Se utilizaron anticuerpos específicos para las marcas postraduccionales de histonas H3K9me3 (ab8898 Abcam) y H3K4me2 (ab7766 Abcam) para realizar los

ensayos de ChIP con los extractos de cromatina soluble de las clonas independientes. El ADN obtenido después del ChIP fue sometido a amplificación por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: XAF-CTCF-s/XAF-CTCF-as fue utilizado para el probable sitio de unión de CTCF sobre el promotor de XAF1; dos pares de oligonucleótidos, IGF2-CTCF-s/IGF2-CTCF-as (63) y MYC-CTCF-s/MYC-CTCF-as (64) fueron utilizados como controles positivos de la interacción CTCF-ADN; y un control negativo NEG-CTCF-s/NEG-CTCF-as también fue incluido.

6.7 El ensayo de Western-blot.

El extracto de proteína total fue obtenido usando la solución amortiguadora RIPA a la cual se le adicionó inhibidores de proteasas. Se cuantificó la cantidad de proteína de cada muestra por el método de Bradford usando el producto comercial DC proteína assay (Bio-rad). De cada muestra 20 µg de proteína total fueron sujetos a electroforesis en geles al 15% ó 18% de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF de la marca millipore. La transferencia fue realizada en condiciones semi-húmedas en el equipo Trans-blot (Bio-rad) a corriente constante de 15mA durante 20 minutos. Las membranas fueron incubadas por 1 hora con la solución bloqueadora TBS-T (20 mM de Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.4) con 5% de leche descremada. Posteriormente, las membranas fueron incubadas en la solución bloqueadora previamente descrita con los anticuerpos indicados durante una noche. Al día siguiente las membranas fueron lavadas e incubadas por 1 h con el anticuerpo secundario, el cual está acoplado a la enzima peroxidasa. Las membranas fueron lavadas y reveladas siguiendo las instrucciones del estuche comercial de Immobilon Western (Millipore).

6.8 El ensayo de inmunoprecipitación de la proteína.

Las células que se utilizaron en este ensayo fueron lavadas dos veces con PBS y centrifugadas a 2,000 rpm durante 3 minutos. Las células fueron lisadas utilizando la

solución amortiguadora TNTE-5 (50mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Tritón, 1 mM EDTA e inhibidores de proteasas) se incubaron en hielo durante 15 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se colectó el sobrenadante al cual se le adicionaron 10 µL de proteína G (Life Technologies) y se incubó a 4°C durante 1 hora. Pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 segundos. Se recolectaron los sobrenadantes de las muestras y fueron incubados durante una noche a 4°C con 3 µL de anticuerpo contra XAF1 en agitación constante. Al día siguiente, se adicionaron 20 µL de proteína G a cada muestra. Se incubaron las muestras durante 1 hora a 4°C en agitación constante. Entonces, las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 30 segundos. Se descartaron los sobrenadantes, los precipitados resultantes fueron lavados cuatro veces con solución amortiguadora TNTE-1 (50 mM Tris pH 7.4, 150 m-m NaCl, 0.1% Triton, 1mM EDTA). Por último, a las muestras se les adicionó solución de carga Laemmli (100 mM Tris pH 6.8, 20% Glicerol, 2% SDS, 0.5% azul de bromofenol y 100 mM DTT) y se hirvieron durante 7 minutos.

6.9 El ensayo de viabilidad celular.

La viabilidad celular fue medida colorimetricamente mediante el ensayo MTS-PMS utilizando la solución comercial CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron sembradas en placas de 96 pozos, 24 horas después del tratamiento la solución comercial fue adicionada al medio de cultivo. Se incubó durante 2 horas, pasado este tiempo se midió a 490 nm utilizando un lector de microplacas.

6.10 La transcripción reversa del ARN mensajero acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa de modo cuantitativo (RT-PCRc).

El ARN fue extraído usando el reactivo TRIzol de la marca invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ARN fue cuantificado y 2 µg del mismo fueron

convertidos a ADN complementario (ADNc) usando el estuche comercial ViLO de la marca invitrogen. El PCR cuantitativo se realizó en el equipo ABI PRISM 7900 Sequence Detection System de la marca Applied Biosystems, utilizando sondas tipo taqman de la marca IDT para detectar a los genes de XAF1, CTCF y HPRT este último se empleó como el control para normalizar los niveles de expresión de los genes XAF1 y CTCF. Los cambios de expresión de los genes fueron analizados por el método comparativo del $2^{-\Delta\Delta CT}$.

6.11 El análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la paquetería GraphPad Prism version 5.0 para Mac Os X (La Jolla, Ca).

7. Resultados.

7.1 La activación transcripcional de XAF1 por agentes desmetilantes.

Estudios realizados en cáncer de colón y cáncer gastrointestinal han demostrado que el promotor de XAF1 se encuentra hipermetilado [99]. Se ha reportado que el tratamiento de líneas celulares cancerosas con el agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (5-A-DC) activa transcripcionalmente a XAF1. Hasta el momento no se ha descrito si esto ocurre en células de cáncer de mama. Por esta razón utilizamos a la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, en la cual la expresión de XAF1 se encuentra abatida (Figura 6). Para reactivar la expresión de XAF1 se trató a la línea celular MCF-7 con 5-A-DC y tricostatina A (TSA) ó en combinación los activadores transcripcionales de XAF1; TNF- α ó IFN- α [101, 106, 109]. Se extrajo ARN total para analizar los niveles de expresión por medio de PCR cuantitativo utilizando sondas tipo taqMan de la compañía IDT para los genes XAF1, CTCF y HPRT, este último al ser un gen de expresión constitutiva fue utilizado como normalizador. A nivel de ARN mensajero (ARNm) la combinación de 5-A-DC/TSA incrementó la expresión de XAF1 en comparación con la condición control; además, se obtuvo un incremento dramático de la expresión de XAF1 ante el tratamiento con 5-A-DC/TSA más TNF- α (Figura 6a), similar a la obtenida mediante el uso de 5-A-DC/TSA más IFN- α (Figura 6b). Estos resultados indican que para obtener una mayor activación transcripcional de XAF1 se requiere de condiciones desmetilantes. Esto lo observamos tanto a nivel de ARNm como de proteína, después de tratar con TNF- α (Figura 6a y b) ó con IFN- α (Figura 6c y d).

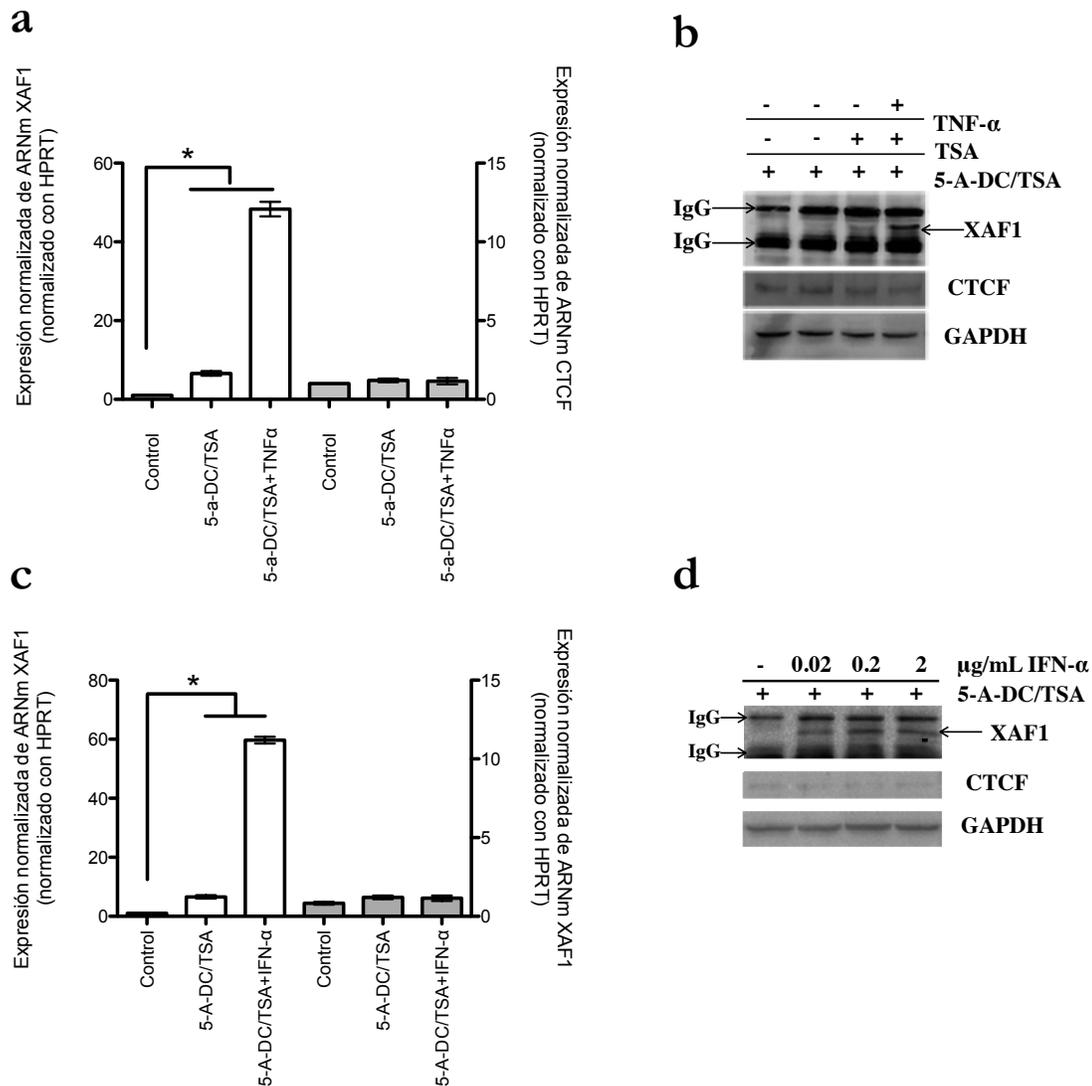


FIGURA 6. La expresión de XAF1 es inducida por TNF- α ó IFN- α en condiciones desmetilantes. (a) Células MCF-7 fueron tratadas con 5-A-DC (5 μ M) y TSA (0.2 μ M) durante 3 días previos al estímulo con TNF- α (20 ng/mL) durante 24h. Se realizó PCR cuantitativo para analizar el nivel de expresión de los genes XAF1 y CTCF a nivel de ARNm, los cambios en los niveles de expresión fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando la expresión del gen HPRT como normalizador. (b) Células MCF-7 fueron tratadas como se muestra en (a). Utilizando un anticuerpo específico contra XAF1, se realizó la inmunoprecipitación de la proteína utilizando cantidades iguales de extractos totales de proteína de cada condición. Los niveles de expresión de XAF1, CTCF y GAPDH fueron detectados por western blot, en la imagen se muestra un western-blot representativo. (c) Células MCF-7 fueron tratadas como se muestra en (a) antes de ser

estimuladas con IFN- α , los niveles de expresión a nivel de ARN mensajero de XAF1 y CTCF fueron analizados por PCR cuantitativo, los cambios en los niveles de expresión fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando la expresión del gen HPRT como normalizador. (d) Células MCF-7 fueron tratadas como se muestra en (a) antes de ser estimuladas con las concentraciones indicadas de IFN- α . El western-blot fue realizado como se describió en (b) y es representativo. Los resultados mostrados en (a) y (c) representan el promedio de 3 experimentos independientes *P<0.05.

Con el objetivo de determinar si esta observación es un comportamiento debido al tipo celular o es un proceso general se utilizó una línea celular no relacionada con cáncer de mama. Se utilizó a la línea celular ACHN de carcinoma renal, la cual previamente se ha demostrado que es sensible al estímulo de IFN- α bajo condiciones desmetilantes [116]. Observamos un mayor incremento de la actividad transcripcional de XAF1 (Figura 7) en comparación al obtenido con la línea celular MCF-7 (Figura 6).

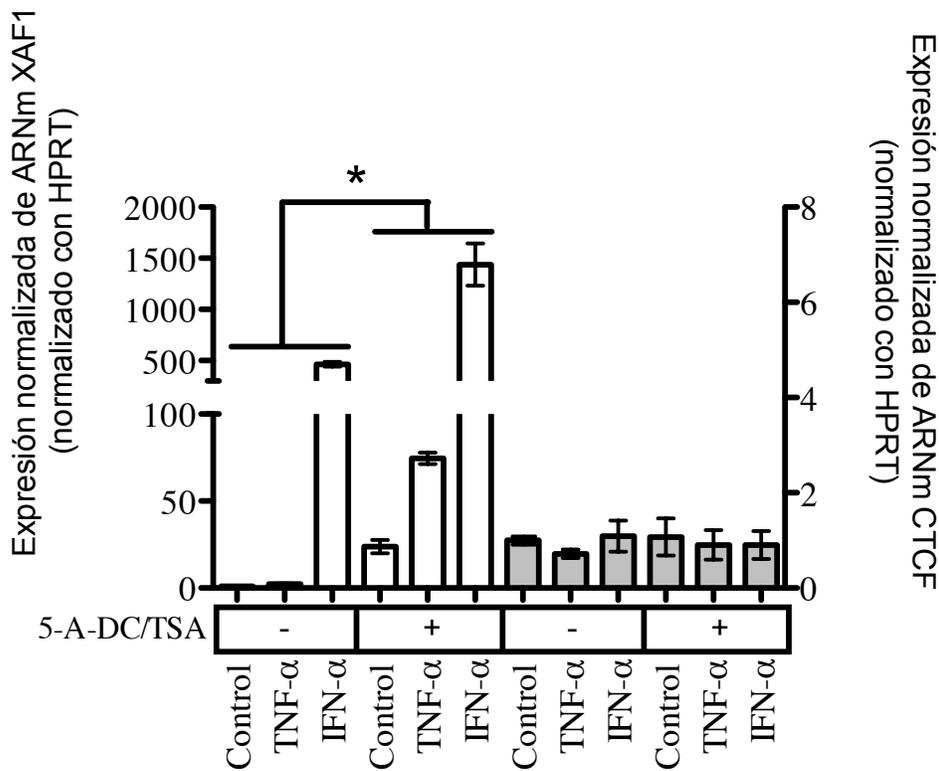


Figura 7. La expresión de XAF1 es inducida por TNF- α ó IFN- α en condiciones desmetilantes.

Células ACHN sin tratar y tratadas con 5-A-DC (5 μ M) y TSA (0.2 μ M) durante 3 días previos a ser estimuladas con TNF- α ó con IFN- α . Los niveles de expresión a nivel de ARN mensajero de XAF1 y CTCF fueron analizados por PCR cuantitativo, los cambios en los niveles de expresión fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando la expresión del gen HPRT como normalizador. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes

Como un control positivo utilizamos a la línea celular Colo205 de cáncer de colon. En dicha línea celular el promotor de XAF1 se encuentra desmetilado [92]. Aún en ausencia de tratamiento previo con agentes desmetilantes, nosotros observamos una clara activación transcripcional de XAF1 debido al estímulo con TNF- α (Figura 8).

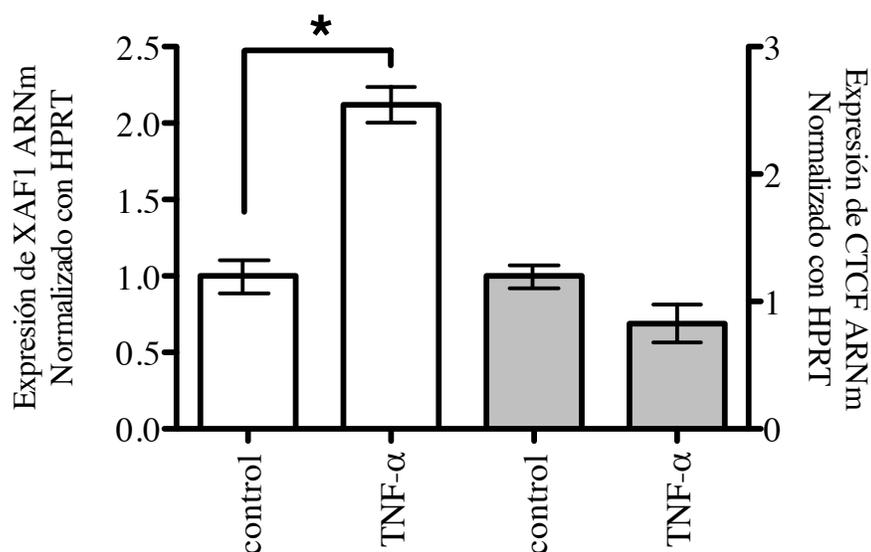


Figura 8. Las células Colo205 fueron estimuladas con TNF- α (20ng/mL) durante 24 horas. Los niveles de expresión a nivel de ARN mensajero de XAF1 y CTCF fueron analizados por PCR cuantitativo, los cambios en los niveles de expresión fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando la expresión del gen HPRT como normalizador. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes, *P<0.05.

7.2 El patrón de metilación del promotor de XAF1.

Muchos genes supresores de tumores son transcripcionalmente silenciados debido a que sus promotores se encuentran hipermetilados, lo que implica un mecanismo de represión debido a alteraciones en la estructura de la cromatina. La metilación del ADN es una modificación epigenética que puede ser revertida mediante el uso de agentes inhibitorios específicos de la metilación del ADN como es el fármaco 5-aza-2'-deoxicitidina (5-A-DC). Este fármaco genera la reversión del estado de metilación, dando lugar a la presentación de sitios estéricamente impedidos, permitiendo la unión de proteínas modificadoras. La activación transcripcional de XAF1 por agentes desmetilantes nos hizo pensar que existe una metilación diferencial entre los dinucleótidos CpG del promotor de *XAF1* la cual nos ayudaría a identificar segmentos de ADN importantes para la completa activación de XAF1. Para poder acceder al efecto del agente desmetilante 5-A-DC y TSA sobre el estatus de metilación del promotor de XAF1. Se utilizaron células MCF-7 sin tratar y tratadas con 5-A-DC y TSA previo a la extracción de ADN genómico, el cual fue sometido a la reacción de conversión por bisulfito. Para determinar el patrón de metilación de los dinucleótidos CpG del promotor de XAF1 se utilizó un par de oligonucleótidos específicos que amplifican la región que va de +100 a -600 pares de bases con respecto al sitio de inicio de la transcripción. El producto de PCR obtenido se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Se purificó y clonó en el plásmido pJET1 (Fermentas) para ser amplificado. Se secuenciaron 8 clonas de cada condición. En la figura 9 se muestra un esquema de los 11 dinucleótidos CpG contenidos en la región que va de -22 a -500 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción del promotor de XAF1. Como podemos observar la exposición a los agentes 5-A-DC y TSA inducen la desmetilación de tres dinucleótidos en el promotor de XAF1 en las células MCF-7. Estos resultados nos indican que la completa activación transcripcional del gen XAF1 está asociada con el estado de metilación de su promotor.

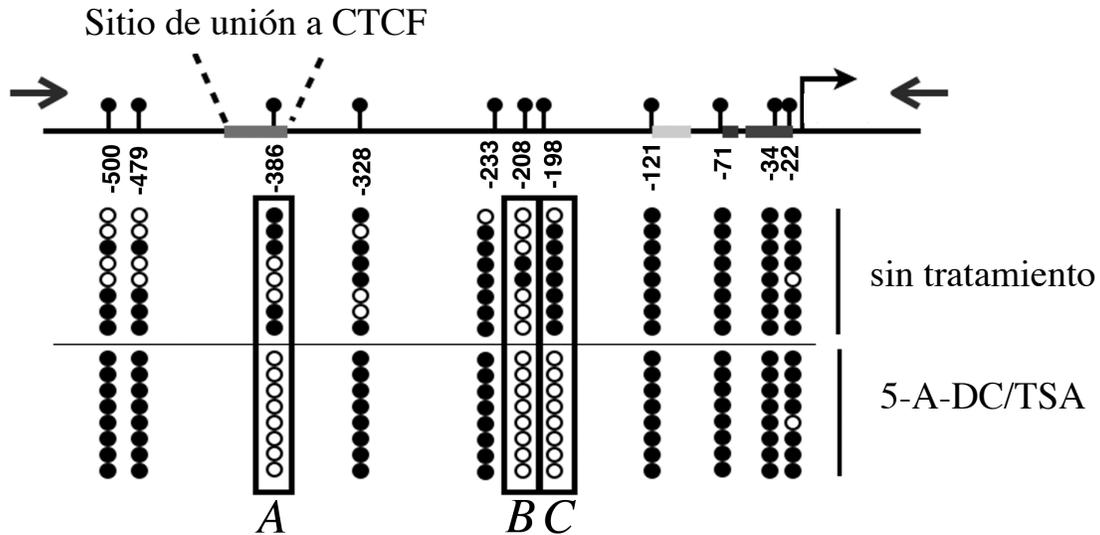


Figura 9. Patrón de metilación de los dinucleótidos CpG del promotor de XAF1. Las células MCF-7 fueron tratadas o no tratadas con 5-A-DC (5 μ M) y TSA (0.2 μ M) durante 3 días antes de la conversión por bisulfito del ADN genómico. En la figura se muestra una representación esquemática del promotor de XAF1 que muestra la localización y el estado de metilación de 11 dinucleótidos CpG ubicados en la región que comprende de -22 a -500 pares de bases relativo al sitio de inicio de la transcripción. Los dinucleótidos CpG metilados y desmetilados son representados por círculos negros y blancos, respectivamente.

7.3 CTCF interacciona con el promotor de XAF1 cuando las células son estimuladas con TNF- α o IFN- α

Se sabe que CTCF regula la expresión de diversos genes supresores de tumor por unión directa a la secuencia promotora [117]. Nosotros buscamos sitios de unión con una ventana de \pm 10 pb de la secuencia adyacente de ADN de cada dinucleótido CpG que fue desmetilado a consecuencia del tratamiento con los modificadores epigenéticos. En esta búsqueda se obtuvo un hallazgo interesante. Se identificó un probable sitio de unión para CTCF en el promotor de XAF1, el cual sobrelapa con el dinucleótido CpG localizado en -386 pb relativo al sitio de unión de la transcripción (Figura 9). Para soportar la relevancia

de este sitio su presencia fue confirmada en la base de datos UCSC GENOME BROWSER (<http://genome.ucsc.edu/>) donde los sitios de unión a CTCF están validados experimentalmente (Figura 10).

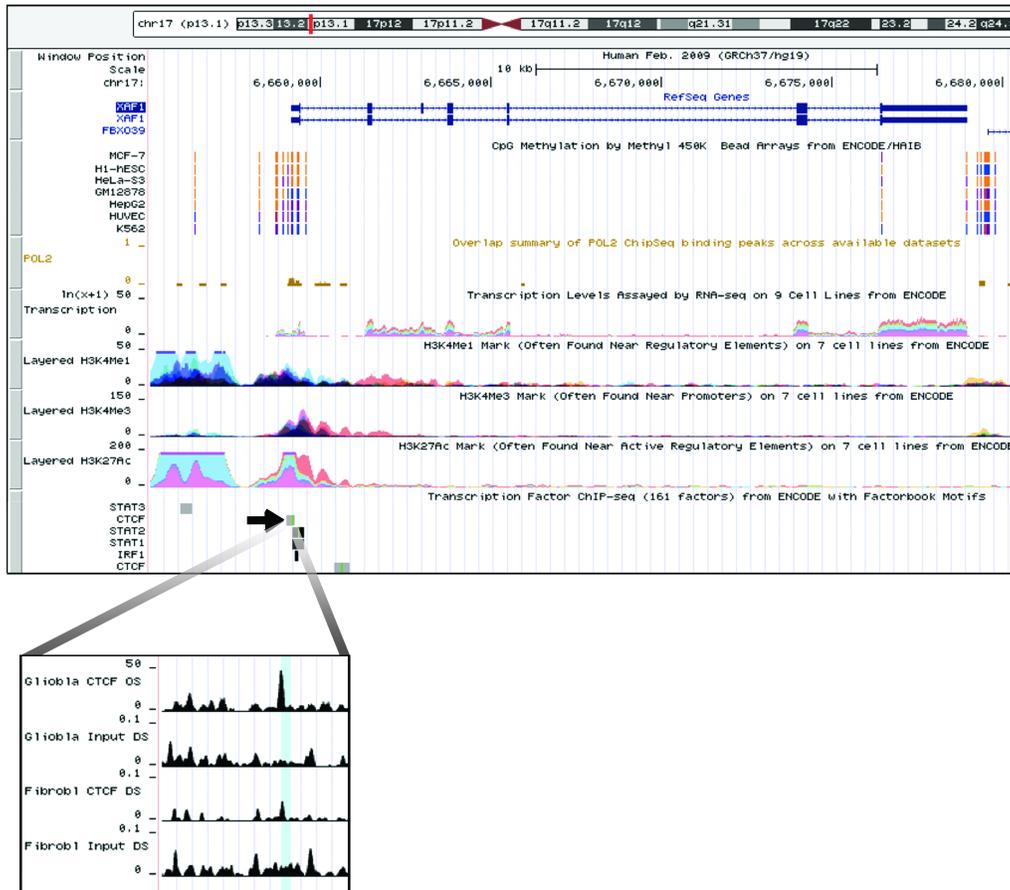


Figura 10. Promotor de XAF1 visualizado en el UCSC genome browser. La imagen ilustra características epigenéticas del promotor de XAF1 como es el estatus de metilación de los dinucleótidos CpG en diferentes tipos de líneas celulares. Así como los perfiles de varias modificaciones postraduccionales histonas tales como H3K4Me1, H3K4me3 y H3K27Ac de diferentes líneas celulares. Adicionalmente se muestra el sitio de unión para varios factores de transcripción datos obtenidos de ChIP-seq. En el recuadro se muestran los sitios de unión para CTCF en el promotor de XAF1 en células de glioblastoma y fibroblastos. Datos obtenidos de ensayos de ChIP-seq.

Para validar experimentalmente este probable sitio de unión se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando células MCF-7 sin estimular y estimuladas con TNF- α ó IFN- α . Como se muestra en la figura 11a en condiciones basales no se detecta una asociación de CTCF en su probable sitio de unión en el promotor de XAF1. Este resultado puede ser explicado por un mecanismo sensible de metilación. En los resultados anteriores se muestra que el tratamiento con agentes desmetilantes es necesario para que se lleve a cabo la activación transcripcional de XAF1 (Figura 6 y 7). Este tratamiento desmetila el dinucleótido CpG (Figura 9 recuadro A) presente en el sitio putativo de unión de CTCF en el promotor de XAF1. Esto indica que muy probablemente la unión de CTCF en el promotor de XAF1 sea sensible de metilación. Para probar esta hipótesis, se realizó un ensayo de ChIP utilizando células MCF-7 las cuales fueron tratadas con agentes desmetilantes antes de ser estimuladas con TNF- α ó IFN- α . Como era de esperarse, la asociación de CTCF con el promotor de XAF1 fue detectada después de la desmetilación del ADN y ante el estímulo con TNF- α ó IFN- α (Figura 11b panel izquierda). Esta observación correlaciona con el incremento de la actividad transcripcional en las células que fueron previamente expuestas a modificadores epigenéticos.

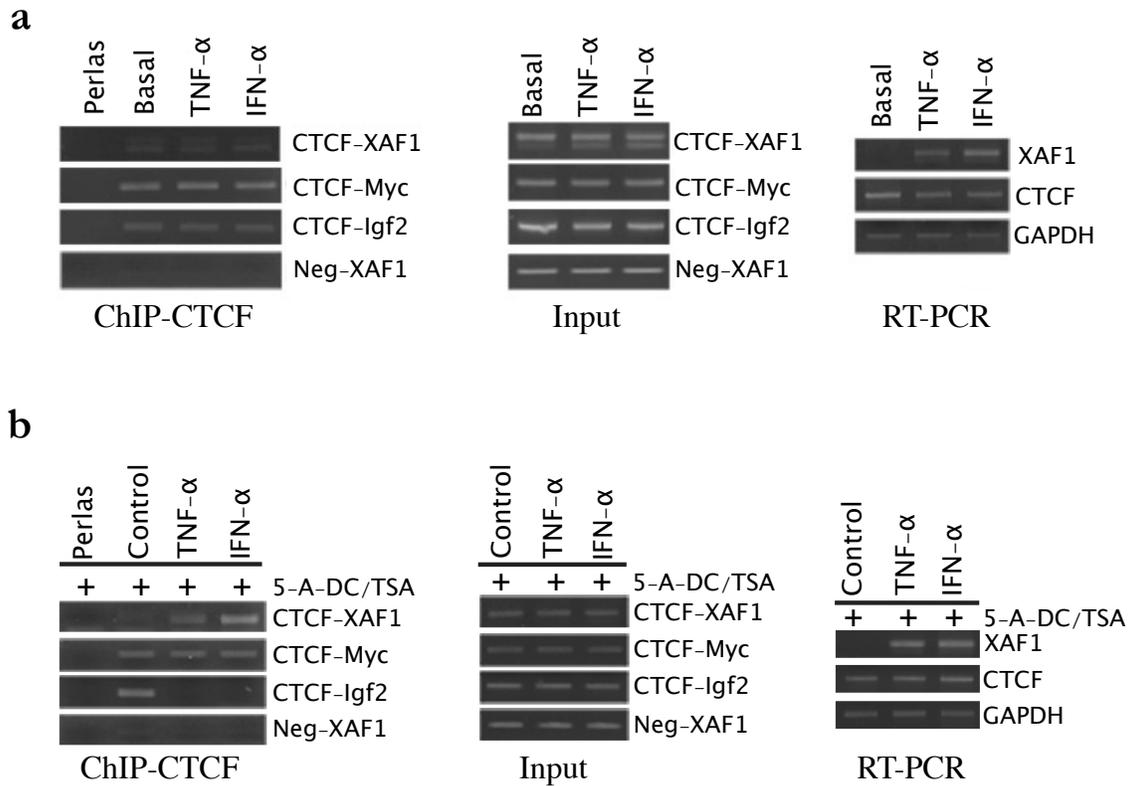


Figura 11. CTCF interacciona con el promotor de XAF1. El ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) fue realizado con (a) células MCF-7 sin tratamiento con agentes desmetilantes y estimuladas con TNF- α ó IFN- α y (d) células MCF-7 tratadas previamente con 5-A-DC (5 μ M) y TSA (0.2 μ M) durante 3 días antes de ser estimuladas con TNF- α o IFN- α fueron utilizadas para realizar la IPC utilizando un anticuerpo específico contra la proteína CTCF. El sitio de unión a CTCF en el promotor de XAF1 fue analizado a través de PCR utilizando un par de oligonucleótidos específicos (panel izquierdo a y b). Como control positivo y negativo de la interacción CTCF-ADN se incluyeron 3 pares de oligonucleótidos. Dos pares dirigidos a sitios de unión a CTCF ya validados (c-Myc e Igf2) como controles positivos y un par como control negativo. (b, e) El input es el extracto de cromatina soluble sin inmunoprecipitar, se amplificó por PCR utilizando los mismos oligonucleótidos que se emplearon en el ChIP. (c, f) Análisis de la expresión a nivel de ARNm en las células utilizadas en el ensayo de ChIP a través de RT-PCR de los genes XAF1, CTCF y GAPDH utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen.

Adicionalmente validamos el sitio de unión de CTCF en el promotor de XAF1 utilizando la línea celular ACHN (Figura 12). Al igual que en las células MCF-7, observamos un dramático incremento en la interacción entre CTCF con el promotor de XAF1 cuando las células fueron estimuladas con TNF- α ó IFN- α bajo condiciones desmetilantes. Estos resultados soportan al resultado previo que nos indica que la unión de CTCF al promotor de XAF1 es sensible de metilación.

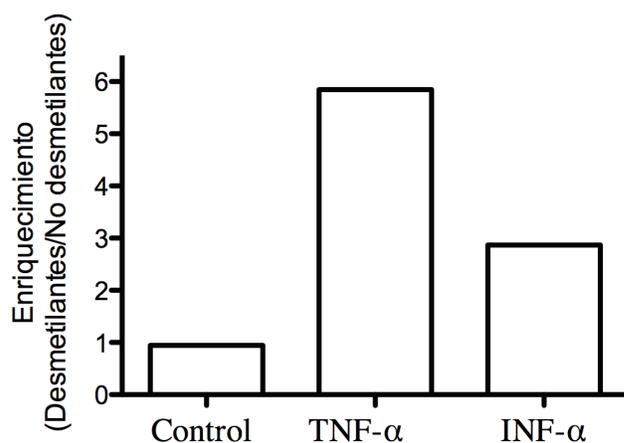


Figura 12. CTCF interactúa con el promotor de XAF1. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) fue realizado utilizando células ACHN pre-tratadas con 5-A-DC (5 μ M) y TSA (0.2 μ M) durante 3 días antes de ser estimuladas con TNF- α ó IFN- α y células ACHN sin tratamiento con agentes desmetilantes y estimuladas con TNF- α ó IFN- α , fueron utilizadas para realizar el ensayo de ChIP utilizando un anticuerpo específico contra la proteína CTCF. El ADN obtenido del ensayo de ChIP fue sujeto a amplificación por PCR cuantitativo utilizando un par de oligonucleótidos específicos para amplificar el sitio de unión de CTCF en el promotor de XAF1. Los datos son presentados como el enriquecimiento de CTCF entre las células en condiciones desmetilantes con respecto a las células en condiciones metiladas.

7.4 La expresión de XAF1 es regulada por CTCF.

Con los datos experimentales obtenidos se puede concluir que CTCF se une al promotor de XAF1, esta unión es sensible de metilación. Para poder conocer con mayor detalle la función reguladora de CTCF nosotros realizamos una serie de ensayos de pérdida y ganancia de función de CTCF sobre la actividad transcripcional de XAF1.

7.4.1 Efecto de la ausencia de CTCF sobre la regulación de XAF1.

La evaluación del efecto de la disminución de la expresión de CTCF sobre la expresión de XAF1 se abordó en primera instancia a través de transfecciones transitorias utilizando ARN de interferencia (ARNi) contra CTCF. Antes de analizar el efecto de la expresión de CTCF sobre la activación transcripcional de XAF1 se verificó la eficacia de los ARNi tanto a nivel de ARNm como de proteína (Figura 13). Como se mencionó anteriormente las condiciones desmetilantes son necesarias para mantener libre el sitio de unión a CTCF sobre el promotor de XAF1 (Figura 11b y 12) por esta razón las células MCF-7 se mantuvieron bajo estas condiciones antes de ser transfectadas transitoriamente con los ARNi contra CTCF.

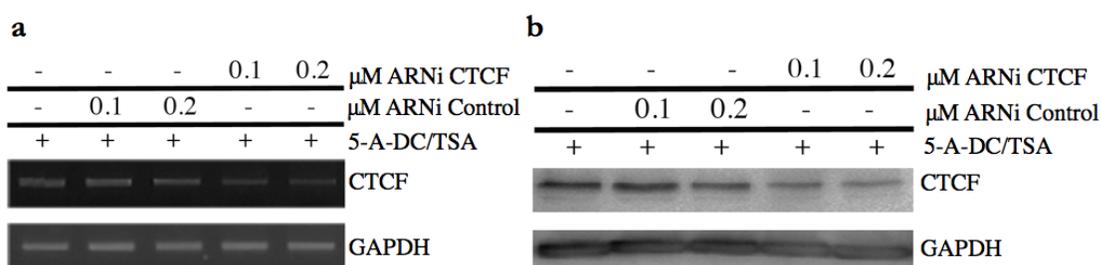


Figura 13. Validación del ARN de interferencia contra CTCF. Células MCF-7 fueron tratadas con 5-A-DC y TSA durante 3 días antes de ser transfectadas transitoriamente con los ARNi contra CTCF o con ARNi control a las concentraciones indicadas. Después de 48 horas post-transfección, se aisló ARN y proteína total. La disminución de la expresión de CTCF se determinó (a) a nivel de ARN mensajero por medio de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para los genes CTCF y GAPDH, (b) y por medio de Western-blot utilizando la misma cantidad de proteína total, se utilizaron anticuerpos específicos contra CTCF y GAPDH.

En reportes previos se ha demostrado que el tratamiento con el agente desmetilante 5-AZA-2'-deoxicidina sinergiza la activación transcripcional de XAF1 por IFN en células de carcinoma renal ACHN [116], nosotros comprobamos el mismo efecto en estas células ACHN (Figura 7). Este efecto es más dramático que el observado en la línea celular MCF-7, del mismo modo el tratamiento solo con 5-A-DC es mayor en la línea celular ACHN que en la línea celular MCF-7. Por esta razón utilizamos a la línea celular ACHN para evaluar el efecto de la disminución de los niveles de expresión de CTCF sobre la expresión de XAF1. Observamos bajos niveles de expresión a nivel de ARNm de XAF1 en las células transfectadas con el ARNi contra CTCF en comparación con las células que fueron transfectadas con el ARNi control (Figura 14).

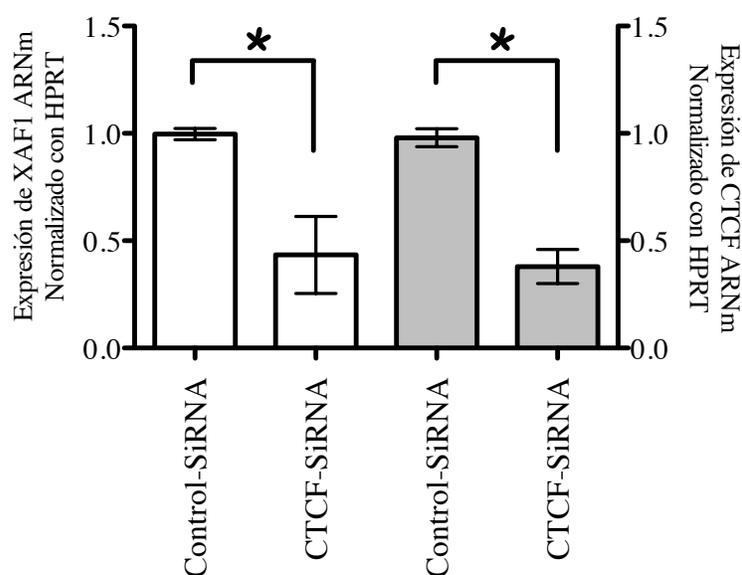


Figura 14. Disminución de la expresión de CTCF y su efecto sobre la expresión de XAF1. La línea celular ACHN fue pretratada con 5-A-DC (5 μ M) y TSA (0.2 μ M) durante 3 días antes de ser transfectada transitoriamente con el ARN de interferencia contra CTCF ó con el ARN de interferencia control. Después de 48 horas pos-transfección, se realizó PCR cuantitativo para analizar el nivel de expresión de los genes XAF1 y CTCF a nivel de ARNm. Los cambios en los niveles de expresión fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando la expresión del gen HPRT como normalizador. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes.

Para demostrar que la unión de CTCF en el promotor de XAF1 es necesaria para inducir su activación transcripcional, se empleó un ensayo de gen reportero. Se transfectaron transitoriamente células MCF-7 con el plásmido silvestre-XAF1-promotor-SEAP (Silvestre) ó con el plásmido Δ -CTCF-XAF1-promotor-SEAP (Δ). Ambos plásmidos poseen la región promotora de XAF1 que va de -3000 a +350 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción, en el segundo plásmido se ha deletado el sitio de unión a CTCF. Además, ambos conducen a la expresión del gen reportero SEAP. Se comparó la actividad enzimática producida por el plásmido Silvestre con respecto a la que produce el plásmido Δ , podemos observar que la ausencia del sitio de unión a CTCF sobre el promotor de XAF1 tiene un efecto inhibitorio sobre su activación transcripcional basal (Figura 15). Estos resultados soportan el papel de CTCF como regulador de la activación transcripcional de XAF1.

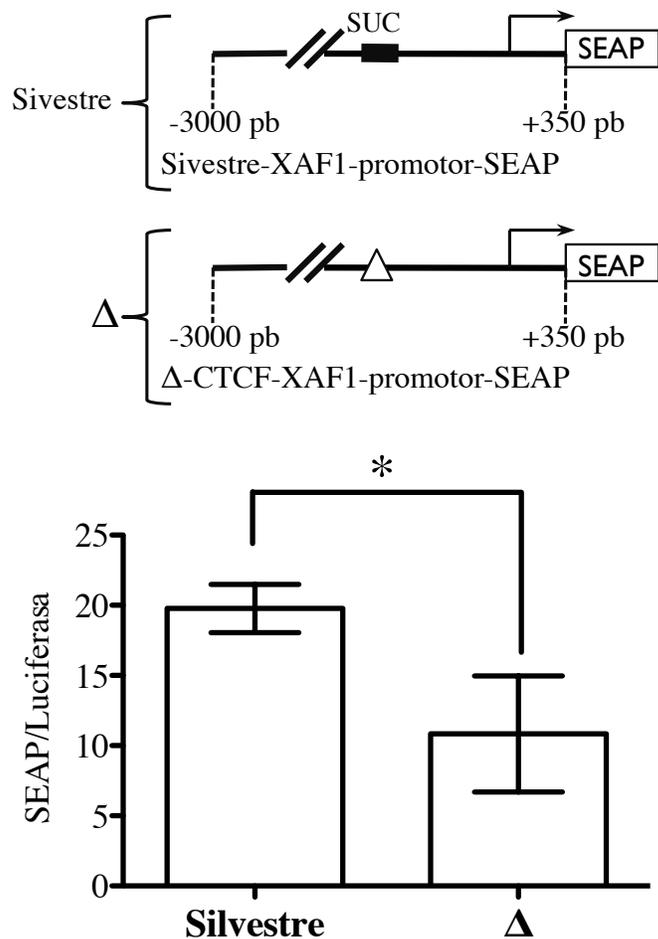


Figura 15. Efecto de la ausencia del sitio de unión de CTCF en el promotor de XAF1 sobre la actividad del promotor de XAF1. En la parte superior de la figura, se muestra una representación esquemática del fragmento del promotor de XAF1 que va de -3000 a +350 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción clonado río arriba del gen reportero SEAP. En la construcción silvestre-XAF1-promotor-SEAP (Silvestre) se muestra el sitio de unión a CTCF (SUC) mientras que la construcción Δ -CTCF-XAF1-promotor-SEAP (Δ) se muestra la delección del SUC. Panel inferior, la línea celular MCF-7 fue co-transfectada transitoriamente con el plásmido Silvestre ó con el plásmido Δ y el plásmido pMetLuc, el cual fue utilizado como normalizador de la transfección. Los datos presentados representan el promedio de tres experimentos independientes, *P<0.05.

7.4.1.2 Efecto de la sobre-expresión de CTCF sobre la regulación de XAF1.

Para complementar los resultados de los ensayos de pérdida de función, realizamos una serie de experimentos con los cuales se evaluó la ganancia de función. Primero se evaluó que efecto tiene la sobre-expresión de la proteína CTCF sobre la actividad transcripcional de XAF1. Para ello se desarrolló un sistema inducible Tet-on CTCF en la línea celular MCF-7, con este sistema indujimos la sobre-expresión de CTCF por adición de tetraciclina al medio de cultivo. Como se ha mencionado anteriormente la unión de CTCF al promotor de XAF1 es sensible de metilación (Figura 11), por ello nosotros indujimos la sobre-expresión de CTCF bajo condiciones desmetilantes. Observamos que cuando se indujo la sobre-expresión de CTCF en las células MCF-7 CTCF-Tet-On, al mismo tiempo se indujo la activación transcripcional de XAF1 (Figura 16).

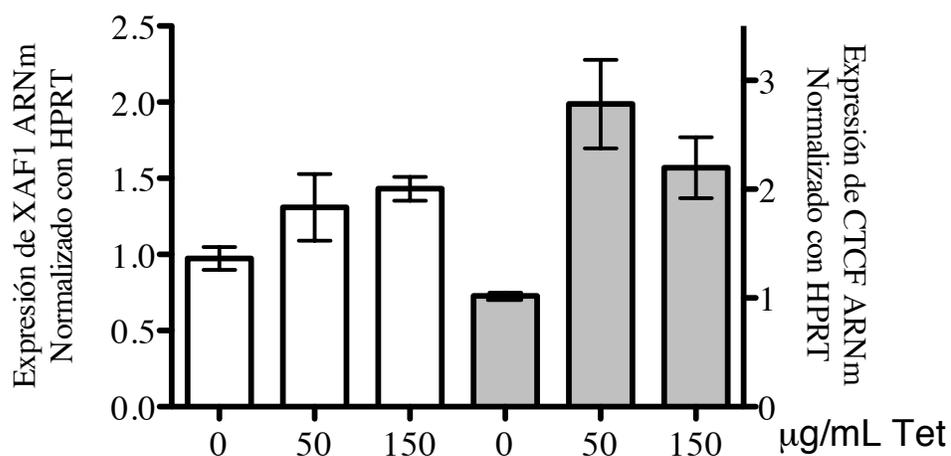


Figura 16. La sobre-expresión de CTCF y su efecto sobre la expresión de XAF1. Las clonas estables de células MCF-7 CTCF/Tet-On fueron pre-tratadas con 5-A-DC (5 µM) y TSA (0.2 µM) durante 3 días antes de inducir la expresión de CTCF con tetraciclina a las concentraciones indicadas. Después de 48 horas pos-inducción, se realizó PCR cuantitativo para analizar el nivel de expresión de los genes XAF1 y CTCF a nivel de ARNm. Los cambios en los niveles de expresión fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando la expresión del gen HPRT como normalizador. Los datos presentados representan el promedio y el rango de dos clonas estables e independientes.

Segundo; las células MCF-7 Tet-On fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido silvestre-XAF1-promotor-SEAP. Pasadas 24 horas pos-transfección se adicionó tetraciclina para inducir la expresión de CTCF, después de 24 horas de inducción se colectó el medio de cultivo para determinar actividad del gen reportero. Se observó un incremento significativo de la actividad enzimática del gen reportero en células que sobre-expresan CTCF (Figura 17) en comparación con las células control.

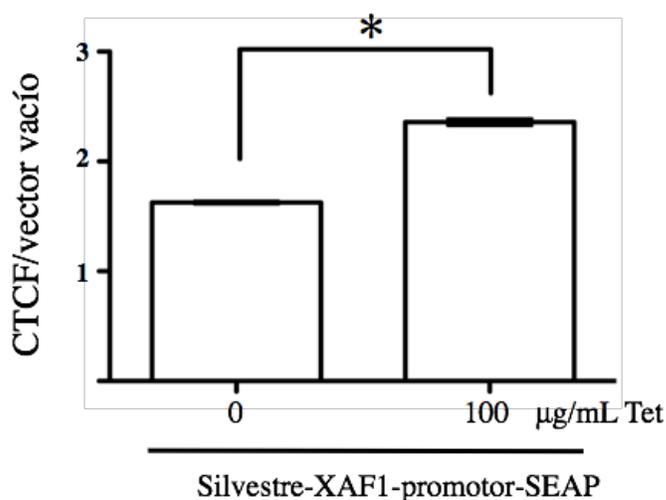


Figura 17. La sobre-expresión de CTCF y su efecto sobre la actividad del promotor de XAF1. Clonas estables MCF-7 CTCF-Tet-On y MCF7 Vector-vacío-Tet-On fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido silvestre-XAF1-promotor-SEAP y el vector pMetLuc como normalizador de la transfección. Después de 24h pos-transfección, se adicionó tetraciclina a la concentración indicada al medio para inducir la expresión de CTCF. Después de 24 horas de inducción se cuantificó la actividad enzimática del gen reportero, la cuál fue normalizada con la actividad enzimática luciferasa del plásmido control. Los datos son presentados como el cociente de la actividad enzimática normalizada producida por las células MCF-7 CTCF-Tet-On con la actividad enzimática normalizada producida por las células MCF-7 vector vacío-Tet-On. Los datos presentados representan el promedio de tres experimentos independientes, *P<0.05.

Adicionalmente también evaluamos el papel de la sobre-expresión de CTCF en términos de la capacidad de respuesta transcripcional de XAF1 ante los estímulos TNF- α ó IFN- α los cuales como ya observamos anteriormente inducen la activación transcripcional de XAF1 (Figura 6 y 7). A pesar de que detectamos un incremento de los niveles de expresión de

XAF1 en las células MCF-7 CTCF-Tet-On al inducir la expresión de CTCF, la actividad transcripcional de XAF1 resultante de los estímulos con TNF- α ó IFN- α no se modifica ante la sobre-expresión de CTCF (Figura 18). Este resultado indica que probablemente exista un mecanismo de señalización compartido y apoya el papel de CTCF en los efectos de estas citocinas en la regulación de XAF. Probablemente se requieren de factores adicionales para obtener la máxima capacidad de respuesta en la activación de XAF1.

Los enfoques de ganancia y pérdida de función de CTCF abren un panorama en el cual CTCF tiene una activa participación sobre la expresión de XAF1.

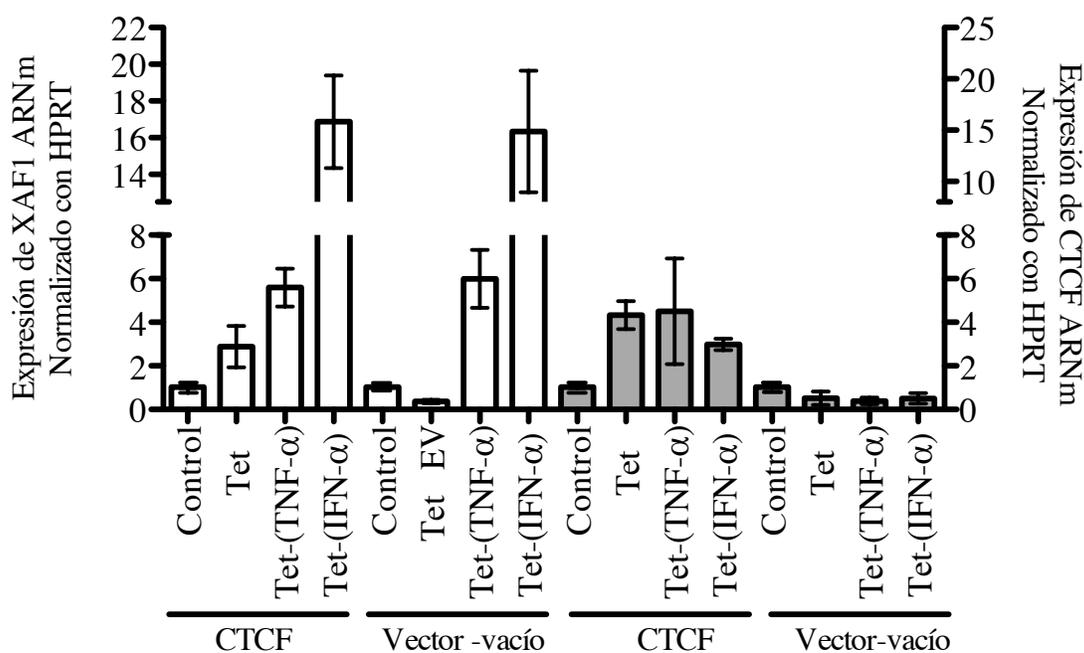


Figura 18. La respuesta de la actividad transcripcional de XAF1 ante los estímulos de TNF- α ó IFN- α y la sobre-expresión de CTCF. Las líneas estables MCF-7 CTCF-Tet-On y MCF-7 vector vacío-Tet-On fueron pre-tratadas con 5-A-DC (5 μ M) y TSA (0.2 μ M) durante 3 días antes de inducir la expresión de CTCF con tetraciclina por 24 horas; pasado este tiempo las células fueron estimuladas con TNF- α ó IFN- α por 24 horas. Después de las 24 horas de estímulo se realizó PCR cuantitativo para analizar el nivel de expresión de los genes XAF1 y CTCF a nivel de ARNm, los cambios en los niveles de expresión fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando la expresión

del gen HPRT como normalizador. Los datos presentados representan el promedio de tres experimentos independientes.

7.5 CTCF protege al gen de XAF1 del silenciamiento epigenético.

La acción aislador (insulator) de CTCF protege a varios genes del silenciamiento epigenético [117, 118]. En particular se ha descrito que la ausencia de unión de CTCF en promotores de genes supresores de tumores induce a su silenciamiento epigenético, lo cual nos habla del papel de CTCF en cáncer [119, 120]. Se decidió estudiar la regulación epigenética ejercida por CTCF sobre el gen de XAF1. Para ello se comparó la actividad promotora de XAF1 en un contexto genómico integrado mediante el seguimiento de la expresión de la proteína verde fluorescente (de sus siglas en inglés GFP) como gen reportero mediante citometría de flujo. De esta manera se generaron dos líneas celulares estables a partir de la línea celular MCF-7. La primera se le nombró peGFP-N1-XAF1-promotor (XAF-1 promotor), la cual posee la región promotora de XAF1 que comprende desde -1200 a +350 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción que conduce a la expresión del gen reportero GFP. La segunda se le nombró peGFP-N1- Δ -CTCF-XAF1-promotor (Δ -CTCF-XAF1-promotor) que posee la misma región del promotor de XAF1 a la cual se le ha deletado el sitio de unión a CTCF. Al finalizar la selección de las líneas estables se evaluó la expresión del transgén por citometría de flujo con lo cuál se observó que no existía diferencia en la expresión del transgén entre XAF-1 promotor y Δ -CTCF-XAF1-promotor (Figura 19 día 30). A partir de este momento se mantuvo en cultivo continuo libre de antibiótico de selección a ambas líneas estables durante 30 días más (Figura 19 Día 60). Al final de este periodo se evaluó la expresión del transgén por citometría de flujo. Las células estables que poseen la construcción Δ -CTCF-XAF1-promotor muestran bajos niveles de expresión del gen reportero en comparación con las células que poseen la construcción XAF1-promotor. Estos resultados soportan el papel insulador de CTCF sobre el gen de XAF1 (Figura 19). Con el objetivo de enfatizar este resultado; se aislaron clonas independientes de cada construcción las cuales se mantuvieron en cultivo continuo durante 35 días más (Figura 19 Día 95), al terminar este periodo

nuevamente se midió la expresión del gen reportero. Como era de esperarse por el resultado previo, el mayor silenciamiento de la expresión de GFP se observó principalmente en las clonas con el promotor integrado Δ -CTCF-XAF1-promotor (Figura 19) lo que señala que la unión de CTCF en el promotor de XAF1 posee un efecto epigenético.

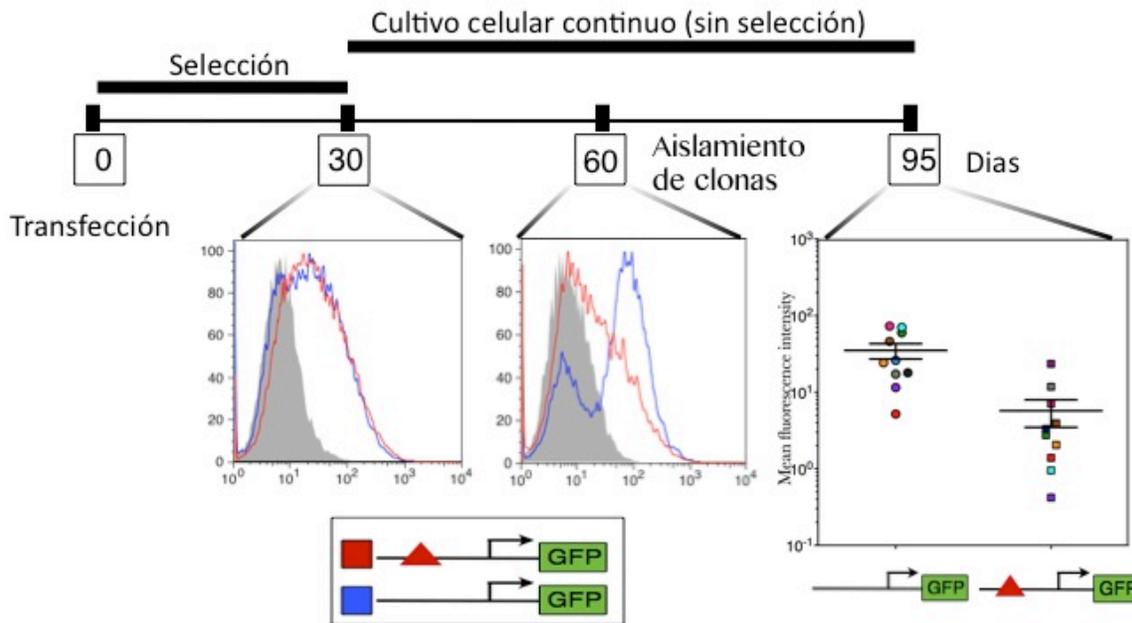


Figura 19. La proteína CTCF mantiene una configuración de cromatina abierta sobre el promotor de XAF1 en los ensayos de transgen. La línea celular MCF-7 fue transfectada con las construcciones peGFPN1-XAF1-promotor ó peGFP-N1- Δ -CTCF-XAF1-promotor, para generar líneas estables. En la imagen se muestra la línea de tiempo de las líneas celulares estables mantenidas en cultivo desde la transfección (Día 0) hasta el día 95. Al final del periodo de selección (Día 30) se mide la expresión del gen reportero por medio de citometría de flujo. Las líneas estables de cada construcción se mantuvieron durante 30 días en cultivo libre de antibiótico de selección (Día 60), momento en el cual se cuantificó la expresión del gen reportero y se aislaron clonas independientes de cada transfección. Las cuales se mantuvieron en cultivo continuo durante 35 días (Día 95), momento en el cual se cuantificó nuevamente la expresión del gen reportero por medio de citometría de flujo.

Una posible explicación de la diferencia de niveles de expresión de la proteína GFP entre las transfecciones se puede atribuir a un distinto número de eventos de integración. Para excluir esta posibilidad se determinó el número de copias del transgen por PCR cuantitativo como se ha reportado previamente [121]. La diferencia entre los niveles de expresión de GFP entre las construcciones XAF1-promotor y Δ -CTCF-XAF1-promotor fue independiente del número de copias del transgen (Figura 20).

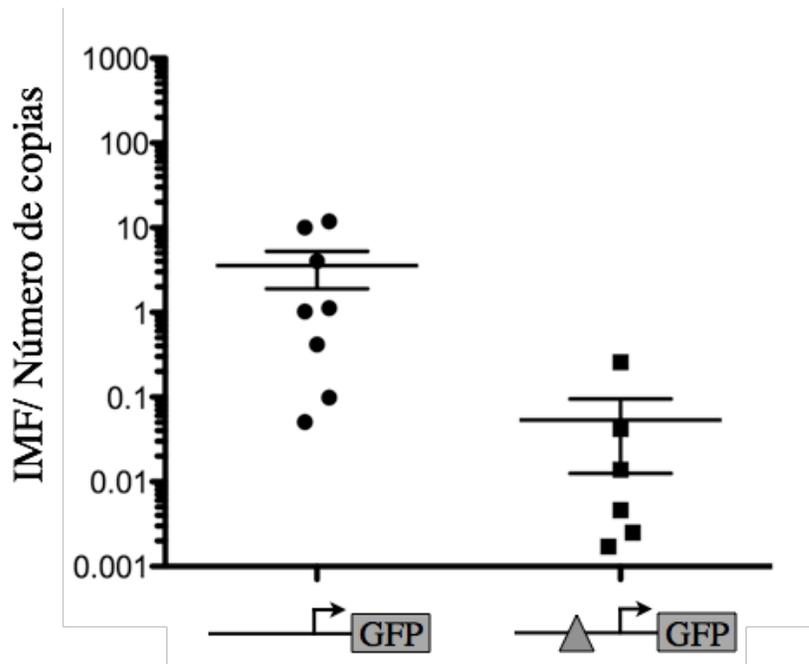


Figura 20. Determinación del efecto de número de eventos de integración sobre la intensidad de fluorescencia del transgén. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada clona independiente de las construcciones peGFPN1-XAF1-promotor ó peGFPN1- Δ -GFP-promotor se normalizó con el número de copias del transgen, el cual fue determinado por PCR cuantitativo.

Los resultados obtenidos con las células que poseen el transgén integrado nos indican que existe un mecanismo epigenético implicado en el silenciamiento de la proteína GFP observado en las clonas independientes Δ -CTCF-XAF1-promotor. Para tratar de explicar este mecanismo, nosotros hipotetizamos que la pérdida del sitio de unión para CTCF podría promover; 1) una acelerada metilación de los dinucleótidos CpG ó 2) la adquisición de configuración de cromatina represiva basada en modificaciones postraduccionales de

histonas ó ambas hipótesis podrían estar ocurriendo.

Para probar la primera hipótesis realizamos secuenciación genómica por bisulfito de tres clonas independientes de cada línea estable. Para discriminar el promotor de XAF1 endógeno del promotor del transgen se recurrió a la estrategia de PCR anidado. En la primera ronda de amplificación el primer par de oligonucleótidos utilizados alinean en la secuencia del plásmido que enmarca a la secuencia del promotor del transgen. El producto obtenido se sometió a una segunda ronda de amplificación utilizando un par de oligonucleótidos que reconocen específicamente al promotor de XAF1 (Figura 21a). Con este resultado observamos que las clonas Δ -CTCF-XAF1-promotor son más susceptible a la metilación que las clonas XAF1-promotor en un contexto genómico integrado (Figura 21a).

Para probar la segunda hipótesis realizamos ensayos de ChIP utilizando anticuerpos específicos contra las modificaciones postraduccionales de histonas H3K4-2me ó H3K9-3me en tres clonas independientes de cada línea estable. Esto lo logramos al diseñar oligonucleótidos específicos (Tabla 1) que reconocen la secuencia del plásmido que se encuentra inmediatamente río abajo del promotor de XAF1 exógeno (Figura 21b). Los resultados mostraron bajos niveles de la marca de actividad transcripcional H3K4-2me en las clonas Δ -CTCF-XAF1-promotor (Figura 21b). Como era de esperarse, observamos un enriquecimiento de la marca represiva H3K9-3me en las clonas Δ -CTCF-XAF1-promotor (Figura 20b). Los resultados mostrados soportan la noción que CTCF regula la metilación del ADN en el promotor de XAF1. Por lo que la pérdida del sitio de unión a CTCF induce la metilación y la transición de modificaciones activas a represivas de histonas induciendo la represión transcripcional de XAF1.

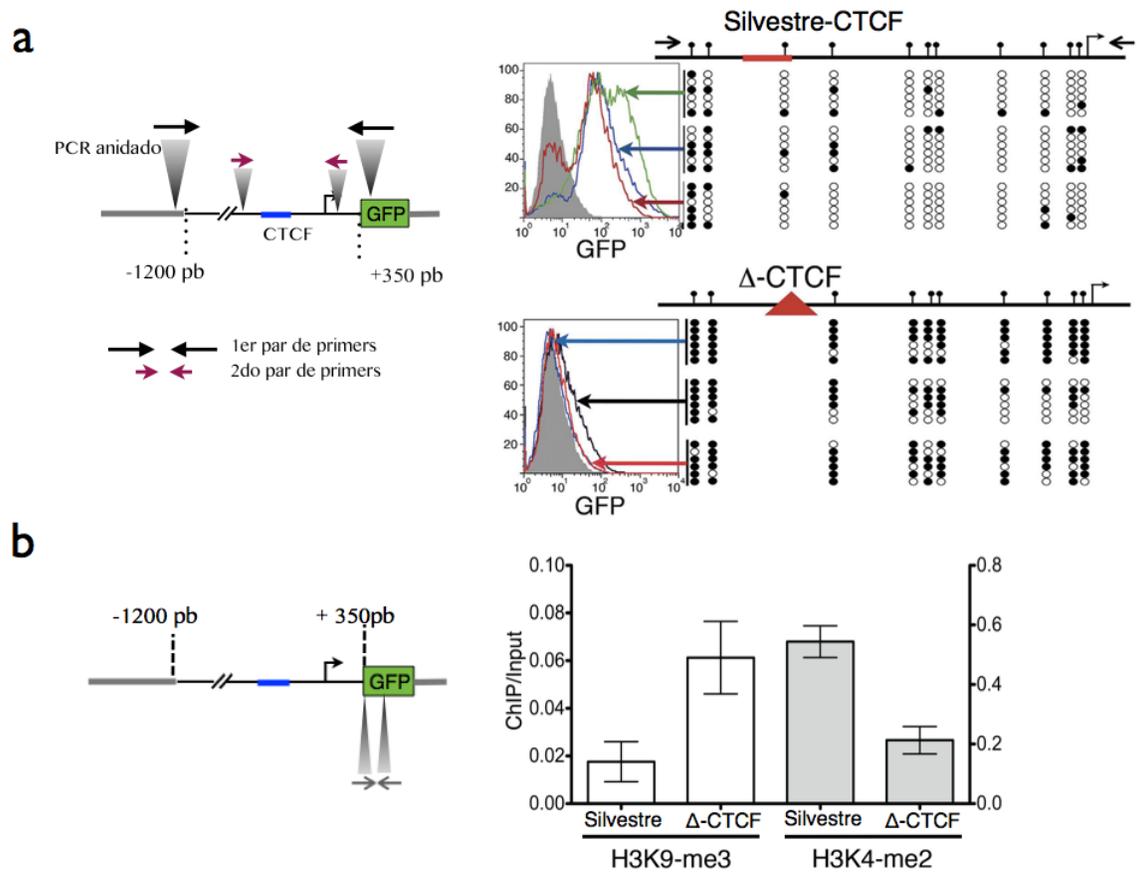


Figura 21. Caracterización de las marcas epigenéticas presentes en el promotor de XAF1 en el transgen. (a) Representación esquemática de la región que identifican los oligonucleótidos utilizados para amplificar específicamente al promotor exógeno de XAF1 convertido con bisulfito. La amplificación se realizó por medio de la estrategia de PCR anidado. En la primera ronda de amplificación los oligonucleótidos utilizados reconocen la secuencia del plásmido (panel izquierdo). En la derecha se muestra el patrón de metilación obtenido de la secuenciación por bisulfito de 3 clonas independientes de peGFP-N1-CTCF-XAF1-promotor y de peGFP-N1- Δ -CTCF-XAF1-promotor respectivamente. Los dinucleótidos CpG metilados y desmetilados son representados por círculos negros y blancos, respectivamente. En el panel central se muestra el histograma de la intensidad media de fluorescencia del gen reportero de cada clona independiente. (b) Representación esquemática de la región que identifican los oligonucleótidos utilizados sobre el promotor exógeno de XAF1 en el ensayo de ChIP, contra las marcas de histonas H3K4-2me ó H3K9-3me (panel izquierdo). Los ensayos de ChIP se realizaron con las clonas independientes utilizando anticuerpos específicos contra H3K4-2me ó H3K9-3me. Los datos son presentados como el promedio de tres clonas independientes. El triángulo rojo simboliza la delección del sitio de unión

de CTCF en el promotor de XAF1.

7.6 La expresión de XAF1 es regulada por CTCF en condiciones apoptóticas.

En la literatura encontramos descrito que la reactivación de la expresión de XAF1 tiene un papel crucial en la apoptosis inducida por TNF- α /cicloheximida (CHX) ó IFN- α /TRAIL [80, 85]. Como hemos observado, la unión de CTCF al promotor de XAF1 tiene un efecto positivo en la activación de XAF1 (Figura 16). Para probar si CTCF es capaz de regular la expresión de XAF1 bajo condiciones apoptóticas, células MCF-7 fueron expuestas a los estímulos con TNF- α /CHX ó IFN- α /TRAIL. La citotoxicidad de estos estímulos fue analizada a través de ensayos de viabilidad celular (Figura 22). Con este ensayo observamos que el tratar a las células con cicloheximida a una concentración de 2 y 4 μ M en combinación con TNF- α no afecta a la viabilidad celular. En el caso del tratamiento con TRAIL se determino que la concentración en el rango de 10 a 20 ng/mL combinado con IFN- α no afecta la viabilidad celular.

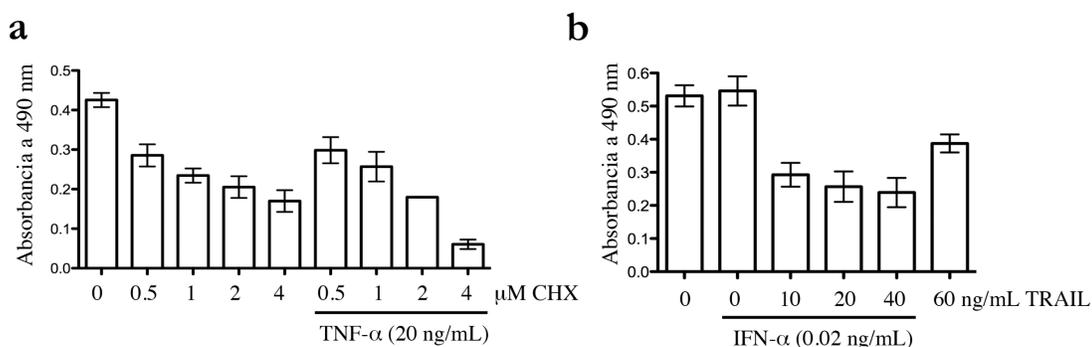


Figura 22. Efecto de la citotoxicidad del co-tratamiento de TNF- α /CHX ó IFN- α /TRAIL en la línea celular MCF-7. Ensayos de viabilidad celular fueron realizados en la línea celular MCF-7, (a) las células fueron pretratadas con 5-A-DC (5 μ M) y TSA (0.2 μ M) durante 3 días antes de ser estimuladas por 24 horas solo con cicloheximida (CHX) ó en combinación con TNF- α a las concentraciones indicadas. (b) Células MCF-7 fueron pretratadas como en (a) antes de ser

estimuladas durante 24 horas solo con TRAIL ó en presencia de IFN- α a las concentraciones indicadas.

Como era de esperarse, después del estímulo ya sea con TNF- α /CHX ó IFN- α /TRAIL observamos activación transcripcional de XAF1 (Figura 22).

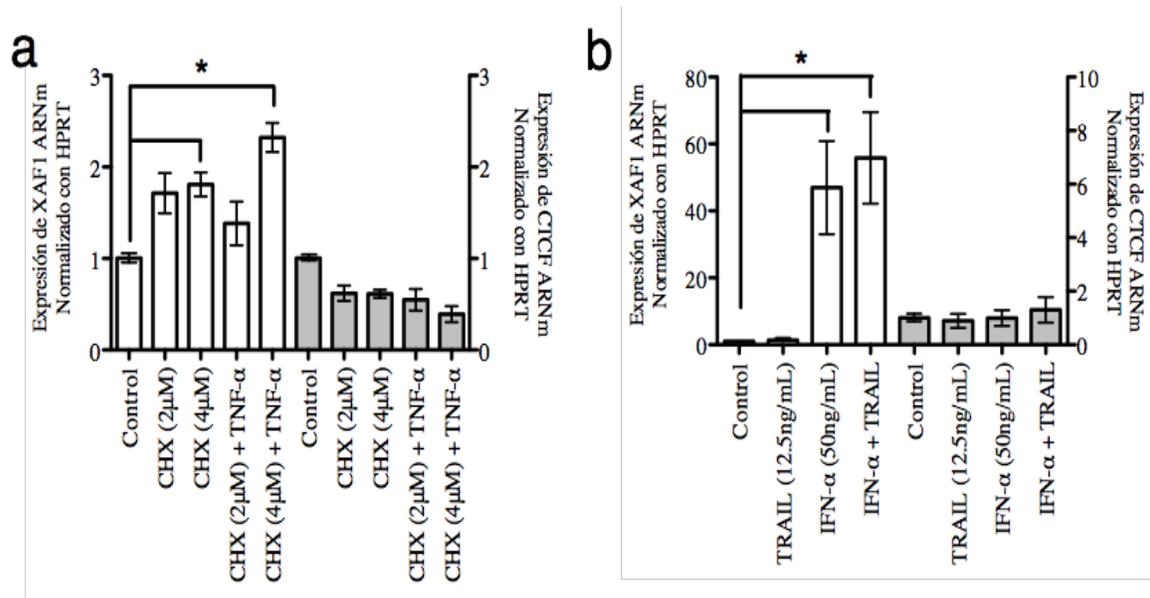


Figura 23. Efecto de los estímulos pro-apopticos sobre la actividad transcripcional de XAF1.

La línea celular MCF-7 fue pre-tratada con 5-A-DC (5 µM) y TSA (0.2 µM) por 3 días antes de ser estimuladas (a) durante 24 horas con cicloheximida (CHX) ó en combinación con TNF- α (CHX+TNF- α) a las concentraciones indicadas. (b) Células MCF-7 pre-tratadas como en (a) antes de ser estimuladas durante 24 horas con TRAIL ó en combinación con IFN- α a las concentraciones indicadas (IFN- α + TRAIL). Al finalizar las 24 horas del estímulo se realizó PCR cuantitativo para analizar el nivel de expresión de los genes XAF1 y CTCF a nivel de ARNm; los cambios en los niveles de expresión fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando la expresión del gen HPRT como normalizador. Los datos presentados representan el promedio de tres experimentos independientes.

Los resultados anteriores permitieron establecer las condiciones apoptóticas bajo las cuales se activa la expresión de XAF1. Para poder interrogar la relevancia biológica que CTCF ejerce sobre la activación transcripcional de XAF1 bajo condiciones apoptóticas, utilizamos a las clonas independientes XAF1-promotor y Δ -CTCF-XAF1-promotor. Estas clonas fueron tratadas con los inductores de apoptosis TNF- α /CHX ó IFN- α /TRAIL. Posterior al estímulo se determinaron los niveles de expresión del gen reportero GFP por citometría de flujo. Los resultados muestran una activación transcripcional del transgén en las clonas XAF1-promotor ante el estímulo TNF- α /CHX, dicha respuesta es mayor cuando estas mismas células son estimuladas con IFN- α /TRAIL, mientras que los mismos estímulos en las clonas Δ -CTCF-XAF1-promotor son incapaces de activar la expresión del transgén (Figura 24). Estos resultados nos dicen que es necesaria la unión de CTCF en el promotor de XAF1 para la activación transcripcional de este último.

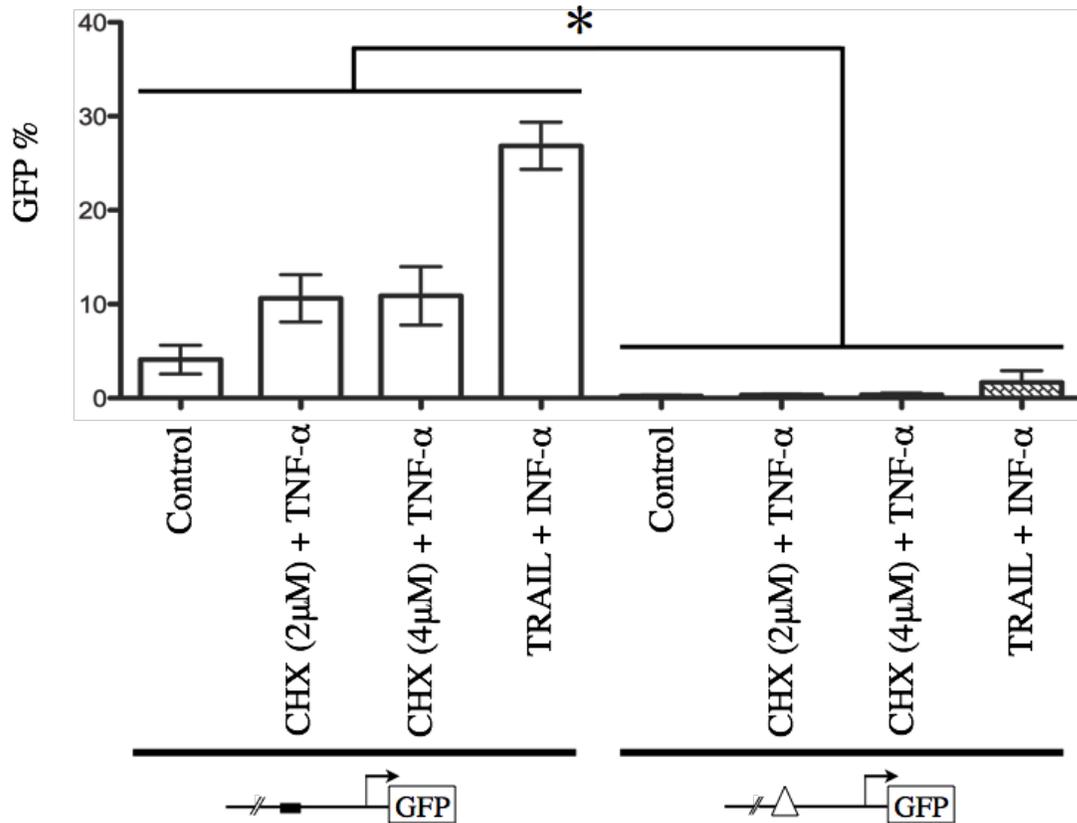


Figura 24. La expresión de XAF1 es regulada por CTCF en condiciones apoptóticas. Las clonas estables independientes que poseen la construcción peGFP-N1-XAF1-promotor ó peGFP-N1-Δ-CTCF-XAF1-promotor fueron estimuladas con TNF-α/CHX ó con IFN-α/TRAIL durante 24 horas. Posteriormente se midieron los niveles de expresión de la proteína GFP por citometría de flujo. Los datos presentados son la media de 4 clonas independientes de cada transfección, *P<0.05

8. Discusión.

El desarrollo y progresión del cáncer es el resultado de una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la pérdida del balance entre el crecimiento celular y la muerte celular programada ó apoptosis. El mecanismo regulatorio mejor caracterizado en la apoptosis es ejecutado por la familia de las PIAs que regulan negativamente las formas activas de las caspasas por interacción física con ellas impidiendo la culminación de la apoptosis. XIAP es el miembro de la familia de las PIAs mejor caracterizado y con mayor potencial inhibitorio sobre las caspasas [74]. La proteína XAF1 antagoniza las acciones anti-apoptóticas de XIAP induciendo la culminación de la apoptosis al liberar las caspasas retenidas por XIAP [79, 83]. XAF1 es considerado un importante gen supresor de tumor. En varios tipos de cáncer, la expresión de XAF1 es ausente en comparación con su contraparte normal [92, 93, 95, 96]. El papel del gen supresor de XAF1 en cáncer se ha estudiado a través de experimentos de expresión ectópica de XAF1 la cual inhibe la proliferación de células malignas e induce a apoptosis [85]. Sobre esta misma línea de evidencia, el uso de modelos xenografticos murinos, el restablecimiento de la expresión de XAF1 es suficiente para inhibir el crecimiento de tumor [80, 90, 103]. Algunos grupos de trabajo se han enfocado en la cuestión relacionada con la ausencia de expresión de XAF1 en cáncer. Se ha descrito que el silenciamiento transcripcional de XAF1 es dependiente de la hipermetilación de su promotor [92, 95, 99]. Esta bien documentado que la metilación del ADN es una modificación epigenética que tienen un papel importante en la promoción del evento carcinogénico. Las células tumorales presentan hipometilación global del ADN, simultáneamente es posible encontrar sitios en el genoma que adquieren una metilación de ADN anormal [5]. Estos sitios corresponden a componentes reguladores de la transcripción de genes definidos como islas CpG las cuales están basadas en una densidad elevada de dinucleótidos CpG [11]. En cáncer estas secuencias que se encuentran metiladas producen el silenciamiento epigenético de los elementos promotores de la transcripción de los genes vinculados a esas regiones reguladoras. Entre los genes afectados se encuentran; genes supresores de tumor, así como genes asociados con la reparación del ADN entre otros. La pérdida de la regulación de los mecanismos epigenéticos está implicada en una variedad de enfermedades [122], entre las que se incluye el cáncer [36, 123, 124].

Debido a que la metilación del ADN es una modificación epigenética reversible, se ha hecho uso de agentes desmetilantes como el 5-aza-2'-deoxicitidina (5-A-DC) en células tumorales, dando como resultado la activación transcripcional de XAF1, de este modo se ve comprometida la viabilidad celular debido a la promoción de la apoptosis [84, 90], catástrofe mitótica [84, 108] ó inhibición del ciclo celular [108]. Hasta el momento la metilación de los dinucleótidos CpG presentes en el promotor de XAF1 representan el principal mecanismo involucrado en el silenciamiento de XAF1 y en consecuencia se presenta la resistencia a apoptosis. El trabajo presentado aquí, describe un mecanismo epigenético por el cual el promotor de XAF1 sufre metilación en cáncer.

Como era de esperarse basado en reportes previos que muestran que el promotor de XAF1 se encuentra hipermetilado en cáncer [92, 95, 99], la exposición de líneas celulares MCF-7 y ACHN a agentes inhibitorios de la metilación del ADN fue suficiente para reactivar la expresión de XAF1 tanto a nivel de ARNm como de proteína (Figura 6 y 7). Interesantemente las condiciones desmetilantes fueron necesarias para una activación completa de XAF1 después de tratar con IFN- α ó TNF- α (Figura 6 y 7), ambas citocinas son activadores transcripcionales de XAF1 [101, 106, 109]. Para ampliar el panorama del efecto de los agentes desmetilantes sobre la activación transcripcional de XAF1, realizamos la secuenciación del ADN genómico convertido con bisulfito de sodio. Comparamos el patrón de metilación de las células control con las células tratadas con los agentes desmetilantes (Figura 9). Se observó la desmetilación diferencial de tres dinucleótidos CpG en respuesta al tratamiento con agentes desmetilantes. Pensando que estos tres dinucleótidos CpG desmetilados podrían ser la clave para la mayor activación transcripcional de XAF1, buscamos sitios de unión para factores de transcripción en la secuencia de ADN adyacente a estos. Este análisis permitió identificar un sitio putativo de unión para CTCF. La presencia de este sitio de unión esta soportado por una base de datos de sitios de unión para CTCF validados experimentalmente por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (Figura 10).

CTCF es una proteína con múltiples funciones, involucrada en la regulación de la cromatina con profundas consecuencias en la expresión génica [21, 125]. En un panel de líneas celulares de cáncer de mama, una alta expresión de CTCF se asocia con resistencia a

apoptosis [126]. La acción protectora de CTCF en parte es explicada por la regulación del gen Bax, el cual incrementa el umbral apoptótico [127]. Esto ha sido claramente demostrado que CTCF regula la configuración de la cromatina de muchos genes supresores de tumor, afectando su tasa de transcripción [117].

Describimos que CTCF interactúa con el promotor de XAF1, dicha interacción tiene un efecto regulatorio sobre la configuración de su cromatina y tiene consecuencia en la respuesta transcripcional ante los activadores transcripcionales IFN- α y TNF- α .

En el presente trabajo demostramos dos escenarios biológicos. El primero, CTCF mantiene una configuración de cromatina abierta en el promotor de XAF1, conferido por la presencia de marcas activas de las modificaciones postraduccionales de histonas (Figura 20b) y dinucleótidos CpG desmetilados (Figura 20a), permitiendo una alta respuesta transcripcional ante el uso de los activadores IFN- α y TNF- α (Figura 3 y 23). Segundo, la pérdida de regulación de CTCF sobre el promotor de XAF1, se explica por el hecho de que la interacción de CTCF con su sitio de unión presente en el promotor de XAF1 es sensible de metilación (Figura 9 y 11), lo que induce la transición de marcas activas a represivas de las modificaciones postraduccionales de histonas (Figura 20b) y una acelerada ganancia de metilación en los dinucleótidos CpG (Figura 20a). Este estado de cromatina cerrada reprime la activación transcripcional (Figura 23) lo que probablemente contribuya a la resistencia de la inducción de la apoptosis. De este modo CTCF es determinante para conferir una configuración de cromatina abierta del gen de XAF1, el cual es crítico para la culminación del evento apoptótico.

En la inactivación del cromosoma X, ciertos genes escapan del mecanismo de silenciamiento epigenético. CTCF media este escape al inhibir la propagación tanto de la metilación del ADN y de las marcas represivas de modificaciones postraduccionales de histonas que rodea a las regiones silenciadas [118]. En este escenario, CTCF media el cambio entre una configuración de cromatina abierta y cerrada al funcionar como una proteína adaptadora que atrae diferentes complejos enzimáticos involucrados en las modificaciones postraduccionales de las histonas [119, 128, 129]. Concordantemente el silenciamiento epigenético de los genes regulados por CTCF se ha observado que cuando CTCF es incapaz de interactuar con su sitio de unión debido a la presencia de metilación esto favorece la presencia de marcas represivas de las modificaciones postraduccionales de

las histonas [119, 130, 131]. Un punto importante que hay que destacar es el hecho que no existen reportes previos que muestren el peso biológico de las modificaciones postraduccionales de las histonas sobre la regulación transcripcional de XAF1. En este trabajo nosotros a través del uso de un transgén describimos las acciones de CTCF en un contexto cromatinico integrado sobre la configuración de la cromatina en el gen de XAF1 (Figura 20b). Con esta estrategia nosotros logramos observar por primera vez que la ausencia local de CTCF en el promotor de XAF1 induce la transición de marcas activas a represivas de modificaciones postraduccionales de histonas.

Se ha descrito que la matriz nuclear juega un importante rol en la regulación de la transcripción de genes. La cromatina se encuentra anclada por fragmentos cortos de secuencias de ADN llamadas regiones de anclajes a la matriz (de sus siglas en inglés MARs). El rango del tamaño de las MARs es de 100 a 2000 pares de bases, ricas de dinucleótidos AT y secuencias repetitivas. Tanto la formación de asas cromatínicas como la activación transcripcional de genes alrededor de las MARs dependen de su anclaje sobre la matriz nuclear [132]. Esto se explica por el hecho de que factores transcripcionales se encuentran presentes en la matriz nuclear [133]. CTCF se asocia con la matriz nuclear [29, 134] y media el anclaje de secuencias de ADN a esta, como se ha observado en el insulador 5'-HS betaglobina de pollo [135]. En adición a la asociación de CTCF con la matriz nuclear depende de nucleofosmina/B23 [29]. No obstante, se ha observado que IFN- γ induce la activación transcripcional de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, lo cual coincide con la reorganización de las asas cromatínicas [136]. Interesantemente el anclaje del ADN a la matriz nuclear después de la exposición con IFN- γ fue asociada con los sitios de unión a CTCF [136]. Por lo tanto, CTCF reconfigura las regiones genómicas a través de formación de asas que afectan el entorno transcripcional del gen. En el presente trabajo, nosotros demostramos que en células de cáncer CTCF es incapaz de asociarse a su sitio de unión en el promotor de XAF1 si este se encuentra metilado (Figura 24a), por tanto efectivamente no es capaz de responder a los activadores conocidos (Figura 24a). No obstante después de desmetilar el sitio, CTCF ahora es capaz de asociarse con el promotor de XAF1 y potenciar su activación transcripcional (Figura 6). Una intrigante posibilidad es que CTCF podría ser capaz de atraer el ADN hacia la matriz nuclear, interviniendo en la

formación de asas cromatínicas en la matriz nuclear después de la exposición a estímulos exógenos. Aunque no se ha probado nosotros visualizamos que CTCF podría ser capaz de atraer al promotor de XAF1 a la matriz nuclear por medio de su asociación con nucleofosmina/B23, por lo tanto induciendo tanto como formación de asas como activación transcripcional del gen XAF1 (Figura 24b). En cáncer, este mecanismo putativo no podría ocurrir debido a la ausencia de unión de CTCF debido al mecanismo sensible de metilación (Figura 24a).

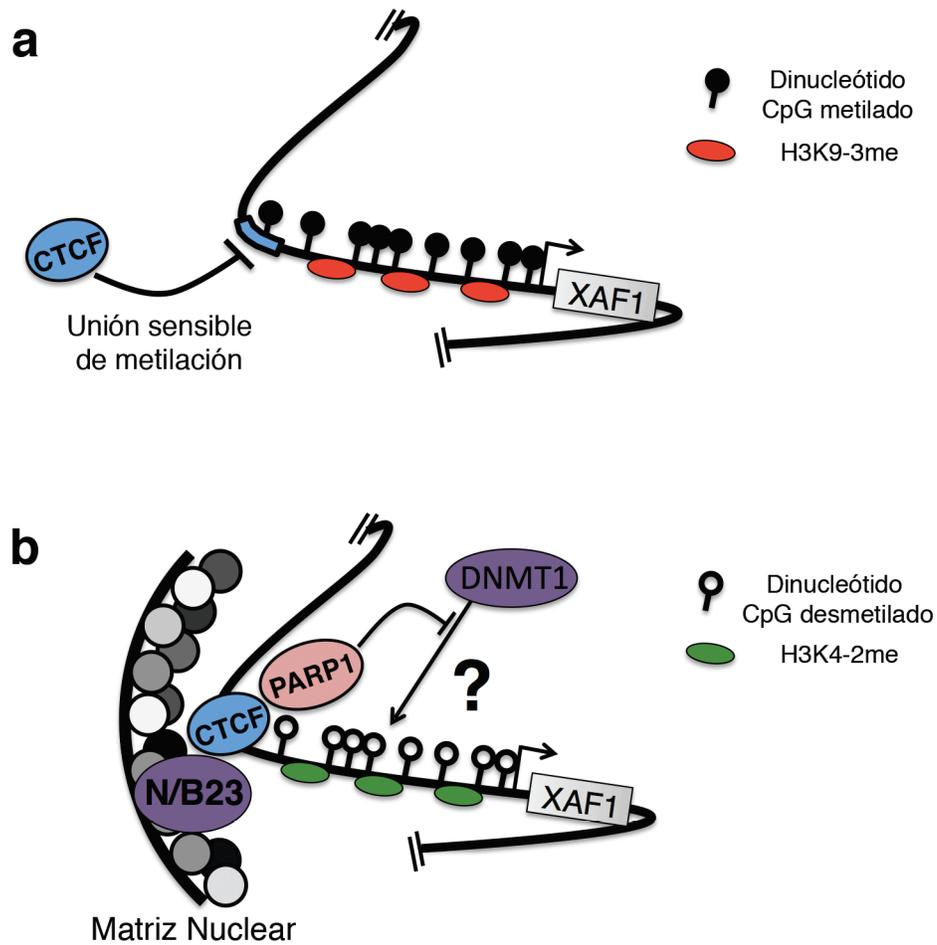


Figura 24. Regulación epigenética del promotor de XAF1 por CTCF. a) La metilación del sitio de unión de CTCF en el promotor de XAF1 como ocurre en cáncer inhibiendo su reconocimiento o por CTCF. Esto lleva a un enriquecimiento represivo de modificaciones postraduccionales de histonas, contribuyendo al silenciamiento transcripcional de XAF1. b) En condiciones desmetilantes, CTCF es capaz de interactuar con su sitio de unión inhibiendo tanto la metilación de los dinucleótidos CpG como modificaciones postraduccionales de histonas represivas como es H3K9-2me. Después del tratamiento con activadores transcripcionales como TNF- α ó IFN- α , la asociación de CTCF y nucleofosmina/B23 es inducida permitiendo el anclaje del promotor de XAF1 a la matriz nuclear induciendo la activación transcripcional. Adicionalmente, varias subunidades de CTCF podrían formar puentes genómicos de regiones intercromosomales o intracromosomales de una misma región de anclaje a la cual el promotor de XAF1 está anclada. La inhibición de la metilación de los dinucleótidos CpG puede ser efectuada por la acción inhibitoria de PARP-1 sobre DNMT1.

Finalmente, nosotros demostramos por primera vez que CTCF es crítico para el mantenimiento del estado desmetilado de los dinucleótidos CpG en el promotor de XAF1 (Figura 24b). Esta acción se puede explicar por reportes previos que han demostrado que CTCF se asocia y activa a PARP-1, la cual regula negativamente a DNMT1, de este modo mantiene a los dinucleótidos CpG que se encuentran presentes en los sitios de unión a CTCF libres de metilación [137, 138]. Adicionalmente, PARP-1 es localizado en la matriz nuclear y está implicado en la formación de asas cromatínicas. Aunque no se ha probado, una hipótesis interesante podría ser que PARP-1 es un mediador de los efectos de CTCF (Figura 24b). Experimentos adicionales son requeridos para probar esta hipótesis.

9. Conclusiones

- ❖ Demostramos un nuevo y funcional sitio de unión a CTCF en el promotor del gen XAF1.
- ❖ La asociación de CTCF con su sitio de unión en el promotor de XAF1 actúa como un regulador clave en el establecimiento de una configuración de cromatina abierta, debido al enriquecimiento de marcas activas de modificaciones postraduccionales de histonas y el mantenimiento de dinucleótidos CpG libres de metilación.
- ❖ En cáncer, la metilación del sitio de unión de CTCF deshabilita las acciones epigenéticas protectoras de CTCF contra la configuración cerrada de la cromatina.
- ❖ Por primera vez se aborda la importancia biológica de las modificaciones postraduccionales de histonas en la regulación transcripcional de XAF1
- ❖ La ausencia de regulación de CTCF en el gen de XAF1 puede constituir una ventaja selectiva durante la evolución clonal por medio del incremento del umbral apoptótico.

10. Anexo

10.1 Tabla de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Construcciones	Sequence (5'-3')	Tm °C	Amplicon pb
XAF1.2-s	<u>ACTCGAGATTTTTCATTCTTGATATTGACAGAC</u> TGC	65	1610
XAF30-s	<u>AGGTACCCCGATTCTGCAAAGGTGACA</u>	63	3350
XAF-as	<u>ATTCGCGACAAGTATGAGTAGCCCAGTTG</u>	66	
Δ CTCF s	GCC ATT TTT AGG GAA CAG ATG GGG GAG AAG GGT G	71	
Δ CTCF as	CAC CCT TCT CCC CCA TCT GTT CCC TAA AAA TGG C	71	
ChIP			
XAF-CTCF-s	TTGCAAGGTCCTCACCGCCTGGAA	63	170
XAF-CTCF-as	TCCGTCTGGGTCTCCATCCCTTTTCC	64	
IgF2-CTCF-s	CAGGCTCCCCAAAATCTA	56	350
IgF2-CTCF-as	GGGAACATAGAGAAAGAGG	52	
c-MYC-CTCF-s	GGGATCGCGCTGAGTATAAA	57	155
c-MYC-CTCF-as	GGATCTCCCTTCCCAGGAC	58	
NEG-CTCF-s	CAGGATCTCCGAGAATCAGC	57	161
NEG-CTCF-as	GAGTTGGGAGAGCTGTCAGG	59	
ChIP líneas estables (Transgen)			
XAF-GFP-s	AAATGTTAGGCTTTCTGGGACAGT	60	126
XAF-GFP-as	TGAACAGCTCCTCGCCCTT	61	
Bisulfito			
XAF1-enBis	TTGGGTTTGGGTTTATATTATTTTG	54	871
XAF1-enBia	TAAATAACCCAATTAACCCTAACC	54	

1.2GFPBis	TTAATGGGAGTTTGT TTTTGGTA	51	1950
1.2GFPBia	AATAAACTTCAA AATCAACTTACC	51	
ARNm			
CTCF-s	CCTGCTGTTCTTCCTCAA AATCGTAG	60	700
CTCF-as	ATGGAAGGTGATGCAGCTGAAGCCAT	62	
XAF1-s	GAGCTGCATGTCCAGTTTGC	57	177
XAF1-as	GCCAACTTCACCCTCCATGA	57	

11. Bibliografía

1. Hanahan D, Weinber RA.: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
2. Shen H, Laird PW.: **Interplay between the cancer genome and epigenome.** *Cell* 2013, **153**(1):38-55.
3. Loeb L: **A mutator phenotype in cancer.** *Cancer research* 2001, **61**:3230-3239.
4. Sandoval J, Esteller M.: **Cancer epigenomics: beyond genomics.** *Current opinion in genetics & development* 2012, **22**(1):50-55.
5. Baylin S, Jones PA.: **A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications.** *Nature reviews Cancer* 2011, **11**(10):726-734.
6. You J, Jones, PA.: **Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?** *Cancer cell* 2012, **22**(1):9-20.
7. Gomez-Diaz E, Corces VG.: **Architectural proteins: regulators of 3D genome organization in cell fate.** *Trends in cell biology* 2014, **24**(11):703-711.
8. Luger K, Mader AW, Richmond R, Sargent D, Richmond T: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.** *Nature* 1997, **389**(6648):251-260.
9. Gilbert N, Gilchrist S, Bickmore WA.: **Chromatin Organization in the Mammalian Nucleus.** *Int Rev Cytol* 2005, **242**:283-336.
10. Misteli T: **Beyond the sequence: Cellular organization of genome function.** *Cell* 2007, **128**:787-800.
11. Jones P: **Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention.** *Annals of the New York Academy Sciences* 2003, **983**:213-219.
12. Hatziapostolou M, Iliopoulos D.: **Epigenetic aberrations during oncogenesis.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2011, **68**(10):1681-1702.
13. Sharma S, Kelly TK, Jones PA.: **Epigenetics in cancer.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(1):27-36.
14. Thompson LL, Guppy BJ, Sawchuk L, Davie JR, McManus KJ: **Regulation of chromatin structure via histone post-translational modification and the link to carcinogenesis.** *Cancer metastasis reviews* 2013, **32**(3-4):363-376.
15. Kouzarides T: **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 2007, **128**(4):693-705.
16. Strahl B, Allis CD.: **The language covalent histone modifications.** *Nature* 2000, **403**:41-45.
17. Jenuwein T, Allis CD.: **Translating the Histone Code.** *Science* 2001, **293**:1074-1080.
18. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T.: **Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins.** *Nature* 2001, **410**(6824):116-120.
19. Liang G, Lin JC, Wei V, Yoo C, *et al*: **Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**(19):7357-7362.

20. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M *et al*: **Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer.** *Nature genetics* 2005, **37**(4):391-400.
21. Phillips JE, Corces VG.: **CTCF: master weaver of the genome.** *Cell* 2009, **137**(7):1194-1211.
22. Filippova GN, Fagerlie S, EM K, Myers C, Dehner Y *et al*: **An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes.** *Molecular and cellular biology* 1996, **16**(6):2802-2813.
23. Martinez SR, Miranda JL: **CTCF terminal segments are unstructured.** *Protein science : a publication of the Protein Society* 2010, **19**(5):1110-1116.
24. Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI *et al*: **Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome.** *Cell* 2007, **128**(6):1231-1245.
25. Wang H, Maurano MT, Qu H, Varley KE *et al*: **Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation.** *Genome research* 2012, **22**(9):1680-1688.
26. Schmidt D, Schwalie PC, Wilson MD, Ballester B, *et al*: **Waves of retrotransposon expansion remodel genome organization and CTCF binding in multiple mammalian lineages.** *Cell* 2012, **148**((1-2)):335-348.
27. Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh TY, *et al*: **Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains.** *Genome research* 2009, **19**(1):24-32.
28. Renda M, Baglivo I, Burgess-Beusse B, Esposito S, *et al*: **Critical DNA binding interactions of the insulator protein CTCF: a small number of zinc fingers mediate strong binding, and a single finger-DNA interaction controls binding at imprinted loci.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(46):33336-33345.
29. Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G.: **CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species.** *Molecular cell* 2004, **13**(2):291-298.
30. Defossez PA, Kelly KF, Filion G J, Perez - Torrado R *et al*: **The human enhancer blocker CTCF - binding factor interacts with the transcription factor Kaiso.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**:43017-43023.
31. Filippova G: **Genetics and Epigenetics of the Multifunctional Protein CTCF.** *Curr Top Dev Biol* 2008, **80**:337-360.
32. Klenova E, Chernukhin I, El-Kady A, Lee RE *et al*: **Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF.** *Molecular and cellular biology* 2001, **21**(6):2221-2234.
33. El-Kady A, Klenova E: **Regulation of the transcription factor, CTCF, by phosphorylation with protein kinase CK2.** *FEBS letters* 2005, **579**(6):1424-1434.

34. Yu W, Ginjala V, Pant V, Chernukhin I *et al*: **Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation.** *Nature genetics* 2004, **36**(10):1105-1110.
35. MacPherson MJ, Beatty LG, Zhou W, Du M.: **The CTCF insulator protein is posttranslationally modified by SUMO.** *Molecular and cellular biology* 2009, **29**(3):714-725.
36. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S.: **The epigenetic progenitor origin of human cancer.** *Nat Rev Genet* 2006, **7**(1):22-33.
37. Lichter P: **The role of epigenetics in carcinogenesis.** *International Journal of Cancer* 2008, **123**(1).
38. Jones R: **Epigenetics: reversing the 'irreversible'.** *Nature* 2007, **450**(7168):357-359.
39. Morey L, Brenner C, Fazi F, Villa R *et al*: **MBD3, a component of the NuRD complex, facilitates chromatin alteration and deposition of epigenetic marks.** *Molecular and cellular biology* 2008, **28**(19):5912-5923.
40. Xu GL BT, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N *et al*: **Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene.** *Nature* 1999, **402**(6758):187-191.
41. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF *et al*: **Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk.** *Science* 2003, **299**(5613):1753-1755.
42. Mohandas T SR, Shapiro LJ: **Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation.** *Science* 1981, **211**(4480):393-396.
43. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F *et al*: **Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor.** *Science* 2002, **295**(5557):1079-1082.
44. Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y: **G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription.** *EMBO J* 2008, **27**(20):2681-2690.
45. Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL *et al*: **PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing.** *Nat Struct Mol Biol* 2009, **16**(6):2453-2458.
46. Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM *et al*: **Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer.** *APMIS* 2005, **113**(4):264-268.
47. Tryndyak V, Kovalchuk O, Pogribny IP.: **Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins.** *Cancer biology & therapy* 2006, **5**(1):65-70.
48. Pogribny I, Ross SA, Wise C, Pogribna M, Jones EA *et al*: **Irreversible global DNA hypomethylation as a key step in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency.** *Mutat Res* 2006, **593**:80-87.

49. Filippova G, Thienes CP, Penn BH, Cho DH, Hu YJ *et al*: **CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus.** *Nature genetics* 2002, **28**(4):335-343.
50. De La Rosa-Velazquez IA, Rincon-Arano H, Benitez-Bribiesca L, Recillas-Targa F: **Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF.** *Cancer Res* 2007, **67**(6):2577-2585.
51. Butcher DT, Mancini-DiNardo DN, Archer TK, Rodenhiser DI.: **DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2004, **111**(5):669-678.
52. Barret C: **Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment.** *Environmental Health Perspectives* 1993, **100**:9-20.
53. Abdel-Rahman W: **Genomic instability and carcinogenesis: an Update.** *Current Genomics* 2008, **9**(8).
54. Stratton MR, Campbell P, Futreal PA.: **The cancer genome.** *Nature* 2009, **458**(7239):719-724.
55. Duyverman AM, Kohno M, Roberge S, Fukumura D, Duda DG, Jain RK.: **An isolated tumor perfusion model in mice.** *Nat Protoc* 2012, **7**(4):749-755.
56. Barcellos-Hoff MH LD, Wang TC: **The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis.** *Nature reviews Cancer* 2013, **13**(7):511-518.
57. Zimmermann KC, Bonzon C, Green D.: **The machinery of programmed cell death.** *Pharmacology & Therapeutics* 2001, **92**:57-70.
58. Taylor RC, Cullen SP, Martin S.: **Apoptosis: controlled demolition at the cellular level.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2008, **9**(3):231-241.
59. Hanahan D, Weinberg RA.: **The hallmarks of the cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
60. Shirley S, Micheau O: **Targeting c-FLIP in cancer.** *Cancer letters* 2013, **332**(2):141-150.
61. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D *et al*: **Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death.** *J Exp Med* 1995, **182**(2):367-377.
62. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B.: **The biochemistry of programmed cell death.** *FASEB J* 1995, **9**(13):1277-1287.
63. Helleday T, Bryant HE, Schultz N.: **Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy.** *Cell Cycle* 2005, **4**(9):1176-1178.
64. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M *et al*: **The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.** *Cell Death Differ* 2002, **9**(10):1031-1042.
65. Zamzami N, Kroemer G.: **The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2001, **2**(1):67-71.
66. Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D: **The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer.** *Seminars in cancer biology* 2004, **14**(4):231-243.

67. Zhang HG, Wang J, Yang X, Hsu HC, Mountz JD: **Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin.** *Oncogene* 2004, **23**(11):2009-2015.
68. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE.: **The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.** *Oncogene* 1998, **17**(25):3247-3259.
69. Silke J, Meier P: **Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, **5**(2).
70. Oberoi-Khanuja TK, Murall A, Rajalingam K: **IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration.** *Cell death & disease* 2013, **4**:e784.
71. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL.: **Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family.** *EMBO reports* 2006, **7**(10):988-994.
72. Bilim V, KasaharaT, Hara N, Takahashi K, Tomita Y: **Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer(TCC)and therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC in vitro.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003, **103**:29-37.
73. Tamm I, Kornblau S, Segall H, Krajewski S, Welsh K *et al*: **Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias.** *Clin Cancer Res* 2001, **6**:1796-1803.
74. Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean M, Craig C, Korneluk RG: **Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines.** *Genomics* 2000, **70**(1):113-122.
75. Holcik M, Gibson H, Korneluk RG: **Apoptotic brake and promising therapeutic target.** *Apoptosis* 2001, **6**(253-61).
76. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y.: **Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO.** *Nature* 2000, **406**(6798):855-862.
77. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R: **A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death.** *Molecular cell* 2001, **8**(3):613-621.
78. Gottfried Y, Rotem A, Lotan R, Steller H, Larisch S: **The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP.** *EMBO J* 2004, **23**(7):1627-1635.
79. Liston P, Fong W, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T *et al*: **Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-caspase activity.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(2):128-133.
80. Tu SP, Sun YW, Cui JT, Zou B, Lin MC *et al*: **Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression.** *Cancer* 2010, **116**(5):1252-1263.
81. Russell JC, Whiting H, Szuflita N, Hossain MA: **Nuclear translocation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) determines cell fate after hypoxia ischemia in neonatal brain.** *Journal of neurochemistry* 2008, **106**(3):1357-1370.

82. Kim KS, Heo JI, Choi KJ, Bae S: **Enhancement of cellular radiation sensitivity through degradation of Chk1 by the XIAP-XAF1 complex.** *Cancer biology & therapy* 2014, **15**(12):1622-1634.
83. Tse MK, Cho CK, Wong WF, Zou B, Hui SK, Wong BC, Sze KH: **Domain organization of XAF1 and the identification and characterization of XIAP(RING) -binding domain of XAF1.** *Protein science : a publication of the Protein Society* 2012, **21**(10):1418-1428.
84. Arora V, Cheung HH, Plenchette S, Micali OC, Liston P, Korneluk RG: **Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(36):26202-26209.
85. Xia Y, Novak R, Lewis J, Duckett CS, Phillips AC: **Xaf1 can cooperate with TNFalpha in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP.** *Molecular and cellular biochemistry* 2006, **286**(1-2):67-76.
86. Chung SK, Lee MG, Ryu BK, Lee JH, Han J *et al*: **Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses.** *Gastroenterology* 2007, **132**(7):2459-2477.
87. Fang X, Liu Z, Fan Y, Zheng C, Nilson S, Egevad L, Ekman P, Xu D: **Switch to full-length of XAF1 mRNA expression in prostate cancer cells by the DNA methylation inhibitor.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006, **118**(10):2485-2489.
88. Yin W, Cheepala S, Clifford JL: **Identification of a novel splice variant of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1.** *Biochemical and biophysical research communications* 2006, **339**(4):1148-1154.
89. Lee MG, Han J, Jeong SI, Her NG, Lee JH, Ha TK, Kang MJ, Ryu BK, Chi SG: **XAF1 directs apoptotic switch of p53 signaling through activation of HIPK2 and ZNF313.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(43):15532-15537.
90. Zhu LM, Shi D, Dai Q, Cheng XJ, Yao WY *et al*: **Tumor suppressor XAF1 induces apoptosis, inhibits angiogenesis and inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma.** *Oncotarget* 2014, **5**(14):5404-5415.
91. Zhao WJ, Deng BY, Wang XM, Miao Y, Wang JN: **XIAP associated factor 1 (XAF1) represses expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and regulates invasion, cell cycle, apoptosis, and cisplatin sensitivity of ovarian carcinoma cells.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2015, **16**(6):2453-2458.
92. Zou B, Chim CS, Zeng H, Leung SY, Yang Y *et al*: **Correlation between the single-site CpG methylation and expression silencing of the XAF1 gene in human gastric and colon cancers.** *Gastroenterology* 2006, **131**(6):1835-1843.
93. Wang Y MH, Hao Q, Wang Y, Yang Y, Shen L, Huang S, Liu P: **Association of expression of XIAP-associated factor 1 (XAF1) with clinicopathologic factors, overall survival, microvessel density and cisplatin-resistance in ovarian cancer.** *Regul Pept* 2012, **178**:36-42.
94. Huang J, Yao WY, Zhu Q, Tu SP, Yuan F *et al*: **XAF1 as a prognostic biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer.** *Cancer science* 2010, **101**(2):559-567.

95. Chen XY, He QY, Guo MZ.: **XAF1 is frequently methylated in human esophageal cancer.** *World journal of gastroenterology* 2012, **18**(22):2844-2849.
96. Sakemi R, Yano H, Ogasawara S, Akiba J *et al*: **X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and XIAP-associated factor-1 expressions and their relationship to apoptosis in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous liver tissues.** *Oncol Rep* 2007, **18**(1):65-70.
97. Ng KC, Campos EL, Martinka M, Li G: **XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma.** *J Invest Dermatol* 2004, **123**:1127-1134.
98. Kempkensteffen C, Hinz S, Schrader M, Christoph F *et al*: **Gene expression and promoter methylation of the XIAP-associated Factor 1 in renal cell carcinomas correlations with pathology and outcome.** *Cancer letters* 2007, **254**(2):227-235.
99. Lee MG, Huh J, Chung SK, Lee JH, Byun DS *et al*: **Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses.** *Oncogene* 2006, **25**(42):5807-5822.
100. Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Kang MJ, Kim HR, Chi SG: **Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas.** *Cancer Res* 2003, **63**(21):7068-7075.
101. Straszewski-Chavez SL, Visintin IP, Karassina N, Los G, Liston P *et al*: **XAF1 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(17):13059-13072.
102. Leaman DW, Chawla-Sarkar M, Vyas K, Reheman M, Tamai K, Toji S, Borden EC: **Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(32):28504-28511.
103. Tu SP, Liston P, Cui JT, Lin MC, Jiang XH *et al*: **Restoration of XAF1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in gastric cancer.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2009, **125**(3):688-697.
104. Chawla-Sarkar M, Linder D, Liu YF, Williams BR *et al*: **Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis.** *Apoptosis* 2003, **8**(3):237-249.
105. Leaman DW, Chawla-Sarka M, Jacobs B, Vyas K *et al*: **Novel growth and death related interferon-stimulated genes (ISGs) in melanoma: Greater potency of IFN- β compared with IFN- α 2.** *J Interferon Cytokine Res* 2003, **23**(12):745-756.
106. Sun Y, Qiao L, Xia HH, Lin MC, Zou B *et al*: **Regulation of XAF1 expression in human colon cancer cell by interferon beta: activation by the transcription regulator STAT1.** *Cancer letters* 2008, **260**(1-2):62-71.
107. Micali OC, Cheung H, Plenchette S, Hurley SL *et al*: **Silencing of the XAF1 gene by promoter hypermethylation in cancer cells and reactivation to TRAIL-sensitization by IFN-beta.** *BMC cancer* 2007, **7**:52.

108. Wang J, Zhang W, Zhang Y, Chen Y, Zou B *et al*: **c-Jun N-terminal kinase (JNK1) upregulates XIAP-associated factor 1 (XAF1) through interferon regulatory factor 1 (IRF-1) in gastrointestinal cancer.** *Carcinogenesis* 2009, **30**(2):222-229.
109. Wang J, Peng Y, Sun YW, He H, Zhu S *et al*.: **All-trans retinoic acid induces XAF1 expression through an interferon regulatory factor-1 element in colon cancer.** *Gastroenterology* 2006, **130**(3):747-758.
110. Yu LF, Wang J, Zou B, Lin MC, Wu YL *et al*: **XAF1 mediates apoptosis through an extracellular signal-regulated kinase pathway in colon cancer.** *Cancer* 2007, **109**(10):1996-2003.
111. Zhang W, Guo Z, Jiang B, Niu L, Xia G *et al*: **Identification of a functional p53 responsive element within the promoter of XAF1 gene in gastrointestinal cancer cells.** *International Journal of Oncology* 2010, **36**(4):1031-1037.
112. Zou B, Chim CS, Pang R, Zeng H, Dai Y *et al*: **XIAP-associated factor 1 (XAF1), a novel target of p53, enhances p53-mediated apoptosis via post-translational modification.** *Mol Carcinog* 2012, **51**(5):422-432.
113. Planchette S, Cheung H, Fong WG, LaCasse EC, Korneluk RG: **The role XAF1 in cancer.** *Curr Opin Investig Drugs*, **8**(6):469-476.
114. Guan XY, Sham JS, Tail LS, Fang Y, Li H, Liang Q: **Evidence for another tumor suppressor gene 17p13 distal to TP53 in hepatocellular carcinoma** *Cancer Genet Cytogenet* 2003, **140**(1):45-48.
115. Lou YF, Zou Z, Chen PJ, Huang GB, Li B, Zheng DQ, Yu XR, Luo XY: **Combination of gefitinib and DNA methylation inhibitor decitabine exerts synergistic anti-cancer activity in colon cancer cells.** *PloS one* 2014, **9**(5):e97719.
116. Reu FJ, Bae SI, Cherkassky L, Leaman DW, Linder D *et al* : **Overcoming resistance to Interferon- induced apoptosis of renal carcinoma and melanoma cells by ADN demethylation.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(23):3771-3779.
117. Recillas-Targa F, De La Rosa-Velazquez IA, Soto-Reyes E.: **Insulation of tumor suppressor genes by the nuclear factor CTCF.** *Biochem Cell Biol* 2011, **89**(479-88).
118. Filippova GN: **Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development.** *Dev Cell* 2005, **8**(31-42).
119. Batle-Lopez A, Cortiguera MG, Rosa-Garrido M, Blanco R, del Cerro E *et al* : **Novel CTCF binding at a site in exon1A of BCL6 is associated with active histone marks and a transcriptionally active locus.** *Oncogene* 2015, **34**:246-256.
120. Peng Z: **Epigenetic repression of RARRES is mediated by methylation of a proximal promoter and loss of CTCF binding.** *PloS one* 2012, **45**:247-258.
121. Joshi M, Pittman HK, Haisch CE, Verbanac KM. : **Real-time PCR to determine transgene copy number and to quantitate the biolocalization of adoptively transferred cells from EGFP-transgenic mice.** *Biotechniques* 2008, **45**:247-258
122. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P: **Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.** *Nature* 2004, **429**(6990):457-463.

123. Esteller M: **Epigenetics in cancer.** *N Engl J Med* 2008, **358**(11):1148-1159.
124. Baylin S, Herman JG.: **DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics.** *Trends Genet* 2000, **16**(4):168-174.
125. Ong C, Corces VG.: **CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function.** *Nature reviews Genetics* 2014, **15**(4):234-246.
126. Docquier F, Farrar D, D'Arcy V, Chernukhin I *et al* : **Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis.** *Cancer Res* 2005, **65**(12):5112-5122.
127. Méndez-Catalá CF, Gretton S, Vostrov A, Pugacheva E, Farrar D *et al*: **A novel mechanism for CTCF in the epigenetic regulation of Bax in breast cancer cells.** *Neoplasia* 2013, **15**(8):898-912.
128. Li T, Hu J, Qiu X, Ling J, Chen H, Wang S, Hou A, Vu TH, Hoffman AR.: **CTCF regulates allelic expression of Igf2 by orchestrating a promoter-polycomb repressive complex 2 intrachromosomal loop.** *Molecular and cellular biology* 2008, **28**(20):6473-6482.
129. Soto-Reyes E, Recillas-Targa F: **Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines.** *Oncogene* 2010, **29**(15):2217-2227.
130. Szabó PE, Tang SH, Silva FJ, Tsark WM, Mann JR.: **Role of CTCF binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region.** *Molecular and cellular biology* 2004, **24**(11):4791-4800.
131. Eldholm V, Haugen A, Zienolddiny S: **CTCF mediates the TERT enhancer-promoter interactions in lung cancer cells: identification of a novel enhancer region involved in the regulation of TERT gene.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014, **134**(10):2305-2313.
132. Venkatraman B, Klenova E.: **Role of CTCF poly(ADP-Ribosyl)ation in the regulation of apoptosis in breast cancer cells.** *Indian J Med Paediatr Oncol* 2015, **36**(1):49-54.
133. Szentirmay MN, Sawadogo M: **Spatial organization of RNA polymerase II transcription in the nucleus.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(10):2019-2025.
134. Dunn K, Zhao H, Davie JR.: **The insulator binding protein CTCF associates with the nuclear matrix.** *Exp Cell Res* 2003, **288**(1):218-223.
135. Yusufzai T, Felsenfeld G.: **The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element.** *Proc Natl Acad Sci* 2004, **101** (23):8620-8624.
136. Ottaviani D, Lever E, Mao S, Christova R, Ogunkolade BW *et al* : **CTCF binds to sites in the major histocompatibility complex that are rapidly reconfigured in response to interferon-gamma.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**(12):5262-5270.
137. Guastafierro T, Cecchinelli B, Zampieri M, Reale A, Riggio G *et al*: **CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(32):21873-21880.
138. Zampieri M, Guastafierro T, Calabrese R, Ciccarone F, Bacalini MG *et al*: **ADP-ribose polymers localized on Ctfp-Parp1-Dnmt1 complex prevent methylation of Ctfp target sites.** *Biochem J* 2012, **441**(2):645-652.

12. Artículo publicado

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Epigenetic silencing of the XAF1 gene is mediated by the loss of CTCF binding

Received: 20 May 2015
Accepted: 07 September 2015
Published: 07 October 2015

Georgina Victoria-Acosta¹, Karla Vazquez-Santillan², Luis Jimenez-Hernandez²,
Laura Muñoz-Galindo², Vilma Maldonado², Gustavo Ulises Martinez-Ruiz^{2,3} &
Jorge Melendez-Zajgla¹

XAF1 is a tumour suppressor gene that compromises cell viability by modulating different cellular events such as mitosis, cell cycle progression and apoptosis. In cancer, the XAF1 gene is commonly silenced by CpG-dinucleotide hypermethylation of its promoter. DNA demethylating agents induce transcriptional reactivation of XAF1, sensitizing cancer cells to therapy. The molecular mechanisms that mediate promoter CpG methylation have not been previously studied. Here, we demonstrate that CTCF interacts with the XAF1 promoter *in vivo* in a methylation-sensitive manner. By transgene assays, we demonstrate that CTCF mediates the open-chromatin configuration of the XAF1 promoter, inhibiting both CpG-dinucleotide methylation and repressive histone posttranslational modifications. In addition, the absence of CTCF in the XAF1 promoter inhibits transcriptional activation induced by well-known apoptosis activators. We report for the first time that epigenetic silencing of the XAF1 gene is a consequence of the loss of CTCF binding.

The tumour-suppressor gene X-linked inhibitor of the apoptosis (XIAP)-associated factor 1 (XAF) favours apoptosis by inhibiting XIAP¹⁻⁵, which is one of the most important members of the inhibitors of apoptosis protein (IAP) family. In addition, XAF1 also presents XIAP-independent proapoptotic actions that contribute to its tumour suppressor gene activity⁶⁻⁸. XAF1 expression is absent or decreased in gastric⁹, ovarian¹⁰, pancreatic¹¹, esophageal¹², colon⁹, hepatic¹³, melanoma¹⁴ and urogenital tumours¹⁵⁻¹⁷. Although loss of heterozygosity has been showed to be associated to XAF1 expression absence¹⁸, promoter CpG dinucleotide hypermethylation appears to be the principal cause of altered XAF1 expression^{9,12,17}. Exposure to demethylating agents such as 5-azacytidine readily induces the reestablishment of XAF1 expression, thereby increasing the sensitivity to drug-induced apoptosis^{12,19,20}. In xenograft models, ectopic XAF1 expression impedes tumour formation and prolongs the survival of tumour-bearing mice^{21,22}. However, the molecular mediators of the hypermethylated state and decreased expression are currently unknown.

CTCF is a multitask protein involved in gene regulation. This protein functions as a transcriptional regulator, enhancer blocker and chromatin barrier²³. These actions are secondary to its main function as a genome-wide organizer of chromatin architecture^{24,25}. The biological actions of CTCF are explained by its ability to function as a DNA-binding protein scaffold. CTCF interacts with its DNA-binding sites in a methylation-sensitive fashion, thereby impeding the methylation of imprinting control regions^{26,27}. In cancer, it has been described that CTCF is able to modulate the histone posttranslational modification (HPM) status and CpG methylation from several tumour suppressor genes²⁸.

¹Functional Cancer Genomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Mexico D.F., 14610, Mexico. ²Epigenetics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Mexico D.F., 14610, México. ³Unit of Investigative Research on Oncological Disease, Children's Hospital of Mexico "Federico Gomez", Mexico City, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.U.M.-R. (email: gustavobambam@gmail.com) or J.M.-Z. (email: jmelendez@inmegen.gob.mx)

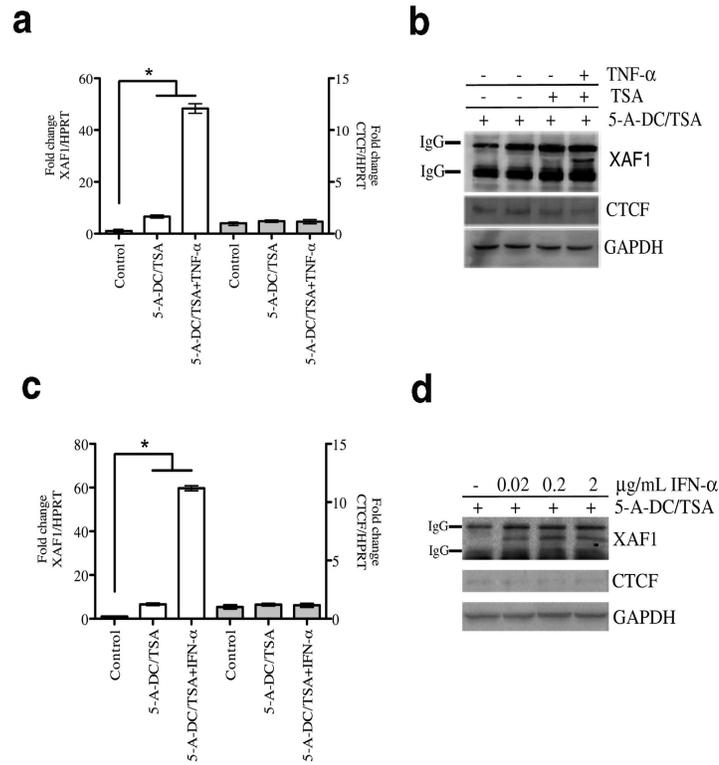


Figure 1. XAF1 expression is induced by either TNF- α or IFN- α in demethylating conditions. (a) MCF-7 cells were pre-treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine (5 μ M) and Trichostatin-A (0.2 μ M) for 3 days before stimulation with TNF- α (20 ng/mL) for 24 h. Quantitative PCR (qPCR) analysis of *XAF1* and *CTCF* mRNA expression was performed. *HPRT* mRNA was used as loading control. Results are presented in terms of fold change. The means from three independent experiments were plotted with \pm SEM, * $P < 0.05$. (b) MCF-7 cells were treated as shown in (a). Using a specific antibody, XAF1 was immunoprecipitated from equal quantities of total extracted proteins for each condition. XAF1, CTCF and GAPDH protein levels were measured by Western blot. (c) MCF-7 cells were pre-treated as in (a) before stimulation with IFN- α at the indicated concentrations. mRNA expression of both *XAF1* and *CTCF* was analysed by qPCR after normalizing with *HPRT* mRNA. The mean from three independent replicates were plotted with \pm SEM, * $P < 0.05$. (d) MCF-7 cells were pre-treated and stimulated as shown in (c). Western blot analysis was performed as shown in (b). 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-A-DC); Trichostatin-A (TSA).

Here, we demonstrated that CTCF directly regulates XAF1 expression by binding to a methylation-sensitive CTCF-binding site in its promoter. The absence of CTCF promotes epigenetic silencing of the *XAF1* promoter by both accelerated CpG-dinucleotide methylation and the transition from active to repressive HPMs. Importantly, in cancer cell lines, the lack of CTCF regulation on the *XAF1* promoter via methylation on its cognate binding site partially blocks its transcriptional responsiveness to two well-known transcriptional activators, TNF- α or IFN- α . These findings uncover for the first time an epigenetic mechanism involved in establishing the repressive configuration of the *XAF1* promoter and, consequently, transcriptional unresponsiveness.

Results

Specific CpG-dinucleotide methylation impedes full XAF1 responsiveness to either TNF- α or IFN- α in MCF-7 cells. As expected based on previous reports showing that *XAF1* promoter is hypermethylated in cancer^{9,12,17}, here, pre-exposure to demethylating agents increased the transcriptional activation of XAF1 in basal conditions (Supplementary Fig.1a). To test XAF1 dynamic expression, we used two well-known XAF1 transcriptional activators, TNF- α and IFN- α ²⁹⁻³¹. Demethylating conditions were required to display full transcriptional activation of XAF1 at both the mRNA and protein levels

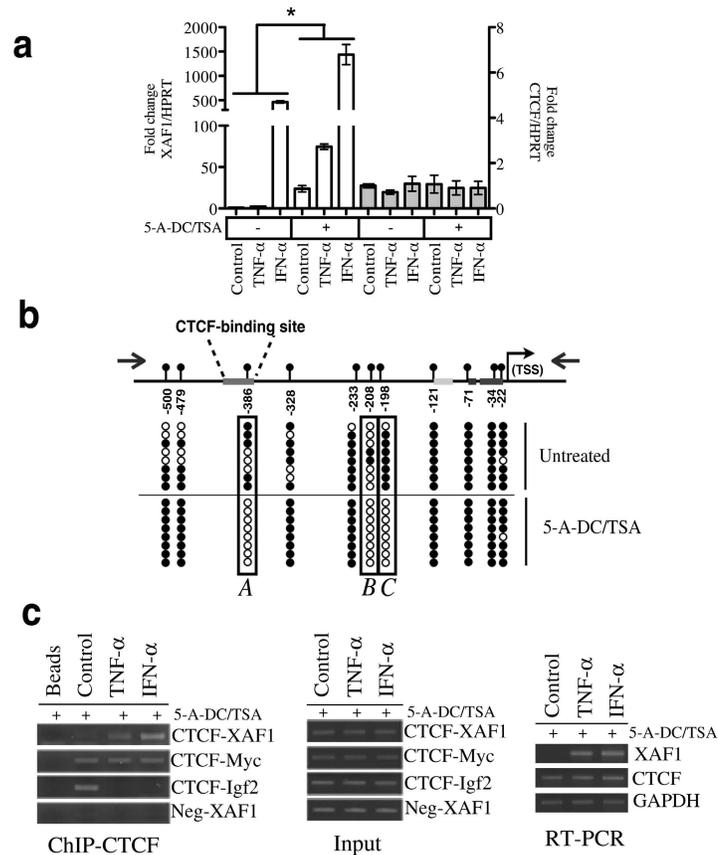


Figure 2. CTCF interacts with the *XAF1* promoter. (a) ACHN cells were pre-treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine (5 μ M) and Trichostatin-A (0.2 μ M) for 3 days before stimulation with either TNF- α or IFN- α . Non-demethylated cells were stimulated with either TNF- α or IFN- α . mRNA expression of *XAF1*, *CTCF* and *HPRT* was analysed by qPCR. Results are presented in terms of fold change. The means from three independent experiments were plotted with \pm SEM, * $P < 0.05$. (b) MCF-7 cells were either treated or not treated with demethylating agents, as shown in (a). Bisulphite sequencing was then performed. A schematic representation of the *XAF1* promoter shows the locations of 11 CpG-dinucleotides sites from -22 to -500 bp relative to the TSS. Methylated and unmethylated CpGs are depicted as filled and open circles, respectively (c) MCF-7 cells were treated as shown in (a). ChIP assays were performed using a specific antibody against CTCF protein. The CTCF-binding site in the *XAF1* promoter was analysed by PCR in the DNA recovered after ChIP (Left panel). As positive and negative controls of CTCF-DNA interaction, three specific sets of primers were included. Two of them were directed to previously validated CTCF binding sites (c-Myc and IGF2) as positive controls, and one was a negative control. The input represents soluble chromatin that was reversed cross-linked and amplified by PCR (central panel). RT-PCR was performed from cells used for ChIP assays. 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-A-DC); Trichostatin-A (TSA).

after TNF- α (Fig. 1a,b) or IFN- α (Fig. 1c,d) exposure. To extend these observations to another unrelated cancer cell line, we used ACHN cells, which have previously been shown to be responsive to IFN- α in demethylating conditions³². As observed with MCF-7 cells, we observed a dramatic increase in *XAF1* responsiveness in demethylating conditions (Fig. 2a). As a positive control, we used the Colo205 cell line that presents an unmethylated *XAF1* promoter⁹. Even without previous exposure to epigenetic modifiers, we observed a clear *XAF1* transcriptional activation by TNF- α exposure (Supplementary Fig. 1b). We then reasoned that differential dinucleotide CpG methylation between control cells and cells treated with demethylating agents could help us to identify which DNA segments are important for the full responsiveness of *XAF1*. To this end, we performed bisulphite genomic sequencing using a specific set of

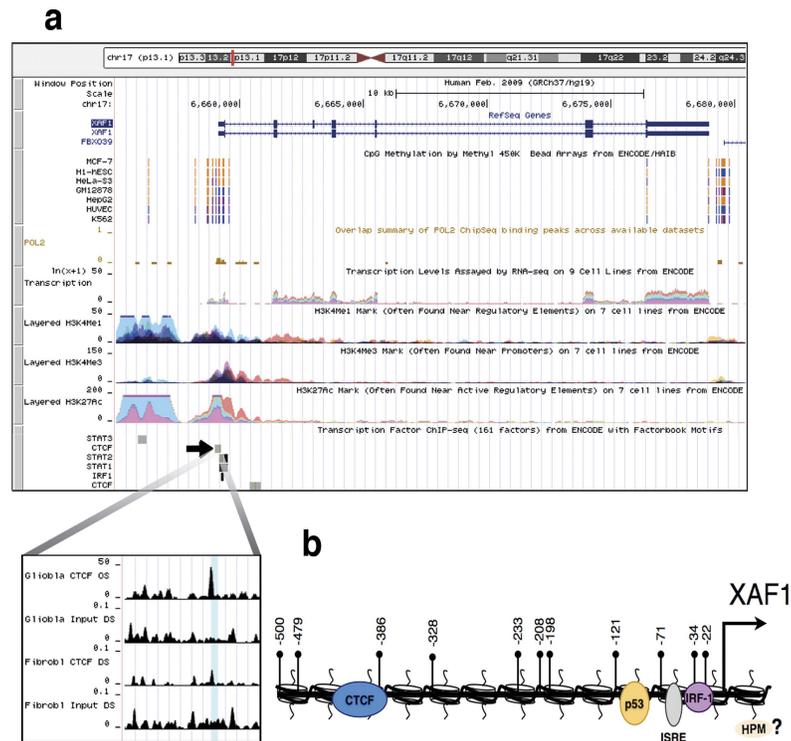


Figure 3. Features of the *XAF1* promoter. (a) The *XAF1* promoter visualized in the UCSC genome browser. The picture illustrates the CpG-methylation status from different types of cell lines. Additionally, the profiles of several histone posttranslational modifications such as H3K4Me1, H3K4Me3 and H3K27Ac are presented from different cell lines. Several transcription factor binding sites obtained from ChIP-Seq data are also shown. At a higher resolution, the CTCF binding site in the *XAF1* promoter in glioblastoma and fibroblast cells is shown. (b) Schematic representation of the *XAF1* promoter showing the CpG-dinucleotide positions from -22 to -500 bp relative to the transcription start site and the previously described binding sites for IRF-1, ISRE, p53 and the uncharacterized CTCF binding site. Histone posttranslational modification (HPM).

primers to amplify the *XAF1* promoter. Exposure to 5-aza-2'-deoxycytidine (5-A-DC) and trichostatin-A (TSA) induced consistent demethylation of three CpG dinucleotides in MCF-7 cells (Fig. 2b; A, B and C). These results indicate that full transcriptional activation of the *XAF1* gene is associated with a specific CpG-dinucleotide methylation state of its promoter.

CTCF interacts with the *XAF1* promoter when cells are stimulated with TNF- α or IFN- α . CTCF is known to regulate the expression of diverse tumour suppressor genes by directly binding to promoter sequences²⁸. We searched for transcription binding sites in a window of $-/+ 10$ bp of the DNA sequence adjacent to each CpG that was demethylated as a consequence of epigenetic modifiers. Interestingly, we identify a putative CTCF binding site that overlapped the CpG dinucleotide located at -388 bp relative to the transcription start site (Fig. 2b). Supporting the relevance of this site, its presence was confirmed in an experimentally validated CTCF-binding site database³³ (Fig. 3a,b). To experimentally validate this, ChIP assays were performed in MCF-7 cells after stimulation with TNF- α or IFN- α . As shown in Fig. 2c, in basal conditions, we could not find a detectable association of CTCF with the putative CTCF binding site in the *XAF1* promoter. This result could be explained by a methylation-sensitive CTCF binding mechanism. To directly test this, we exposed the cells to demethylating agents before stimulation with TNF- α or IFN- α . As expected, the association of CTCF with the *XAF1* promoter was detected only after DNA demethylation and stimulation with TNF- α or IFN- α (Fig. 2c). This observation correlated with an increased transcriptional activation when the cells were previously exposed to the epigenetic modifiers (Fig. 2c, third panel). Additionally, we validated this CTCF binding site using an additional

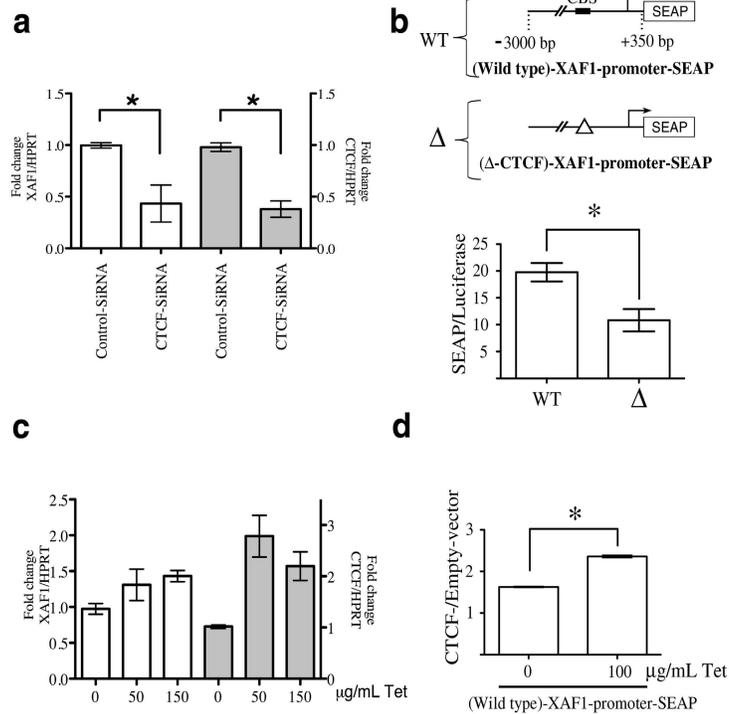


Figure 4. CTCF regulates transcriptional activation of the *XAF1* gene. (a) ACHN cells were pre-treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5 μM) and Trichostatin-A (0.2 μM) for 3 days. After that, the cells were transiently transfected with CTCF siRNAs or control scramble siRNAs. qPCR analyses were performed to measure the expression of both *XAF1* and *CTCF* mRNA. *HPRT* was used as loading control. The means from three independent experiments were plotted with +SEM, * $P < 0.05$. (b) MCF-7 cells were transiently co-transfected with both Wild-type-XAF1-promoter-SEAP or Δ-CTCF-XAF1-promoter-SEAP constructs and pMetLuc, which was used for transfection normalization. Data are represented as the means + SEM from three independent experiments, * $P < 0.05$. (c) MCF-7 stable clones of CTCF/Tet-On were stimulated with tetracycline at the indicated concentrations. Using qPCR assays, *XAF1* and *CTCF* mRNA expression was normalized to *HPRT*, used as a loading control. The mean and range were plotted from two independent stable cell lines. (d) MCF-7-CTCF/Tet-On and MCF-7 Empty/Tet-On cell lines were transiently co-transfected with Wild-type-XAF1-promoter-SEAP and pMetLuc. After 48 h, tetracycline was added for 24 h. Data are represented as the means + SEM from three independent experiments, * $P < 0.05$. 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-A-DG); Trichostatin-A (TSA); CTCF-binding site (CBS).

cell line. As in MCF-7 cells, we observed a dramatic increase in the interaction of CTCF with the *XAF1* promoter when the cells were stimulated with either TNF-α or IFN-α after exposure to demethylating agents (Supplementary Fig. 1c). These results support a methylation-sensitive association of CTCF with the *XAF1* promoter.

XAF1 expression is regulated by CTCF. To further define the role of CTCF on *XAF1* mRNA expression, we used specific siRNAs to downregulate CTCF expression in a series of loss-of-function experiments. We verified the efficacy of these siRNAs at both mRNA and protein levels (Supplementary Fig. 1d). Because previous reports have shown that demethylating agents increase *XAF1* induction by IFN in ACHN cells³², we used this cell line to analyse the effect of these siRNAs on *XAF1* transcriptional responsiveness to TNF-α or IFN-α. As described above, demethylating conditions are necessary to uncover the CTCF-binding site (Fig. 2b,c). We clearly observed lower levels of *XAF1* mRNA in cells transfected with the siRNAs against CTCF than those transfected with control siRNAs (Fig. 4a). Additionally, we confirmed the regulatory effect of CTCF on the *XAF1* promoter using the secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene assays. In these assays, the enzymatic activity drove by the *XAF1* promoter region comprising -3000 bp to +350 bp relative to the transcription

start site (Wild-type-XAF1-promoter-SEAP) was compared with the same region with a deletion of the core CTCF binding site (Δ -CTCF-XAF1-promoter-SEAP). The absence of the CTCF binding site in the XAF1 promoter inhibits its basal transcriptional activation (Fig. 4b). To further support these results, we also conducted gain-of-function experiments by analysing the effects of CTCF overexpression on XAF1 mRNA expression. To achieve this, we engineered a Tet-on CTCF system in the MCF-7 cell line. In demethylating conditions, the overexpression of CTCF mediated by tetracycline addition induced transcriptional activation of XAF1 (Fig. 4c). Additionally, these cells were transfected with the Wild-type-XAF1-promoter-SEAP construct. After tetracycline addition, we observed a significant increase in the enzymatic activity of the reporter in cells overexpressing CTCF (Fig. 4d). On the other hand, we evaluated the role of CTCF over-expression in terms of transcriptional responsiveness of XAF1 in TNF- α - or IFN- α -treated cells. Although we detected an increase in XAF1 levels in cells over-expressing CTCF, the TNF- α or IFN- α -mediated transcriptional increase was not modified by CTCF overexpression (supplementary Fig. 2a). This points toward a shared signalling mechanism and supports the role of CTCF in the effects of these cytokines on XAF1 regulation, with additional factors needed for maximal responsiveness. Thus, both gain and loss of function approaches showed the participation of CTCF in XAF1 expression.

CTCF protects the XAF1 gene from epigenetic silencing. The insulating action of CTCF protects several genes from epigenetic silencing^{28,34}. In particular, it has been described that the absence of CTCF in tumour suppressor gene promoters induces their epigenetic silencing, which supports the role of CTCF in cancer^{35–37}. To test the possible epigenetic-mediated regulation of CTCF on the XAF1 gene, we compared the XAF1 promoter activity in a genomic integrated context by measuring a GFP reporter gene. For this, we compared the wild type XAF1 promoter with the CTCF-deletion (Δ -CTCF-XAF1) construct. Supporting the insulating role of CTCF on the XAF1 gene, cells with the Δ -CTCF-XAF1 promoter showed lower GFP levels than those with the wild-type XAF1 promoter after 60 days of continuous culture (Fig. 5a). To further support this finding, single-cell clones for each transfection were isolated and propagated for an additional 35 days. As expected by the previous result, silencing of GFP expression levels was mainly observed in single-cell clones with the integrated Δ -CTCF-XAF1-promoter (Fig. 5a), pointing toward an epigenetic-protective effect of the CTCF binding site. A possible alternative explanation for the difference in GFP expression levels between transfections could be attributed to a distinct number of integration events. To exclude this possibility, the transgene copy number was measured by real-time PCR as previously reported³⁸. The difference between GFP expression levels driven by the Δ -CTCF-XAF1-promoter and wild-type-XAF1-promoter was independent of the transgene copy number (Supplementary Fig. 2b). To gain insight into the epigenetic mechanism involved in GFP silencing of the Δ -CTCF-XAF1-promoter, we hypothesized that loss of the CTCF-binding site could promote 1) accelerated CpG methylation or 2) acquisition of a repressive chromatin configuration based on HPMs (or both). To test the first hypothesis, sequencing of the sodium bisulphite-modified genomic DNA from three single-cell clones for each transfection was performed. To discriminate endogenous XAF1 promoter amplification, a nested-PCR strategy was performed in which the first set of primers annealed to plasmid sequences surrounding the exogenous XAF1 promoter (Fig. 5b and Supplementary Fig. 2c). We observed that the Δ -CTCF-XAF1-promoter is more susceptible to dinucleotide-CpG methylation than the wild-type-XAF1-promoter in a genomic-integrated context (Fig. 5b). To test our second hypothesis, ChIP assays were performed using specific antibodies directed to H3K4-2me or H3K9-3me posttranslational modifications in single-cell clones from each stable transfection. To interrogate the relative enrichment of repressive or active HPMs in the transgene, we designed a pair of primers that anneal to the plasmid sequence immediately after the exogenous XAF1 promoter (Fig. 5c and Supplementary Fig. 2c). Lower levels of the H3K4-2me posttranslational modification, a marker for transcription activity, were observed in cell single clones from the Δ -CTCF XAF1-promoter (Fig. 5c). As expected, the Δ -CTCF XAF1 promoter was enriched with the repressive H3K9-3me modification (Fig. 5c). Overall, these findings support the notion that CTCF regulates DNA methylation in the XAF1 promoter; thus, loss of CTCF in its cognate-binding site induces DNA-methylation and polarization from active to repressive HPM, which in turn induces transcriptional repression.

XAF1 expression is modulated by CTCF in apoptotic conditions. It has been well described that XAF1 expression reactivation has a crucial role in apoptosis induced by TNF- α /cycloheximide (CHX) or IFN- α /TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)^{6,22}. To test if CTCF could regulate XAF1 expression in apoptotic conditions, MCF-7 cells were exposed to either TNF- α /CHX or IFN- α /TRAIL. Cytotoxicity induced by the co-treatment of either TNF- α /CHX or IFN- α /TRAIL was analysed by cell viability assays (Supplementary Fig. 2d). As expected, we observed the transcriptional activation of XAF1 after exposure to both regimens (Fig. 6a,b). To assess the biological relevance of CTCF-mediated XAF1 transcription, single-cell clones with the wild type- or Δ -CTCF-XAF1 promoter were exposed to inducers of apoptosis. After that, FACS was used to measure GFP-reporter gene activity. Whereas the wild-type promoter activity correlated with the XAF1 transcriptional activation, the Δ -CTCF-XAF1 promoter did not present any transcriptional activity (Fig. 6c). Several reports have shown that XAF1 is an IFN-stimulated gene in cancer cells^{30,39,40}. Because its promoter is commonly hypermethylated in these

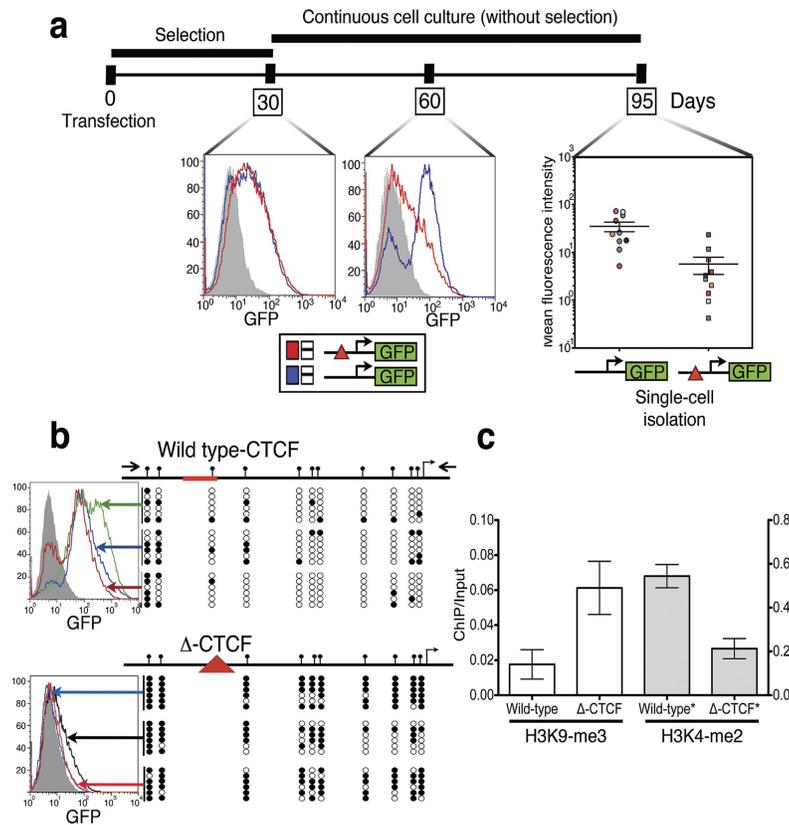


Figure 5. CTFC maintains an open-chromatin configuration in the *XAF1* promoter in transgene assays.

(a) The timeline for stable transgenic cell line generation using peGFPN1-*XAF1* or peGFPN1- Δ -CTFC-*XAF1* plasmids. The detection of GFP expression for each cell line was performed using FACS. Single-cell clones were generated at day 60. (b) Right, bisulphite sequencing was performed from single-cell clones containing either peGFPN1-*XAF1* or peGFPN1- Δ -CTFC-*XAF1* constructs. The exogenous *XAF1* promoter was specifically amplified using a nested-PCR strategy in which the first amplification was performed using primers recognizing plasmid sequences. Methylated and unmethylated CpGs are depicted as filled and open circles, respectively. Left, histograms from each single cell clones are showed (c) ChIP assays were performed from stable single-cell clones using specific antibodies against H3K4-2me or H3K9-3me. Data are represented as the means \pm SEM from three single-cell clones. Red triangle symbols the deletion of the CTFC binding site.

cells, transcriptional activation of the *XAF1* gene could be dependent on IFN- α -mediated demethylation and could thus rely on CTFC²⁰. Supporting this hypothesis, we found that single-cell clones with the Δ -CTFC-*XAF1* promoter were unable to respond to IFN- α , indicating that CTFC could be relevant in the IFN- α -mediated induction of *XAF1* (Fig. 6c).

Discussion

In cancer, it has been described that the *XAF1* gene is transcriptionally silenced by CpG-dinucleotide hypermethylation in its promoter^{9,17,41}. Exposure to demethylating agents induces *XAF1* transcriptional activation, thereby compromising cell viability by promoting apoptosis^{4,21}, mitotic catastrophe^{4,8} or cell cycle inhibition⁸. Thus, CpG methylation in the *XAF1* promoter represents the main epigenetic mechanism involved in *XAF1* silencing and, consequently, in resistance against apoptosis. However, the deregulation of epigenetic mechanism is implicated in a variety of diseases⁴², including cancer⁴³⁻⁴⁵. CTFC is a multi-task protein involved in chromatin regulation, with profound consequences in gene expression^{23,24}. In a panel of breast cancer cell lines, heightened CTFC expression was associated with apoptosis

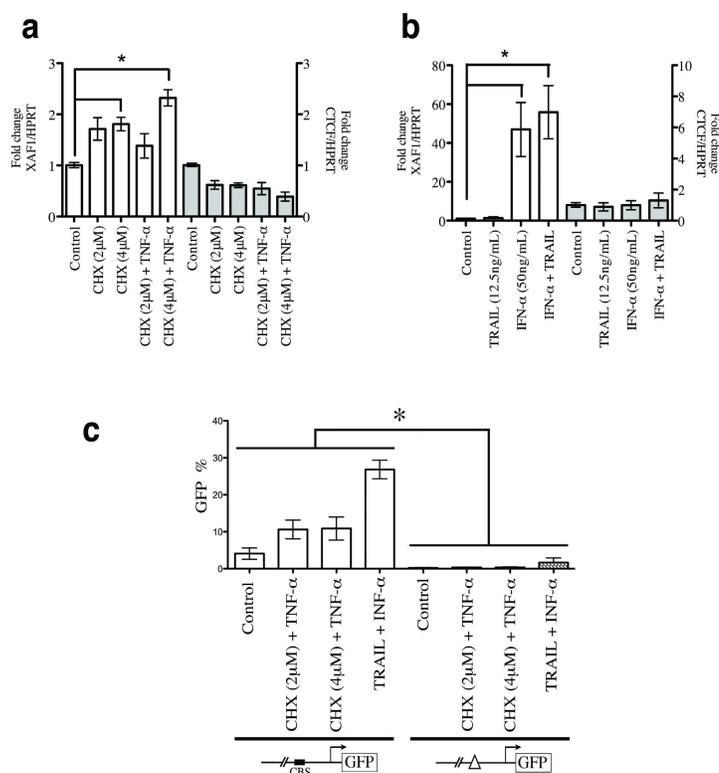


Figure 6. The CTCF binding site in the *XAF1* promoter mediates *XAF1* responsiveness to activators in apoptotic conditions. **(a)** MCF-7 cells were treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine (5μM) and Trichostatin-A (0.2μM) for 3 days before stimulation with TNF-α in the presence of cycloheximide (TNF-α + CHX) (left panel). qPCR analyses of *XAF1* and *CTCF* mRNA expression were performed. *HPRT* mRNA was used as loading control. Results are presented as fold change. Data are represented as the means ± SEM from three independent experiments, **P* < 0.05. **(b)** MCF-7 cells were pre-treated as shown in (A) before the addition of IFN-α in the presence of TRAIL (IFN-α + TRAIL) (right panel). The expression of *XAF1* and *CTCF* and *HPRT* was determined by qPCR. *HPRT* was used as loading control. **(c)** Stable single-cell clones containing either peGFPN1-*XAF1* or peGFPN1-Δ-CTCF-*XAF1* constructs were stimulated with either TNF-α + CHX or IFN-α + TRAIL. After, GFP protein levels were measured using FACS. Data are represented as the mean SD of four single-cell clones from each transfection, **P* < 0.05.

resistance⁴⁶. The protective action of CTCF is explainable, in part, by negative regulation of the *Bax* gene, which increases the apoptotic threshold⁴⁷. It has also been clearly demonstrated that CTCF regulates the chromatin configuration of many tumour suppressor genes, affecting their transcription rates²⁸. Here, we describe that CTCF interacts with the *XAF1* promoter, thereby regulating its chromatin configuration and, consequently, its transcriptional responsiveness to well-known activators. We were able to demonstrate two biological scenarios. First, CTCF maintains an open-chromatin configuration in the *XAF1* promoter, as assessed by the presence of both active HPMs (Fig. 5c) and de-methylated CpG dinucleotides (Fig. 5b), allowing high transcriptional responsiveness to activators (Figs 1 and 6c). Second, the loss of CTCF regulation in the *XAF1* promoter, explained by the fact that CTCF interaction with its cognate binding site in the *XAF1* promoter is methylation sensitive (Fig. 2b,c), induces polarization from active to repressive HPMs (Fig. 5c) and accelerates CpG-dinucleotide methylation (Fig. 5b). This closed chromatin state represses transcriptional activation (Fig. 6c) and possibly contributes to apoptotic resistance. Thus, CTCF is a determinant that confers a permissive chromatin configuration to the *XAF1* gene, which is critical for apoptotic program culmination.

In X-chromosomal inactivation, certain genes escape from the epigenetic silencing mechanism. CTCF mediates this escape by inhibiting the propagation both of methylation and of repressive HPMs from surrounding silent regions³⁴. In this scenario, CTCF mediates the shift between an open and closed

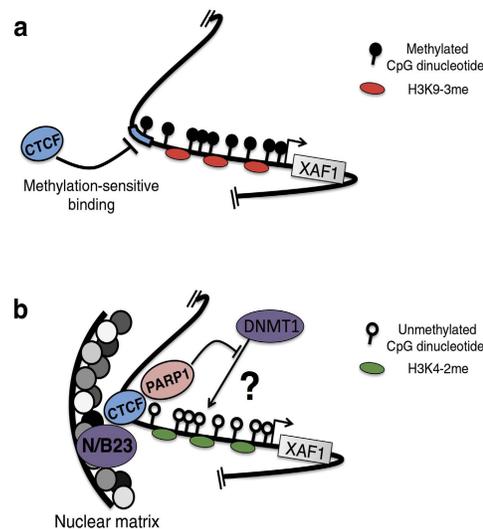


Figure 7. Epigenetic regulation by CTCF of the *XAF1* promoter. (a) Methylation of the CTCF binding site in the *XAF1* promoter, as occurs in cancer, inhibits its recognition by CTCF. This enriches repressive histone posttranslational modifications, contributing to *XAF1* transcriptional silencing. (b) In demethylating conditions, CTCF is able to interact with its cognate DNA-binding site, inhibiting both CpG-dinucleotide methylation and repressive histone posttranslational modifications such as H3K9-2me. After treatment with transcriptional activators such as TNF- α or IFN- α , the association between CTCF and nucleophosmin/B23 is induced, allowing *XAF1* promoter anchorage to the nuclear matrix and inducing transcriptional activation. Additionally, several subunits of CTCF could bridge additional genomic regions from interchromosomal or intrachromosomal locations to the same genomic anchor to which the *XAF1* promoter is attached. The inhibition of CpG-dinucleotide methylation could be mediated by the inhibitory action of PARP-1 on DNMT1.

chromatin configuration by functioning as a scaffold protein to attract different enzymatic complexes involved in HPMs^{35,48,49}. Concordantly, epigenetic silencing of CTCF-regulated genes is observed when CTCF is unable to interact with its DNA-binding site by a methylation-sensitive interaction that favours the presence of repressive, HPMs^{27,35,50}. Importantly, reports showing the biological weight of different HPMs in the *XAF1* promoter are missing. In the present report, assessing long-term transgenic behaviour allowed us to uncover the actions of CTCF on the chromatin configuration of the *XAF1* promoter (Fig. 5). We observed for the first time that the absence of local CTCF in the *XAF1* promoter induces the transition from active to repressive HPMs. We envision that the loss of CTCF affinity to its cognate binding-site in the *XAF1* promoter could be the first driving event for the transcriptional repression of the *XAF1* gene. Additional experiments are needed to support this, but it has been reported that CTCF posttranslational modifications impair its ability to interact with DNA targets^{51–54}. Thus, lack of CTCF in its cognate site allows its methylation, impeding re-association of CTCF to it even with new posttranslational modifications arise. Consequently, this induces accelerated CpG-dinucleotide methylation and polarization from active to repressive HPM and a consequent *XAF1* transcriptional silencing.

It has been described that the nuclear matrix plays an important role in the regulation of gene transcription. Chromatin is anchored by short stretches of DNA sequences called matrix attachment regions (MARs). MARs range in size from 100 to 2000 bp and are rich in AT dinucleotide pairs and repetitive sequences. Both chromatin loop formation and the transcriptional activation of genes surrounded by MARs are dependent on nuclear matrix anchorage⁵⁵. This is explainable by the fact that transcriptional factors are present in the nuclear matrix⁵⁶. CTCF associates with the nuclear matrix^{57,58} and mediates the anchoring of DNA sequences to it, as observed in the 5'-HS4 chicken β -globin insulator⁵⁸. In addition, the association of CTCF with the nuclear matrix depends on nucleophosmin/B23⁵⁹. However, it has been observed that IFN- γ induces transcriptional activation of major histocompatibility complex genes, which coincides with the reorganization of chromatin loops⁶⁰. Interestingly, DNA anchorage to the nuclear matrix after IFN- γ exposure was associated with CTCF binding sites⁶⁰. Therefore, CTCF reconfigures genomic regions by forming loops that affect the transcriptional gene landscape. In the present paper, we demonstrate that in cancer cells, CTCF is unable to associate with its cognate DNA-binding site in the *XAF1* promoter if it is methylated (Fig. 7a), thus effectively rendering it unresponsive to well-known

activators (Fig. 7a). However, after demethylating the cognate site, CTCF is now able to associate with the *XAF1* promoter to enhance transcriptional activation (Fig. 2). One intriguing possibility is that CTCF could be able to attract DNA to the nuclear matrix, mediating faster chromatin loop formation in the nuclear matrix after exposure to exogenous stimuli. Although not tested, we envision that CTCF could be able to attract the *XAF1* promoter to the nuclear matrix by its association with nucleophosmin/B23, thereby inducing both chromatin loop formation and transcriptional activation of the *XAF1* gene (Fig. 7b). In cancer, this putative mechanism would not occur due to the absence of CTCF in its DNA-binding site via a methylation-sensitive mechanism (Fig. 7a).

Finally, we demonstrate for the first time that CTCF is critical to maintaining key CpG-dinucleotides demethylated in the *XAF1* promoter (Fig. 5b). This could be explainable by previous reports showing that CTCF associates with and activates PARP-1, which negatively regulates DNMT1, thus maintaining the CpG dinucleotides within the CTCF-binding sites free from methylation^{61,62}. Additionally, a pool of PARP is located in the nuclear matrix and is implicated in chromatin loop formation. Although not tested, an interesting hypothesis would be the possibility that PARP-1 is a mediator of the effects of CTCF (Fig. 7b). Further experiments are required to test this.

In conclusion, we demonstrate a novel functional CTCF binding site in the *XAF1* promoter. The association of CTCF with its binding site induces an open chromatin configuration by enriching active HPMS and maintaining CpG-dinucleotides free from methylation. In cancer, methylation negatively affects the interaction between CTCF and the *XAF1* promoter, disabling the protective epigenetic actions of CTCF against the closed-chromatin configuration. Our findings are consistent with CTCF acting as key regulatory element in the well-accepted observation that CpG-dinucleotide methylation on the *XAF1* promoter inhibits its transcriptional activation. The absence of CTCF regulation of the *XAF1* gene may constitute a selective advantage during clonal evolution by means of increasing the apoptotic threshold.

Methods

Cell culture and reagents. MCF-7 (HTB22) cells were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). ACHN (CRL-1611) cells were acquired from the ATCC, and maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% FBS. The cells were grown in a humidified incubator that was maintained at 37 °C with 5% CO₂. Demethylating conditions were established by treating the cell lines for 3 days with 0.2 μM Trichostatin-A (TSA) and 5 μM 5-aza-2'-deoxycytidine (5-A-DC) (SIGMA). Daily, the medium was replaced with fresh medium containing 5-A-DC and TSA. The transfection of constructs was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). TNF-α and IFN-α were purchased from R&D and PROSPEC, respectively.

Constructs. Genomic DNA isolated from peripheral human blood was used as a template. Primers used in this work are listed in Supplementary Table S1. Specific primers were designed to amplify by PCR the region from -1200 to +350 bp relative to the transcription start site (TSS) from the *XAF1* gene (*XAF1.2*). The PCR product was purified and cloned into pTZ57r/t (Thermo). Then, *XAF1.2* was subcloned into the peGFP-N1 (Clontech) expression vector to produce peGFP-N1-*XAF1*-promoter. Deletion of the CTCF-binding site from the peGFP-N1-*XAF1*-promoter plasmid was performed using the QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies). Following the manufacturer's protocol, we generated peGFP-N1-Δ-CTCF-*XAF1*. Specific primers were designed to amplify by PCR the genomic region from -3000 to +350 bp relative to the transcription start site from the *XAF1* gene (*XAF1*-promoter). The PCR product was cloned using GeneJET PCR cloning kit (Fermentas) and was then subcloned into pSEAP2-Basic (Clontech), a secreted alkaline phosphatase (SEAP) gene reporter expression vector, to produce the wild-type-*XAF1*-promoter-SEAP construct. Using a QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies), we generated the Δ-CTCF-*XAF1*-promoter-SEAP construct, which lacked the CTCF binding site. To generate an inducible system for CTCF overexpression, CTCF was amplified from cDNA using Pfu polymerase (Stratagene) and cloned into pQCXIP (Clontech). It was then subcloned into pTRE-Tight-Bi-AcGFP1 (Clontech) to produce pTRE-Tight-Bi-AcGFP1-CTCF. All plasmids were confirmed by capillary sequencing.

Transient and stable transfection of MCF-7 cells. MCF-7 cells were seeded in 12-well plates one day before transfection. The cells were co-transfected with 0.625 μg of either wild-type-*XAF1*-promoter-SEAP or Δ-CTCF-*XAF1*-promoter-SEAP plasmids and 0.625 pg of pMetLuc (Clontech), which is a plasmid encoding secreted Metridia luciferase used for transfection normalization. After 24 h, the transfection medium was changed out for fresh medium. After 48 h, the medium was collected to measure both SEAP and Luciferase activities using the Great EscAPE SEAP chemiluminescence kit (Clontech) and Ready-To-Glow-Secreted Luciferase Reporter Assay (Clontech), respectively.

For inducible CTCF overexpression, MCF-7 cells were transfected with 2 μg pTet-On plasmid (Clontech), which encodes the rTet repressor protein. The cells were selected in G418 (1000 μg/mL) for 4 weeks. The pool of the resulting colonies was then expanded under G418 selection and cotransfected with 2 μg pTRE-Tight-Bi-AcGFP1-CTCF with 1 μg pQCXIP empty plasmid. Stable cell clones were selected with puromycin after two weeks of selection.

MCF-7 cells were seeded in 6-well plates. After 1 day, the cells were transfected with 2 μg of either peGFP-N1-XAF1-promoter or peGFP-N1- Δ -CTCF-XAF1-promoter plasmids. After 48 h, the cells were selected with G418 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 weeks. Then, G418-resistant cells were analysed by fluorescence activate cell sorting (FACS). The resistant cells were further cultured for 30 days in the absence of G418 and were analysed by FACS. Then, single cell clones were isolated. The single cell clones were continuously cultured further in the absence of G418 for 35 days, and reporter gene expression was evaluated by FACS.

Transient transfection of small interfering RNAs (siRNAs) against CTCF. ACHN and MCF-7 cells were seeded in 6-well plates. After one day, the cells were treated in demethylating conditions, as indicated above. The cells were then transfected with 0.1 μM human CTCF small interfering RNAs (siRNAs; Qiagen) using Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen). After 24 h, the transfection medium was replaced with fresh medium containing demethylating agents. RNA isolation was performed 48 h post-transfection using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA was converted to cDNA using random primers and SuperScript[®] VILO (Invitrogen).

Bisulphite DNA sequencing analysis. DNA was extracted from either MCF-7 cells or MCF-7 stable cell lines using the FlexiGene DNA Kit (Qiagen). DNA (1.5 μg) was bisulphite converted using the Zymo EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's protocol. The bisulphite-converted DNA was subjected to PCR amplification using specific primers to the XAF1 promoter (XAF-EnBis/XAF-EnBia). A nested-PCR amplification strategy was used to amplify DNA converted from stable cell lines using specific primers against the plasmid sequence (1.2GFPBis/1.2GFPBia) in the first PCR reaction to avoid amplification of the XAF1 endogenous promoter. The product from this PCR was used in a second round of PCR amplification using specific primers against the XAF1 promoter, as described above. PCR products were gel purified and cloned using the GeneJET PCR cloning kit (Fermentas), and positive clones were sent for sequencing.

Chromatin immunoprecipitation. Cells (3×10^6) were fixed with 1% formaldehyde and neutralized by adding 0.125 M glycine. The cells were then lysed in cell lysis buffer (10 mM EDTA, 50 mM TRIS-HCl pH 8, 1% SDS, protease inhibitor cocktail). The cell lysate was sonicated to obtain soluble chromatin with a mean length of 400 bp. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed using a specific antibody raised against CTCF (C02-2899; Cell Signaling Technology) or CTCF (07-729; Millipore). Specific antibodies against H3K9me3 (ab8898 Abcam) and H3K4me2 (7766 Abcam ab) were used to perform ChIP assays on soluble chromatin from single cell clones. The DNA recovered after ChIP was subjected to PCR amplification using the following primers: XAF-CTCF-s/XAF-CTCF-as was used for the putative CTCF binding site of the XAF1 promoter; two set of primers, IGF2-CTCF-s/IGF2-CTCF-as⁶³ and MYC-CTCF-s/MYC-CTCF-as⁶⁴, were used as positive controls for the CTCF-DNA interaction; and a negative control, NEG-CTCF-s/NEG-CTCF-as, was also included.

Immunoblotting. Protein fractions were subjected to either 15% or 18% SDS-PAGE and transferred to Immobilon P membranes (Millipore). Next, the membranes were incubated with the indicated antibodies overnight, and the blots were visualized using the Immobilon Western kit (Millipore) with a peroxidase-labelled secondary antibody, according to the manufacturer's protocols.

Protein immunoprecipitation assay. The cells were washed with PBS, scraped and centrifuged at 2,000 rpm for 3 min. The cells were lysed using 1 mL of TNTE-5 buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton, 1 mM EDTA and 1X protease inhibitor cocktail) and incubated at 4 °C for 15 min. The lysates were centrifuged at 14000 g for 10 min. The supernatants were incubated with 10 μL of recombinant protein G agarose beads (Life Technologies) for 1 h. After incubation, the lysates were centrifuged at 14000 g for 30 sec. The supernatants were incubated overnight at 4 °C with 3 μL of primary antibody with constant agitation. Next, 20 μL of recombinant protein G agarose beads was added to each lysate, and the lysates were then incubated with constant agitation for 1 h on ice. The lysates were next centrifuged at 14000 g for 10 sec. The resulting pellets were washed twice with TNTE-1 buffer (50 mM Tris at pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton, 1 mM EDTA and 1X protease inhibitor cocktail), followed by boiling in Laemmli sample solution (100 mM Tris pH 6.8, 20% Glycerol, 2% SDS, 0.05% bromophenol blue and 100 mM DTT) for further analysis.

Cell viability assay. Cell viability was measured colorimetrically using the MTS-PMS assay (CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; Promega) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the cells were seeded in 96-well plates, and 24 h after treatment, the reagents from the kit were added to the culture medium. After 2 h of incubation, the absorbance was measured at a wavelength of 490 nm using a microplate reader.

RT-qPCR. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2 μg of total RNA was used for cDNA synthesis with random hexamers. Quantitative PCR was carried out using an ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using

IDT Prime Time qPCR Primers and ZEN Double-Quenched Probe for detecting XAF1, CTCF, and HPRT genes. The TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) was used. The geometric mean of housekeeping gene HPRT was used as an internal control to normalize the variability in expression levels. Results were analyzed by the comparative $2^{-\Delta\Delta CT}$ method to calculate fold changes in gene expression⁶⁵. The plotted results include the mean + s.e.m. from at least three independent biological experiments.

Statistical analysis. GraphPad Prism version 5.0 for Mac Os X (La Jolla, CA) was used to perform statistical analyses. One-way analysis of variance was performed, and the Bonferroni post-test was used at 95% confidence intervals to determine significant differences.

References

- Liston, P. *et al.* Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* **3**, 128–133 (2001).
- Kim, K. S., Heo, J. I., Choi, K. J. & Bae, S. Enhancement of cellular radiation sensitivity through degradation of Chk1 by the XIAP-XAF1 complex. *Cancer Biol Ther* **15**, 1622–1634 (2014).
- Tse, M. K. *et al.* Domain organization of XAF1 and the identification and characterization of XIAP(RING)-binding domain of XAF1. *Protein Sci* **21**, 1418–1428 (2012).
- Arora, V. *et al.* Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J Biol Chem* **282**, 26202–26209 (2007).
- Fong, W. G. *et al.* Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* **70**, 113–122 (2000).
- Xia, Y., Novak, R., Lewis, J., Duckett, C. S. & Phillips, A. C. Xaf1 can cooperate with TNFalpha in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP. *Mol Cell Biochem* **286**, 67–76 (2006).
- Zou, B. *et al.* XIAP-associated factor 1 (XAF1), a novel target of p53, enhances p53-mediated apoptosis via post-translational modification. *Mol Carcinog* **51**, 422–432 (2012).
- Wang, J. *et al.* Identification of XAF1 as a novel cell cycle regulator through modulating G(2)/M checkpoint and interaction with checkpoint kinase 1 in gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis* **30**, 1507–1516 (2009).
- Zou, B. *et al.* Correlation between the single-site CpG methylation and expression silencing of the XAF1 gene in human gastric and colon cancers. *Gastroenterology* **131**, 1835–1843 (2006).
- Wang, Y. *et al.* Association of expression of XIAP-associated factor 1 (XAF1) with clinicopathologic factors, overall survival, microvessel density and cisplatin-resistance in ovarian cancer. *Regul Pept* **178**, 36–42 (2012).
- Huang, J. *et al.* XAF1 as a prognostic biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer. *Cancer Sci* **101**, 559–567 (2010).
- Chen, X. Y., He, Q. Y. & Guo, M. Z. XAF1 is frequently methylated in human esophageal cancer. *World J Gastroenterol* **18**, 2844–2849 (2012).
- Sakemi, R. *et al.* X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and XIAP-associated factor-1 expressions and their relationship to apoptosis in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous liver tissues. *Oncol Rep* **18**, 65–70 (2007).
- Ng, K. C., Campos, E. I., Martinka, M. & Li, G. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma. *J Invest Dermatol* **123**, 1127–1134 (2004).
- Fang, X. *et al.* Switch to full-length of XAF1 mRNA expression in prostate cancer cells by the DNA methylation inhibitor. *Int J Cancer* **118**, 2485–2489 (2006).
- Kempkensteffen, C. *et al.* Gene expression and promoter methylation of the XIAP-associated Factor 1 in renal cell carcinomas: correlations with pathology and outcome. *Cancer Lett* **254**, 227–235 (2007).
- Lee, M. G. *et al.* Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses. *Oncogene* **25**, 5807–5822 (2006).
- Chung, S. K. *et al.* Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses. *Gastroenterology* **132**, 2459–2477 (2007).
- Lou, Y. F. *et al.* Combination of gefitinib and DNA methylation inhibitor decitabine exerts synergistic anti-cancer activity in colon cancer cells. *PLoS One* **9**, e97719 (2014).
- Micali, O. C. *et al.* Silencing of the XAF1 gene by promoter hypermethylation in cancer cells and reactivation to TRAIL-sensitization by IFN-beta. *BMC Cancer* **7**, 52 (2007).
- Zhu, L. M. *et al.* Tumor suppressor XAF1 induces apoptosis, inhibits angiogenesis and inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **5**, 5403–5415 (2014).
- Tu, S. P. *et al.* Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression. *Cancer* **116**, 1252–1263 (2010).
- Phillips, J. E. & Corces, V. G. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* **137**, 1194–1211 (2009).
- Ong, C. T. & Corces, V. G. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat Rev Genet* **15**, 234–246 (2014).
- Filippova, G. N. Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Curr Top Dev Biol* **80**, 337–360 (2008).
- Schoenherr, C. J., Levorse, J. M. & Tilghman, S. M. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat Genet* **33**, 66–69 (2003).
- Szabo, P. E., Tang, S. H., Silva, F. J., Tsark, W. M. & Mann, J. R. Role of CTCF binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region. *Mol Cell Biol* **24**, 4791–4800 (2004).
- Recillas-Targa, F., De La Rosa-Velazquez, I. A. & Soto-Reyes, E. Insulation of tumor suppressor genes by the nuclear factor CTCF. *Biochem Cell Biol* **89**, 479–488 (2011).
- Straszewski-Chavez, S. L. *et al.* XAF1 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem* **282**, 13059–13072 (2007).
- Wang, J. *et al.* All-trans retinoic acid induces XAF1 expression through an interferon regulatory factor-1 element in colon cancer. *Gastroenterology* **130**, 747–758 (2006).
- Sun, Y. *et al.* Regulation of XAF1 expression in human colon cancer cell by interferon beta: activation by the transcription regulator STAT1. *Cancer Lett* **260**, 62–71 (2008).
- Reu, F. J. *et al.* Overcoming resistance to interferon-induced apoptosis of renal carcinoma and melanoma cells by DNA demethylation. *J Clin Oncol* **24**, 3771–3779 (2006).
- Ziebarth, J. D., Bhattacharya, A. & Cui, Y. CTCFBSDB 2.0: a database for CTCF-binding sites and genome organization. *Nucleic Acids Res* **41**, D188–D194 (2013).

34. Filippova, G. N. *et al.* Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell* **8**, 31–42 (2005).
35. Batlle-Lopez, A. *et al.* Novel CTCF binding at a site in exon1A of BCL6 is associated with active histone marks and a transcriptionally active locus. *Oncogene* **34**, 246–256 (2015).
36. Witcher, M. & Emerson, B. M. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell* **34**, 271–284 (2009).
37. Peng, Z. *et al.* Epigenetic repression of RARRES1 is mediated by methylation of a proximal promoter and a loss of CTCF binding. *PLoS One* **7**, e36891 (2012).
38. Joshi, M., Keith Pittman, H., Haisch, C. & Verbanck, K. Real-time PCR to determine transgene copy number and to quantitate the biolocalization of adoptively transferred cells from EGFP-transgenic mice. *Biotechniques* **45**, 247–258 (2008).
39. Leaman, D. W. *et al.* Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 28504–28511 (2002).
40. Leaman, D. W. *et al.* Novel growth and death related interferon-stimulated genes (ISGs) in melanoma: greater potency of IFN-beta compared with IFN-alpha2. *J Interferon Cytokine Res* **23**, 745–756 (2003).
41. Plenchette, S., Cheung, H. H., Fong, W. G., LaCasse, E. C. & Korneluk, R. G. The role of XAF1 in cancer. *Curr Opin Investig Drugs* **8**, 469–476 (2007).
42. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457–463 (2004).
43. Feinberg, A. P., Ohlsson, R. & Henikoff, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* **7**, 21–33 (2006).
44. Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**, 1148–1159 (2008).
45. Baylin, S. B. & Herman, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* **16**, 168–174 (2000).
46. Docquier, F. *et al.* Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis. *Cancer Res* **65**, 5112–5122 (2005).
47. Mendez-Catala, C. F. *et al.* A novel mechanism for CTCF in the epigenetic regulation of Bax in breast cancer cells. *Neoplasia* **15**, 898–912 (2013).
48. Li, T. *et al.* CTCF regulates allelic expression of Igf2 by orchestrating a promoter-polycomb repressive complex 2 intrachromosomal loop. *Mol Cell Biol* **28**, 6473–6482 (2008).
49. Soto-Reyes, E. & Recillas-Targa, F. Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene* **29**, 2217–2227 (2010).
50. Eldholm, V., Haugen, A. & Zienolddiny, S. CTCF mediates the TERT enhancer-promoter interactions in lung cancer cells: identification of a novel enhancer region involved in the regulation of TERT gene. *Int J Cancer* **134**, 2305–2313 (2014).
51. Wang, J., Wang, Y. & Lu, L. De-SUMOylation of CCCTC binding factor (CTCF) in hypoxic stress-induced human corneal epithelial cells. *J Biol Chem* **287**, 12469–12479 (2012).
52. MacPherson, M. J., Beatty, L. G., Zhou, W., Du, M. & Sadowski, P. D. The CTCF insulator protein is posttranslationally modified by SUMO. *Mol Cell Biol* **29**, 714–725 (2009).
53. Klenova, E. M. *et al.* Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF. *Mol Cell Biol* **21**, 2221–2234 (2001).
54. Venkatraman, B. & Klenova, E. Role of CTCF poly(ADP-Ribosylation) in the regulation of apoptosis in breast cancer cells. *Indian J Med Paediatr Oncol* **36**, 49–54 (2015).
55. Ottaviani, D., Lever, E., Takousis, P. & Sheer, D. Anchoring the genome. *Genome Biol* **9**, 201 (2008).
56. Szentirmay, M. N. & Sawadogo, M. Spatial organization of RNA polymerase II transcription in the nucleus. *Nucleic Acids Res* **28**, 2019–2025 (2000).
57. Dunn, K. L., Zhao, H. & Davie, J. R. The insulator binding protein CTCF associates with the nuclear matrix. *Exp Cell Res* **288**, 218–223 (2003).
58. Yusufzai, T. M. & Felsenfeld, G. The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8620–8624 (2004).
59. Yusufzai, T. M., Tagami, H., Nakatani, Y. & Felsenfeld, G. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell* **13**, 291–298 (2004).
60. Ottaviani, D. *et al.* CTCF binds to sites in the major histocompatibility complex that are rapidly reconfigured in response to interferon-gamma. *Nucleic Acids Res* **40**, 5262–5270 (2012).
61. Guastafierro, T. *et al.* CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. *J Biol Chem* **283**, 21873–21880 (2008).
62. Zampieri, M. *et al.* ADP-ribose polymers localized on Ctf-Parp1-Dnmt1 complex prevent methylation of Ctf target sites. *Biochem J* **441**, 645–652 (2012).
63. Davalos-Salas, M. *et al.* Gain of DNA methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human retinoblastoma gene promoter. *BMC Cancer* **11**, 232 (2011).
64. Vetchinova, A. S., Akopov, S. B., Chernov, I. P., Nikolaev, L. G. & Sverdlov, E. D. Two-dimensional electrophoretic mobility shift assay: identification and mapping of transcription factor CTCF target sequences within an FXYD5-COX7A1 region of human chromosome 19. *Anal Biochem* **354**, 85–93 (2006).
65. 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**, 402–408 (2001).

Acknowledgements

Georgina Victoria-Acosta was a recipient of a PhD fellowship provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) [grant number 267949], and this study is part of her doctoral thesis from the Biomedical Sciences Doctorate Program, Universidad Nacional Autonoma de Mexico. This work was partly supported by CONACYT grant 132931 to Jorge Melendez-Zajgla. The authors thank Jose Luis Cruz-Colin for his help in cell culture techniques.

Author Contributions

G.V.-A. performed gain-of-function and loss-of-function assays, RT-PCRs, transgene assays, bisulfite genomic sequencing and analyzed data. K.V.-S. performed gene reporter assays. L.J.-H. and L.M.-G. performed western-blot and statistical analyses. V.M. interpreted data and reviewed the manuscript. G.U.M.-R. performed all plasmid constructs and ChIP assays, conceived experiments, analyzed and

interpreted data, and wrote the manuscript. J.M.-Z. conceived experiments, analyzed and interpreted data, reviewed the manuscript and wrote the final version.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Victoria-Acosta, G. *et al.* Epigenetic silencing of the XAF1 gene is mediated by the loss of CTCF binding. *Sci. Rep.* 5, 14838; doi: 10.1038/srep14838 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>