



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**PAPEL DE CTCF EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL *miR-125b-1* EN LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER DE MAMA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS PRESENTA:

FERNANDA CISNEROS SOBERANIS

TUTOR PRINCIPAL

LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR

FÉLIX RECILLAS TARGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2017



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.

Tabla de contenido

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
1. Bases moleculares del cáncer.....	5
2. Importancia de la cromatina en cáncer.....	5
3. Metilación del DNA en cáncer	6
4. Modificaciones post-traduccionales de histonas en cáncer.....	8
5. Elementos de barrera en cáncer	10
6. microRNAs.....	11
7. Funciones del miR-125	11
8. Regulación transcripcional del miR-125b.....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
RESULTADOS	17
9. miR-125b-1 tiene bajos niveles de expresión en la línea celular MCF 7	17
10. Presencia de H3K27me3 en los promotores del miR-125b-1 en la línea celular MCF7 de acuerdo a la base de datos de ENCODE	18
11. H3K9me3 está presente en los promotores del miR-125b-1 de la línea celular MDA-MB-231 mientras que, en la línea celular MCF7 está presente H3K27me3 en los mismos sitios estudiados.....	20
12. La sobreexpresión de KDM4B/JMJD2B en la línea celular MDA-MB-231 aumenta los niveles de expresión del miR-125b.....	22
13. El inhibidor de EZH2 promueve la expresión del miR-125b-1 en la línea celular MCF7..	23
14. La reactivación del miR-125b-1 puede afectar los niveles de expresión y los niveles de proteína de BAK1	24
15. CTCF está presente diferencialmente en los loci miR-125b-1, let-7a-2 y miR-100 en las líneas celulares de mama	25
16. La disminución global de CTCF disminuye los niveles del miR-125b-1 en la línea celular MCF 10A	27
DISCUSIÓN.....	28
17. Modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor del miR-125b-1	28
18. Efecto de las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor del miR-125b-1	29

19. Efecto de la represión del miR-125b-1 en la expresión de genes blanco.....	30
20. Efecto de CTCF en los loci de miR-125b-1/let-7a-2/miR-100	31
CONCLUSIONES	32
PERSPECTIVAS	33
REFERENCIAS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
21. Líneas celulares	36
22. Tratamientos con GSK126	36
23. Extracción de RNA total usando TRIzol	37
24. RT-PCR en tiempo real usando sondas TaqMan.....	37
25. RT- PCR en tiempo real usando SYBR Green	41
26. Inmunoprecipitación de la cromatina	43
27. Western blot	47

RESUMEN

Introducción. El *miR-125b-1* es un microRNA capaz de regular la expresión de genes involucrados en procesos como proliferación celular, apoptosis y respuesta a estímulos químicos, entre otros. En cáncer de mama, se ha demostrado que un decremento en los niveles de expresión de este miRNA correlaciona con mayor agresividad del tumor. A nivel transcripcional, la expresión del *miR-125b-1* disminuye en líneas celulares de cáncer de mama en comparación con una línea no tumoral. Esto correlaciona con un mayor grado de metilación del DNA en su promotor. Existen proteínas capaces de evitar la ganancia de marcas represivas, como la proteína CTCF. Esta proteína puede evitar la propagación de heterocromatina a regiones de eucromatina. Al analizar bases de datos, se observó la presencia de CTCF en regiones cercanas al promotor del *miR-125b-1*. Por tal motivo, nos interesa conocer si la pérdida de CTCF se asocia con la ganancia de marcas represivas de histonas y con un decremento en los niveles de expresión de este miRNA.

Resultados. Se evaluó el enriquecimiento de dos modificaciones de histonas asociadas a represión génica, H3K9me3 y H3K27me3, en regiones reguladoras del *miR-125b-1* de las líneas celulares MCF 10A (mama no transformada), MCF 7 (cáncer de mama) y MDA-MB-231 (cáncer de mama). La línea celular MCF 7 está enriquecida en H3K27me3; mientras que, la línea celular MDA-MB-231 está enriquecida en H3K9me3. Posteriormente, se disminuyeron los niveles de estas modificaciones de histonas a nivel global usando un inhibidor de EZH2 (H3K27me3) y sobre-expresando KDM4B/JMJD2B (H3K9me3). En la línea MCF 7 tratada con el inhibidor de EZH2 aumentaron los niveles de expresión de este miRNA. Por otro lado, en la línea MDA-MB-231 también aumentaron los niveles de expresión del *miR-125b-1*. Evaluamos el enriquecimiento de la proteína CTCF en regiones cercanas al *miR-125b-1*. Únicamente en la línea celular MCF 10A, la cual expresa al *miR-125b-1* y no tiene modificaciones de histonas asociadas a represión génica en sus promotores, está enriquecida esta proteína en los cinco sitios evaluados. Usando RNAs interferentes,

disminuimos los niveles globales de CTCF y observamos una disminución de los niveles de expresión del *miR-125b-1*.

Conclusiones. La proteína CTCF está unida al promotor del *miR-125b-1* de la línea de mama no transformada, MCF 10A, y no hay presencia de H3K27me3 en esta región, a diferencia de una línea de cáncer de mama, MCF 7. Al tratar las líneas celulares con el inhibidor de EZH2, observamos una reactivación del *miR-125b-1* en la línea tumoral, sugiriendo que el silenciamiento está mediado por la ganancia de H3K27me3. Al disminuir los niveles de CTCF en la línea celular de mama MCF10A, encontramos un decremento de los niveles de expresión de este miRNA, lo cual nos indica que CTCF podría participar en su regulación.

INTRODUCCIÓN

Bases moleculares del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial cuya principal característica es la alta proliferación celular, la evasión de la apoptosis, el ilimitado potencial replicativo, la angiogénesis y la metástasis [3]. La iniciación y progresión del cáncer es producto de múltiples eventos moleculares. Una de las principales causas de iniciación son los cambios en la secuencia de DNA en su genoma [4]. Las células cancerosas a diferencia de las células sanas presentan diferencias tanto a nivel genético como epigenético. A nivel genético, la secuencia del DNA sufre alteraciones como sustituciones, inserciones, deleciones, amplificaciones y rearrreglos cromosómicos [5]. Mientras que, a nivel epigenético, existen cambios en la metilación del DNA y modificaciones de histonas. Estos cambios tienen un papel fundamental en el control de la regulación de la expresión génica y la estructura nuclear [6, 7].

Importancia de la cromatina en cáncer

La cromatina es el complejo de DNA e histonas, el cual provee del andamiaje para el empacamiento del material genético. La unidad básica funcional de la cromatina es el nucleosoma. El nucleosoma contiene 147 pb de DNA enrollado alrededor de un octámero de histonas. El octámero de histonas está formado por dos histonas de: H2A, H2B, H3 y H4 [8]. La cromatina puede subdividirse en dos grandes regiones: heterocromatina, la cual es altamente compacta, se replica en la fase S tardía y principalmente contiene genes inactivos; y eucromatina, la cual contiene genes transcripcionalmente activos y el grado de compactación de la cromatina es menor (Figura 1) [6]. Sin embargo, estos componentes están sujetos a modificaciones covalentes, las cuales alteran la organización y función de la cromatina. Entre estas modificaciones están la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas.

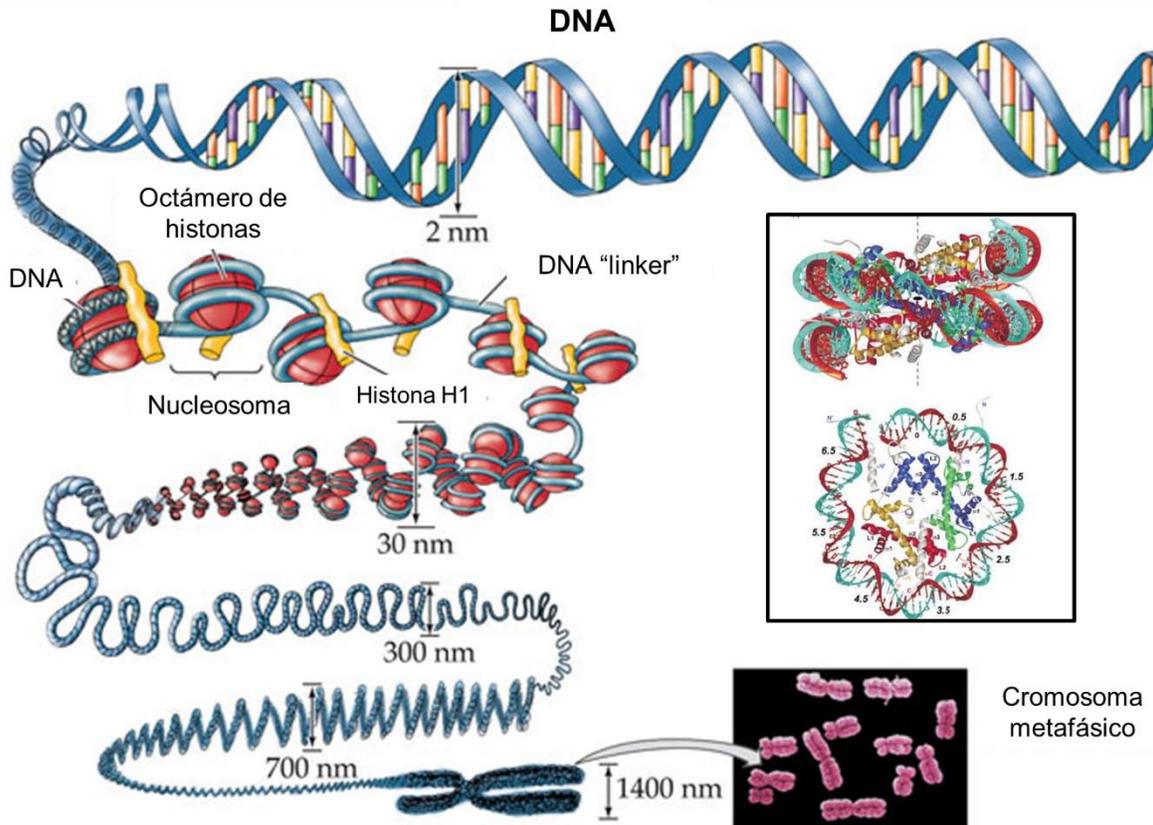


Figura 1. **Estructura de la cromatina.** La unidad mínima funcional de la cromatina es el nucleosoma. Esta estructura está formada por un octámero de histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Sobre esta estructura se enrollan 147 pb del DNA dando 1.65 vueltas en forma toroidal. La cromatina tiene diferentes estructuras dependiendo de su grado de compactación.

Metilación del DNA en cáncer

La primera modificación en el DNA descrita fue la metilación. La metilación del DNA es la adición de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina (5mC) en contexto CpG. Esta reacción es catalizada por DNA metil-transferasas: DNMT1, DNMT3a y DNMT3b [9]. DNMT1 es una DNA metil-transferasa de mantenimiento, mientras que DNMT3a y DNMT3b son DNA metil-transferasas *de novo*. La metilación del DNA se ha asociado a distintos efectos en la expresión génica. Por ejemplo, en regiones de eucromatina, la hipometilación del DNA comúnmente se asocia a la expresión génica.

Se han identificado tres mecanismos de cómo la metilación del DNA contribuye al fenotipo oncogénico: 1) Hipometilación global de genoma; 2) Hipermetilación de promotores de genes supresores de tumores; y 3) Mutagénesis directa de secuencias que contienen 5mC por desaminación [10-12]. Alteraciones en las enzimas encargadas de metilar el DNA han sido descritas en distintos tipos de cáncer, como cáncer colorrectal [13], cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia mieloide aguda [14] y síndrome mielodisplásico, entre otros (Tabla 1) . Sin embargo, recientemente se han descrito enzimas que participan en la desmetilación del DNA y sus alteraciones en cáncer. Por ejemplo, TET1 y TET2 son dos hidroxilasas de la 5-metilcitosina que participan en el proceso de desmetilación del DNA. De estas enzimas se han encontrado mutaciones y translocaciones que alteran su función en enfermedades mieloides [15]. A pesar de la información que se tiene sobre la regulación de la metilación y las alteraciones descritas en cáncer, aún no se conoce el mecanismo por el cual existe una hipometilación a nivel global y una hipermetilación a nivel local en cáncer.

Gen	Función	Tipo de tumor	Alteración
DNMT1	DNA metil-transferasa	Colorectal, NSCLC, gástrico, mama	Mutaciones, sobre-expresión
DNMT3A	DNA metil-transferasa	MDS, AML	Mutaciones
DNMT3B	DNA metil-transferasa	Síndrome ICF, SNPs en mama y pulmón	Mutaciones
MBD1/2	Proteína de unión a grupos metilo	Mama y pulmón	Mutaciones
TET1	Hidroxilasa de 5-metilcitosina	AML	Translocaciones
TET2	Hidroxilasa de 5-metilcitosina	MDS, gliomas, enfermedades mieloides	Mutaciones Silenciamiento
IDH1/2	Deshidrogenas de isocitato	Glioma, AML	Mutaciones
AID	Desaminasa de 5-citidina	CML	Expresión aberrante

Tabla 1. **Alteraciones de la metilación del DNA en cáncer.** Esta tabla muestra las principales alteraciones en enzimas que participan en la metilación o desmetilación del DNA. Abreviaturas: NSCLC – Cáncer de pulmón de células no pequeñas; MDL – Síndrome de mielodisplasia; AML – Leucemia mieloide aguda; SNP – polimorfismos de un solo nucleótido; ICF – inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica, anormalidades faciales; TET – translocación 10-11. [Adaptado de [2]]

Modificaciones post-traduccionales de histonas en cáncer

Las modificaciones post-traduccionales de histonas ocurren principalmente en el dominio amino terminal de las histonas. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación y sumoilación entre otras. Las modificaciones post-traduccionales de las histonas tienen un papel importante en la estructura y función de la cromatina.

En cáncer, se han descrito alteraciones en las enzimas encargadas de colocar las modificaciones en residuos específicos de las histonas (Tabla 2). Las principales modificaciones post-traduccionales alteradas en cáncer están en los residuos H3K4, H3K9 y H3K27. Además, también se han descrito alteraciones en desacetilasas y acetilasas de histonas como HDAC2 y p300, respectivamente.

H3K4 se puede mono-, di- y tri- metilar. Particularmente, la H3K4me3 se asocia a regiones transcripcionalmente activas. Las enzimas que se encargan de colocar la marca y leerla pertenecen al complejo de Trithorax. La principal alteración en cáncer encontrada es sobre la histona metil-transferasa de H3K4. El gen que codifica para esta enzima puede adquirir mutaciones o translocarse [16]

H3K9 al igual que H3K4, puede mono-, di- y tri- metilarse. H3K9me3 es una marca específica de heterocromatina constitutiva. La enzima G9a está encargada de la mono- y di- metilación de H3K9. En cáncer, se ha demostrado que la sobre-expresión de esta enzima es importante para la progresión de la enfermedad, dado que promueve el aumento en la metilación de H3K9 y el silenciamiento de genes supresores de tumores [17].

La trimetilación de H3K27 (H3K27me3) es una modificación característica de heterocromatina facultativa. La enzima encargada de metilar H3K27 es EZH2, la cual forma parte del complejo de Polycomb. Los genes blanco de esta enzima son genes de la familia HOX y otros relacionados con desarrollo como NANOG, BMP, WNT y SOX [18]. Se han caracterizado mutaciones en EZH2 que aumentan la actividad de metil-transferasa de esta

enzima en cáncer [19] Actualmente, se usan inhibidores de EZH2 como terapia blanco de linfomas de células B y síndrome mielodisplásico [20].

Gen	Función	Tipo de tumor	Alteración
MLL1/2/3	Histona metil-transferasa H3K4	Linfoma no Hodgkin, linfoma de células B, próstata	Translocación, mutaciones, expresión aberrante
EZH2	Histona metil-transferasa H3K27	Mama, próstata, vejiga, hígado, gástrico, melanoma, uterinos, linfoma, mieloma, sarcoma de Erwing's	Mutaciones y expresión aberrante
BMI-1	Subunidad de PRC1	Ovario, carcinoma de células de Merkel	Sobre-expresión
G9a	Histona metil-transferasa H3K9	Carcinoma hepatocelular, cervical, uterino, ovario, mama	Expresión aberrante
PRMT1/5	Metil-transferasa de arginina	Mama, gástrico	Expresión aberrante
LSD1	Histona desmetil-transferasa de H3K4/H3K9	Próstata	Mutaciones
UTX (KDM6A)	Histona desmetil-transferasa de H3K27	Páncreas, mama, riñón, vejiga, pulmón, esófago, colon, útero, cerebro, enfermedades hematopoiéticas	Mutaciones
JARID1B/C (KDM5C)	Histona desmetil-transferasa de H3K4/H3K9	Testículo, mama	Sobre-expresión
EP300(P300/KAT3B)	Acetil-transferasa de histonas	Mama, colorrectal, páncreas	Mutaciones
CREBBP (CBP/KAT3A)	Acetil-transferasa de histonas	Gástrico, colorrectal, epitelial, ovario, pulmón, esofágico	Mutaciones, sobre-expresión

PCAF	Acetil-transferasa de histonas	Epitelial	Mutaciones
HDAC2	Desacetil-transferasa de histonas	Colon, gástrico, endometrio	Mutaciones
SIRT1, HDAC5/7A	Desacetil-transferasa de histonas	Mama, colorrectal, próstata	Mutaciones, expresión aberrante

Tabla 2. **Alteraciones de las modificaciones post-traduccionales de histonas en cáncer.** Esta tabla muestra las principales alteraciones en enzimas que participan en las modificaciones post-traduccionales de las histonas en distintos tipos de cáncer [Adaptado de [2]].

Elementos de barrera en cáncer

La organización genómica en dominios de heterocromatina y eucromatina requiere de elementos delimitantes que eviten la interferencia entre estos dos dominios. Estos elementos se conocen como *insulators* (Figura 2) [21]. Uno de los *insulators* descritos en humanos es la proteína CTCF.

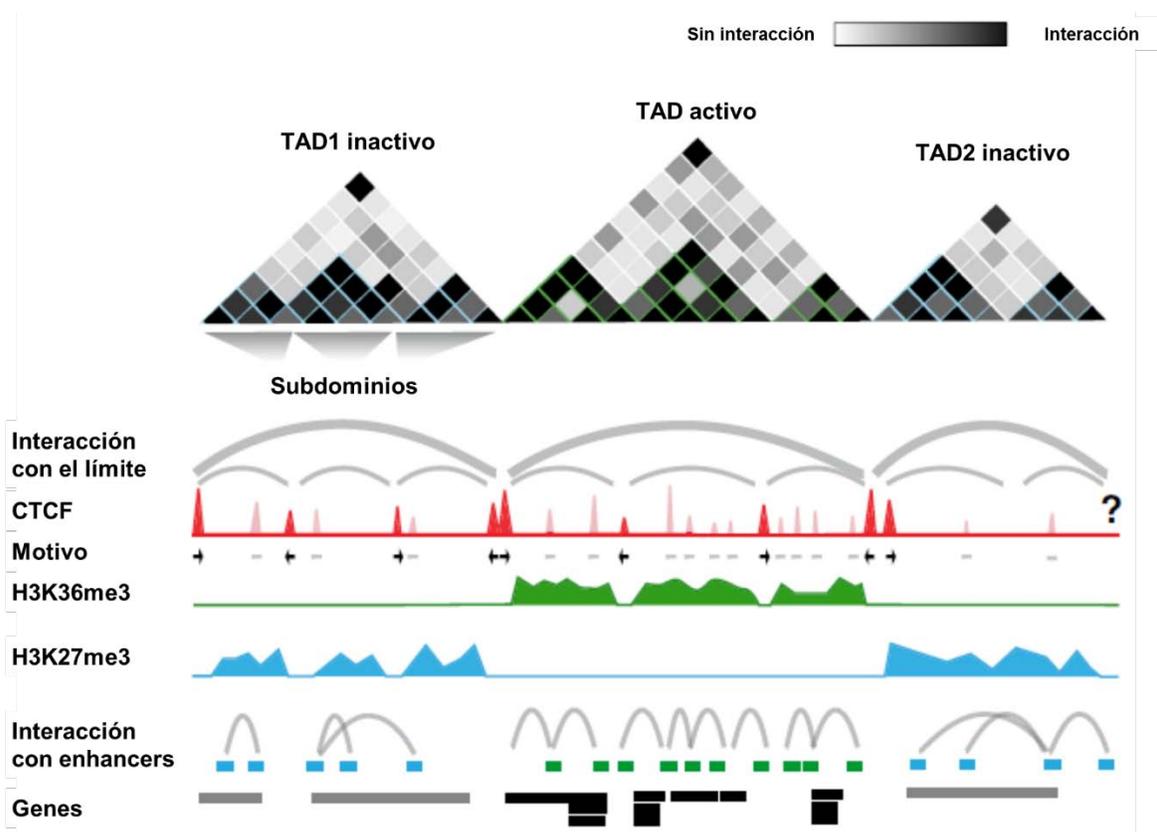


Figura 2. **Funciones de CTCF como *insulator***. CTCF puede delimitar regiones de heterocromatina y eucromatina. Además, puede separar regiones en TADs y subTADs, regulando específicamente la expresión de genes en un dominio. Abreviaturas: TAD – Dominio asociado a transcripción.

CTCF es una proteína capaz de delimitar regiones de heterocromatina de regiones de eucromatina. Se han propuesto múltiples mecanismos de cómo CTCF puede realizar esta función. El primero de estos mecanismos propone que CTCF y el complejo de cohesinas pueden formar asas de cromatina y aislar la cromatina transcripcionalmente activa de la inactiva [22]. Otro mecanismo propone que la unión de CTCF promueve la incorporación de la variante de histona H3.3 y de esta manera puede evitar el esparcimiento de H3K27me3 [23]. Otra propuesta promueve que en sitios CpG específicos PARP1 poliADPribosila a CTCF y evita el reclutamiento de DNMT1, manteniendo esos sitios no metilados [24].

Recientemente se ha descubierto que mutaciones en sitios de unión a CTCF pueden promover la tumorigénesis a través de la sobre-expresión de oncogenes en gliomas [25]. Estos resultados, ayudan a entender cómo alteraciones en la unión CTCF pueden promover el proceso de carcinogénesis.

microRNAS

Los microRNAS (miRNAs) son RNAs de 18 a 22 nucleótidos capaces de disminuir los niveles de mRNAs en eucariontes. Muchos de estos miRNAs están localizados en regiones distantes de otros genes, sugiriendo que tienen sus propios elementos reguladores [26]. En células tumorales, se han descrito alteraciones en los niveles de expresión de diferentes miRNAs. Esto sugiere que los miRNAs pueden tener actividad de genes supresores de tumores y oncogenes, dependiendo de sus genes blanco [27].

Funciones del *miR-125*

El miR-125b puede disminuir los niveles de mRNA asociados a apoptosis, proliferación celular, metástasis y resistencia a fármacos entre otros. Se ha propuesto que el miR-125b tiene actividad de gen supresor de tumores en cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza y cuello [28], cáncer de piel, osteosarcoma, cáncer de tiroides, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular y carcinoma oral de células escamosas. Mientras que, en otros tipos de cáncer como cáncer de páncreas, cáncer de cerebro [29], cáncer de colon, cánceres hematopoiéticos, cáncer gástrico y cáncer folicular, el miR-125b está asociado con actividad de oncogen [1] (Figura 3). Entre los blancos del miR-125b están genes asociados a apoptosis, como BCL2 (anti-apoptótico) y BAK1 (pro-apoptótico); proliferación celular como p53, E2F3, CDK6 y ERBB2/3, entre otros, y metástasis, como MMP13 (Figura 3).

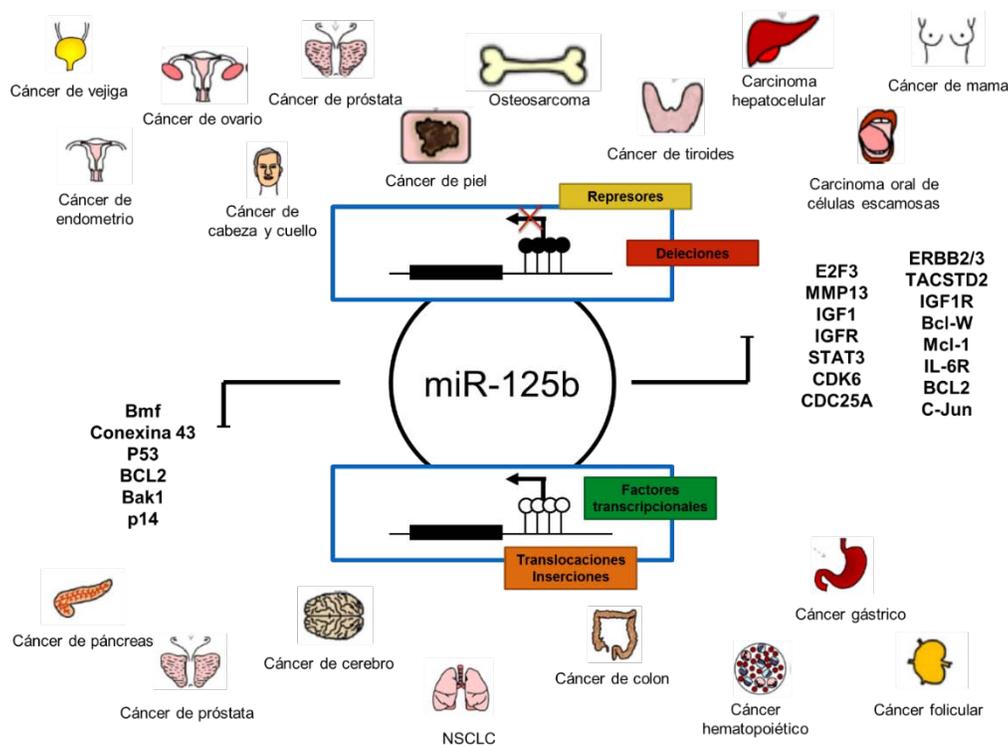


Figura 3. **Papel del miR-125b en cáncer.** Se ha propuesto que el miR-125b puede tener actividad de gen supresor de tumores u oncogen dependiendo de los genes blanco a los que regule. Además, el miR-125b se expresa de forma ubicua entre diferentes tejidos. Sin embargo, se ha reportado que en algunos tipos de tumores tiene bajos niveles de expresión (parte superior), mientras que en otros tiene altos niveles de expresión (parte inferior). Los niveles de expresión de este miRNA se han asociado a pronóstico del paciente y respuesta a quimioterapia (Modificado de [1]).

Regulación transcripcional del *miR-125b*

El miR-125b es un miRNA que se expresa de forma ubicua en distintos tejidos. El miR-125b proviene de la familia del miR-125, la cual consiste en el *miR-125a*, el *miR-125b-1* y el *miR-125b-2*. A pesar de que el miR-125a y miR-125b no tienen la misma secuencia, podrían tener blancos similares por compartir la región “semilla” [1]. El miR-125b maduro es producto de dos genes, el *miR-125b-1* y el *miR-125b-2*. El *miR-125b-1* se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (chr11q24), mientras que el *miR-125b-2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 21 (chr21q21) [30]. En este proyecto nos enfocaremos en la regulación transcripcional del *miR-125b-1*.

La sobre-expresión del *miR-125b-1* se asocia principalmente a translocaciones. En leucemia linfocítica aguda de células B, mielodisplasia y leucemia mieloide aguda, la traslocación t(11;14)(q24;q32) y t(2;11)(p21;q23) pueden aumentar los niveles de expresión hasta 90 veces. Esta sobre-expresión protege a las células B de la apoptosis a través de la represión de BCL2.

Por otro lado, en tumores sólidos como cáncer de mama, se ha propuesto que el silenciamiento del *miR-125b-1* es principalmente por metilación del promotor de este miRNA (Figura 4) [31, 32]. A su vez, se han descrito dos factores transcripcionales que afectan su transcripción, OCT4 [33] y NRF2 (Figura 4) [34]. Cuando disminuye este miRNA, aumentan los niveles de expresión de genes asociados a proliferación celular (ERBB2/3) [35], apoptosis (BAK1)[33, 36] y metástasis (ETS-1) [31].

En estudios previos en el laboratorio, hemos caracterizado una región con actividad promotora cercana a la secuencia de miR-125 maduro. Esta región está dentro de una isla CpG intermedia y la metilación de DNA en esta región afecta la transcripción de este gen [32]. Sin embargo, no conocemos si existen otros elementos epigenéticos involucrados en el silenciamiento del *miR-125b-1*. Por tal motivo, nos interesa evaluar si las modificaciones post-traduccionales de histonas y la presencia de la proteína CTCF afectan la expresión del *miR-125b-1*.

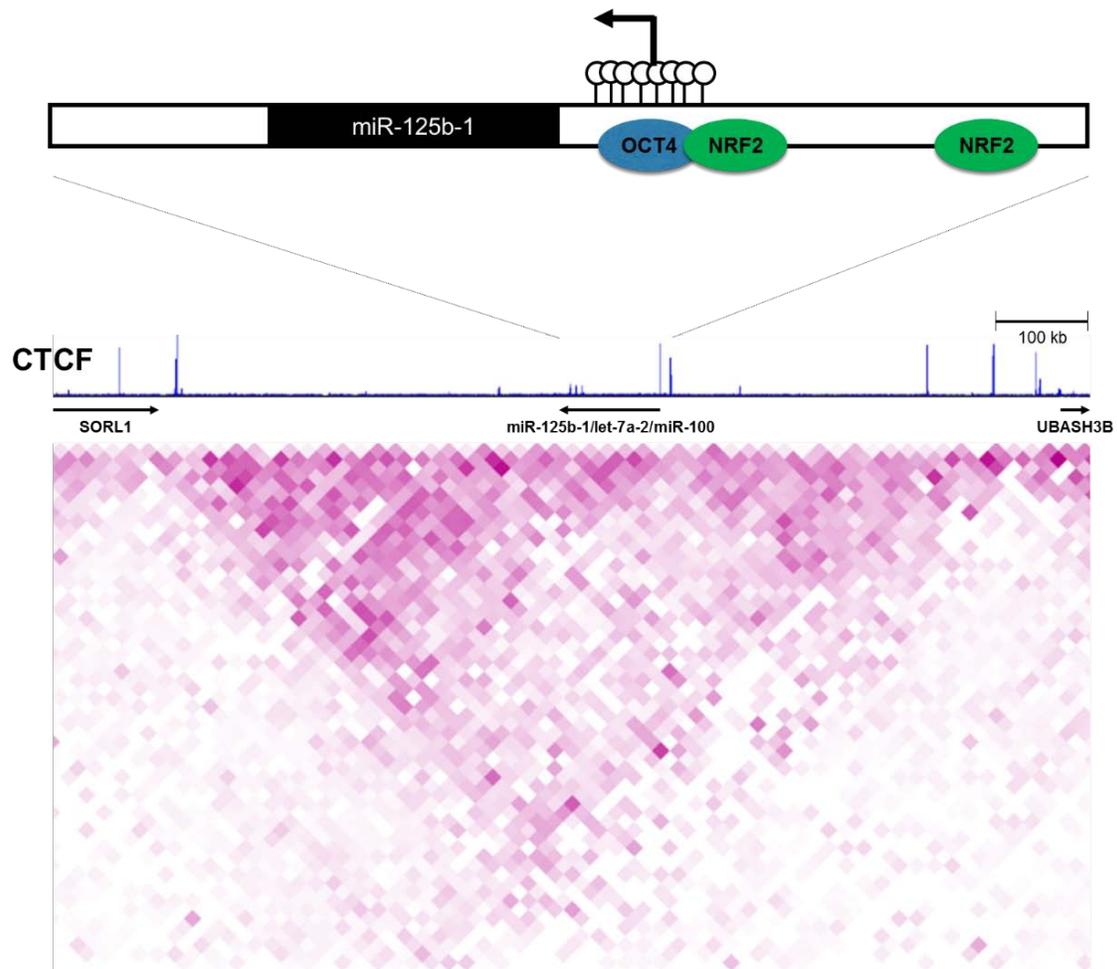


Figura 4. **Regulación transcripcional del *miR-125b-1***. El *miR-125b-1* se localiza en el brazo largo del cromosoma 11. Existen dos promotores conocidos, el primero está cercano a la secuencia madura del *miR-125b*, mientras que el segundo puede transcribir al policistrón *miR-125b-1/let-7a-2/miR-100*. Se han descrito dos factores transcripcionales que pueden regular la expresión de este miRNA, OCT4 y NRF2. Además, de acuerdo a la base de datos de ENCODE, el *miR-125b-1/let-7a-2/miR-100* está aislado por la proteína CTCF en una TAD.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El *miR-125b-1* es un miRNA capaz de regular la proliferación celular, apoptosis y metástasis. En tumores de cáncer de mama se ha determinado que la disminución del *miR-125b-1* se asocia con peor pronóstico para las pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, no se conoce el mecanismo de silenciamiento de este miRNA. Nosotros proponemos que la disminución de este miRNA es consecuencia de la pérdida de la proteína CTCF en sitios relevantes para la regulación transcripcional del *miR-125b-1*, ocasionando ganancia en modificaciones de histonas asociadas a represión transcripcional, como H3K9me3 y H3K27me3, y metilación del DNA en las regiones con actividad promotora del *miR-125b-1*.

HIPÓTESIS

La presencia de CTCF en el promotor del *miR-125b-1* evita la ganancia de metilación del DNA y modificaciones de histonas asociadas a represión génica (H3K9me3 y H3K27me3) en esta región, promoviendo su expresión.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la presencia de CTCF en el promotor del *miR-125b-1* y modificaciones epigenéticas (metilación del DNA y modificaciones de histonas asociadas a represión génica) en esta región, asociándolas con la expresión del miRNA.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la presencia de modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a represión génica en los promotores del *miR-125b-1*.
2. Determinar si la presencia de las modificaciones represivas de histonas altera los niveles de expresión del *miR-125b-1*.
3. Demostrar si la reactivación del *miR-125b-1* puede alterar los niveles de expresión y proteína de genes blanco.

4. Evaluar la presencia de CTCF en sitios cercanos al *miR-125b-1*.
5. Demostrar si la pérdida de CTCF altera los niveles de expresión del *miR-125b-1*.

RESULTADOS

miR-125b-1 tiene bajos niveles de expresión en la línea celular MCF 7

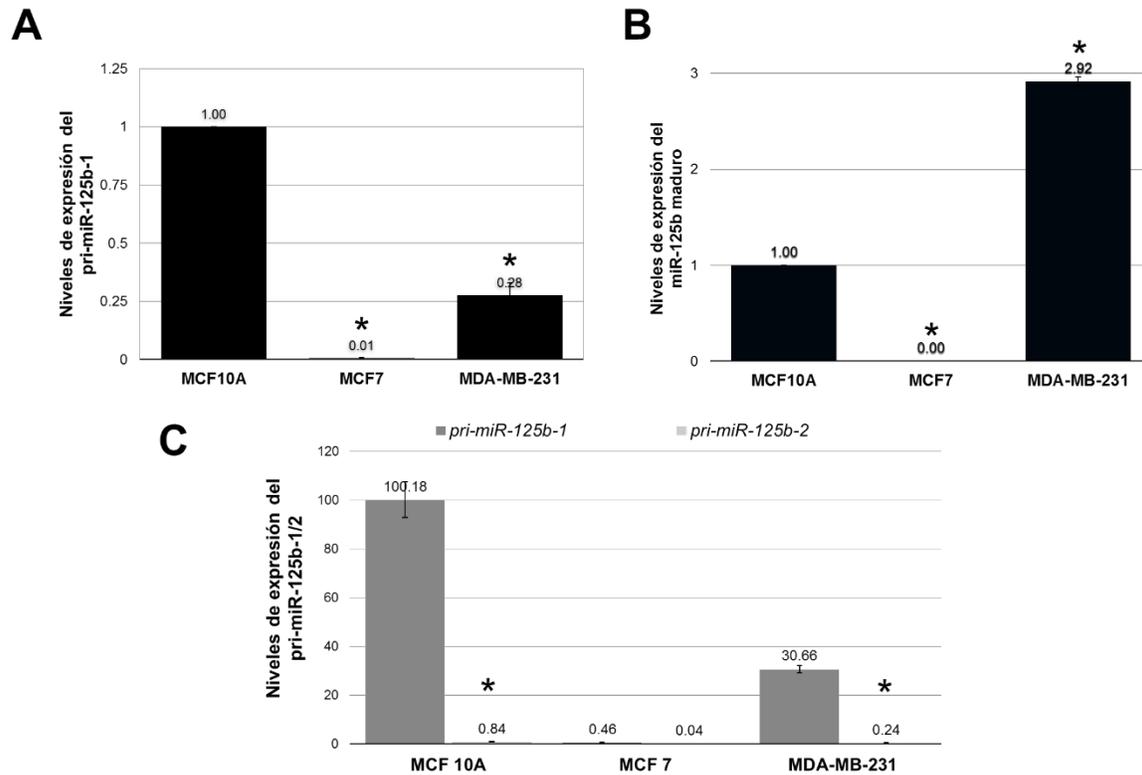


Figura 5. *miR-125b-1* tiene bajos niveles de expresión en la línea de cáncer de mama MCF 7. Los niveles transcripcionales del pri-miR-125b-1 (transcrito primario) (A) y el miR-125b (miRNA maduro) (B) fueron evaluados en las líneas celulares MCF 7 y MDA-MB-231 (líneas celulares de cáncer de mama) y en la línea MCF 10A (línea celular de mama no transformada). Con el fin de saber si únicamente se transcribe el *miR-125b-1*, se compararon los niveles de expresión tanto del miR-125b-1 (cromosoma 11) como del miR-125b-2 (cromosoma 21) en las tres líneas celulares de mama (C). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, las diferencias entre la línea de mama no transformada y las líneas de cáncer de mama se mostraron con un asterisco (donde * $p < 0.001$).

El miR-125b (miRNA maduro) es producto de la transcripción de dos genes: *miR-125b-1* (cromosoma 11) y *miR-125b-2* (cromosoma 21) [1]. Sin embargo, en líneas celulares de mama, el *miR-125b-2* no se transcribe (Figura 5C), dejando al *miR-125b-1* como responsable de la producción del miR-125b. Con el fin de conocer los niveles transcripcionales del *miR-125b-1*, se realizó una RT-qPCR en dos líneas celulares de cáncer de mama: MCF 7 (subtipo

luminal A) y MDA-MB-231 (subtipo triple negativo). Se tomó como referencia la línea celular de mama MCF 10A, una línea celular de mama no transformada. Nosotros encontramos bajos niveles de expresión del pri-miR-125b-1 (transcrito primario) en ambas líneas de cáncer de mama, en MCF 7 llegó al 0.01%, mientras que en MDA-MB-231 llegó al 28% (Figura 1A). Sin embargo, cuando evaluamos los niveles del miR-125b (miRNA maduro), nosotros encontramos bajos niveles del miR-125b en la línea MCF 7 (0.03%), mientras que los niveles del miR-125b en la línea MDA-MB-231 aumentaron casi 3 veces (Figura 1A). Con estos resultados concluimos que en la línea celular MCF 7, existen bajos niveles de expresión del *miR-125b-1* tanto en el transcrito primario como en el miRNA maduro (Figura 5 AB). Por otro lado, en la línea celular MDA-MB-231, existen bajos niveles de transcrito primario, pero altos niveles de miRNA maduro (Figura 5AB). Posiblemente, el resultado obtenido en la línea MDA-MB-231 se deba a una diferencia en la biogénesis y/o degradación de miRNAs favoreciendo la acumulación del transcrito maduro.

Presencia de H3K27me3 en los promotores del *miR-125b-1* en la línea celular MCF7 de acuerdo a la base de datos de ENCODE

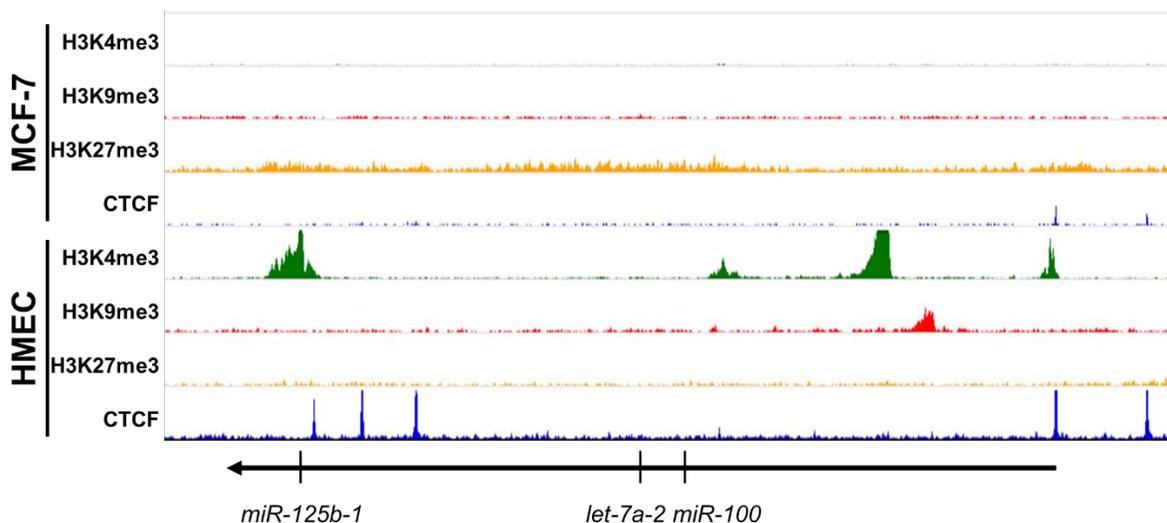


Figura 6. **Modificaciones de histonas en los loci *miR-125b-1*, *let-7a-2* y *miR-100*.** A partir de la base de datos ENCODE, se obtuvieron los niveles de enriquecimiento de H3K4me3 (verde), H3K9me3 (rojo), H3K27me3 (naranja) y CTCF (azul) a lo largo del loci *miR-125b-1*, *let-7a-2* y *miR-100* en dos líneas celulares, MCF-7 (cáncer de mama) y HMEC (mama normal).

En estudios previos, se ha demostrado que existen dos promotores encargados de regular la actividad transcripcional del *miR-125b-1* [33, 37, 38]. El primero de ellos, es un promotor localizado a 1.5 kb de la secuencia de DNA del miR-125b maduro. Este promotor está dentro de una isla CpG con un contenido de CpGs intermedio [33]. Además, se ha propuesto que esta clase de promotores podría ser regulado tanto por la metilación del DNA como por modificaciones de histonas [39]. El segundo promotor no está en una isla CpG y puede transcribir a otros dos miRNAs además del *miR-125b-1*, *let-7a-2* y *miR-100* [38]. Esto sugiere que su regulación transcripcional no está mediada por la metilación DNA.

Con el fin de conocer la presencia de modificaciones post-traduccionales de histonas capaces de reprimir al *miR-125b-1*, realizamos un análisis en la base de datos de ENCODE en busca de modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a represión transcripcional. Se analizó la presencia de dos modificaciones de histonas asociadas a represión génica, H3K9me3 y H3K27me3, en dos líneas celulares de mama MCF 7 (cáncer de mama) y HMEC (mama no transformada) (Figura 6). En la línea celular MCF 7 observamos un esparcimiento de la marca H3K27me3, la cual no se observa en la línea celular MCF 10A (Figura 6 – naranja). Por otro lado, también analizamos la presencia de H3K4me3 (asociada a activación génica), esta marca únicamente está presente en picos discretos en la línea celular MCF 10A (Figura 6 - verde). A su vez, analizamos la presencia de la proteína CTCF en esta región. La proteína CTCF está unida a cinco sitios a lo largo de la región analizada de la línea celular MCF 10A, mientras que en la línea celular MCF 7 no está unida esta proteína (Figura 6 - azul). Esto nos sugiere que la presencia de la proteína CTCF podría ser importante para la regulación transcripcional del *miR-125b-1*.

H3K9me3 está presente en los promotores del *miR-125b-1* de la línea celular MDA-MB-231 mientras que, en la línea celular MCF7 está presente H3K27me3 en los mismos sitios estudiados

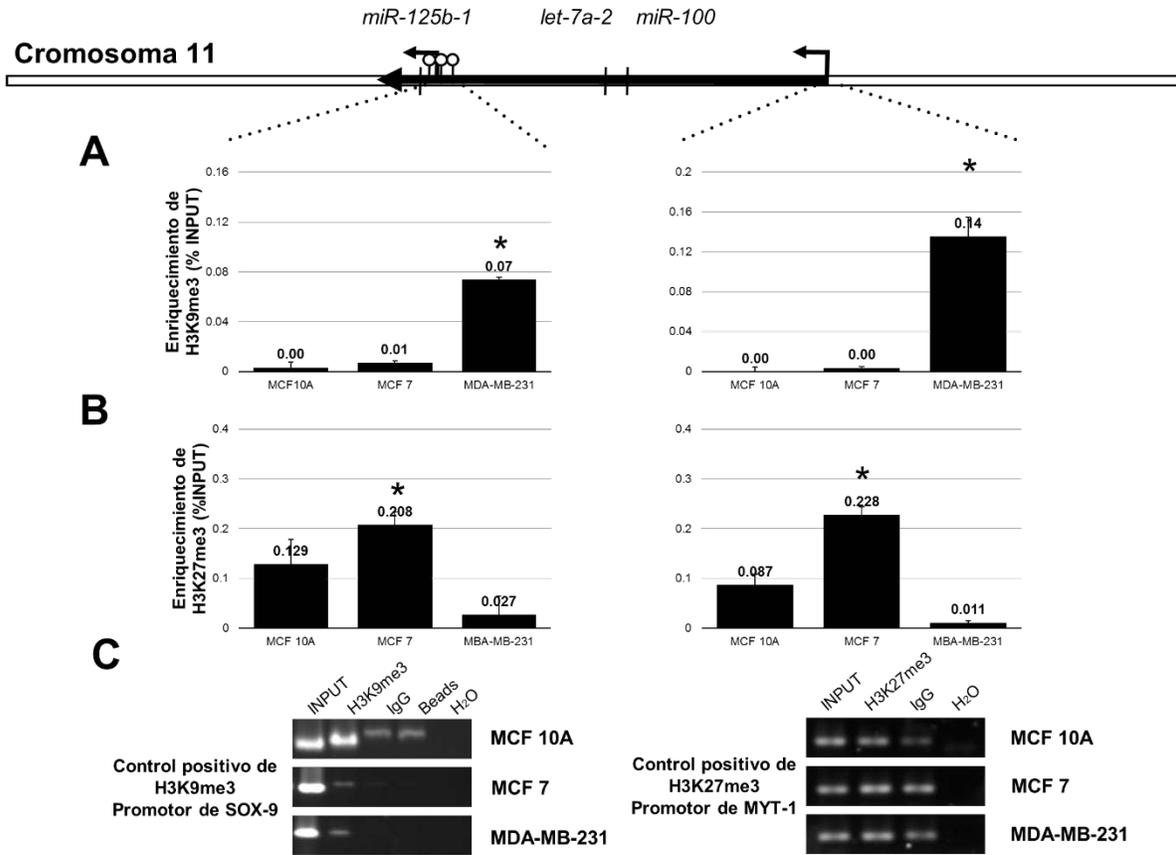


Figura 7. H3K9me3 se localiza en el promotor del *miR-125b-1* de la línea celular MDA-MB-231, mientras que, H3K27m3 está en el promotor del *miR-125b-1* de la línea celular MCF 7. En la parte superior, se muestran las regiones promotoras del *miR-125b-1*. La primera está dentro de una isla CpG y únicamente transcribe al *miR-125b-1*, mientras que la segunda no está en una isla CpG y puede transcribir a otros dos miRNAs además del *miR-125b-1* (*let-7a-2* y *miR-100*). En la parte inferior, se muestra el enriquecimiento de H3K9me3 (A) y H3K27me3 (B) en los dos promotores que regulan al gen del *miR-125b-1* en líneas celulares de cáncer de mama (MCF 7 y MDA-MB-231) y una línea de mama no transformada (MCF 10A). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, las diferencias entre la línea de mama no transformada y las líneas de cáncer de mama se mostraron con un asterisco (donde * $p < 0.03$).

En nuestro estudio, evaluamos la presencia de dos modificaciones de histonas asociadas a represión transcripcional, H3K9me3 y H3K27me3, por inmunoprecipitación de la cromatina en dos líneas celulares de cáncer mama, MCF 7 y MDA-MB-231, y una línea celular de mama no transformada, MCF 10A. Encontramos un enriquecimiento de H3K9me3 únicamente en los promotores de la línea celular MDA-MB-231 (Figura 7A). Mientras que, en la línea celular MCF 7, encontramos un enriquecimiento de H3K27me3 en ambos promotores (Figura 7B). Esto indica que la presencia de estas dos modificaciones de histonas (H3K9me3 y H3K27me3) es específico de la línea celular estudiada y, además, podría ser la responsable de la represión del *miR-125b-1* en líneas celulares de cáncer de mama.

La sobreexpresión de KDM4B/JMJD2B en la línea celular MDA-MB-231 aumenta los niveles de expresión del miR-125b

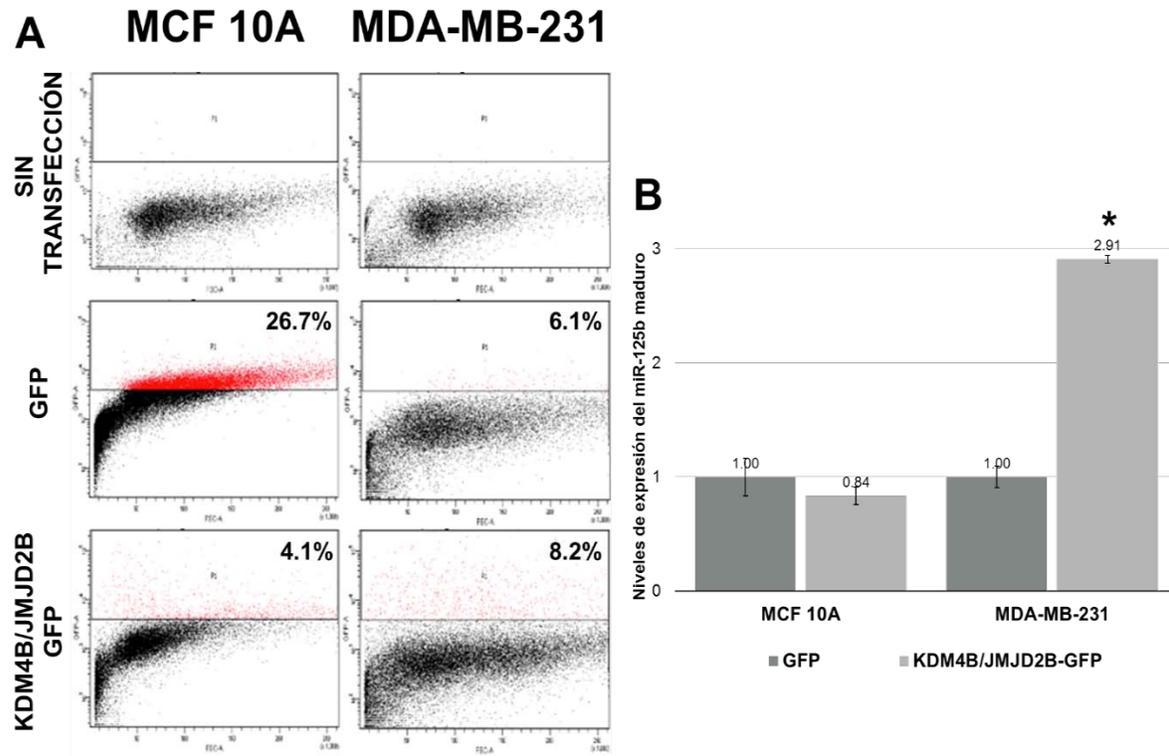


Figura 8. La sobreexpresión del KDM4B/JMJD2B en la línea celular MDA-MB-231 aumenta los niveles de expresión del miR-125b. Las células MCF 10A y MDA-MB-231 fueron transfectadas con KDM4B/JMJD2B-GFP y GFP. Por medio de citometría de flujo y *sorting*, separamos células MCF10A y MDA-MB-231 que sobre-expresaban KDM4B/JMJD2B-GFP (desmetilasa de H3K9me3). Como control únicamente sobre-expresamos GFP (A). Posteriormente, evaluamos los niveles de expresión del miR-125b maduro en las células MCF 10A y MDA-MB-231 transfectadas con KDM4B/JMJD2B-GFP y GFP.

Para determinar si H3K9me3 es responsable de la represión del *miR-125b-1* en la línea celular MDA-MB-231 sobre-expresamos a una desmetilasa de histona específica para H3K9, KDM4B/JMJD2B. Esta desmetilasa eliminará los grupos metilo de H3K9me3 dejando H3K9me1 [40]. Las líneas celulares MCF 10A y MDA-MB-231 fueron transfectadas con KDM4B/JMJD2B-GFP y GFP (vector vacío). Posteriormente, fueron seleccionadas por citometría de flujo y “*sorting*” (Figura 8A). A las células seleccionadas, se les evaluaron los niveles de expresión del miR-125b maduro. La línea celular MDA-MB-231 transfectada con KDM4B/JMJD2B-GFP aumentó los niveles de expresión del miR-125b maduro dos veces más

que la MDA-MB-231 transfectada con GFP (vector vacío). Mientras que, la línea MCF 10A, no mostró cambios en los niveles de expresión del miR-125b maduro (Figura 8B). Estos resultados sugieren que H3K9me3 es responsable de la represión del *miR-125b-1* en la línea celular MDA-MB-231.

El inhibidor de EZH2 promueve la expresión del *miR-125b-1* en la línea celular MCF7

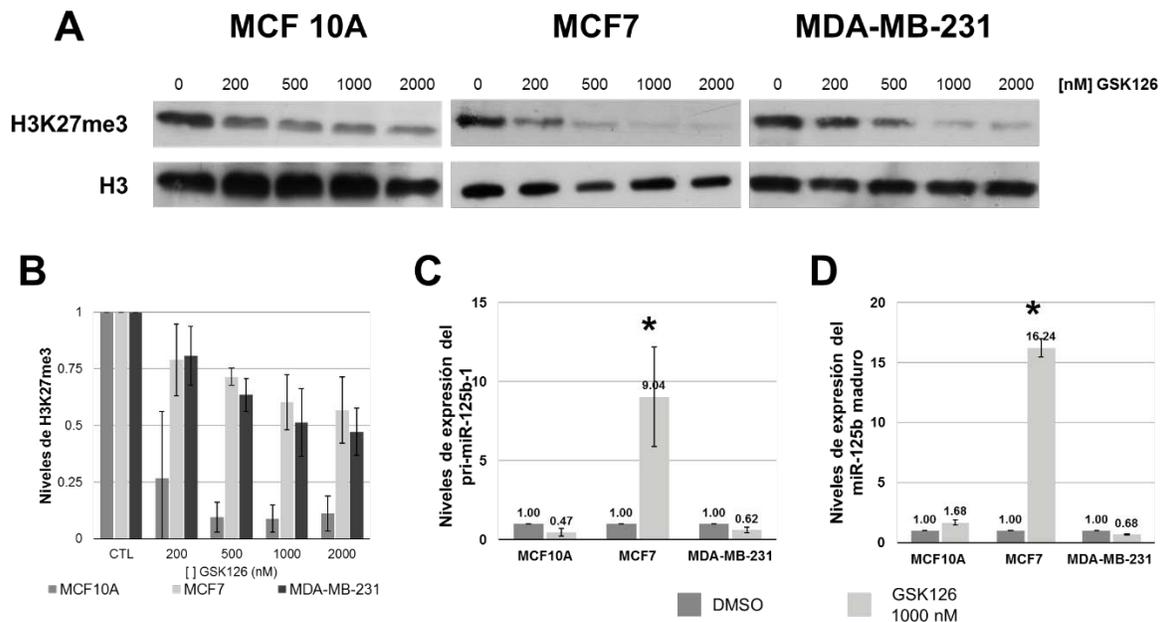


Figure 9. El inhibidor de EZH2 reactiva al *miR-125b-1* en la línea celular de cáncer de mama MCF 7. La dosis mínima a la cual GSK126 (inhibidor de EZH2) disminuye los niveles globales de H3K27me3 fue determinada por Western blot (A). Los resultados fueron analizados con densitometrías usando como control de carga a la histona H3 (B). Posteriormente, elegimos la dosis de 1000 nM para evaluar los niveles de expresión del pri-miR-125b-1 (C) y al miR-125b maduro (D). Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes (n=3). * p > 0.05

Con el fin de demostrar que H3K27me3 es responsable de la represión del *miR-125b-1* en la línea celular MCF 7, disminuimos los niveles de H3K9me3 globales usando un inhibidor específico para EZH2, GSK126 [41]. Para determinar la dosis de GSK126 a la cual se disminuyen los niveles globales de H3K27me3 realizamos Western blot contra esta marca de histona (Figura 9AB). Usando la dosis de 1000 nM, tratamos las líneas celulares MCF10A,

MCF 7 y MDA-MB-231 con este inhibidor de EZH2. Al evaluar los niveles de transcrito del pri-miR-125b-1 y miR-125b maduro en la línea MCF 7, observamos un aumento de hasta 10 y 15 veces, respectivamente. Mientras que, en las líneas celulares MCF 10A y MDA-MB-231, no hubo cambios entre los controles y los tratados con GSK126. Con estos resultados podemos concluir que la represión del *miR-125b-1* en la línea celular MCF 7 está mediado por H3K27me3 y el complejo de Polycomb.

La reactivación del *miR-125b-1* puede afectar los niveles de expresión y los niveles de proteína de BAK1

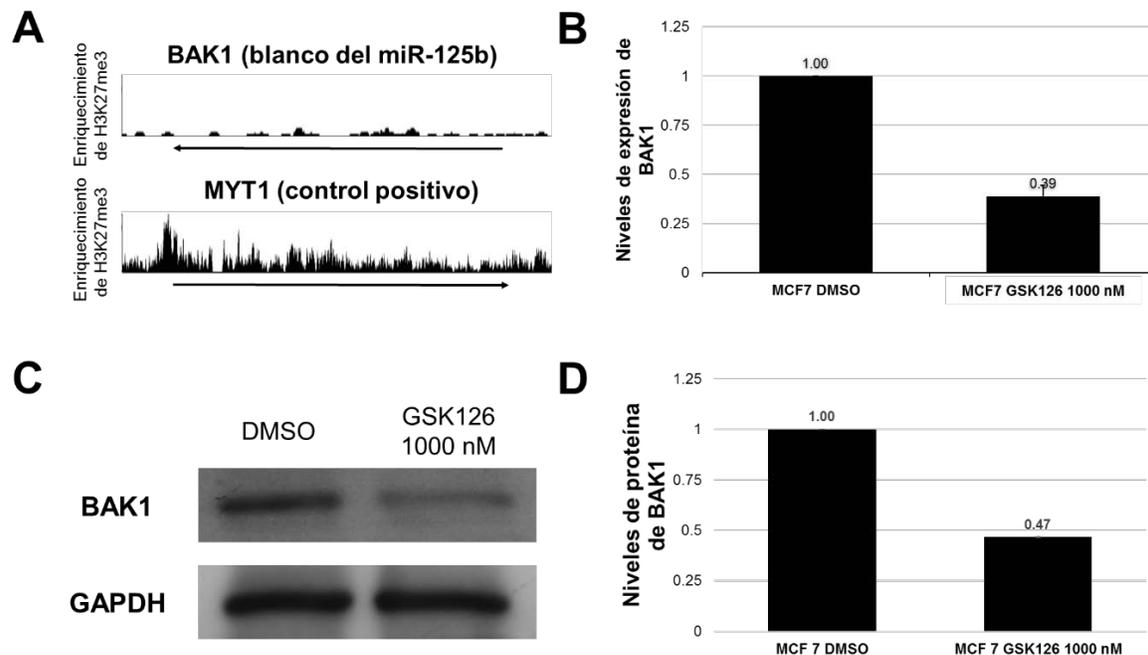


Figura 10. La reactivación del *miR-125b-1* disminuye los niveles de expresión y niveles de proteína de BAK1. BAK1 es un gen blanco del *miR-125b-1*. BAK1, a diferencia de otros genes blanco, no está reprimido por H3K27me3 en la línea celular MCF 7, de acuerdo a la base de datos ENCODE (A). Evaluamos los niveles de expresión (B) y niveles de proteína de BAK1 (C y D) en las líneas MCF 10A y MCF 7 tratadas con GSK126. Únicamente en la línea celular MCF 7 tratada con GSK126 hay menores niveles de expresión y de proteína de BAK1. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes (n=3). * p > 0.05

A continuación, nos interesó conocer si la reactivación del *miR-125b-1* usando el inhibidor de EZH2 podría afectar la expresión de genes blanco. BAK1 es un gen blanco del *miR-125b* asociado a apoptosis [33, 36] y en su promotor no hay presencia de H3K27me3 (Figura 10A). Por medio de RT-qPCR, evaluamos los niveles de expresión de BAK1. En la línea celular MCF 7 tratada con GSK126, los niveles de expresión de BAK1 disminuyeron hasta un 60% en comparación con la línea celular MCF 7 tratada con el vehículo (DMSO) (Figura 10B). Los niveles de proteína BAK1 también fueron evaluados por Western blot, en la línea celular MCF 7 tratada con GSK126 encontramos una disminución del 50% en comparación con la línea MCF 7 tratada con el vehículo (DMSO) (Figura 10CD). Con esto podemos concluir que, la represión del *miR-125b-1* en la línea MCF 7 está mediada por H3K27me3 y al reactivar la expresión de este gen usando inhibidores de EZH2, también podemos disminuir los niveles de expresión de genes blanco como BAK1.

CTCF está presente diferencialmente en los loci *miR-125b-1*, *let-7a-2* y *miR-100* en las líneas celulares de mama

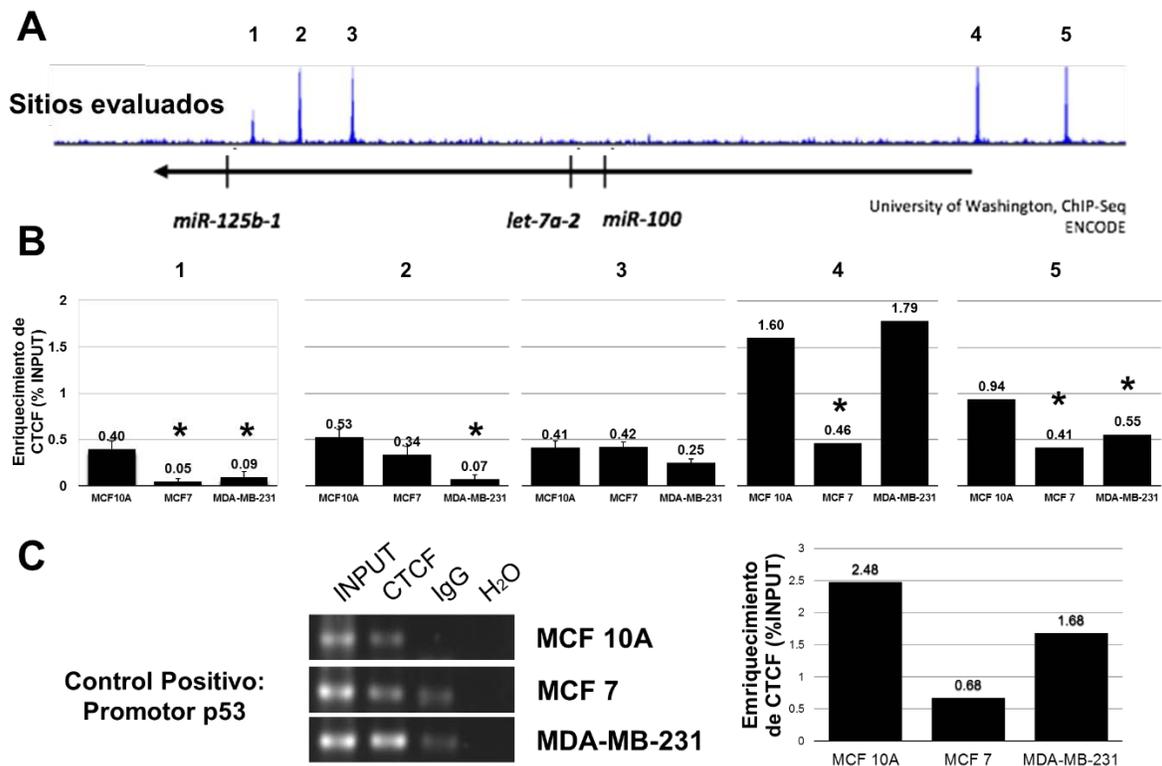


Figura 11. **CTCF está presente diferencialmente en los loci *miR-125b-1*, *let-7a-2* y *miR-100* en las líneas celulares de mama.** En la parte superior, se muestran los sitios de unión a CTCF cercanos al *miR-125b-1* (A). En la parte inferior, se representa el enriquecimiento de CTCF en las líneas celulares MCF10A, MCF 7 y MDA-MB-231 a lo largo de los loci *miR-125b-1*, *let-7a-2* y *miR-100* (B). Como control positivo se evaluó la presencia de CTCF en el promotor de p53 (C). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Las diferencias entre la línea MCF 10A y las líneas de cáncer de mama se muestran con un asterisco (donde * $p < 0.04$).

CTCF es una proteína con múltiples funciones, una de ellas es la actividad de “insulator”. CTCF puede delimitar regiones de heterocromatina de regiones de eucromatina para permitir la transcripción génica [21]. En la Figura 6, realizamos una búsqueda de modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a represión génica y la unión de la proteína CTCF en una región de 90 kb que incluye al *miR-125b-1*, *let-7a-2* y *miR-100*. Aparentemente existe una asociación entre la presencia de CTCF, la ausencia de H3K27me3 (marca asociada a represión génica) y la transcripción del *miR-125b-1*. Para demostrar el papel de CTCF en la regulación transcripcional del *miR-125b-1*, evaluamos la presencia de esta proteína en los cinco sitios de unión descritos por la base de datos de ENCODE (Figura 6). Por medio de inmunoprecipitación de la cromatina contra CTCF en las tres líneas celulares de mama, encontramos que en el sitio 1 (cercano al promotor del *miR-125b-1*) CTCF está enriquecido únicamente en la línea celular MCF 10A. En el sitio 2, hay enriquecimiento tanto en la línea MCF 10A como en MCF 7. En el sitio 3, no hay cambios entre las tres líneas celulares. En el sitio 4 (cercano al promotor del *miR-125b-1/let-7a-2/miR-100*), hay enriquecimiento en las líneas celulares MCF 10A y MDA-MB-231. Y finalmente, en el sitio 5, CTCF está enriquecido en la línea celular MCF 10A (Figura 11). De forma interesante, CTCF está presente en los promotores del *miR-125b-1* de la línea celular MCF 10A, en la cual el *miR-125b-1* se está expresando.

La disminución global de CTCF disminuye los niveles del *miR-125b-1* en la línea celular MCF 10A

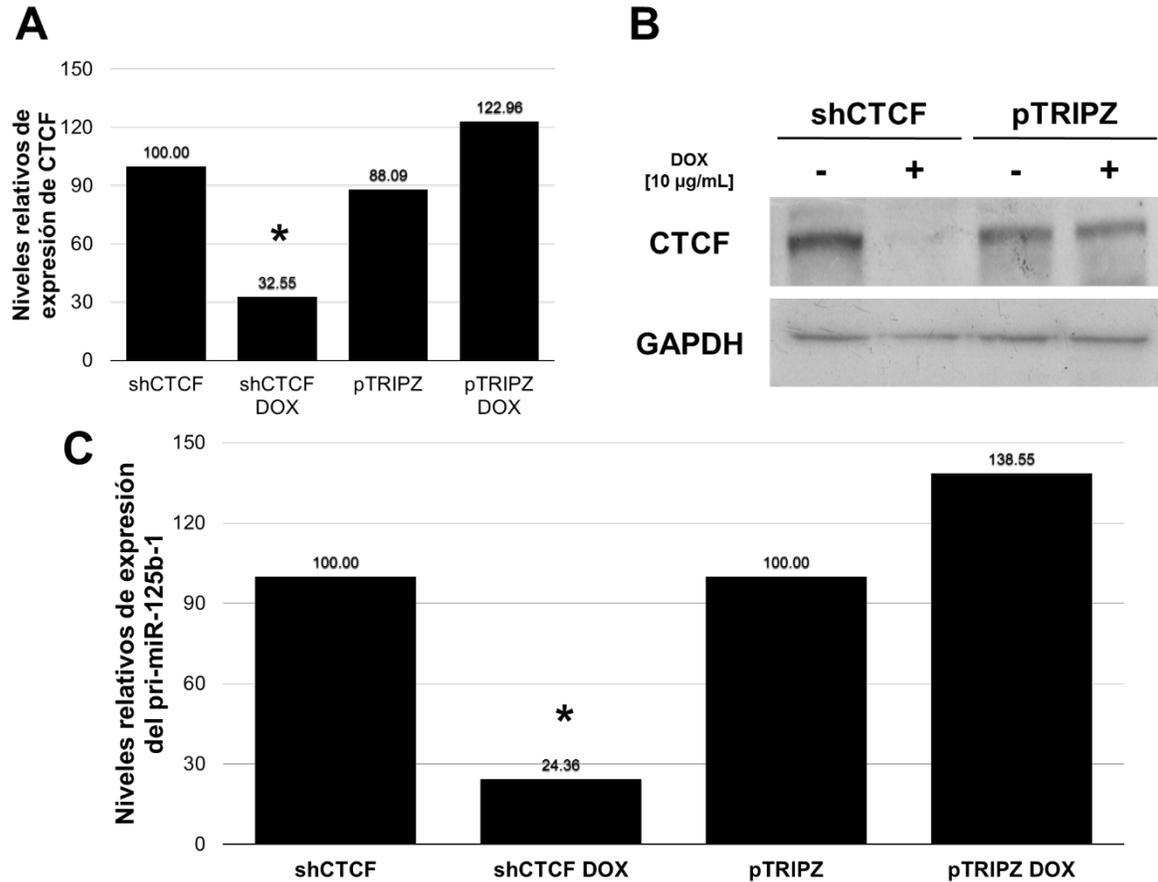


Figura 12. La disminución global de CTCF disminuye los niveles del *miR-125b-1* en la línea celular MCF 10A. Por medio de RNAs interferentes que se expresan de forma inducible con doxiciclina en la línea MCF 10A, se disminuyeron los niveles globales de CTCF. La disminución de CTCF se evaluó por PCR en tiempo real (A) y los niveles de proteína por Western blot (B). Posteriormente, se evaluaron los niveles de expresión del pri-miR-125b-1. La línea celular MCF10A shCTCF inducida con doxiciclina disminuyó los niveles de expresión del pri-miR-125b-1 hasta un 75%, mientras que la misma línea sin inducir y la línea MCF 10A pTRIPZ (vector vacío) no mostró cambios.

Posteriormente, nos interesó saber si CTCF podría participar en la regulación transcripcional del *miR-125b-1*. Para esto, disminuimos a nivel global los niveles de expresión (Figura 12A) y de proteína de CTCF (Figura 12B) usando RNAs interferentes en la línea celular MCF 10A. Al evaluar los niveles de expresión del pri-miR-125b-1, encontramos una disminución hasta del 75% en la línea MCF 10A transfectada con shCTCF inducida con doxiciclina. Mientras

que, en la línea MCF 10A sin inducir con doxíciclina y el vector vacío, no observamos cambios (Figura 12C). Estos resultados sugieren que CTCF podría participar en la regulación transcripcional del *miR-125b-1*. Sin embargo, falta conocer cómo CTCF afecta la ganancia de elementos epigenéticos asociados a represión transcripcional en el promotor del *miR-125b-1*.

DISCUSIÓN

Modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor del *miR-125b-1*

El *miR-125b-1* es un miRNA capaz de regular la proliferación celular, apoptosis y metástasis. La disminución de este miRNA en pacientes con cáncer de mama se asocia a un peor pronóstico para éstas. Sin embargo, no se conocen los mecanismos asociados a su silenciamiento. El objetivo de este trabajo es determinar los elementos involucrados en la represión del *miR-125b-1*. En trabajos previos en el laboratorio, hemos determinado que la metilación del DNA podría ser un mecanismo de represión transcripcional [31, 32]. Sin embargo, no hay una correlación directa entre el grado de metilación de la isla CpG del promotor del *miR-125b-1* y su silenciamiento. Además, uno de los promotores de este miRNA está dentro de una isla CpG intermedia, esto significa que la regulación transcripcional de este gen puede estar mediado tanto por la metilación del DNA como por las modificaciones post-traduccionales de histonas [39]. Por tal motivo, enfocamos en estudiar el papel de las modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a represión génica como H3K9me3 y H3K27me3 en líneas celulares de cáncer de mama.

H3K9me3 y H3K27me3 son dos modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a represión génica. Sin embargo, sus mecanismos de represión están asociadas a diferentes mecanismos. Por ejemplo, en el silenciamiento mediados por H3K9me3 se asocia principalmente a heterocromatina constitutiva (regiones teloméricas y pericentroméricas) y la participación de la proteína HP1 [42]. Mientras que, en la represión mediada por H3K27me3 participa el complejo de Polycomb y se asocia a heterocromatina facultativa [43]. De forma interesante, encontramos presentes estas modificaciones post-

traduccionales de histonas en los promotores del *miR-125b-1* en dos líneas celulares de cáncer de mama con diferentes características (subtipo luminal A y subtipo triple negativo). En MCF 7 (subtipo luminal A) está presente H3K27me3 en ambos promotores mientras que, en MDA-MB-231 (subtipo triple negativo) está presente H3K9me3 en los mismos sitios estudiados (Figura 7). Esto sugiere que estas modificaciones podrían ser mutuamente excluyentes. Sin embargo, falta aumentar el estudio en líneas celulares para demostrar que esto es algo representativo del subtipo de cáncer de mama. A su vez, usando microarreglos de tejidos de tumores de cáncer de mama y tinciones contra H3K9me3 y H3K27me3, se demostró que hay una mayor presencia de H3K27me3 en subtipos que expresan receptor de estrógenos (ER+) y menor grado de invasión [44]. Esto sugiere que, a pesar de provenir de la misma estirpe celular, los diferentes subtipos de cáncer de mama podrían tener distintos patrones epigenéticos entre ellos, promoviendo diferencias en la estructuración nuclear y la regulación transcripcional de genes.

Efecto de las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor del *miR-125b-1*

A pesar de que estén presentes elementos epigenéticos que podrían regular transcripción de un gen, es necesario evaluarlos funcionalmente. En el caso de la regulación transcripcional del *miR-125b-1*, se han descrito dos promotores. El primero de ellos está embebido en una isla CpG intermedia, mientras que, el segundo no está en una isla CpG [38, 45, 46]. Por tal motivo, las modificaciones post-traduccionales de histonas podrían tener un papel fundamental en su regulación transcripcional.

En la línea celular MDA-MB-231, H3K9me3 está presente en ambos promotores del *miR-125b-1*. Al sobre-expresar una desmetilasa de H3K9 (KDM4B-JMJD2B) [40], encontramos un aumento en los niveles de miR-125b maduro (Figura 8). Uno de los problemas técnicos de trabajar con líneas celulares de mama es su dificultad para ser transfectadas, por lo cual seleccionamos las células que sobre-expresaron KDM4B-JMJD2B por *cell sorting*. A pesar de tener una eficiencia baja, esta técnica nos permite de tener únicamente las que sobre-

expresan KDM4B-JMJD2B y hacer el análisis de expresión más específico. Sin embargo, no se pudo evaluar el transcrito primario porque no teníamos suficiente RNA ya que la sobreexpresión de KDM4B-JMJD2B compromete la viabilidad celular. Otra estrategia que tratamos de utilizar, fue el uso de inhibidores contra SUV39H1 y G9a (enzimas encargadas de metilar H3K9) como la chaetocina [47]. Sin embargo, este inhibidor fue muy poco eficiente y también compromete la viabilidad celular (datos no mostrados).

Por otro lado, se sabe que la línea celular MCF 7 está enriquecida con H3K27me3 en ambos promotores del *miR-125b-1* (Figura 7), para demostrar si esta modificación post-traducciona de histonas participa en la represión de este gen, usamos un inhibidor de EZH2 (enzima que trimetila H3K27) para disminuir H3K27me3 a nivel global. Únicamente, en la línea celular MCF 7 aumentaron los niveles de expresión del *miR-125b-1* (Figura 9). Esto sugiere que H3K27me3 puede regular la expresión del *miR-125b-1* específicamente en esta línea celular. Una de las desventajas de este experimento fue que la disminución de H3K27me3 fue a nivel global. Actualmente, se están probando otras estrategias para dirigir remodeladores de la cromatina a regiones específicas del DNA usando los sistemas CRISPR-Cas [48]. A pesar de esto, este experimento si resuelve nuestra pregunta, H3K27me3 está mediando la represión del *miR-125b-1* en la línea celular MCF 7.

Efecto de la represión del *miR-125b-1* en la expresión de genes blanco

Los miRNAs son capaces de regular la expresión de genes que codifican para proteína en organismos eucariontes. Particularmente el miR-125b tiene como genes blanco ERBB2, ETS1 y BAK1, entre otros. Uno de los criterios que utilizamos para elegir a los genes blanco que estudiamos fue que no tuvieran enriquecimiento de H3K27me3 en sus promotores, ya que el tratamiento con el inhibidor de EZH2 podría afectar el resultado del experimento. También excluimos al gen ERBB2 porque las líneas celulares que usamos como modelo tienen bajos niveles de expresión de este gen y también bajos niveles de esta proteína (datos no mostrados). Por tal motivo, nos enfocamos en evaluar la expresión de BAK1 y sus

niveles de proteína en la línea MCF 7. Al disminuir los niveles globales de H3K27me3 en línea celular MCF 7, observamos un aumento en los niveles de miR-125b y una disminución de los niveles de expresión y de proteína de BAK1 (Figura 10). Esto sugiere que la reactivación del *miR-125b-1* podría afectar la expresión de algunos genes blanco. Por otro lado, también evaluamos la expresión y los niveles de proteína de ETS1, otro gen blanco. Sin embargo, no observamos cambios significativos (datos no mostrados) entre las células control y las tratadas con el inhibidor de EZH2. Estos resultados sugieren que hay cierta afinidad entre los blancos de este miRNA. Además, este análisis nos sirve para conocer la función del miR-125b en cáncer y los genes a los que puede regular. BAK1 es una proteína pro-apoptótica. Se ha propuesto que esta proteína participa en la resistencia a fármacos [33, 36]. Por tal motivo, se sugiere que cambios en los niveles del miR-125b podrían afectar la sensibilidad a agente quimioterapéuticos. Sin embargo, falta hacer ensayos funcionales para corroborar esta hipótesis.

Efecto de CTCF en los loci de *miR-125b-1/let-7a-2/miR-100*

Para conocer la función de CTCF en la regulación transcripcional del *miR-125b-1*, fue importante conocer los elementos epigenéticos involucrados en la represión de este gen, la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de histonas. CTCF es una proteína capaz de delimitar regiones de heterocromatina de regiones de eucromatina. Se han propuesto múltiples mecanismos de cómo CTCF puede realizar esta función. El primero de estos mecanismos propone que CTCF y el complejo de cohesinas pueden formar asas de cromatina y aislar la cromatina transcripcionalmente activa de la inactiva [22]. Otro mecanismo propone que la unión de CTCF promueve la incorporación de la variante de histona H3.3 y de esta manera puede evitar el esparcimiento de H3K27me3 [23]. Otra propuesta sugiere que en sitios CpG específicos, PARP1 poliADPribosila a CTCF y evita el reclutamiento de DNMT1, manteniendo esos sitios no metilados [24].

El primer acercamiento de nuestro estudio para entender la relevancia de CTCF en la regulación transcripcional del *miR-125b-1*, consistió en evaluar la presencia de CTCF en sitios

previamente descritos en ENCODE. A lo largo de los genes *miR-125b-1*, *let-7a-2* y *miR-100*, existen 5 sitios que flanquean la región. Los primeros tres están cercanos al promotor que únicamente regula la transcripción del *miR-125b-1*, mientras que los otros dos están cercanos al promotor que regula al policistrón (*miR-125b-1*, *let-7a-2* y *miR-100*). En este estudio, nosotros localizamos cinco sitios de unión a CTCF (Figura 11) y los correlacionamos con la ausencia de H3K27me3 en regiones cercanas al promotor del *miR-125b-1* (Figura 7). De forma interesante, encontramos que en la línea celular MCF 10A, la cual transcribe al *miR-125b-1* y no tiene H3K27me3 en los promotores, está presente CTCF en los cinco sitios. Sin embargo, en la línea celular MCF 7, la cual no transcribe al *miR-125b-1* y tiene H3K27me3 en los promotores, está CTCF presente pero en menores niveles que en la línea celular MCF 10A. Esto nos sugiere que CTCF podría participar en la regulación transcripcional del *miR-125b-1*. Posteriormente, disminuimos a nivel global la proteína CTCF en la línea celular MCF 10A y observamos una disminución considerable de los niveles de expresión del *miR-125b-1*. Posiblemente, CTCF está evitando la ganancia de H3K27m3 en los promotores del *miR-125b-1*, promoviendo su transcripción.

CONCLUSIONES

El *miR-125b-1* es un miRNA capaz de regular la proliferación celular, apoptosis y metástasis. La disminución de este miRNA en tumores de mama se asocia a un peor pronóstico para las pacientes. Sin embargo, no se conocen los mecanismos asociados a su silenciamiento.

En este estudio, determinamos la presencia y funcionalidad de modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a represión transcripcional, H3K9me3 y H3K27me3, en el silenciamiento del *miR-125b-1*. La línea celular MDA-MB-231 (características de triple negativo) presenta un enriquecimiento de H3K9me3 en ambos promotores del *miR-125b-1*. Mientras que, la línea celular MCF 7 (características de luminal A) presenta un enriquecimiento de H3K27me3 en ambos promotores del *miR-125b-1*. Al disminuir H3K27me3 a nivel global observamos un aumento de expresión del *miR-125b-1*, sugiriendo

la su represión está mediada por H3K27me3. Por otro lado, también analizamos el efecto de esta reactivación sobre un gen blanco de este miRNA (BAK1) y observamos una disminución significativa tanto de niveles de RNA mensajero como de proteína de BAK1.

Continuamos analizando otros mecanismos que podrían llevar al esparcimiento de H3K27me3 sobre las regiones reguladoras del miR-125b-1 y su silenciamiento. Una proteína candidata es CTCF. Esta proteína es capaz de delimitar regiones de heterocromatina de regiones de eucromatina. En la base de datos de ENCODE, se reporta que en líneas celulares que no presentan CTCF en sitios específicos se promueve el esparcimiento de H3K27me3 y el silenciamiento de los genes cercanos. Mientras que, en las líneas donde CTCF está unido no hay esparcimiento de H3K27me3 y hay transcripción génica. En nuestro estudio, asociamos la presencia de la proteína CTCF en promotor del *miR-125b-1* con la ausencia de H3K27me3 en esta región, promoviendo la expresión de este miRNA. Al disminuir los niveles de CTCF en la línea celular de mama MCF10A, la cual expresa al *miR-125b-1* y no tiene H3K27me3 en la región promotora, encontramos un decremento de los niveles de expresión de este miRNA. Esto sugiere que CTCF podría participar en la regulación transcripcional del *miR-125b-1*.

PERSPECTIVAS

- 1) Determinar la relación entre la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor del *miR-125b-1* a través de ensayos funcionales.
- 2) Demostrar si el mecanismo de regulación mediado por CTCF involucra la ganancia de H3K27me3 en el promotor, evita la ganancia de metilación del DNA o ambas.
- 3) Determinar si la represión mediada por H3K9me3 es independiente a CTCF, determinar el mecanismo de silenciamiento y las consecuencias biológicas de esta represión.
- 4) Mutando puntualmente los sitios de unión a CTCF, evaluar qué es lo que sucede con el mecanismo de represión transcripcional y el fenotipo celular al disminuir los niveles de expresión del *miR-125b-1*.

REFERENCIAS

1. Banzhaf-Strathmann, J.E., E., *Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer*. Cell Communication and Signaling, 2014. **12**(30).
2. You, J.S. and P.A. Jones, *Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?* Cancer Cell, 2012. **22**(1): p. 9-20.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Chakravarthi, B.V., S. Nepal, and S. Varambally, *Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer*. Am J Pathol, 2016. **186**(7): p. 1724-35.
5. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
6. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
7. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 27-36.
8. Felsenfeld G, G.M., *Controlling the double helix*. Nature 2003. **421**: p. 448-453.
9. Denis, H., M.N. Ndlovu, and F. Fuks, *Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms*. EMBO Rep, 2011. **12**(7): p. 647-656.
10. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(10): p. 726-34.
11. Herman, J.G. and S.B. Baylin *Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation*. New England Journal of Medicine, 2003. **349**(21): p. 2042-2054.
12. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
13. Kanai, Y., et al., *Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers*. Cancer Lett. **192**(1): p. 75-82.
14. Ley, T.J., et al., *DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(25): p. 2424-2433.
15. De Carvalho, D.D., J.S. You, and P.A. Jones, *DNA methylation and cellular reprogramming*. Trends Cell Biol. **20**(10): p. 609-617.
16. Rao, R.C. and Y. Dou, *Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 334-346.
17. Casciello, F., et al., *Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer*. Frontiers in Immunology, 2015. **6**(487).
18. Conway, E., E. Healy, and A.P. Bracken, *PRC2 mediated H3K27 methylations in cellular identity and cancer*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **37**: p. 42-8.
19. Chase, A. and N.C. Cross, *Aberrations of EZH2 in cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(9): p. 2613-8.
20. McCabe, M.T. and Caretha L. Creasy, *EZH2 as a potential target in cancer therapy*. Epigenomics, 2014. **6**(3): p. 341-351.

21. Ali, T., R. Renkawitz, and M. Bartkuhn, *Insulators and domains of gene expression*. *Curr Opin Genet Dev*, 2016. **37**: p. 17-26.
22. Downen, J.M., et al., *Control of cell identity genes occurs in insulated neighborhoods in mammalian chromosomes*. *Cell*, 2014. **159**(2): p. 374-87.
23. Weth, O., et al., *CTCF induces histone variant incorporation, erases the H3K27me3 histone mark and opens chromatin*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(19): p. 11941-51.
24. Zampieri, M., et al., *ADP-ribose polymers localized on Ctcf-Parp1-Dnmt1 complex prevent methylation of Ctcf target sites*. *Biochem J*, 2012. **441**(2): p. 645-52.
25. Flavahan, W.A., et al., *Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas*. *Nature*, 2016. **529**(7584): p. 110-114.
26. Di Leva, G., M. Garofalo, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 287-314.
27. Lee, Y.S. and A. Dutta, *MicroRNAs in cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 199-227.
28. Nakanishi, H., et al., *Loss of miR-125b-1 contributes to head and neck cancer development by dysregulating TACSTD2 and MAPK pathway*. *Oncogene*, 2014. **33**(6): p. 702-12.
29. Kappelmann, M., et al., *MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression*. *Oncogene*, 2013. **32**(24): p. 2984-2991.
30. Sun, Y.M., K.Y. Lin, and Y.Q. Chen, *Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts*. *J Hematol Oncol*, 2013. **6**: p. 6.
31. Zhang, Y., et al., *miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer*. *Cancer Res*, 2011. **71**(10): p. 3552-62.
32. Soto-Reyes, E., et al., *Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in gynecological cancers*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 40.
33. Wang, Y.D., et al., *OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e760.
34. Shah, N.M., et al., *NRF2-driven miR-125B1 and miR-29B1 transcriptional regulation controls a novel anti-apoptotic miRNA regulatory network for AML survival*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(4): p. 654-64.
35. Scott, G.K., et al., *Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(2): p. 1479-86.
36. Zhou, M., et al., *MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(28): p. 21496-507.
37. Chien, C.H., et al., *Identifying transcriptional start sites of human microRNAs based on high-throughput sequencing data*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(21): p. 9345-56.
38. Marson, A., et al., *Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells*. *Cell*, 2008. **134**(3): p. 521-33.
39. Weber, M., et al., *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*. *Nat Genet*, 2007. **39**(4): p. 457-66.

40. Fodor, B.D., et al., *Jmjd2b* antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev*, 2006. **20**(12): p. 1557-62.
41. McCabe, M.T., et al., *EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations*. *Nature*, 2012. **492**(7427): p. 108-12.
42. Kim, J.K., H., *Recruitment and Biological Consequences of Histone Modification of H3K27me3 and H3K9me3*. *ILAR Joournal*, 2012. **53**(3-4): p. 232-9.
43. Muller, J. and P. Verrijzer, *Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes*. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. **19**(2): p. 150-8.
44. Healey, M.A., et al., *Association of H3K9me3 and H3K27me3 repressive histone marks with breast cancer subtypes in the Nurses' Health Study*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **147**(3): p. 639-51.
45. Ozsolak, F., et al., *Chromatin structure analyses identify miRNA promoters*. *Genes Dev*, 2008. **22**(22): p. 3172-83.
46. Fujita, S. and H. Iba, *Putative promoter regions of miRNA genes involved in evolutionarily conserved regulatory systems among vertebrates*. *Bioinformatics*, 2008. **24**(3): p. 303-8.
47. Greiner, D., et al., *Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9*. *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(3): p. 143-145.
48. Thakore, P.I., et al., *Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements*. *Nat Meth*, 2015. **12**(12): p. 1143-1149.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Las líneas celulares MCF 10A, MCF 7 y MDA-MB-231 se obtuvieron en ATCC. La línea celular MCF 10A fue cultivada en medio DMEM/F12 (3:1) (GIBCO) adicionado con 10% de suero fetal bovino (ATCC), 2 mM de glutamina (GIBCO), 10 ng/mL de EGFrh (Invitrogen), 120 mU/mL de insulina recombinante humana y 1 µg/mL de hidrocortizona (Sigma). Mientras que las líneas celulares MCF 7 y MDA-MB-231 fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (GIBCO) adicionando 10% de suero fetal bovino (ATCC). Todas las líneas mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂.

Tratamientos con GSK126

Las líneas celulares MCF 10A, MCF 7 y MDA-MB-231 fueron tratadas con GSK126 (BioVision) a 200 nM, 500 nM, 1000 nM y 2000 nM. Como vehículo se utilizó DMSO.

Extracción de RNA total usando TRIzol

Sembrar una caja p100 (CORNING) con la línea celular de interés.

1. Agregar 1 mL de TRIzol (Ambion) a la caja y agitar.
2. Con una pipeta, resuspender y pasar el volumen de TRIzol con células a un tubo de 1.5 mL nuevo.
3. Agregar 200 μ L de cloroformo y agitar fuertemente con un vórtex.
4. Centrifugar a 14,000 g por 15 min.
5. Recuperar la fase acuosa (transparente) y pasarla a un tubo nuevo.
6. Agregar 500 μ L de isopropanol. Agitar fuertemente.
7. Centrifugar a 14,000 g por 10 min.
8. Eliminar el sobrenadante.
9. Agregar 1 mL de etanol al 70%.
10. Centrifugar a 7,500 g por 5 min.
11. Eliminar el sobrenadante y dejar secando a temperatura ambiente.
12. Agregar 30 μ L libre de nucleasas.
13. Almacenar a -80°C.

Cuantificar la concentración de RNA usando en NanoDrop y correr un gel desnaturizante para evaluar la integridad del RNA.

RT-PCR en tiempo real usando sondas TaqMan

Transcripción reversa

- Usar de 1-10 ng de RNA total por cada 15 μ L de reacción de RT.

- Descongelar los componentes del Kit para RT y los oligos (vortexea) en hielo, mezclar suavemente y bajar con la nanofuga.

1. En un tubo de polipropileno, preparar la siguiente reacción:

Componente	Volumen
100mM dNTPs (con dTTP)	0.15 μ L
MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/ μ L)	1.00 μ L
10X reverse Transcriptor Buffer	1.50 μ L
RNase Inhibitor (20U/ μ L)	0.19 μ L
Agua libre de nucleasas	4.16 μ L
Volumen final	7.00 μ L

a) Cada 15 μ L de reacción de RT consiste en:

- 7 μ L de MasterMix
- 3 μ L de primer
- 5 μ L de la muestra de RNA

2. Mezclar gentilmente y bajar el volumen con la nanofuga.

3. Colocar el MasterMix en hielo hasta que se prepare la reacción de microRNAs.

Preparación de la reacción de RT:

1. Para cada 15 μ L de reacción de RT, mezclar 7 μ L de RT MasterMix con 5 μ L de RNA total (1-10 ng) y colocarlo en un tubo de polipropileno de 0.2 mL.

2. Mezclar gentilmente y bajar el volumen con la nanofuga (no exceder los 5 min o las 2000 RPM).

3. Agregar 3 μ L de primer para RT a cada muestra.

4. Mezclar gentilmente y bajar el volumen con la nanofuga.

5. Incubar el tubo en hielo por 5 min y mantenerlo en hielo hasta cargarlo en el termociclador.

Programa para el termociclador:

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	--	4

6. Colocar el volumen de la reacción en el termociclador (15 µL)

7. Cargar los tubos de reacción en el plato del termociclador.

8. Comenzar la corrida de la transcripción reversa.

Amplificación por PCR

- Proteger de la luz los componentes de la reacción.
- Mezclar la TaqMan Universal PCR Master Mix muy suavemente.
- Preparar la reacción antes de colocarla en el plato de reacción.

Preparación del plato de reacción para PCR (para una reacción de 20 µL)

Componente	Volumen
TaqMan MicroRNA Assay (20X)	1.00 µL
Producto de la reacción de RT	1.33 µL
TaqMan 2X Universal PCR MasterMix	10.00 µL
Agua libre de nucleasas	7.67 µL

Volumen final	20 μ L
---------------	------------

1. Haz el cálculo del volumen total de tus muestras.
2. En hielo, mezcla en la siguiente relación: 10 μ L de TaqMan 2X Universal PCR MasterMix y 7.67 μ L de agua libre de nucleasas (haciendo un volumen final de 17.67 μ L por muestra).
3. Mezcla gentilmente y baja el volumen con la nanofuga.
4. Coloca los 17.67 μ L de la mezcla anterior en un tubo para PCR.
5. Transfiere 1 μ L de 20X TaqMan MicroRNA Assay Mix en cada tubo.
6. Transfiere 1.33 μ L del producto de RT al tubo de PCR.
7. Mezcla gentilmente y baja el volumen con la nanofuga.
8. Prepara el plato de reacción para colocar 20 μ L de la mezcla en los pozos.
9. Sella el plato colocando una cubierta adhesiva, después centrifuga y elimina las burbujas.

Parámetros para el termociclador

Parámetro	Valor			
Modo de corrida	9600 emulation			
Volumen de la muestra	20 μ L			
Parámetros del termociclador	Paso	AmpliTaq Gold Enzyme Activation	PCR	
		HOLD	Ciclos: 40	
			Desnat	Anidado/ Extensión
	Tiempo	10 min	15s	60s
	Temp (°C)	95	95	60

Ajuste de Autoincremento	Default (0)
Ajuste de Rampa	Default (Estándar)
Datos	Default (60°C)

Para correr el plato:

1. En el software SDS, abre el documento que corresponde a la reacción del plato.
2. Carga el plato de reacción en el instrumento.
3. Comienza la corrida.

RT- PCR en tiempo real usando SYBR Green

Transcripción reversa

Se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems - # Cat 4374966).

1. Descongelar reactivos y muestras en hielo.
2. Preparar el RT Master Mix 2X (Para 20 µL de reacción)

Componente	Volumen (µL) / Reacción
10X RT Buffer	2.0
25X dNTP Mix (100mM)	0.8
10X RT Random Primers	2.0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0
RNAse Inhibitor	1.0
H ₂ O	3.2
Volumen final	10.0

3. Coloca el RT Master Mix 2X en hielo.

4. Agrega 10 µL de RT Master Mix 2X a un tubo de 0.2 mL.
5. Agrega 1 µg de RNA a cada tubo y completa un volumen de 10 µL con H₂O.
6. Tapa los tubos y centrifúgalos para bajar el volumen.

Programación del termociclador:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	Infinito

En este punto, las muestras se pueden almacenar a -20 °C o continuar con la amplificación por PCR.

Amplificación por PCR

Para este procedimiento se usó el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific - # Cat #K0221).

Oligos

Nombre del oligo	Secuencia
pri-miR-125b-1 FW	CCATACCACCTGTTTGTTCATCT
pri-miR-125b-1 RV	CTGAGAGGAGCGCAACAATGT
pri-miR-125b-2 FW	GAAGAATTCTACCGCATCAAACCA
pri-miR-125b-2 RV	CTGCAGACAATCAATAAGGTCCAA
BAK1 FW	GCTCCCAACCCATTCACTAC
BAK1 RV	TCCCTACTCCTTTCCCTGA
GAPDH FW	TGCTGGGAGTTGTAGTCTG
GAPDH RV	GATGCAGAAGAGGTGCAAG

1. Descongelar los reactivos y las muestras en hielo.
2. Preparar el Master Mix.

Componente	Volumen (µL) /Reacción
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	10.0
Oligo FW	0.5

Oligo RV	0.5
cDNA	1.0
H2O	8.0
Volumen final	20.0

- Colocar los tubos o placa en el termociclador de tiempo real (StepOne – Applied Biosystems) y programar el termociclador.

	45 ciclos		
	Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento
Temperatura	95 °C	95 °C	58°C
Tiempo	5 min	30 s	30 s (Lectura)

- Analizar los resultados usando doble delta Ct.

Inmunoprecipitación de la cromatina

Buffers

ross-linking	Buffer de lisis	Buffer de dilución	Buffer de lavados	Lavado final	Buffer de elución
11% Formaldehido 100mM NaCl 0.5mM de EGTA 50mM de HEPES pH 8.0 PARA 100ML	1% de SDS(10ml a 10%) 10mM de EDTA, pH 8.0 (2ml a 500mM) 50mM de Tris-HCl pH 8.0 (5ml a 10%). Todo con inhibidores de proteasas.	1% de Triton X-100 150mM de NaCl 2mM de EDTA pH 8.0 20mM de Tris-HCl pH 8.0 Todo con inhibidores de proteasas.	1% de Triton X-100 0.1% de SDS 150mM de NaCl 2mM EDTA, pH 8.0 20mM de Tris-HCl pH 8.0 Todo con inhibidores de proteasas.	1% de Tritón X-100 0.1% de SDS 500mM de NaCl 2mM de EDTA pH 8.0 20mM de Tris-HCl pH 8.0 Todo con inhibidores de proteasas.	1% de SDS 100mM NaHCO ₃

- CÉLULAS:** Para realizar este protocolo se necesitan crecer las células en 8 cajas de 150 mm con una confluencia del 80%.
- CROSSLINKING:** Una vez obtenido la cantidad de células necesarias se adiciona 2 mL de Buffer Cross-Linking Mix directamente al medio de las células (nota: su volumen

debe de ser de 20 mL) para que quede al 1% de formaldehído. Se dejan moviendo las células por 10 m.

3. DETENER EL CROSSLINKING: Una vez transcurrido el tiempo se detiene la reacción de crosslinking con la adición de 1 mL de glicina 2.5 M teniendo una concentración final de 125 mM. Se dejan 5 m agitando las células.
4. LAVADO DE PBS: Se retira el medio y se lavan las células 3 veces con PBS frío.
5. LISIS: Posteriormente, se remueve el PBS y se adicionan 1 mL de Buffer de Lisis a cada una de las cajas, y se incuba a 4°C de 3-5 minutos. Transcurrido el tiempo se cosechan las células con un *scraper* y se pasa la cromatina a un tubo de 50 mL.
6. SONICACIÓN: Para sonicar las células se toma la cromatina y se coloca el tubo en un vaso con hielo, para que se mantenga frío y no saque mucha espuma. Programa: 30 s pulso 2.0 0.5 Amplitud de 35%. Mientras se puede guardar la cromatina a 4°C.
7. EVALUACIÓN DE LA SONICACIÓN: Para determinar si la sonicación fue adecuada, se toman 50 µL de muestra. Se le adicionan 5 µL de RNAsa y se incuba a 37°C por 1 h. Posteriormente, se incuba con 5 µL de proteinasa K durante 1 h a 55°C. Y finalmente, se deja a 65°C por mínimo 5 horas u O/N. Después, se hacen 2 fenoles cloroformos (llevar la muestra a 400 µL para ello) y se precipita el DNA (agregando 300 µL de etanol 100% y 33.3 µL de acetato de amonio 5M). Posteriormente, se corre un gel al 1% para evaluar el tamaño de la cromatina que debe estar entre 500-700pb (dependiendo del tamaño del fragmento que DNA que quieras amplificar).
8. CROMATINA: Una vez que ya se tiene estandarizada la cromatina se puede medir la concentración del lisado, y se puede ajustar a 1 µg/µL adicionando buffer de lisis (Esto se puede guardar a 4°C por varios meses). CHECAR LA CONCENTRACIÓN DE CROMATINA EN CHIP.
9. INMUNOPRECIPITACIÓN (1 IP): Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se centrifugan 420ul de la cromatina por 5 minutos a 4000RPM (EN LA CENTRIFUGA BLABLA...), se puede hacer en la centrífuga no refrigerada. Con cuidado se toma 400ul de la cromatina y se lleva a un volumen final de 4ml de una mezcla de 9 partes de Dilution Buffer y 1 parte de Buffer de lisis todo con inhibidores de proteasas (todo esto en un tubo falcon de 15ml).

10. PRE-CLEANING: Se limpian las cromatinas (dependiendo la cantidad de cromatina se adicionan de 10-50 uL de las perlas A/G) se dejan agitando (en el rotador orbital) en cuarto frío (4°C) de 2h a ON. Se centrifuga a 2000RPM (800g) de 2-3 minutos máximo. Se recupera el sobrenadante para hacer la inmunoprecipitación.
11. ANTICUERPOS: Se adicionará 4 ug de anticuerpos por cada IP que se pretenda realizar y se deja rotando a 4°C por mínimo 6hrs u O/N.

Anticuerpo	Número de catálogo	Compañía
α -H3K27me3	07-449	Millipore
α -H3K9me3	ab-8898	Abcam
α -CTCF	07-729	Millipore

12. PREPARACIÓN DE PERLAS: Se toman 0.2 g de proteína A (Amersahm Protein A sepharose CL-4B) y 100ul de perlas proteína G (Ge Healthcare protein G sepharose) en un volumen final de 2ml de Buffer de dilución 9:1 lisis Buffer (1.8ml de buffer de dilucion 9:1 y 200ul de Lisis Buffer). A esta mezcla se le adicionan 100ug/ml de BSA (20ul de BSA al 10%) y 500ug/ml de esperma de salmón (50ul de esperma a 10ug/ul) y se dejan rotando a la par con los AB de las IPS. Al día siguiente se retira el buffer de las perlas y se lavan dos veces con buffer de dilución y se resuspenden e un buffer de 9:1 de buffer de dilución y buffer de lisis (2ml vol final).
13. AGREGAR PERLAS A LAS IP's: Se ponen 50ul de perlas a cada uno de los flacon y se incuban 2hrs mientras están rotando a 4°C.
14. LAVADO DE PERLAS: Se centrifugan los falcon a 2000rpm por 2 minutos y con mucho cuidado se quita el sobrenadante. Se llevan las perlas con 1ml de Buffer Wash y se transfieren a un tubo eppendorf. Se lavan las perlas adicionándoles 3 veces más 1ml de Buffer de Wash (total de lavados 4 con Buffer Wash) y finalmente se lava 1 vez con 1ml de Final Wash (NOTA: No se aspire el líquido, pues se pueden perder las perlas y las centrifugaciones entre lavados es de 2 minutos a 2000rpm).

15. ELUCION DEL DNA: Para eluir las IPs se adicionan 450ul de Elution Buffer y se adicionan proteinasa K y RNasa A (500ug/ml cada una) y se incuba a 37oC por 30 minutos.
16. TOMAR EL INPUT: Para ello de la cromatina restante se toman 400ul de esta y se tratan de la misma forma que las IP's.
17. REVERTIR EL CROSSLINKING: Se dejan las muestras a 65oC por 6 horas u O/N.
18. LIMPIEZA DEL DNA: Se harán Fenoles/Cloroformo de las IP y se pueden precipitar usan 20ug de glicógeno, o también se pueden utilizar las columnas de Qiagen mini-elute para obtener el DNA.
19. RESUSPENDER DEL DNA: Se resuspende el DNA con 50ul de agua esteril. Incubando a 37oC por 30 minutos y posteriormente se procede a realizar la PCR.
NOTA: El INPUT se puede diluir 1/100 a 1/400 y de ahí utilizar 2 ul por PCR.

Para este procedimiento se usó el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific - # Cat #K0221).

Oligos

Nombre del oligo	Secuencia
miR-125b-1 Prom 1 FW	TATCTGGGGGCGCATATACA
miR-125b-1 Prom 1 RV	TGGGCATTTCTGAGTCTGTG
miR-125b-1 Prom 2 FW	TAATCTCACCAGCAAGTGGC
miR-125b-1 Prom 2 RV	TTCCCTTTCTTCCTTCGGC
CTCF 1 FW	GCACAAATCAGCGACAAGTT
CTCF 1 RV	GTTGCCTCCTGTAACCAGAC
CTCF 2 FW	AGTCCTGTTGGTCAGTAAAGC
CTCF 2 RV	CCCTTTGAGACCACTTGAGC
CTCF 3 FW	AGGAAGGTCTCTGAAGCACA
CTCF 3 RV	TATCCAGAGGCAAAGCAGC
CTCF 4 FW	TTCTGCGCTTCCAAAATTCC
CTCF 4 RV	TCACACAGAGGCTGTTCTTC
CTCF 5 FW	CGACCATGTTGTCCTCAAGT
CTCF 5 RV	GACGACCTACCTTGGCTTTT

1. Descongelar los reactivos y las muestras en hielo.
2. Preparar el Master Mix.

Componente	Volumen (µL) /Reacción
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	10.0
Oligo FW	0.5
Oligo RV	0.5
cDNA	1.0
H2O	8.0
Volumen final	20.0

- Colocar los tubos o placa en el termociclador de tiempo real (StepOne – Applied Biosystems) y programar el termociclador.

		45 ciclos	
	Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento
Temperatura	95 °C	95 °C	58°C
Tiempo	5 min	30 s	30 s (Lectura)

- Analizar los resultados usando doble delta Ct adaptado para inmunoprecipitación de la cromatina, de acuerdo al protocolo de Abcam.

Western blot

Lisis

- Realizar todo el procedimiento en hielo.
- Lavar las células con PBS (1x) y eliminar todo el PBS.
- Preparar Buffer de Lisis

Buffer de Lisis

- Cell Lysis Buffer (10x) (Cell Signaling, Cat #9803) o en su caso buffer RIPA
- Coctel de Inhibidores de proteasas (*Cell. Signaling, Cat #:5871*)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). (Sigma, # Cat. P7626)
- Ortovanadato de sodio (*Sigma, Lot #. 069K0031*)

Agregar coctel de inhibidores (1 μ L del coctel por cada 100 μ L de buffer de lisis). Agregar PMFS y Ortovanadato de Sodio (en caso de ser necesario) a una concentración final de 1 mM cada uno en el buffer de lisis.

4. Agregar 250 μ L del buffer de lisis para una caja de 10 cm de diámetro con una confluencia celular del 80 al 90%.
5. Incubar en hielo por 5 minutos
6. Despegar las células con un raspador de células, presionando firmemente sobre el plástico de la caja de cultivo. Recuperar todo el lisado.
7. Tomar el lisado con una micropipeta de 1 mL y agregarlo a un tubo de 1.5 mL.
8. Centrifugar a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4°C.
9. Tomar el sobrenadante con cuidado de no tomar nada del pellet.
10. Guardar la proteína a -20°C.

Gel Concentrador y Separador

- Solución de Acrilamida Bis Acrilamida 40% (*Sigma, # Lote:SLBHO323V*)
- H₂O milliQ
- Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10% (*BIO-RAD, # Cat.161-0301*)
- Persulfato de Amonio (APS) 10% (*BIO-RAD, # Cat. 161-0700*)
- TEMED (*Sigma # Lote:71K1515*)
- Tris 0.5 M (*BIO-RAD # Cat. 161-0716*)

1. Agregar la cantidad de reactivo correspondiente con respecto al porcentaje del gel que se desea preparar.

Cantidad de reactivo por cada gel:

Porcentaje del gel de poliacrilamida	Agua MilliQ	Buffer de Tris (pH 8.8/6.8)*	Acrilamida/Bisacrilamida al 40%	Duodecil Sulfato de sodio (SDS) al 10%	Persulfato de amonio al 10%	TEMED**
Gel Separador						
<i>Gel al 8%</i>	5.33 mL	2.5 mL	2 mL	100 μ L	50 μ L	10 μ L

Gel al 10%	4.84 mL	2.5 mL	2.5 mL	100 µL	50 µL	10 µL
Gel al 12%	4.34 mL	2.5 mL	3 mL	100 µL	50 µL	10 µL
Gel al 14%	3.83 mL	2.5 mL	3.5 mL	100 µL	50 µL	10 µL

Gel Concentrador						
Gel al 4%	3.20 mL	1.311 mL	0.658 mL	525 µL	14 µL	5.83 µL

* La preparación del gel separador contiene Buffer de Tris-HCL (pH 8.8) y la preparación del gel concentrador contiene Buffer Tris-HCL (pH 6.8)

2. Preparar gel separador con las cantidades de reactivos adecuadas al porcentaje del gel deseado. Agregar agua o isopropanol para alinear el gel.
3. Dejar polimerizando el gel separador durante 25 minutos aproximadamente a temperatura ambiente.
4. Desechar por decantación el agua o isopropanol del equipo de preparación de geles.
5. Secar la superficie del gel separador con papel filtro.
6. Preparar gel concentrador con las cantidades de reactivos adecuadas.
7. Dejar polimerizar el gel concentrador durante 25 minutos aproximadamente a temperatura ambiente.

Corrida de proteínas por SDS-PAGE

Buffer de carga Laemmli (5X):

- 6 mL Tris 0.5 pH 6.8 (BIO-RAD # Cat. 161-0716)
- 2.5 mL glicerol (Fermont, # Lote: 525432)
- 0.5 mL H₂O MilliQ
- 0.5 mL β-mercaptoetanol (BIO-RAD, Cat # 161-0710)
- 1 g Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) (BIO-RAD, # Cat.161-0301)
- 0.002 g de Azul de Bromofenol (Sigma, # Lot. 66H3672)

Agregar como reactivo final el β-Mercaptoetanol, hacer alícuotas y congelar.

Buffer de Corrida 10x:

- 32.2 g. de Tris 0.5 M (BIO-RAD # Cat. 161-0716)
- 144 g. de Glicina (Promega, # Lot. 0000155432)

- 10 g. de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS).

Ajustar pH a 8.3 y aforar a 1L.

1. Preparar muestras en tubos de 0.6 mL utilizando un máximo de 35 μ L para cada uno de los pozos con buffer Laemmli al (1x) y agua MilliQ.
2. Hervir las muestras durante 5 minutos en baño María.
3. Dejar las muestras en hielo durante 2 minutos.
4. Centrifugar los tubos en la nanofuga.
5. Cargar las muestras en cada uno de los pozos del SDS-PAGE dentro de la cámara de electroforesis con Buffer de corrida al 1x.
6. Correr en la cámara de electroforesis a 100 Voltios.

Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Buffer de Transferencia 10X:

30 g Tris-Base 25 mM (BIO-RAD # Cat. 161-0716)

145 g Glicina 190 mM (Promega, # Lot. 0000155432)

Metanol (J.T. Baker, # Cat. 9070-03): 20% para nitrocelulosa ó 10% para PVDF.

Aforar a 1 L.

Membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Inmobilon # Cat. IPVH00010)

1. Retirar el gel de poliacrilamida del equipo de electroforesis (cámara de corrida, cristales, etc.).
2. Cortar el área del gel en donde se espera que se encuentre la(s) proteína(s) de interés.
3. Cortar membranas de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) a un tamaño aproximado al gel de poliacrilamida.
4. Activar la membrana en metanol absoluto durante 5 minutos aproximadamente.
5. Hidratar las membranas de PVDF en Buffer de Transferencia 1x durante 5 minutos aproximadamente.

6. Colocar la membrana de PVDF sobre el gel, y formar un “sándwich” con las esponjas y trozos de papel filtro hidratado con Buffer de Transferencia 1x.
7. Montar el sándwich en el cassette de transferencia y colocarlo en la cámara de transferencia con 1.5 L de Buffer de transferencia al 1x.
8. Correr en la cámara de transferencia a 100 Voltios durante 1 hora con 30 minutos.

Bloqueo de la membrana

Solución Buffer Tris (TBS) Tween20 al 0.1%

- NaCl 150 mM (J. K. Baker, #Cat. 3624-01)
- Tris-HCL 20mM (BIO-RAD, # Cat. 161-0716)
- Tween20 (Sigma, Lot # SLBN3325V)

Ajustar el pH a 7.5.

Solución con Leche 5%

- Leche en polvo, *Svelty* de NESTLE, cero grasas.
- TBS Tween al 0.1%

1. Retirar las membranas de PVDF del cassette de transferencia.
2. Lavar con TBS Tween al 0.1% (Reactivos y Materiales) durante 15 minutos aproximadamente.
3. Bloquear con Leche (*Svelty*) al 5% en TBS Tween al 0.1% durante 1 hora aproximadamente.
4. Lavar 4 veces con TBS Tween al 0.1% durante 15 minutos por lavado.

Incubación con anticuerpos primarios

Anticuerpo	Número de catálogo	Compañía
α -H3K27me3	07-449	Millipore
α -H3K9me3	ab-8898	Abcam

α -H3	H0164	Sigma
α -CTCF	07-729	Millipore
α -BAK1	sc-832	Santa Cruz
α -GAPDH	sc-25778	Santa Cruz

Solución con Albumina de suero Bovino (BSA) al 3%

- Albumina de suero bovino (BSA) (Sigma, Lot # SLBM2234V).
- TBS Tween al 0.1%.

1. Colocar las membranas de PVDF en contenedores o bolsas de incubación.
2. Preparar una dilución del anticuerpo primario en 1 ml de BSA al 3% con TBS Tween en las concentraciones requeridas en la hoja técnica del anticuerpo.
3. Agregar la dilución del anticuerpo primario en contenedores o bolsas de incubación.
4. Incubar la(s) membrana(s) dentro del contenedor o bolsa de incubación a 4 °C toda la noche.

Incubación con anticuerpos secundarios

Solución con Leche 5%

- Leche en polvo, *Svelty* de NESTLE, cero grasas.
- TBS Tween al 0.1%

Solución Buffer Tris (TBS) Tween20 al 0.1%

- NaCl 150 Mm (J. K. Baker, #Cat. 3624-01).
- Tris-HCL 20mM (*BIO-RAD*, # Cat. 161-0716).
- Tween20 (Sigma, Lot # SLBN3325V).

Anticuerpo	Número de catálogo	Compañía
Anticuerpo secundario α -conejo	NB7187	NOVUS

1. Colocar la membrana de PVDF en un contenedor con TBS Tween al 0.1%.
2. Lavar 4 veces con TBS Tween al 0.1% durante 15 minutos cada lavado.
3. Preparar una dilución del anticuerpo secundario en un volumen necesario para cubrir toda la membrana con Leche (*Svelty*) al 5%, de acuerdo a las concentraciones requeridas en la hoja técnica del anticuerpo secundario.
4. Agregar la dilución del anticuerpo secundario a la(s) membrana(s) en el(los) contenedor(es).
5. Incubar durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Revelado

Solución Buffer Tris (TBS) Tween20 al 0.1%

- NaCl 150 Mm (J. K. Baker, #Cat. 3624-01).
- Tris-HCL (*BIO-RAD*, # *Cat. 161-0716*).
- Tween20 (Sigma, Lot # SLBN3325V).

Sustrato Quimioluminiscente para HRP (Luminol y Peróxido) (Millipore, Cat # WBKLS0500)

Revelador y reforzador al 20% (Sigma. Cat # P7042-1GA)

Fijador y reforzador al 20% (Sigma. Cat # P7167-1GA)

Placas de revelado Amersham Hyperfilm ECL. (GE Healthcare, Lot # 64102)

1. Lavar 4 veces con TBS Tween al 0.1% durante 15 minutos cada lavado.
2. Preparar una solución de quimioluminiscencia con el reactivo de luminol y peróxido a una proporción de 1:1 en un contenedor nuevo.
3. Secar la(s) membrana(s) de TBS Tween al 0.1%.
4. Agregar el reactivo de quimioluminiscencia a toda la superficie de las membranas de PVDF.
5. Incubar la membrana con el reactivo de quimioluminiscencia por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Eliminar el exceso de reactivo quimioluminiscente.

7. Cubrir la membrana con una envoltura plástico/hule limpio o una hoja protectora y eliminar las burbujas de aire.
8. Revelar las placas Amersham Hyperfilm ECL con luz roja en variados rangos de tiempo.