



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE BORIS EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
GÉNICA EN UN MODELO DE CÁNCER DE OVARIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARISOL SALGADO ALBARRÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX., NOVIEMBRE , 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.


Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 11 de septiembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **SALGADO ALBARRÁN MARISOL** con número de cuenta **307287203**, con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE BORIS EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN UN MODELO DE CÁNCER DE OVARIO"**, realizada bajo la dirección del **DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS**:

Presidente: DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA
Vocal: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
Secretario: DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO
Suplente: DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN
Suplente: DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 09 de noviembre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de maestría dentro de este programa.

De igual manera agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado en el programa de becarios (CVU 659273), al Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS, 0261181), Fondo Mixto SEP-CONACyT (182997).

A mi tutor principal, el Dr. Ernesto Soto Reyes Solís y a los miembros de mi comité tutor, la Dra. Elena Aréchaga Ocampo y el Dr. Sergio Juárez Méndez, por los aportes realizados a mi trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco al Dr. Jan Baumbach de la Universidad del Sur de Dinamarca, quien me permitió realizar una estancia de investigación con duración de tres meses con su grupo de trabajo, donde realicé los análisis bioinformáticos presentados en este proyecto de tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de figuras	I
Abreviaturas	II
Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	3
1.1 CTCF.....	4
1.1.1 Interacción CTCF-DNA	4
1.1.1.1 Metilación del DNA	7
1.1.1.2 Interacción CTCF-RNA	7
1.1.2 Funciones de CTCF	8
1.1.2.1 Impronta	9
1.1.2.2 Regulación de la transcripción	11
1.1.2.3 Establecimiento de la estructura tridimensional de la cromatina	11
1.1.2.4 Organización de la cromatina perinucleolar	12
1.2 BORIS.....	13
1.2.1 El gen CTCFL.....	13
1.2.1.1 Regulación de la expresión de CTCFL.....	13
1.2.1.2 Variantes de empalme alternativo de exones de CTCFL.....	15
1.2.2 La proteína BORIS	15
1.2.2.1 Interacción BORIS-DNA	17
1.2.3 Funciones de BORIS	19
1.2.3.1 BORIS en espermatogénesis	19
1.2.3.2 BORIS en impronta.....	22
1.2.3.3 Otras funciones de BORIS	24
1.2.4 BORIS en cáncer.....	25
1.3 Cáncer epitelial de ovario.....	27
1.3.1 El gen MUC16	27
1.3.2 El gen MUC1	29
1.3.3 El RNA no codificante largo MALAT1.....	30
1.3.4 BORIS en cáncer de ovario.....	31
Planteamiento del problema	33
Objetivos.....	34

1.4	Objetivo principal	34
1.5	Objetivos particulares	34
	Estrategia experimental	35
	Resultados	37
1.6	Caracterización de BORIS en líneas celulares de cáncer de ovario.....	37
1.7	Generación del modelo Knock Down (KD) y Knock Out (KO) de BORIS en OVCAR3	39
1.8	Evaluación de la expresión de los genes MUC1, MUC16 y MALAT1 en células KD y KO de BORIS	41
1.9	Análisis de los perfiles de expresión en el modelo KD y KO de BORIS	45
	Discusión.....	51
1.10	BORIS está presente en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario.	51
1.11	BORIS participa en la represión transcripcional de RNAs pequeños no codificantes, tales como SNORDs, SNORAs y SCARNAs.....	54
1.12	BORIS participa en la regulación transcripcional de genes expresados en testículo y asociados a cáncer.	58
	Conclusión.....	63
	Perspectivas	64
	Metodología.....	65
1.13	Líneas celulares.....	65
1.14	RT-PCR y PCR cuantitativa	65
1.15	Extracción de proteína y Western Blot	67
1.16	Transfecciones de siRNAs.....	68
1.17	Transfección de plásmido CRISPR/Cas9	69
1.18	Análisis de los perfiles de expresión	69
1.18.1	Análisis de expresión diferencial	70
1.18.2	Análisis de enriquecimiento de vías	70
	Literatura citada.....	71
	Anexos varios: Información académica.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La proteína CTCF y su interacción con el DNA	5
Figura 2. Funciones de CTCF en la regulación de la transcripción y en la organización tridimensional de la cromatina.	10
Figura 3. Estructura génica de <i>CTCF</i> y <i>CTCFL</i>	13
Figura 3. Representación esquemática de la región promotora de <i>CTCFL</i>	14
Figura 4. Variantes de splicing de <i>CTCFL</i>	16
Figura 5. Secuencia de aminoácidos del dominio de 11 ZF de BORIS	17
Figura 6. Modelo de los 2xCTSs y su ocupación por BORIS y CTCF	18
Figura 7. Esquema de diferenciación durante la espermatogénesis.....	20
Figura 8. Esquema de la estrategia experimental empleada.	36
Figura 9. Expresión de <i>CTCFL</i> en líneas celulares de cáncer de ovario	38
Figura 10. Abundancia de BORIS en líneas celulares de cáncer de ovario.....	39
Figura 12. Eficiencia de disminución de BORIS con transfecciones de siRNAs...	40
Figura 13. Eficiencia de disminución de BORIS con transfecciones de plásmido CRISPR/Cas9	41
Figura 14. Expresión de los genes <i>MUC1</i> , <i>MUC16</i> y <i>MALAT1</i> en células KD de BORIS	43
Figura 15. Expresión de los genes <i>MUC1</i> , <i>MUC16</i> y <i>MALAT1</i> en células KO de BORIS	44
Figura 16. Genes con expresión diferencial en los modelos KD y KO.....	45
Figura 17. Red de interacciones proteína-proteína identificada con los genes diferencialmente expresados en los modelos KD y KO	47
Figura 18. Red de regulación transcripcional identificada con los genes diferencialmente expresados en los modelos KD y KO	49

ABREVIATURAS

CEO	Cáncer epitelial de ovario
ChIP-seq	Inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación
CpG	Citosina y guanina adyacentes unidos por un fosfato
CTA	Antígenos de cáncer y testículo
CTSs	Sitios de unión a CTCF
DMR	Región diferencialmente metilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ICR	Región de control de impronta
KD	Knock Down
KO	Knock Out
pb	Pares de bases
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciación de RNA
<i>sf1-6</i>	Subfamilia de isoformas de <i>CTCF</i> 1 a 6
TFs	Factores de Transcripción
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UTR	Region no traducida de mRNA
WT	Wild type o silvestre
ZF	Dedo de zinc

Resumen

El gen *CTCF* posee un gen parálogo conocido como *CTCF-Like*, que codifica a la proteína BORIS. Este gen se expresa principalmente en espermatoцитos, en tejidos de alto recambio como la epidermis y de manera anormal en diferentes neoplasias, donde se ha sugerido que participa en la regulación transcripcional de múltiples genes. Actualmente se desconocen a detalle los genes regulados por BORIS en cáncer. En cancer de ovario la sobreexpresión de *CTCFL* se ha relacionado con una menor sobrevida y mal pronóstico.

En el presente trabajo, con el objetivo de identificar los genes regulados directa o indirectamente por BORIS, utilizamos microarreglos de expresión y PCR cuantitativa en células derivadas de cáncer de ovario deficientes y con presencia endógena de BORIS.

Encontramos que BORIS participa en la regulación transcripcional de múltiples genes, entre ellos las mucinas *MUC1*, *MUC16*, el lncRNA *MALAT1* y *AR*; los cuales han sido ampliamente utilizados como biomarcadores de metástasis y progresión en cáncer. Asimismo, la disminución de BORIS está relacionada con la regulación transcripcional de RNAs no codificantes como *SNORDs*, *SNORAs* y *SCARNAs*, y de genes involucrados en las vías de EGFR, HIF y Beta cateninas.

Nuestros datos proponen que BORIS podría tener una participación relevante en cáncer de ovario, donde esta proteína podría ser un novedoso biomarcador de pronóstico.

Abstract

The *CTCF* gene has a paralog gene known as *CTCF-Like*, which encodes the BORIS protein. This gene is mainly expressed in spermatocytes, in tissues of high renewal rate such as epidermis and is abnormally expressed in different neoplasms, where it can participate in the transcriptional regulation of multiple genes. Currently, the genes regulated by BORIS in cancer are not fully known. In ovarian cancer, *CTCFL* overexpression has been associated with decreased survival and poor prognosis.

The aim of the present study was to identify genes regulated by BORIS directly or indirectly, by using expression microarrays and quantitative PCR in ovarian cancer-derived cells with deficient and endogenous presence of BORIS.

We found that BORIS is involved in the transcriptional regulation of multiple genes, including mucins, such as *MUC1*, *MUC16*, the lncRNA *MALAT1* and AR; which have been widely used as metastasis and progression biomarkers in cancer. Furthermore, the decrease of BORIS is related with the transcriptional regulation of non-coding RNAs such as SNORDs, SNORAs and SCARNAs, and genes involved in the EGFR, HIF and Beta catenin pathways.

Our data suggest that BORIS could have a relevant participation in ovarian cancer be and could novel prognostic biomarker.

Introducción

Los mecanismos epigenéticos son esenciales en el desarrollo normal de un individuo y en el mantenimiento de los patrones de expresión de un tejido; estos mecanismos incluyen la metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de histonas, RNAs no codificantes y la organización tridimensional de la cromatina dentro del núcleo¹.

En cáncer, la activación o represión de oncogenes y de genes supresores de tumor ha sido un mecanismo ampliamente estudiado². Sin embargo, la participación de la maquinaria epigenética es reconocida como un factor fundamental en el desarrollo del cáncer. Cambios en estos mecanismos pueden derivar en funciones celulares alteradas como la transformación maligna en cáncer³. Un ejemplo de lo anterior es la proteína CTCF, la cual participa en la activación y represión transcripcional mediando la organización tridimensional de la cromatina. CTCF participa en procesos normales de la célula y su alteración en cáncer ha sido ampliamente estudiada⁴⁻⁶.

El gen **CTCF** y su parálogo **CTCFL** (que codifica para la proteína **BORIS**) forman una familia génica que codifican para factores nucleares que regulan la transcripción génica^{7,8}. Ambas proteínas son de especial interés ya que se ha observado que en cáncer sus funciones se encuentran alteradas, tal es el caso del gen TP53 regulado por CTCF⁹.

1.1 CTCF

El gen *CTCF* codifica para una proteína ubicua presente en vertebrados con múltiples funciones, como la represión y activación transcripcional¹⁰, como proteína *insulator*¹¹ en impronta¹², en la inactivación del cromosoma X¹³ y en la arquitectura u organización tridimensional de la cromatina dentro del núcleo mediante la formación de asas^{14,15}.

CTCF tiene un dominio central con 11 dedos de zinc (ZF) y dominios N- y C-terminales. Los ZF le permiten a la proteína reconocer sitios específicos del DNA y los dominios terminales participan en el reclutamiento de proteínas en conjunto con los ZF¹⁶.

1.1.1 Interacción CTCF-DNA

Las múltiples funciones de CTCF están dadas por su versatilidad para reconocer varios sitios en el genoma utilizando el dominio de 11ZF. Wang y colaboradores en el 2012 identificaron que CTCF tiene aproximadamente 77,811 sitios de unión (*CTCF sites*, *CTSs*), de los cuales 27,662 están representados en 18 diferentes líneas celulares y 50,149 son variables¹⁷. De estos sitios, el 44.6% se encuentra en intrones, 37.6% en zonas intergénicas, 12.1% en promotores, 3.1% en exones y 2.6% en UTRs¹⁷ (Figura 1A), indicando que CTCF reconoce sitios en el genoma altamente variables. Con el propósito de identificar de mejor manera los sitios de unión de CTCF, se realizaron experimentos de inmunoprecipi-

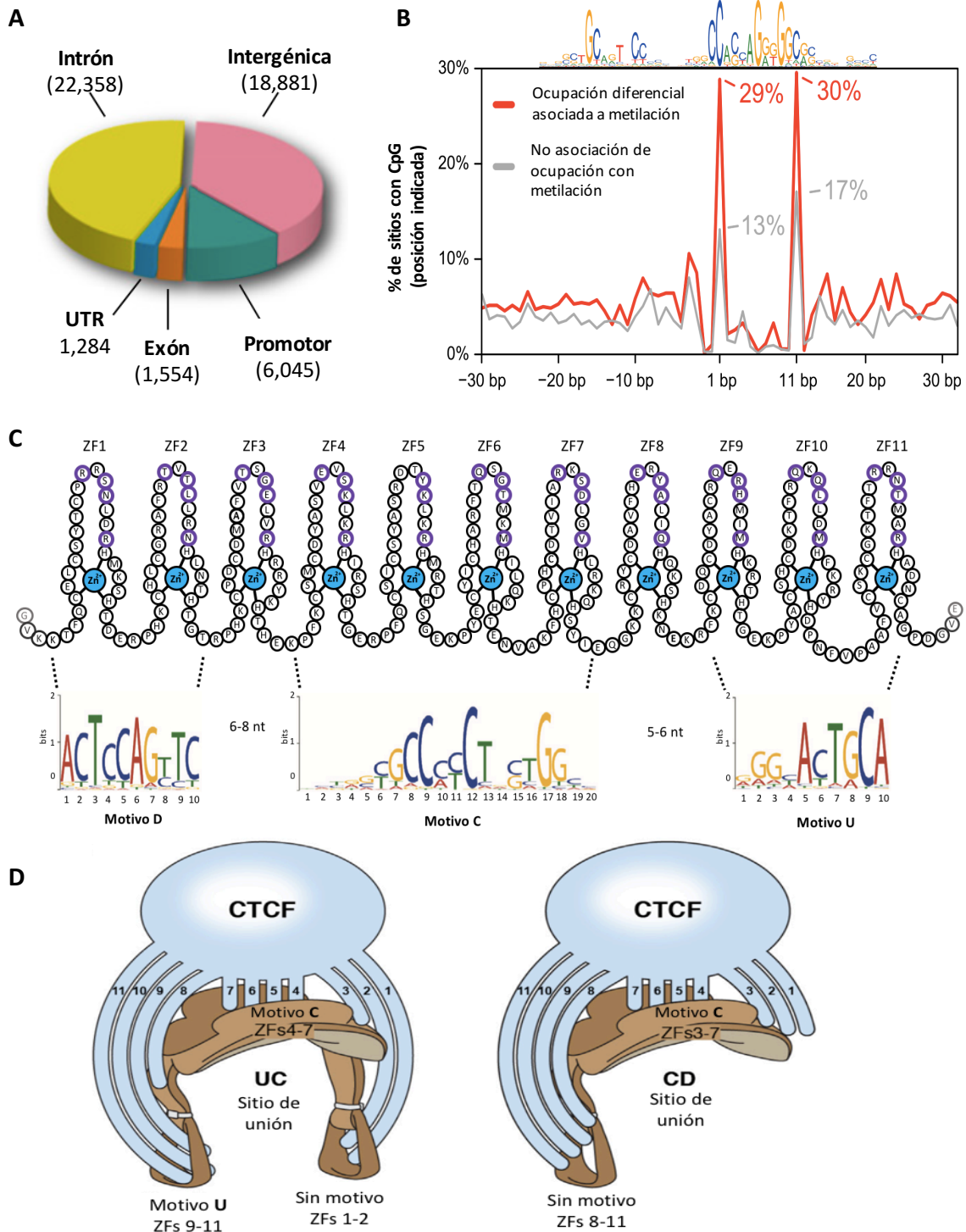


Figura 1. La proteína CTCF y su interacción con el DNA. A) Distribución de los sitios de unión de CTCF en el genoma. B) Porcentaje de sitios con CpGs cuya ocupación por CTCF está asociada a metilación. C) Estructura de los 11ZF del dominio central de CTCF. En morado se indican los aminoácidos necesarios para la interacción con el DNA y en la parte inferior se muestra el motivo de unión. D) Modelo de “silla de caballo” en el que los ZF centrales 4-7 reconocen una secuencia core y los ZF 8-11 proporcionan estabilidad a la interacción CTCF-DNA. Los ZF 1-3 no tienen una secuencia de reconocimiento. Tomado y modificado de ^{8,17,18}

tación de la cromatina y secuenciación masiva (ChIP-seq), los cuales muestran un motivo “core” de ~20 pb¹⁹; sin embargo, existe una gran variabilidad en la secuencia de nucleótidos en este motivo a lo largo de todo el genoma, por lo que no se tiene definida una secuencia consenso para los CTSs^{19,20}.

Dada la gran variabilidad de sitios que son reconocidos por CTCF, se ha hecho un esfuerzo por entender con mayor profundidad el mecanismo de como CTCF utiliza sus 11ZF para interaccionar con el DNA, proponiendo así un modelo conocido como el “código CTCF”¹⁶. Este modelo derivó de experimentos donde mutaciones o deleciones, en uno o varios ZF, provoca que CTCF no pueda unirse a los CTSs^{10,21}.

Estudios posteriores usando datos de ChIP-seq mostraron que la unión de CTCF está dada por un motivo *core* (presente en el 80% de los CTSs) que es reconocido por los ZF 4-7. Además, existe un motivo adyacente río arriba, reconocido por ZF 9-11 que estabiliza la unión. Y finalmente, en algunos CTSs se encuentra un motivo río abajo que disminuye la afinidad de CTCF a los sitios blanco (Figura 1C). Cuando el motivo río arriba no está presente, los ZF 1-2 ayudan a la estabilización de la interacción CTCF-DNA, a este modelo se le conoce como “silla de caballo”¹⁸ (Figura 1D).

Por lo tanto, entender el mecanismo por el cual, CTCF y proteínas con funciones similares a ésta, reconocen sus sitios de unión ha sido una limitante en el estudio de la regulación transcripcional, al igual que su participación en la regulación tejido-específico.

1.1.1.1 Metilación del DNA

Uno de los factores que influyen en el reconocimiento de una secuencia en el DNA mediada por CTCF es la metilación del DNA.

Inicialmente se propuso que, dado que los CTSs son ricos en los nucleótidos guanina y citosina, la metilación de estos podría influenciar su interacción con CTCF¹². Actualmente se sabe que la interacción CTCF-DNA es sensible a metilación: cuando los CTSs se encuentran metilados, CTCF pierde afinidad por el DNA¹⁷ (Figura 1B). Este fenómeno es común en secuencias a las que CTCF se une de manera tejido-específica¹⁷.

De manera interesante, la relación entre la metilación del DNA y CTCF ocurre de manera bidireccional: la metilación influye en la capacidad de unión de CTCF (mencionado anteriormente), y CTCF también regula la metilación del DNA en los sitios en los que se encuentra. Esto último ocurre mediante la activación de la Poli(ADP-ribosa) Polimerasa 1 (PARP1), que a su vez inactiva a la DNA metil transferasa 1 (DNMT1), con lo que se favorece el manteniendo de los sitios CpGs no metilados²²⁻²⁴.

1.1.1.2 Interacción CTCF-RNA

Por otro lado, se ha demostrado que CTCF no solamente es capaz de interaccionar con el DNA usando sus ZF, sino que también tiene capacidad de unión a RNA. Saldaña-Meyer et al. (2014) reportaron que CTCF utiliza los ZF 10 -

11 en conjunto con el dominio C-terminal de la proteína (*RNA binding region*, RBR)²⁵. Además, el modelo de “silla de caballo” propone que los ZF 9-11 se asocian con un segundo dominio río arriba, presente únicamente en el 15% de los sitios; por lo tanto, en el 85% de los sitios, CTCF tiene libres estos mismos ZF que podrían potencialmente participar en interacciones adicionales con RNA. Las interacciones CTCF-RNA podrían participar en la formación de complejos multiméricos, mediante el RBR; sin embargo, aun no queda claro si algunas asas de cromatina formadas por CTCF están mediadas por RNA y la importancia biológica de estas interacciones en la regulación de la transcripción aun es desconocida.

1.1.2 Funciones de CTCF

El mecanismo principal por el cual CTCF puede llevar a cabo sus distintas funciones es debido a su capacidad de unión con el DNA y por favorecer interacciones de larga distancia entre dos o más secuencias, estableciendo asas de cromatina²⁶ (Figura 2). Estas asas de cromatina participan en la función de CTCF como elemento frontera, como proteína *insulator* en genes improntados, como regulador transcripcional (favoreciendo la interacción CTCF y potenciadores), así como regulador de la estructura tridimensional de la cromatina⁴.

1.1.2.1 Impronta

La impronta genómica es un mecanismo de regulación transcripcional que limita la expresión de un grupo de genes a un solo alelo parental. El ejemplo más estudiado de impronta es el caso del *locus IGF2/H19*. Este *locus* contiene una Región Diferencialmente Metilada (DMR), o Región de Control de la Impronta (ICR), localizada entre ambos genes. El ICR controla que el gen *H19* se encuentre activo en el alelo materno, *IGF2* inactivo en el paterno y viceversa^{27,28}.

Una de las funciones mejor estudiadas de CTCF es la regulación de genes improntados, bloqueando la actividad de potenciadores o también conocidos como *enhancers* (

Figura 2A). CTCF es una proteína sensible a la metilación del DNA, que únicamente puede unirse al ICR no metilado del alelo materno y previene la interacción *enhancer-IGF2*. En cambio, en el alelo paterno, el ICR se encuentra metilado y CTCF no puede unirse, favoreciendo la interacción *enhancer-IGF2*^{11,12} (

Figura 2B). Por lo tanto, cambios en el estado de metilación del DNA o alteraciones en los patrones de unión de CTCF al ICR puede generar cambios estructurales en la formación de asas de cromatina, alterando así la expresión de estos genes. Se sabe que afectaciones en el *locus IGF2/H19* ocasiona síndromes como Beckwith-Wiedemann y Silver-Russell²⁹.

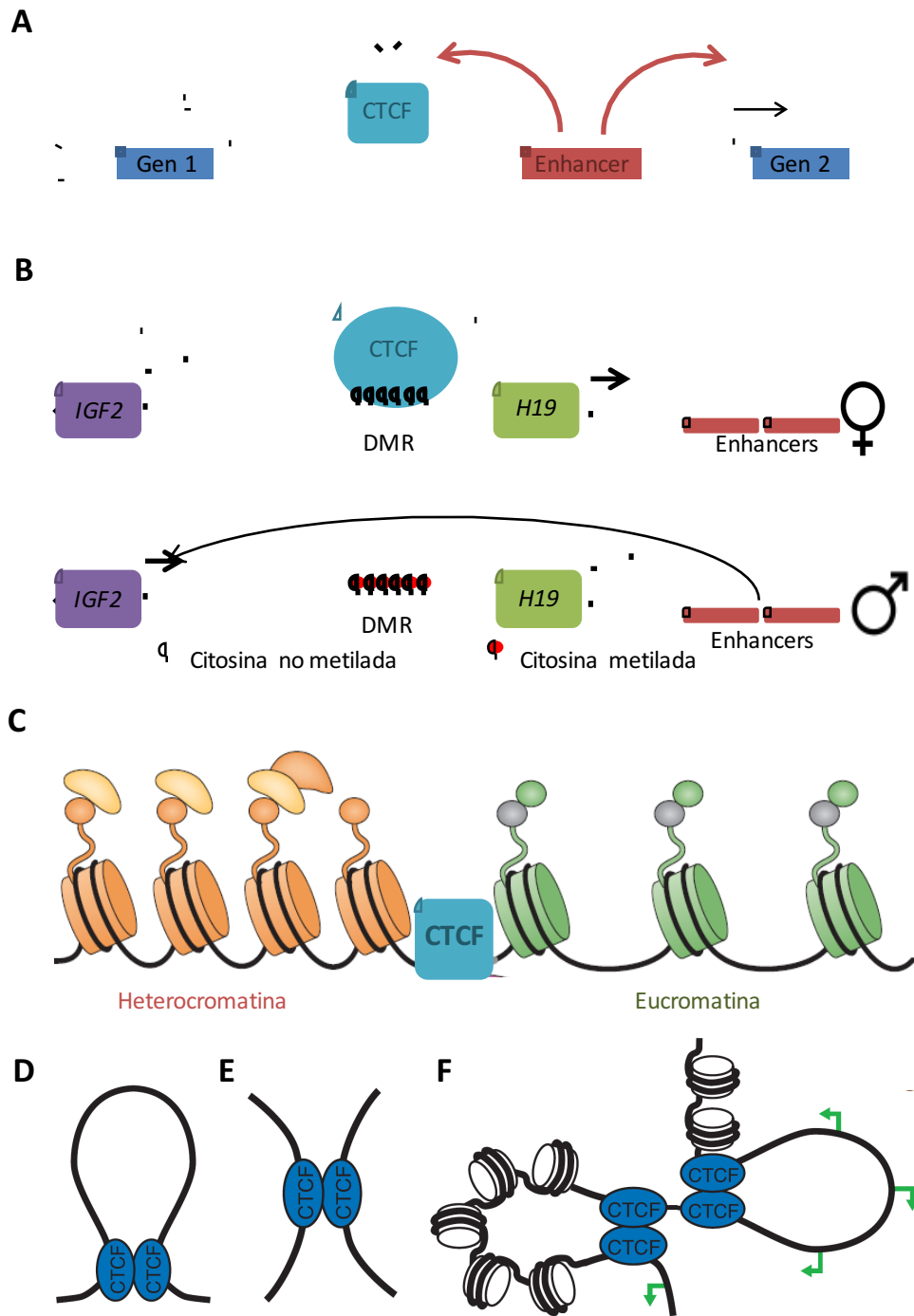


Figura 2. Funciones de CTCF en la regulación de la transcripción y en la organización tridimensional de la cromatina. A) bloqueo de *enhancer*, B) impronta, C) dominios de cromatina, D-F) asas intracromosómicas y asas intercromosómicas. Tomado y modificado de ^{8,30}.

1.1.2.2 Regulación de la transcripción

Las asas de cromatina que establece CTCF, también permiten la interacción *enhancer*-promotor para favorecer la transcripción. Inicialmente este fenómeno se observó en genes analizados de manera individual¹⁰ y recientemente se ha encontrado que a nivel global CTCF se localiza en regiones con modificaciones post-traduccionales de histonas específicas de promotores activos, como la H3K4me3 y específicos de *enhancers* como H3K4me1³¹. La unión de CTCF a promotores tiende a ser más conservada entre tejidos, a diferencia de la unión a *enhancers* que está asociada a regulación tejido-específico³².

De igual manera, CTCF participa en la formación de asas de cromatina que ayudan en el mantenimiento de dominios de eucromatina y heterocromatina³³⁻³⁶ (

Figura 2D-F). De esta manera CTCF participa en el mantenimiento de las zonas de transcripción activa e inactiva (

Figura 2C).

1.1.2.3 Establecimiento de la estructura tridimensional de la cromatina

Estudios recientes han demostrado que los CTSs se encuentran localizados frecuentemente en las fronteras de los llamados Dominios Asociados Topológicamente o *Topologically-Associated Domains* (TADs)³⁷. Los TADs son regiones con interacciones frecuentes dentro de un mismo dominio con pocas interacciones con dominios adyacentes. Los TADs están involucrados en la

organización tridimensional de la cromatina dentro del núcleo³⁸. La presencia de CTCF en los TADs sugiere que es esencial en la arquitectura nuclear mediante el establecimiento de interacciones inter e intracromosómicas en conjunto con los complejos formados con la cohesina.

1.1.2.4 Organización de la cromatina perinucleolar

Otra de las posibles funciones de CTCF está relacionada con la organización de la cromatina perinucleolar. El nucléolo es una estructura nuclear que coordina la síntesis y maduración de las subunidades ribosomales³⁹. Además de su función primaria, el nucléolo participa en otros procesos como la replicación viral⁴⁰ y el secuestro de proteínas reguladoras del ciclo celular⁴¹ y factores de transcripción⁴².

El nucléolo está formado por secuencias del genoma específicas, llamadas Regiones Asociadas a Nucleolo (*Nucleolar-associated Domains*, NADs). En 2010, dos estudios reportaron que los NADs son regiones del genoma con una baja frecuencia de genes en comparación con el resto del genoma y están enriquecidos por secuencias repetidas^{43,44}. El mecanismo por el cual estas secuencias son dirigidas hacia nucléolo después de cada división celular se desconoce; sin embargo, se ha propuesto que podría estar mediado por proteínas como CTCF⁴⁵, por su capacidad de interactuar con el DNA, RNAs y varias proteínas localizadas en nucléolo como UBF⁴⁵ y NPM1⁴⁵ para la organización de los NADs.

Por lo tanto, CTCF es una proteína capaz de unirse a distintos sitios del genoma dependiendo del tipo celular, para regular la transcripción génica, la

expresión de genes improntados y la organización de la cromatina dentro del núcleo y posiblemente la cromatina perinucleolar.

1.2 BORIS

1.2.1 El gen CTCFL

El gen *CTCFL* es el parálogo de CTCF, el cual se localiza en la banda 13.2 del brazo largo del cromosoma 20 (20q13.2), tiene un tamaño de 29,688 pb, consta de 14 exones⁴⁶. *CTCFL* tiene los mismos exones que codifican para el dominio de ZF de *CTCF*, pero los dominios amino y carboxilo terminales son distintos⁴⁷ (

Figura 3).

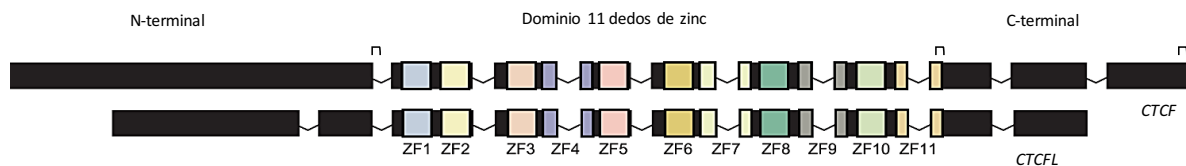


Figura 3. Estructura génica de *CTCFL* y *CTCF*. *CTCFL* y *CTCF* comparten los exones codificantes al dominio de 11 ZF. En colores se muestran los exones que codifican para los ZF. Tomado y modificado de ⁴⁸.

1.2.1.1 Regulación de la expresión de CTCFL

Un análisis de la actividad de la región promotora de *CTCFL* mostró que ésta puede ser regulada por la metilación del DNA^{49,50} y por la presencia de CTCF. En ese caso, CTCF participa como un regulador negativo de la expresión de *CTCFL*⁴⁹.

Además, esta región contiene 3 promotores cuya actividad está regulada por de manera independiente (Figura 4)⁴⁹. Renaud et al. (2007) caracterizaron la región reguladora río arriba de *CTCF* e identificaron 3 promotores: promotor A (-2071 a -1276), promotor B (-1106 a -996) y promotor C (-821 a -622). Los promotores B y C se encuentran dentro de una isla CpG. Además, análisis *in silico* indican la presencia de secuencias de unión a factores de transcripción como Sp1 y AP-2 en los tres promotores. En particular, el promotor A contiene sitios de unión a CREB; el promotor B a NFjB y N-Myc; y el promotor C a WT1 y EKLF⁴⁹. Estos TFs los cuales podrían participar en la regulación de este gen; sin embargo, esto no se ha comprobado experimentalmente.

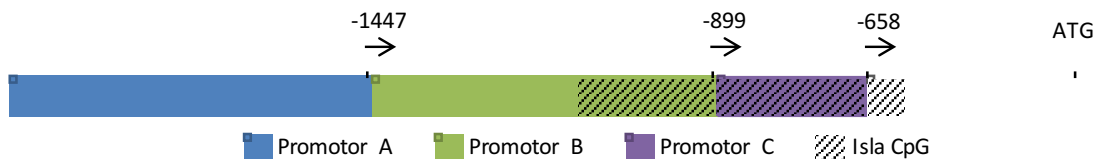


Figura 4. Representación esquemática de la región promotora de *CTCF*. *CTCF* está regulado por tres promotores (A, B y C) y contiene una isla CpG localizada en B y C. Modificado de ⁴⁹.

Se ha visto que la preferencia de utilización de cada uno de los promotores es distinta. Por ejemplo, en testículo los tres promotores son activos; mientras que en líneas celulares derivadas de cáncer, hay una utilización mayoritaria de los promotores A y C⁴⁹. Lo cual sugiere que *CTCF* tiene diferentes mecanismos de regulación transcripcional dependientes del tipo celular; sin embargo, estos mecanismos aun se desconocen a detalle.

1.2.1.2 Variantes de empalme alternativo de exones de CTCFL

El gen *CTCFL* codifica 23 variantes de empalme alternativo de exones (también conocido como *splicing*), nombradas *A1* a *A6*, *B0* a *B7* y *C1* a *C9* dependiendo del promotor que regule su transcripción, las cuales se clasifican en 6 subfamilia (*sf1-6*) y codifican para 17 isoformas de BORIS⁵¹ (Figura 5).

En general, las variantes de *splicing* contienen regiones 5' y 3'-UTRs, sitios de *splicing* y codones de paro distintos. Por lo tanto, las isoformas varían en el La proteína BORIS

1.2.2 La proteína BORIS

La proteína BORIS canónica consiste en 663 aminoácidos (aa) y tiene una masa molecular de 75.7kDa. El dominio N-terminal es de 256 aa, los 11 ZF abarcan los aa 257-568 y el C-terminal de los residuos de aa 569-663 (Figura 6).

A nivel de proteína, existe un porcentaje de identidad en el dominio de ZF de 74.1%, mientras que los dominios terminales tienen una identidad menor al 15%^{47,48} (Figura 6). Las similitudes en ambos dominios de ZF se conservan incluso en los residuos de reconocimiento del DNA y en los aminoácidos de enlace entre cada uno. Esto sugiere que BORIS podría tener la capacidad de unirse a los mismos sitios de DNA que CTCF, reclutando proteínas distintas y generando un efecto diferente en la regulación génica⁴⁷.

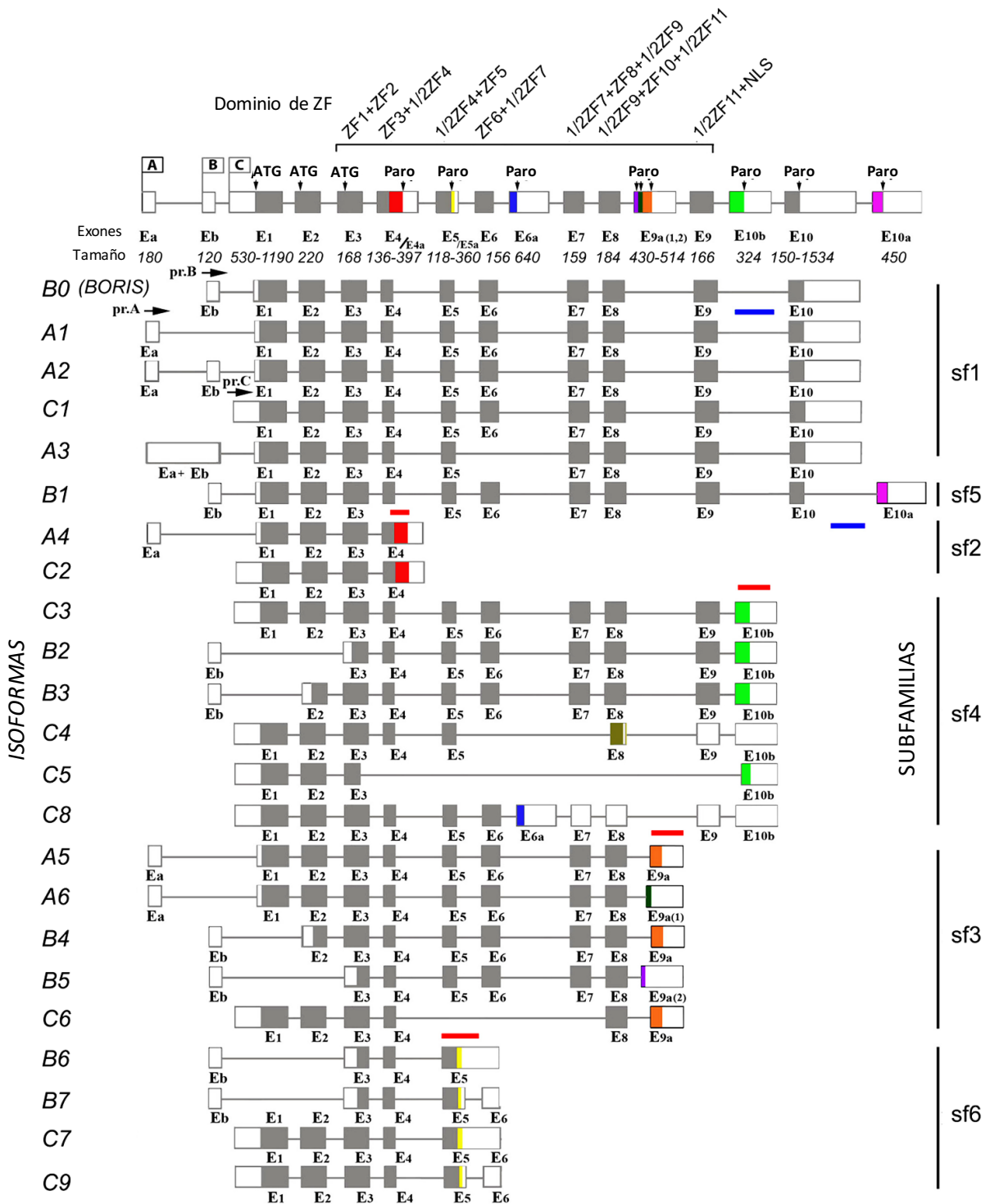


Figura 5. Variantes de *splicing* de CTCFL. CTCFL genera 23 variantes de *splicing* clasificadas en 6 subfamilias y codifican para 17 isoformas de BORIS. Los tamaños de los exones se muestran debajo del esquema superior. Los codones de inicio y de paro de los marcos de lectura abiertos se indican con ATG y Paro respectivamente. El primer transcrito representa la variante canónica (B0) y los transcritos mostrados abajo son isoformas. Del lado izquierdo se indica el nombre de las isoformas y del lado derecho se muestran las seis subfamilias clasificadas por sus extremos 3'. Tomado y modificado de ⁴⁹.

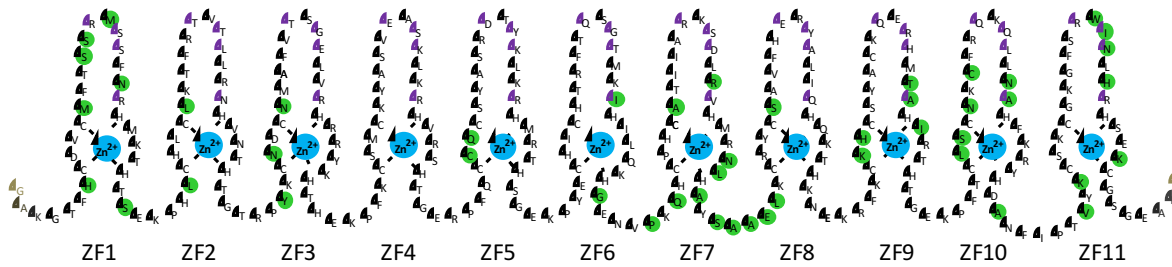


Figura 6. Esquema de la estructura de los 11ZF del dominio central de BORIS. Los aminoácidos con borde morado son los necesarios para la interacción con el DNA y en verde se muestran los aminoácidos diferentes al dominio de ZF de CTCF. Tomado y modificado de ^{47,48}.

1.2.2.1 Interacción BORIS-DNA

Dado que BORIS y CTCF comparten el dominio de 11ZF, se ha propuesto que BORIS utiliza las mismas combinaciones de ZF para reconocer sitios específicos en el genoma⁴⁷. Sin embargo, la identificación de las diferentes isoformas de BORIS sugiere que esta proteína podría estar reconociendo un subconjunto de los CTSs y también otros sitios a los que CTCF no es capaz de unirse⁵¹.

La unión de CTCF o de BORIS a un sitio específico del genoma depende de varios factores; entre estos se encuentra la metilación del DNA. Se sabe que CTCF tiene una especificidad de unión a secuencias del DNA no metiladas^{12,49,52}, mientras que BORIS puede interactuar con el DNA independientemente del estado de metilación⁵³. Aunque esta información es contrastante con otro estudio donde se reporta que BORIS, al igual que CTCF es metilo-sensible⁵⁴.

Dado que BORIS tiene el potencial de unirse a los mismos sitios que CTCF independientemente del estado de metilación, se ha sugerido que en tejidos donde

hay presencia de ambas proteínas, existe una competencia por dichos sitios que tiene como consecuencia cambios en la regulación genómica.

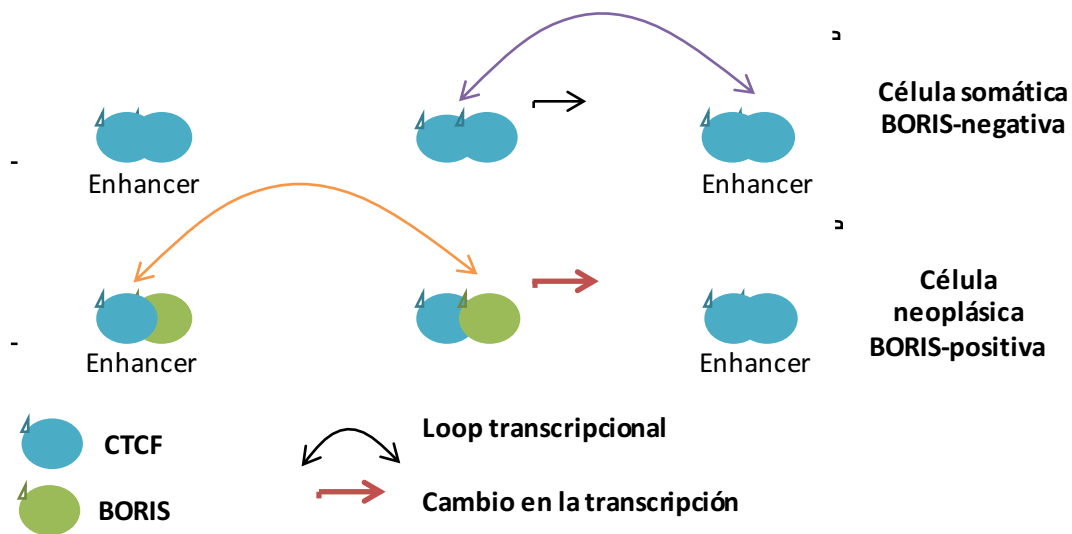


Figura 7. Modelo de los sitios de unión de CTCF (2xCTSs) y su ocupación por BORIS y CTCF. En células somáticas negativas a BORIS, los 2xCTSs están ocupados por CTCF únicamente principalmente en *enhancers* y promotores. En células neoplásicas, BORIS compite por los sitios de unión y hay un cambio en el programa transcripcional de la célula. Tomado y modificado de ⁵⁵.

En este sentido, Pugacheva et al. (2015), mediante experimentos de Inmunoprecipitación de la Cromatina y secuenciación (ChIP-seq) identificaron que, contrario a lo que se esperaría, BORIS sólo ocupa del 29-38% de los sitios de CTCF (BORIS & CTCF). Un análisis de las secuencias mostró que las regiones BORIS & CTCF en realidad están compuestas por 2 sitios (2xCTSs), separados por 58pb, los cuales pueden estar ocupados por dímeros CTCF-CTCF, BORIS-CTCF o BORIS-BORIS⁵⁵. Los 2xCTSs se encuentran localizados principalmente en *enhancers* y promotores activos y tienen diferentes propiedades funcionales dependiendo del dímero presente⁵⁵ (

Figura 7). Además, estudios previos demuestran que la presencia diferencial de BORIS o CTCF en la región promotora de algunos genes provoca cambios en su expresión génica⁵⁶⁻⁶⁰.

1.2.3 Funciones de BORIS

BORIS se expresa preferentemente en testículo adulto, donde se ha visto que su función principal ocurre durante la espermatogénesis⁴⁷. Adicionalmente, existen estudios que indican que BORIS no solo está presente en testículo adulto, sino que también participa en el desarrollo del testículo⁶¹, en ovario y otros tejidos en etapas embrionarias^{51,62}, además de las *embryonic stem cells* (ESCs)⁶³ así como en impronta génica⁶⁴.

1.2.3.1 BORIS en espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso que ocurre en adultos, en el que las células primordiales de la línea germinal masculina (espermatogonias) dan lugar a espermatozoides (Figura 8). En este proceso de diferenciación, existen tipos celulares llamados espermatocitos, que se dividen por meiosis para dar lugar a células haploides. Dependiendo de la meiosis en la que se encuentren, pueden denominarse espermatocitos primarios (meiosis I) y secundarios (meiosis II). Una vez llevada a cabo la meiosis, los espermatocitos secundarios continúan con su proceso de diferenciación a espermátidas y finalmente a espermatozoides⁶⁵.

CTCF forma parte de un grupo de genes denominados “Antígenos de Cáncer y Testículo” (*Cancer-Testis Antigens, CTAs*)⁴⁹, los cuales se expresan en altos niveles en testículo y no se encuentran en células somáticas⁶⁶.

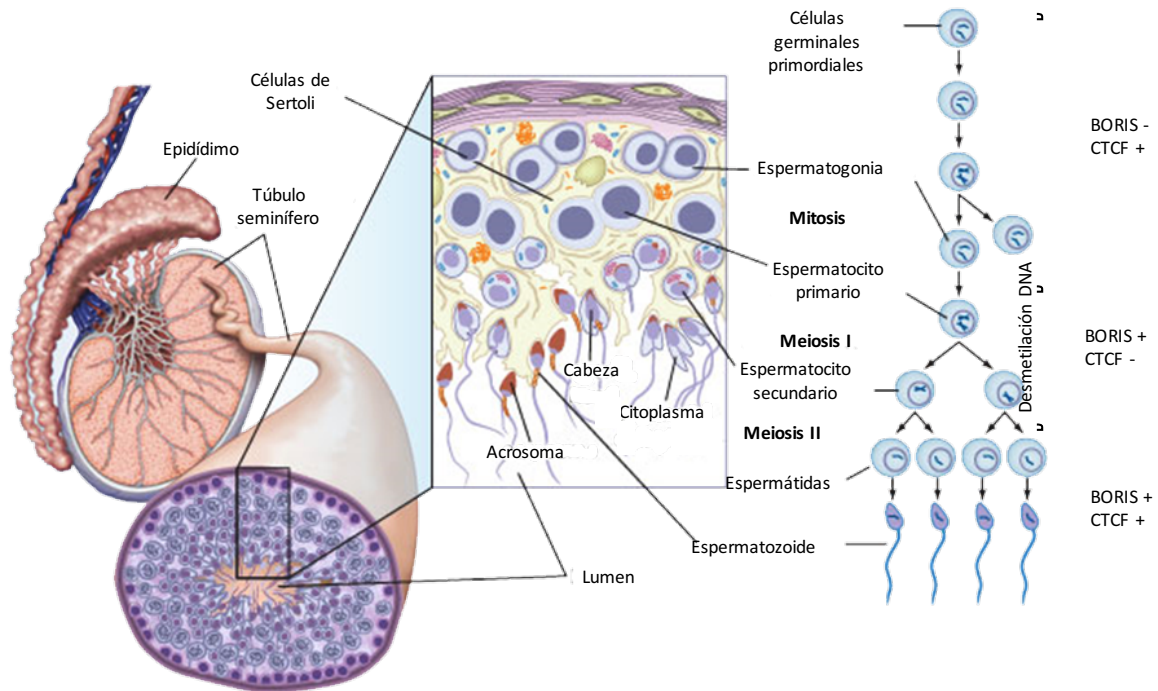


Figura 8. Esquema de diferenciación durante la espermatogénesis. *CTCF* se expresa en células específicas de testículo como espermatocitos, espermátidas y espermatozoides; y participa en la regulación de genes necesarios en la espermatogénesis.

CTCF está activo en testículo adulto, donde la población con mayor abundancia son los espermatocitos, posteriormente *CTCF* es reprimido por CTCF en células de línea germinal post-meióticas⁴⁷. En contraste, otros estudios reportan que BORIS está presente no sólo en espermatocitos, sino también en otros tipos celulares como espermátidas y espermatozoides. Se ha observado la expresión preferencial de algunas subfamilias de isoformas de BORIS en espermátidas (*sf2*), y hay indicios de que las *sf2*, *sf5* y *sf6* son características de

las últimas fases de la espermatogénesis (desde espermatocitos hasta espermatidas)⁵¹.

Sin embargo, se desconoce cuál es la participación de BORIS en estas células. Se ha propuesto que BORIS es necesario durante el desarrollo del testículo, ya que experimentos en embriones de ratón muestran que la ausencia de BORIS provoca defectos en testículo tales como disminución del tamaño y retraso en la producción de células haploides; además, BORIS regula directamente la expresión del gen *Gal3st1*, un gen crucial de meiosis en espermatozoides⁶¹. Además, análisis de ChIP-seq reportan que varios factores de transcripción específicos de testículo se encuentran localizados en las mismas regiones que BORIS⁶⁷. Adicionalmente, se sabe que la inactivación de CTCF en células germinales de ratón provoca infertilidad, así como anomalías en la morfología de los espermatozoides, alteraciones en la compactación de la cromatina e incorporación de protaminas⁶⁸.

En relación a lo anterior, en células postmeióticas como las espermatidas, se lleva a cabo la remodelación de la cromatina, que consiste principalmente en la sustitución de histonas por protaminas, que generan un DNA más condensado. Únicamente ~15% de la cromatina conserva histonas⁶⁹ y se ha reportado que son precisamente estas regiones las esenciales para la expresión de genes relacionados con las primeras etapas de la formación del cigoto una vez ocurrida la fecundación⁷⁰. En este sentido, Pugacheva et al. (2015) encontraron que en espermatozoides, son estas regiones de la cromatina donde se encuentra

enriquecido BORIS⁵⁵, indicando que BORIS podría tener un papel importante no solo durante la espermatogénesis, sino también en la organización del genoma en espermatozoides e incluso durante las primeras etapas del desarrollo embrionario⁵⁵.

Por otro lado, la presencia de BORIS (en células que carecen de CTCF), ocurre de forma paralela al “borrado” y restablecimiento de marcas de metilación del DNA en la línea germinal masculina⁴⁷; lo cual, en conjunto con la capacidad de unión de BORIS independiente de metilación a los mismos sitios de DNA que CTCF, apoya su papel en la regulación de la impronta en espermatozoides primarios y espermátidas en las que CTCF no se expresa^{47,51}.

Finalmente, se ha sugerido que la función de BORIS en testículo podría estar asociada con la sustitución de CTCF, llevando a cabo funciones específicas que, de otra manera, podrían ser inhibidas en la presencia de CTCF. Por lo que la temporalidad entre el borrado de marcas de metilación y la expresión de BORIS podría estar asociada con metilasas y desmetilasas de DNA que participan en este proceso⁷¹.

1.2.3.2 BORIS en impronta

Como previamente se mencionó, la metilación del ICR participa en la regulación de los genes improntados. Esta metilación del DNA se establece durante el desarrollo de la línea germinal masculina. La metilación disminuye en testículos en las primeras etapas del desarrollo; posteriormente, las DNA metiltransferasas

(DNMTs) *de novo* (DNMT3A y DNMT3B) tienen su máximo nivel de expresión. Las DNMTs *de novo* no tienen especificidad de unión al DNA, y por lo tanto se piensa que éstas son reclutadas al DNA mediante la interacción con modificaciones de histonas específicas o proteínas que reconozcan sitios del DNA⁶⁴. Además, se sabe que CTCF es una proteína que participa activamente en la lectura de marcas de impronta en células somáticas¹²; sin embargo, aún no existe una explicación sobre el reconocimiento y re-establecimiento de estas marcas durante la reprogramación epigenética en línea germinal.

BORIS es una proteína candidata que puede cumplir esta función en impronta. Actualmente, su relación con las DNMTs se desconoce, pero se ha demostrado que BORIS puede interactuar con el ICR de *IGF2* y con PRMT7, una proteína metiltransferasa de argininas que se expresa durante el desarrollo en los testículos embrionarios. La modificación generada por PRMT7, H4R3me2 (asociada a activación transcripcional⁷²⁻⁷⁴), se acumula en células germinales durante este periodo de desarrollo. Además, esta modificación de histonas, se encuentra en el ICR de *H19* y se ha observado que BORIS favorece la actividad metiltransferasa de PRMT7 mediante su interacción con esta proteína e histonas. Por lo que se sugiere que BORIS, en conjunto con PRMT7, podría tener un papel importante en la metilación de histonas de línea germinal masculina⁶⁴ y posiblemente en el reclutamiento de DNMTs a sitios específicos del genoma.

Este reclutamiento de PRMT7 al locus IGF/H19, podría involucrar a algunas isoformas específicas de BORIS. En relación a esto, Pugacheva et al. (2010)

reportaron que 9 isoformas de BORIS (B1, B2, B3, B4, B5, A5, A6 y C3) tienen capacidad de unirse al ICR de *IGF2/H19* de manera metilación-dependiente⁵¹, igual que CTCF. Esto podría indicar que la expresión de algunas variantes de *splicing* de *CTCF* participan en procesos específicos de ciertas etapas de desarrollo, tales como impronta. Sin embargo, el mecanismo por el cual BORIS está participando en el establecimiento de estas marcas se desconoce.

1.2.3.3 Otras funciones de BORIS

BORIS se localiza principalmente en nucléolo^{75,76}, donde interacciona directamente con el factor de transcripción UBF para el reconocimiento de los promotores que codifican al RNA ribosomal, y también con CTCF, es así como ambos participan en la regulación transcripcional del rRNA⁷⁷. Además, se ha visto que interacciona con regiones cercanas a los genes de rRNA por lo que podría estar relacionado con la regulación transcripcional de estos⁷⁶; sin embargo, la función que está cumpliendo en nucléolo se desconoce a detalle.

Por inmunofluorescencias se ha observado la presencia de BORIS en citoplasma^{47,51,76}. Existen pocos estudios que aborden la función de BORIS en citoplasma. Sin embargo, se ha encontrado que BORIS tiene capacidad de interactuar con mRNA de varios genes, tales como *BLC-2* y *SOX4*, donde podría estar participando en la regulación de la traducción de estos; además interacciona con RNAs ribosomales, particularmente aquellos ribosomas asociados en polisomas⁷⁸.

Finalmente, se ha observado que BORIS y CTCF se encuentran localizados de manera excluyente en regiones de la célula durante el ciclo celular. Tal es el caso del centrosoma, donde BORIS está presente durante interfase y es sustituido por CTCF en mitosis. Se ha observado que la sobreexpresión de BORIS impide la progresión del ciclo celular, provocando un aumento de células en fase S, lo cual podría estar asociado con la generación de inestabilidad cromosómica y cáncer⁷⁶.

1.2.4 BORIS en cáncer

Actualmente, varios estudios han reportado que *CTCF* se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer como pulmón⁵⁷, melanoma⁷⁹, neuroblastoma⁸⁰, mama^{81,82}, próstata⁸³, colon⁸⁰, seminomas⁸⁴, endometrio⁸⁵, laringe⁸⁶ y cérvix⁸⁷. Esta sobreexpresión está asociada principalmente con progresión de la enfermedad y menor supervivencia^{81,83,85,88-90}. En contraste, en tejido no neoplásico los niveles de mRNA de *CTCF* son muy bajos excepto en testículo⁷⁵, por lo que se ha catalogado como un Antígeno de Cáncer y Testículo (CTA)^{66,91}.

Debido a lo anterior, ha sido de interés conocer más sobre la posible función que puede llevar a cabo BORIS en cáncer; por lo cual se han realizado estudios que en general producen datos inconsistentes y no permiten alcanzar un consenso. Por ejemplo, la sobreexpresión de *CTCF* en líneas celulares ha mostrado que inhibe la proliferación⁹². En contraste, otros estudios reportan que la sobreexpresión y la disminución inhiben la formación de colonias⁷⁶.

Por otro lado, enfoques genómicos para entender la función de BORIS indican que la sobreexpresión de BORIS provoca una competencia con CTCF por sus sitios de unión al DNA, interfiriendo con las funciones normales de éste y contribuye a la desregulación epigenética comúnmente observada en tumores^{47,91}, de hecho, se ha reportado que la sustitución de CTCF por BORIS en los promotores de algunos genes asociados a cáncer provoca cambios en su expresión⁵⁵, aunque se desconoce si es una isoforma específica de BORIS la que participa en este proceso.

De igual manera, se ha estudiado el potencial de BORIS como un posible biomarcador en cáncer, ya sea de progresión o sobrevida. Se ha reportado que los niveles de expresión de *CTCF* en leucocitos (neutrófilos) de pacientes de cáncer de mama, correlaciona con el tamaño del tumor, por lo que podría ser un marcador de progresión en sangre⁹³.

En un estudio realizado en cáncer de útero, evaluaron los perfiles de expresión mediante microarreglos, y se encontró que *CTCF* se encuentra sobreexpresado en el 77% de los tumores malignos y no en los tejidos sanos, a diferencia de otros CTAs como *MAGE-A9* (19.6%), lo cual sugiere el potencial de BORIS como un blanco de diagnóstico o inmunológico en éste tipo de cáncer⁹⁴. Sin embargo, aun existen muy pocos estudios enfocados en el potencial de BORIS como un biomarcador en cáncer o como blanco inmunológico.

1.3 Cáncer epitelial de ovario

Uno de los intereses de esta tesis es el cáncer epitelial de ovario (CEO). Este tipo de neoplasia es el tipo más común de cáncer de ovario (90% de los casos son CEO) y es la neoplasia ginecológica más letal. Aproximadamente, el 70% de los casos de CEO se diagnostican en etapas tardías, en las que la enfermedad ya se ha diseminado y la sobrevida a largo plazo es muy baja⁹⁵⁻⁹⁷.

Los tumores epiteliales de ovario se clasifican en 4 tipos histológicos: seroso (68%), endometroide (20%), células claras (8%) y mucinoso (6%). De los cuales, los pacientes con CEO de tipo seroso poseen una menor sobrevida (únicamente 12% tiene sobrevida a 12 años). A su vez, los tumores serosos se clasifican en bajo y alto grado; siendo los de alto grado los más frecuentes (90%)⁹⁶.

Uno de los motivos por los que el CEO tiene una alta mortalidad, es la dificultad en su diagnóstico dado que los síntomas no son específicos (distensión o dolor abdominal e irregularidades del tracto digestivo); por lo cual, los casos diagnosticados son pacientes con enfermedad avanzada en etapa III o IV⁹⁵. De ahí la importancia de identificar biomarcadores de diagnóstico o progresión en CEO.

1.3.1 El gen MUC16

MUC16 codifica para la Mucina16, la cual contiene una región de repetidos de aminoácidos que corresponde al antígeno CA-125. *MUC16* se expresa de manera

normal en células epiteliales de bronquios, córnea, endometrio y ovario⁹⁸. Un dominio transmembranal mantiene a la proteína anclada a la membrana celular, por lo cual se puede detectar a MUC16 en la superficie celular. MUC16 puede ser liberado de la membrana como consecuencia de cortes proteolíticos llevados a cabo por proteasas presentes en la matriz extracelular⁹⁹.

En la práctica clínica, existen pocos biomarcadores (de diagnóstico, respuesta a tratamiento o recurrencia) aprobados por la FDA. Una de estas moléculas es el antígeno CA-125, aprobado principalmente como biomarcador de recurrencia y monitoreo de la respuesta a quimioterapia^{100,101}.

Niveles en suero de CA-125 son monitoreados de manera rutinaria en pacientes con cáncer de ovario, un aumento en estos niveles es un indicador de recurrencia y mal pronóstico¹⁰². Debido a su relevancia en este tipo de cáncer, gran cantidad de estudios han sido realizados sobre CA-125 y su uso como biomarcador en combinación con otras moléculas^{103,104}; sin embargo, aun se desconocen a detalle los mecanismos moleculares por los cuales los niveles de CA-125 aumentan en cáncer de ovario. Uno de estos mecanismos es el aumento en los niveles de transcripción de su gen, *MUC16*¹⁰⁵; sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos que regulan su transcripción, ya sea en procesos fisiológicos normales o en patologías.

En cáncer, algunos estudios reportan que *MUC16* puede ser regulado por citosinas inflamatorias¹⁰⁶ y su promotor tiene sitios de unión a NFκB¹⁰⁵; sin embargo, los mecanismos epigenéticos que participan en este proceso se

desconocen. Un único antecedente enfocado en los procesos epigenéticos involucrados en la regulación de *MUC16* son del grupo de Yamada et al. (2011), quienes analizaron la región 5' de *MUC16* en células neoplásicas de mama, pulmón, páncreas y colon, donde encontraron que la metilación del promotor no está asociada con la transcripción del gen¹⁰⁷. Sin embargo, no existen más estudios que relaciones a los componentes moleculares involucrados en la transcripción de *MUC16* siendo que es uno de los biomarcadores más relevantes en esta neoplasia.

1.3.2 El gen MUC1

Este gen codifica para la Mucina1, que al igual que *MUC16*, es una mucina transmembranal que se expresa en tejidos epiteliales¹⁰⁸ (entre ellos ovario¹⁰⁹) y aumenta su expresión en tejidos neoplásicos de mama¹¹⁰ y ovario¹¹¹.

La proteína *MUC1* contiene los antígenos CA15-3 y CA27-29, los cuales están aprobados por la FDA como biomarcadores de respuesta en cáncer de mama^{100,101}, de igual manera, existen estudios que muestran que esta proteína está presente en cáncer de ovario, donde el uso combinado de datos de expresión de *MUC16* y *MUC1* son de utilidad en la sub-clasificación de tumores de ovario serosos de alto grado en *Proliferativo* (alta expresión de *MUC1* y *MUC16*) y *Diferenciado* (baja expresión de *MUC1* y *MUC16*)¹¹².

A diferencia de *MUC16*, los procesos relacionados con la regulación de la expresión de *MUC1* han sido ampliamente abordados. Moléculas inflamatorias

como IL-6 e interferones¹¹³ aumentan los niveles de transcrito de *MUC1*, al igual que hormonas esteroideas. Análisis de su promotor muestran sitios de unión a varios factores como Sp1¹¹⁴, receptor de estrógenos¹¹⁵, progesterona¹¹⁶ y andrógenos¹¹⁷.

Respecto a los mecanismos epigenéticos que participan en la regulación de *MUC1*, sólo se ha reportado que la metilación del DNA en su región promotora podría tener una participación importante^{118,119}. Sin embargo, no se han descrito otros mecanismos relacionados con la transcripción de *MUC1*.

1.3.3 El RNA no codificante largo MALAT1

MALAT1 (*Metástasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*) es un RNA largo no codificante (lncRNA) que participa en la regulación de varios procesos celulares, entre ellos el crecimiento celular, la progresión del ciclo celular, la transición epitelio-mesenquimal y apoptosis¹²⁰⁻¹²³. Además, se ha visto mediante RNA FISH que *MALAT1* se localiza en los *speckles* nucleares¹²⁴, regiones conocidas por estar enriquecidas en factores de *splicing*, por lo que se sugiere que *MALAT1* también podría participar en *splicing*¹²⁵.

MALAT1 tienen altos niveles de expresión en tejidos normales y ha sido encontrado sobreexpresado en varios tipos de cáncer¹²⁶, entre ellos el cáncer epitelial de ovario¹²⁷⁻¹³⁰, donde se ha identificado el transcrito en plasma de pacientes con CEO y altos niveles están asociados con metástasis y mal

pronóstico¹³¹, sugiriendo que *MALAT1* podría contribuir de manera importante al desarrollo de cáncer de ovario.

Debido a lo anterior, algunos estudios se han enfocado en la identificación de los mecanismos que regulan la transcripción de *MALAT1*. Se sabe que *MALAT1* tiene diferentes TTS y presenta diferentes productos de *splicing*¹³²; además, se han identificado algunos factores que participan en su regulación, entre ellos SP1 aumenta la transcripción de *MALAT1*¹³³ en respuesta a 17 β -estradiol¹³⁴, al igual que condiciones de hipoxia y el factor HIF-1 α ¹³⁵.

Recientemente, un mecanismo epigenético ha sido reportado en la regulación de la transcripción de *MALAT1*. En 2014, Tee y colaboradores, reportaron que la desmetilasa de histonas JMJD1A aumenta los niveles de transcrito de *MALAT1*¹³⁵. JMJD1A (también llamada KMD3A) participa en la desmetilación de la modificación de histonas H3K9me2⁷³, la cual está asociada con represión transcripcional⁷². JMJD1A, por lo tanto, disminuye esta modificación de represión y promueve la activación transcripcional. Sin embargo, otros mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la transcripción de *MALAT1* no han sido reportados.

1.3.4 *BORIS en cáncer de ovario*

El gen *CTCF* ha sido reportado sobreexpresado en cáncer de ovario epitelial⁵⁰, en particular las subfamilia de isoformas *sf1*¹³⁶. A su vez, se ha encontrado en CEO de tipo seroso que la relación de mRNA de *CTCF/CTCF* es

un indicador de sobrevida global y sobrevida libre de progresión y aquellos pacientes que presentan una mayor expresión de *CTCFL* o una relación *CTCFL/CTCF* tienen peor pronóstico que aquellos pacientes con bajos niveles de *CTCFL*. Además, *BORIS* correlaciona con el estadio clínico en el que se encuentra un paciente en este tipo de cáncer¹³⁷.

Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual la sobreexpresión de *BORIS* podría estar participando en cáncer de ovario y los genes a los cuales podría estar regulando.

Planteamiento del problema

El cáncer de ovario epitelial es una de las neoplasias ginecológicas con el mayor índice de mortalidad, en la cual el 70% de las pacientes son diagnosticadas en etapas tardías. Se han observado que los genes *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* se encuentran sobreexpresados en este tipo de cáncer y han sido asociados con progresión de la enfermedad y mal pronóstico.

Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares que ocasionan un cambio en los niveles de expresión de estos genes. Un posible factor involucrado en este proceso es la proteína BORIS, la cual se ha reportado sobreexpresado en cáncer de ovario. Adicionalmente, se desconocen los genes que cambian su expresión por la sobreexpresión de BORIS, los procesos celulares en los que participan y si estos están asociados con cáncer.

Objetivos

1.4 Objetivo principal

Identificar los genes regulados por BORIS, en particular *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1*, así como los procesos celulares en los que participan en un modelo de líneas celulares derivadas de cáncer de ovario.

1.5 Objetivos particulares

1. Seleccionar el modelo celular mediante la caracterización de la expresión, abundancia y localización de BORIS en líneas celulares de cáncer de ovario.
2. Evaluar la expresión de *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* en una línea celular derivada de cáncer de ovario con presencia de BORIS en comparación con células deficientes de BORIS.
3. Comparar los perfiles de expresión en células deficientes y con presencia endógena de BORIS para identificar los genes regulados por BORIS.
4. Identificar los procesos celulares en los que participan los genes regulados por BORIS.

Estrategia experimental

Con el fin de seleccionar el modelo celular más adecuado, se evaluó la presencia de BORIS en tres líneas celulares derivadas de cáncer de ovario: **NIH: OVCAR3**, **SKOV3** y **SW626**. Se utilizó la línea celular **HeLa** (adenocarcinoma de cérvix) como control positivo.

En las cuatro líneas celulares se evaluó la expresión del gen *CTCF* mediante RT-qPCR, la abundancia de proteína por Western Blot y localización subcelular por inmunofluorescencia. Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó la línea celular OVCAR3 ya que ésta presentó los mayores niveles de expresión de *CTCF*, por lo cual, se utilizó para los experimentos posteriores.

A continuación, para determinar si los genes *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* son posibles blancos de BORIS, se evaluó la expresión de estos en células deficientes de BORIS, obtenidos mediante transfecciones de siRNAs contra *CTCF* y transfecciones de plásmido CRISPR/Cas9 en la línea celular OVCAR3, respectivamente.

Adicionalmente, con el fin de identificar otros posibles genes regulados por BORIS, ya sea directa o indirectamente, se evaluaron los perfiles de expresión de las células KD, KO y células con presencia endógena de BORIS utilizando los microarreglos GeneChip 2.0 ST (Affymetrix). Posteriormente, se realizó un análisis de expresión diferencial usando la plataforma de análisis estadístico R y el

paquete Limma de Bioconductor para identificar aquellos genes que cambian su expresión con la disminución de BORIS.

Se seleccionaron únicamente los genes diferencialmente expresados en ambos modelos y con estos se realizó un Análisis de Enriquecimiento de Vías *de novo* con la aplicación KeyPathwayMiner de Cytoscape para identificar la red de interacción entre los genes encontrados y realizar un análisis ontológico de estos.

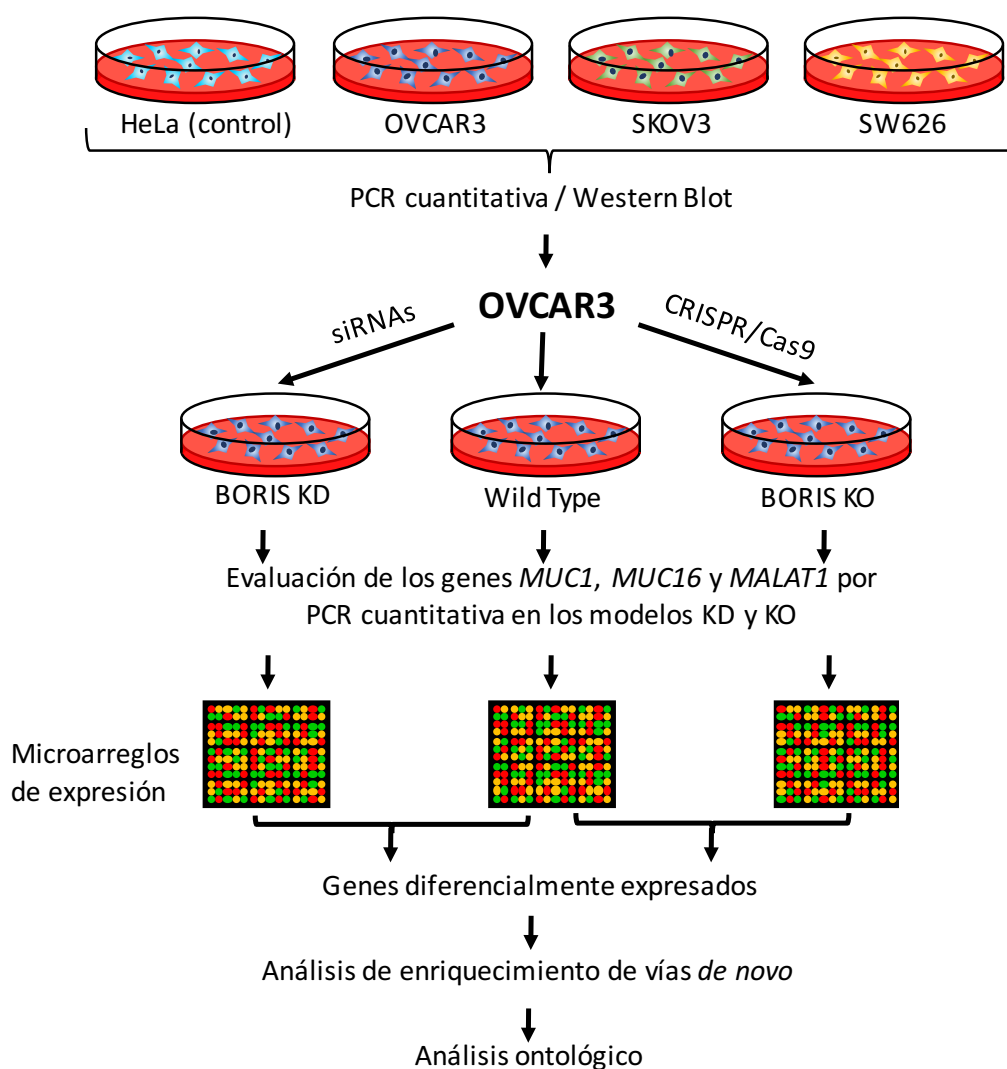


Figura 9. Esquema de la estrategia experimental empleada.

Resultados

1.6 Caracterización de BORIS en líneas celulares de cáncer de ovario

Con el fin de evaluar los niveles de expresión de BORIS en un panel de líneas celulares para determinar el modelo celular más adecuado para llevar a cabo los experimentos de KD y KO, se evaluó la expresión de *CTCF*. A su vez, se estudió la abundancia y localización de BORIS en las distintas líneas celulares derivadas de cáncer de ovario: OVCAR3, SKOV3 y SW626. Se utilizó HeLa como un control positivo ya que previamente se ha utilizado para evaluar los niveles de expresión de BORIS^{59,60,138,139}.

Se evaluaron los transcritos de *CTCF* utilizando un par de oligonucleótidos localizados en regiones compartidas por todas las variantes de *splicing* de *CTCF* y un segundo par que amplifica únicamente a la subfamilia 1 (*sf1*), dado que es de la que se cuenta con mayor información sobre sus niveles de expresión¹⁴⁰.

En la Figura 10 se muestra el análisis de expresión de *CTCF* en las distintas líneas celulares. En estos resultados se observa que la expresión de *CTCF global* de las líneas celulares OVCAR3 y SKOV3 tienen los niveles más altos de expresión en al menos dos veces de cambio respecto a HeLa (la cual utilizamos como control positivo del ensayo); en contraste, el nivel de expresión de la *sf1* es significativamente mayor en OVCAR3 comparado con HeLa. Por ello, determinamos que la línea celular OVCAR3 es la que presenta mayor nivel de

expresión de *CTCF* y SW626 presentó los menores niveles de expresión respectivamente a HeLa.

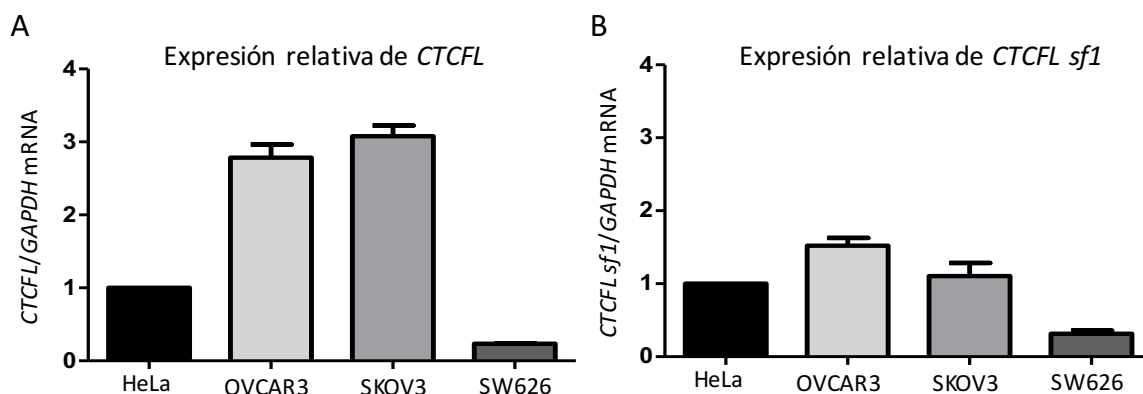


Figura 10. Expresión de *CTCF* en líneas celulares de cáncer de ovario. PCR cuantitativa de la expresión relativa de todas las variantes de *splicing* de *CTCF* (A) y de la expresión relativa de la subfamilia1 (*sf1*) de variantes de *splicing* de *CTCF* (B), n=3.

Por otro lado, se evaluaron los niveles de proteína BORIS mediante el ensayo de Western Blot (

Figura 11). En este trabajo se evaluaron los niveles de proteína utilizando el único anticuerpo comercial validado para inmunofluorescencia e inmunohistoquímica por The Human Protein Atlas¹⁴¹.

En la Figura 11 se muestran las dos bandas observadas que corresponden a la proteína BORIS (~100 kDa y ~70 kDa). El grupo de Jones *et al.* (2011) validó este anticuerpo para Western Blot, y reportaron dos bandas principales de BORIS (~100 kDa y ~70 kDa), las cuales coinciden con nuestros resultados⁷⁵.

En ambas bandas, observamos que no hay diferencia significativa de la abundancia de BORIS entre líneas celulares en comparación con HeLa, respecto a la banda de 70kDa, SKOV3 muestra una tendencia a tener los mayores niveles

de proteína en comparación con el control. Sin embargo, desconocemos las isoformas a las cuales corresponden o la relevancia de cada una de las bandas obtenidas mediante este ensayo.

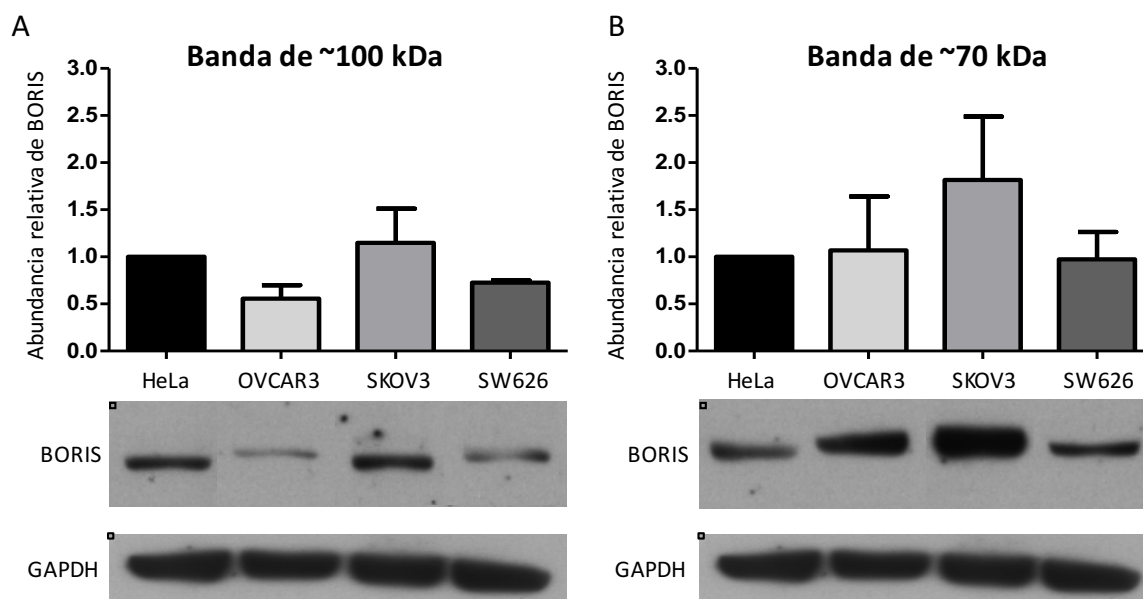


Figura 11. Abundancia de BORIS en líneas celulares de cáncer de ovario. Western Blot de la abundancia relativa de la banda de 100 kDa (A) y abundancia relativa de la banda de 70 kDa (B), n=3.

Por lo tanto, tomando en cuenta los niveles de transcrito de *CTCF*L y la abundancia de proteína BORIS, seleccionamos la línea celular OVCAR3, dado que presenta mayores niveles de transcritos de *CTCF*L *sf1* y niveles detectables de proteína BORIS

1.7 Generación del modelo Knock Down (KD) y Knock Out (KO) de BORIS en OVCAR3

Con el propósito de determinar si los genes *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* son posibles blancos de BORIS, se evaluó la expresión de estos en un modelo KD y KO de *CTCF* en comparación con las células con presencia endógena (WT).

Para la obtención de las células KD, la línea celular OVCAR3 se transfectó con siRNAs contra BORIS y se evaluó mediante Western Blot la eficiencia de disminución en tres réplicas biológicas.

En la Figura 12 se observa que las eficiencias de disminución de BORIS con una disminución de la proteína que va del 40% al 90%.

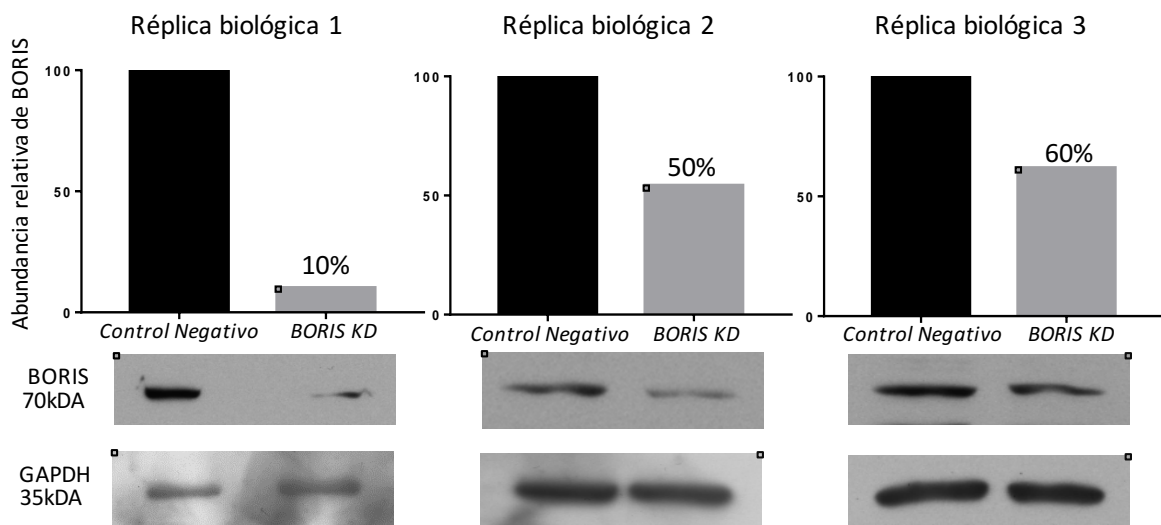


Figura 12. Eficiencia de disminución de BORIS con transfecciones de siRNAs. Western Blot de BORIS en las células KD y WT en tres réplicas biológicas.

Con el fin de emplear otra técnica para abatir los niveles de abundancia de BORIS, se obtuvieron células Knock Out (KO) de *CTCF*. Para ello se utilizó el

sistema CRISPR/Cas9 el cual tiene la capacidad de generar mutaciones en 3 sitios del gen y así evitar que el gen codifique para su proteína. Para utilizar esta metodología, se realizaron transfecciones transitorias del plásmido CRISPR/Cas9 en la línea OVCAR3 y se evaluó el porcentaje de disminución de BORIS mediante Western Blot en las tres réplicas biológicas. En la Figura 13 se muestra que el porcentaje de disminución de BORIS es similar entre réplicas y corresponde al ~50%.

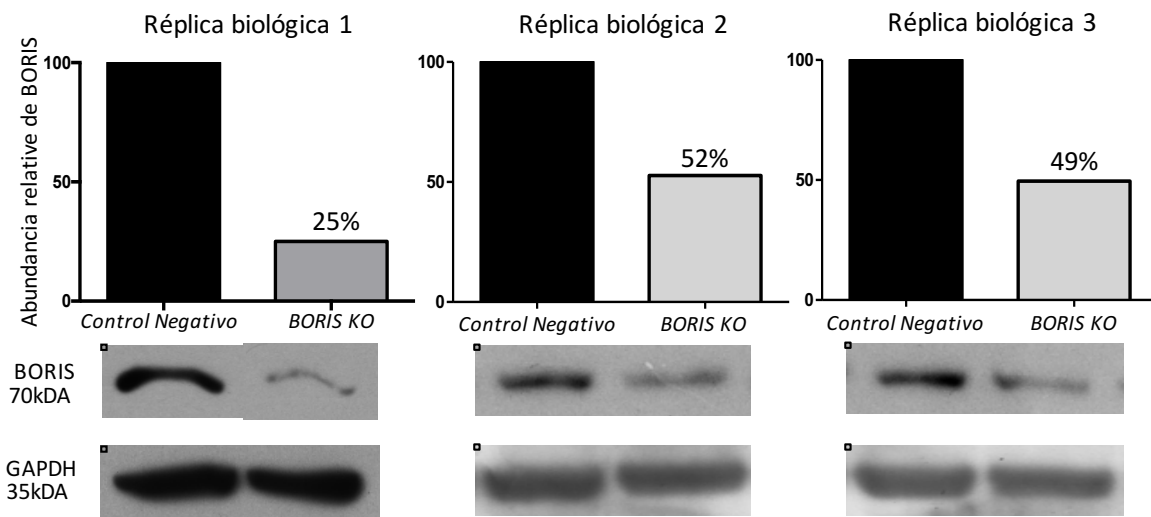


Figura 13. Eficiencia de disminución de BORIS con transfecciones de plásmido CRISPR/Cas9. Western Blot de BORIS en las células KO y WT en tres réplicas biológicas.

1.8 Evaluación de la expresión de los genes *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* en células KD y KO de BORIS

Con el fin de determinar si BORIS tiene la capacidad de regular la expresión de los genes *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* se procedió a evaluar la expresión de estos genes en OVCAR3 y en el modelo deficiente de BORIS (KD y

KO). Se evaluaron los niveles de transcritos de los tres genes mediante PCR cuantitativa en las células KD y KO de BORIS en comparación con su control correspondiente.

En la Figura 14 se observa que en el modelo KD, *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* aumentan su expresión, en comparación con las células WT. Dicho aumento está relacionado con el porcentaje de disminución de BORIS en cada réplica. Es decir, en aquellas réplicas con mayor porcentaje de disminución de BORIS, hay un mayor aumento en los niveles de expresión de estos genes.

Igualmente se evaluó la expresión de estos genes en las células KO de *CTCF*. En este ensayo se encontró que en aquellas réplicas en las que BORIS disminuyó al 50% no se observa el aumento en la expresión de *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1*. Únicamente en la réplica biológica 1 (que presenta un porcentaje de disminución mayor al 50%) se observa aumento de los niveles de transcrito de los tres genes (Figura 15).

Por lo tanto, estos datos sugieren que BORIS participa en la regulación negativa de la transcripción de *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1*, dado que se observa un aumento en la expresión e estos en células con disminución de BORIS.

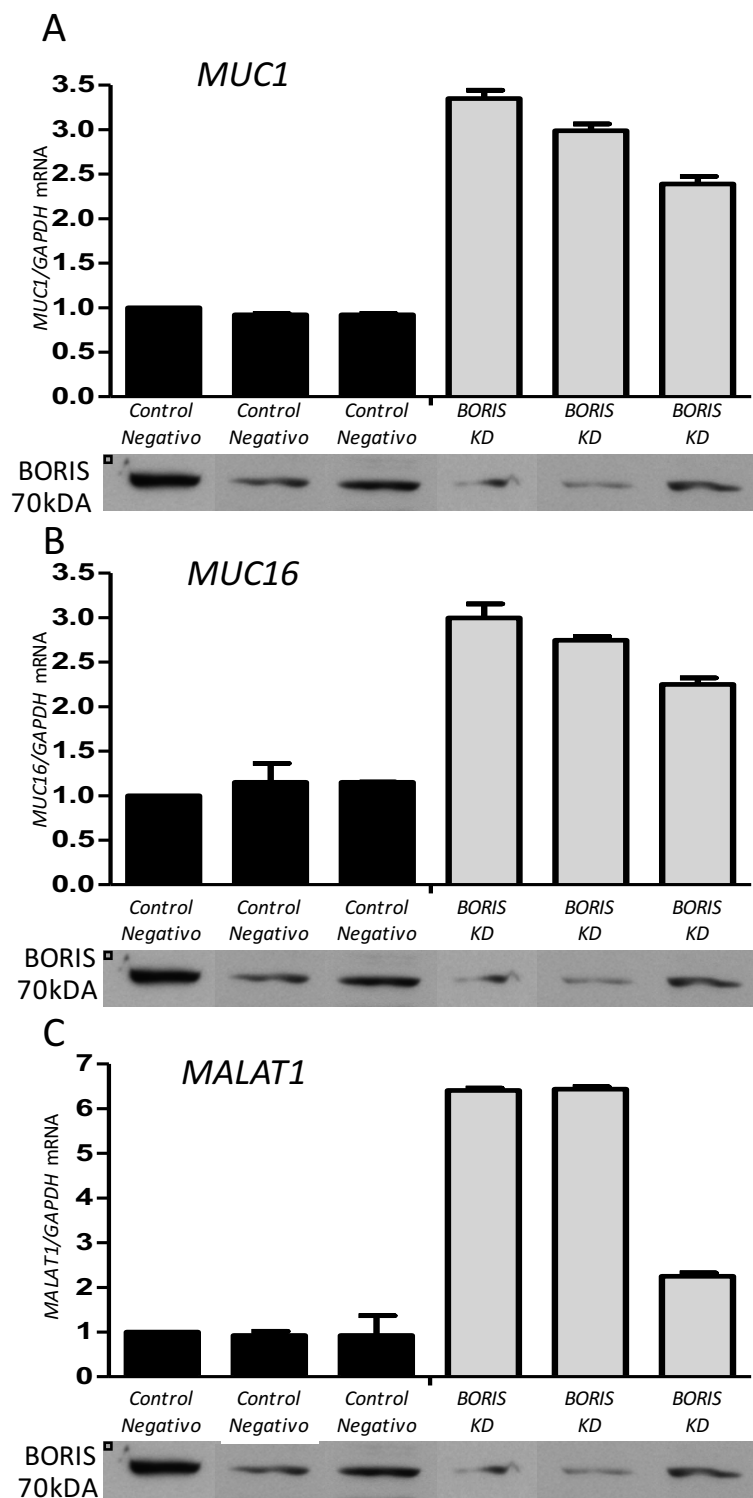


Figura 14. Expresión de los genes *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* en células KD de BORIS. PCR cuantitativa de A) *MUC1*, B) *MUC16* y C) *MALAT1*. Cada barra indica una réplica biológica, ya sea de las células KD o del control negativo. En la parte inferior de cada gráfica se muestra la abundancia de BORIS obtenida por Western Blot.

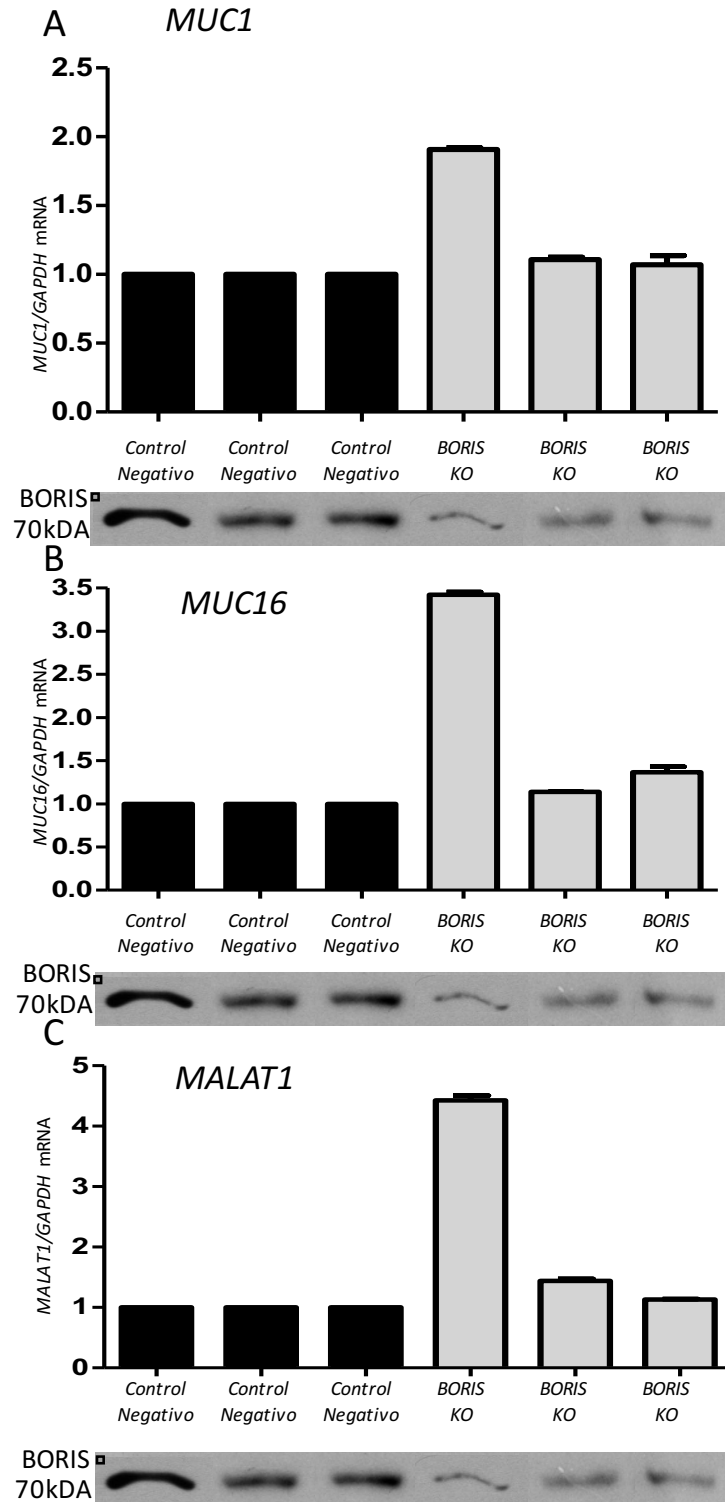


Figura 15. Expresión de los genes *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* en células KO de *BORIS*. PCR cuantitativa de A) *MUC1*, B) *MUC16* y C) *MALAT1*. Cada barra indica una réplica biológica, ya sea de las células KO o del control negativo. En la parte inferior de cada gráfica se muestra la abundancia de *BORIS*.

1.9 Análisis de los perfiles de expresión en el modelo KD y KO de BORIS

Además de los genes *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1*, uno de los objetivos fue identificar otros genes que sean regulados directa o indirectamente por BORIS. Para lograrlo, se obtuvieron los perfiles de expresión mediante microarreglos empleando las células KD, KO y en comparación con OVCAR3 WT. Cabe mencionar que los microarreglos de expresión (Affymetrix, Human Gene 2.1ST Array), evalúan 33,500 transcritos codificantes y más de 11 transcritos no codificantes largos.

En la Figura 16A-B se puede observar que la proporción de genes que aumentan su expresión es mayor respecto al número de genes que disminuyen, ~63 y ~36% respectivamente. Este fenómeno se observa en las células KD y KO, indicando que BORIS podría estar actuando, en la mayoría de los casos, como un regulador negativo de la transcripción.

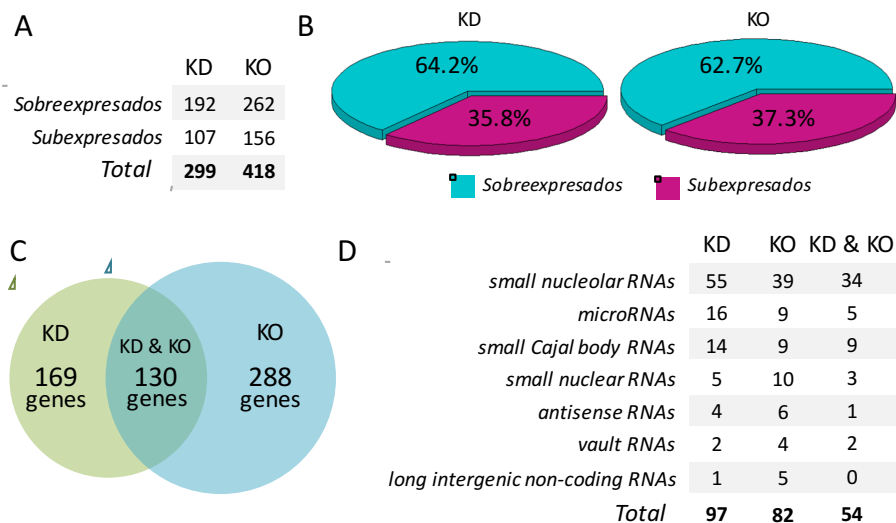


Figura 16. Genes con expresión diferencial en los modelos KD y KO. A) Número de genes totales encontrados con cambios en expresión en ambos modelos (KD y KO). B) representación gráfica en porcentajes de los genes que se sobreexpresan y subexpresan en ambos modelos. C) número de genes que se encontraron en ambos modelos. D) RNAs no codificantes identificados.

De igual manera, se puede observar que una gran proporción de los genes identificados son ncRNAs (Figura 16D), entre ellos genes que participan en la maduración de RNA ribosomal (snoRNA) y asociados al mecanismo *splicing* (scaRNAs, snRNAs). Indicando que BORIS podría estar involucrado en la regulación de genes que participan en procesos esenciales para la célula, tales como el *splicing* y la maduración de RNAs ribosomales.

Posteriormente, con el fin de identificar los procesos celulares donde BORIS pudiera estar implicado, se realizó un Análisis de Enriquecimiento de Vías *de novo* (*De novo Pathway Enrichment Analysis*)¹⁴² usando la plataforma KeyPathwayMiner¹⁴³, con los 130 genes con cambios en la expresión identificados en las células KD y KO (Figura 16C).

El análisis con KeyPathwayMiner permite comparar nuestros datos con todo el interactoma anotado previamente en bases de datos, con el propósito de extraer la red máxima que contengan los genes desregulados por BORIS en los modelos KD y KO. Estas redes pueden representar módulos funcionales o nuevas vías activas que no sería posible identificar usando la información contenida en otras bases de datos¹⁴².

En la Figura 17 se esquematiza la red de interacciones proteína-proteína identificada con los genes desregulados en los modelos KO y KD usando la base de datos de BioGRID, donde se puede evidenciar que una parte importante de los genes tienen una participación en cáncer, son factores de transcripción o proteínas que se expresan preferencialmente en testículo.

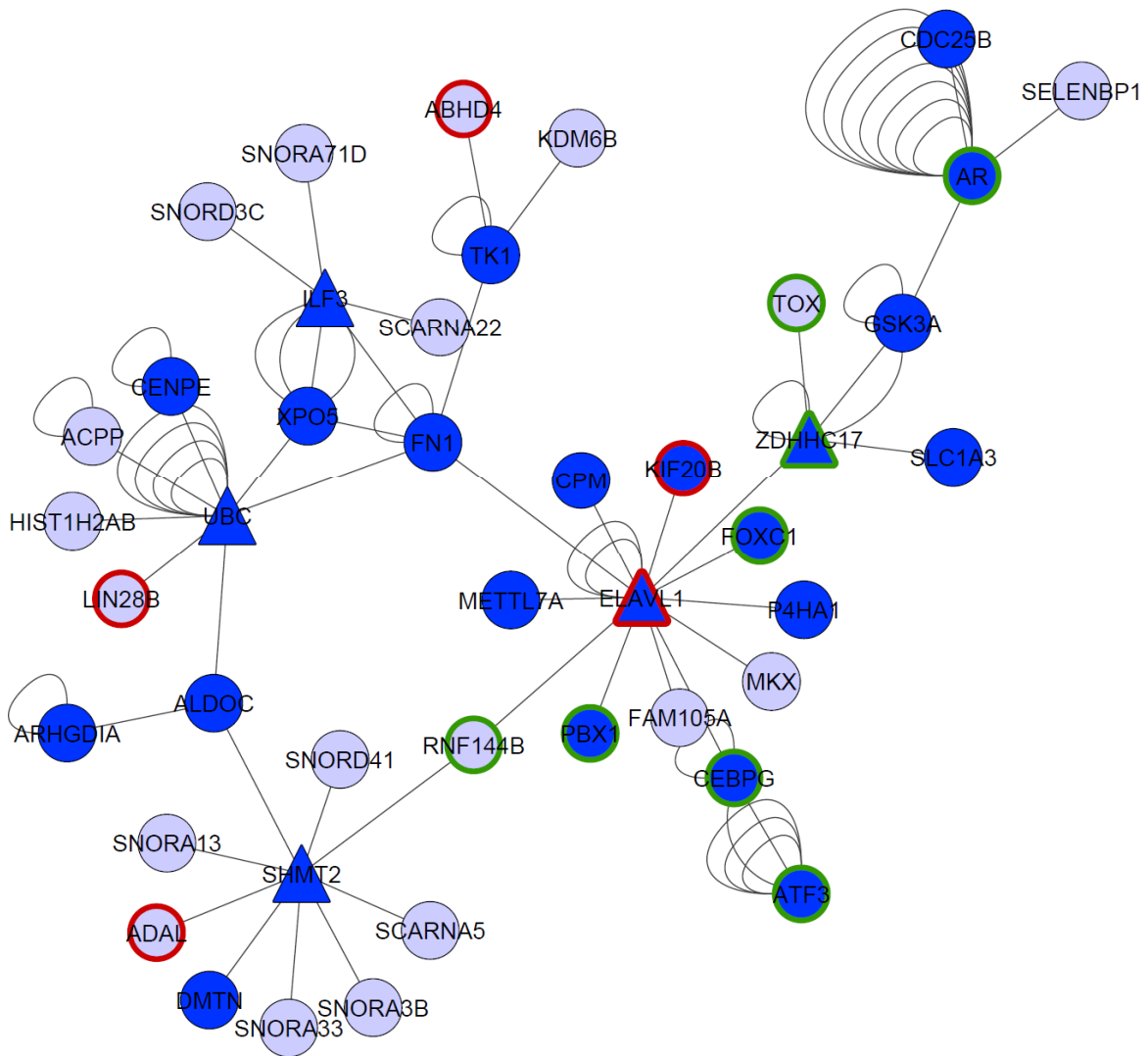


Figura 17. Red de interacciones proteína-proteína identificada con los genes diferencialmente expresados en los modelos KD y KO. Análisis con KeyPathwayMiner utilizando la base de datos de BioGRID. Los nodos (círculos o triángulos) representan proteínas y las líneas indican la interacción entre ambos. Los nodos circulares indican las proteínas o ncRNAs codificadas por los genes con expresión diferencial en los modelos KD y KO. Los triángulos representan proteínas con las que ya se ha reportado su interacción. Los nodos en color azul intenso indican aquellas proteínas que se sabe que tienen una participación en cáncer (ciclo celular, proliferación, diferenciación, etc.). Los bordes color verde indican factores de transcripción y los bordes rojos indican proteínas con expresión preferente en testículo.

Posteriormente, al hacer un análisis ontológico de los genes contenidos en la red encontramos que las proteínas que la integran participan en la regulación del proliferación, diferenciación celular y desarrollo, entre otros (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del análisis ontológico de la red identificada con la base de datos BioGRID (Figura 17).

	<i>p-value</i>	<i>FDR q-value</i>
<i>Regulación del desarrollo celular</i>	9.58E-07	3.63E-03
<i>Vía de señalización de EGFR</i>	2.54E-06	3.93E-03
<i>Regulación de la expresión génica</i>	3.48E-06	4.19E-03
<i>Regulación del ciclo celular</i>	4.79E-06	4.24E-03
<i>Regulación de la diferenciación celular</i>	8.14E-06	6.29E-03
<i>Regulación negativa del metabolismo del nitrógeno</i>	9.30E-06	6.29E-03
<i>Regulación negativa del desarrollo celular</i>	9.45E-06	6.29E-03
<i>Regulación de la proliferación celular</i>	9.86E-06	6.29E-03
<i>Regulación de la actividad de la RNA Polimerasa II</i>	1.14E-05	6.86E-03
<i>Regulación de los procesos biosintéticos</i>	2.99E-05	1.27E-02

Posteriormente, se realizó el mismo tipo de análisis, esta vez utilizando la base de datos HTRIdb que contiene información de regulación transcripcional. La Figura 18 muestra una de las redes identificadas, donde varios de los genes identificados con expresión desregulada también son blancos de otros factores de transcripción como FOXP3, ETS1 y AR.

Finalmente, se realizó un análisis ontológico de los genes encontrados en la red de regulación transcripcional (Figura 18) y se identificaron procesos asociados a diferenciación y desarrollo celular, al igual que en la red de interacción proteína-proteína. Sin embargo, también se lograron indentificar otras vias, como aquellas asociadas con respuesta a hipoxia, a factores de crecimiento como EGF y de respuesta a progesterona (Tabla 2).

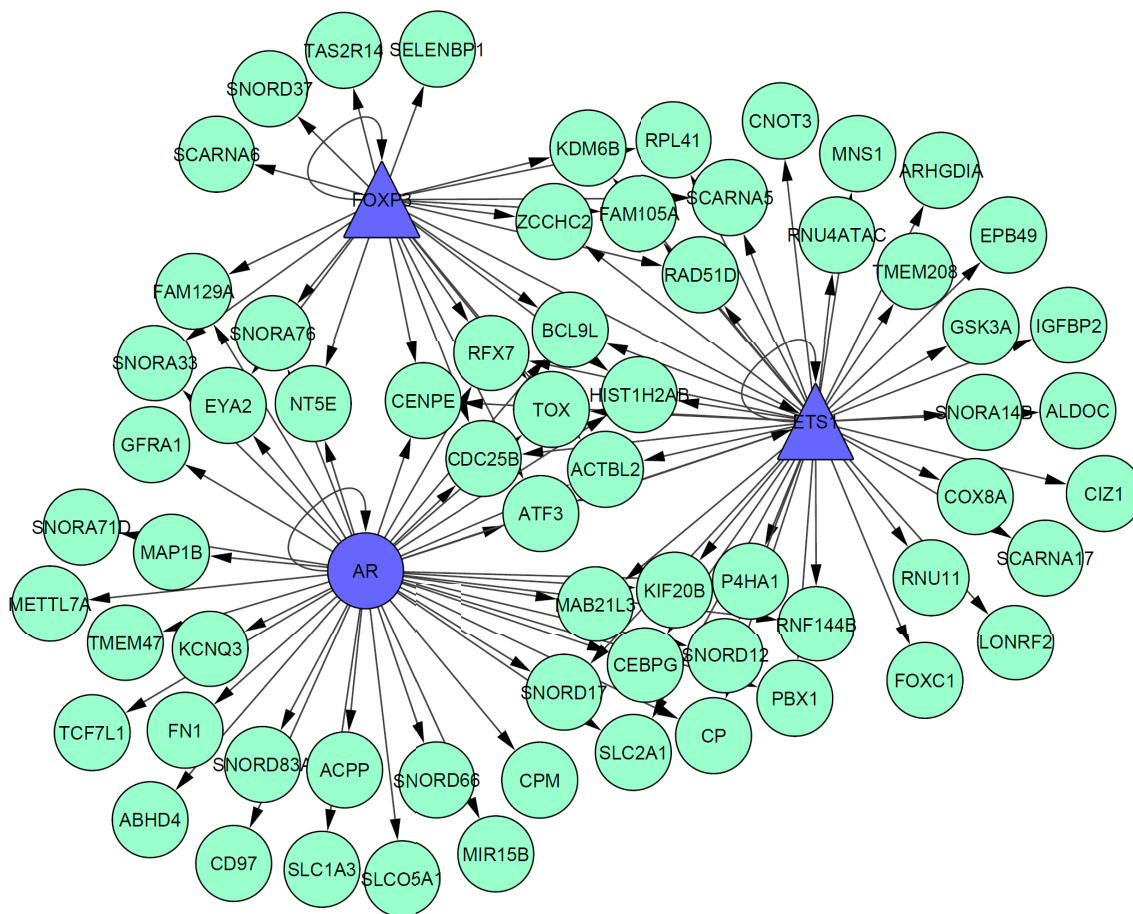


Figura 18. Red de regulación transcripcional identificada con los genes diferencialmente expresados en los modelos KD y KO. Análisis con KeyPathwayMiner utilizando la base de datos de HTRIdb. Los nodos (círculos o triángulos) representan genes y las líneas indican la interacción entre ambos nodos indicando la dirección de la interacción en la red de regulación. Los nodos circulares representan los genes con expresión diferencial en los modelos KD y KO. Los triángulos representan genes, previamente reportados, que regulan la transcripción. Los nodos en color azul indican factores de transcripción con múltiples genes blanco en la red.

Tabla 2. Resultados del análisis ontológico de la red identificada con la base de datos HTRIdb (Figura 18).

	<i>p-value</i>	<i>FDR q-value</i>
<i>Genes regulados por EGF</i>	1.33E-09	1.41E-05
<i>Vía del factor de transcripción HIF-1</i>	2.64E-07	6.41E-04
<i>Regulación de la diferenciación celular</i>	3.01E-07	6.41E-04
<i>Regulación positiva de la diferenciación celular</i>	4.21E-07	6.47E-04
<i>Señalización por EGFR</i>	4.66E-07	6.47E-04
<i>Regulación del desarrollo celular</i>	4.86E-07	6.47E-04
<i>Genes de respuesta a TNF</i>	1.26E-06	1.22E-03
<i>Genes sobreexpresados en hipoxia</i>	2.52E-06	2.23E-03
<i>Genes de respuesta a progesterona</i>	3.13E-06	2.37E-03
<i>Unión a Beta Catenina</i>	8.20E-06	3.64E-03

Los resultados mostrados sugieren que BORIS no sólo participa en la regulación transcripcional de *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1*; sino que también participa en la regulación de varios genes, entre ellos RNAs no codificantes asociados a splicing y maduración de RNA ribosomal, al igual que genes que codifican proteínas que participan en procesos asociados a cáncer, tales como la vía EGFR, respuesta a hipoxia, desarrollo y diferenciación celular, y respuesta a hormonas como progesterona y andrógenos.

Discusión

El gen CTCF y su parálogo *CTCFL* (también conocido como BORIS) codifican proteínas nucleares cuya expresión se encuentra frecuentemente desregulada en varios tipos de cáncer⁸. CTCF no solamente actúa como un regulador de la transcripción reconociendo sitios en el DNA, sino que participa activamente en la organización tridimensional de la cromatina en el núcleo¹⁴⁴. BORIS, por su parte, contiene un dominio de unión al DNA similar al de CTCF⁷; sin embargo, su participación en cáncer no se conoce a detalle.

Además, se ha observado que BORIS es una proteína presente en altos niveles en cáncer de ovario en comparación con tejido no neoplásico¹³⁶ y participa en la regulación transcripcional de múltiples genes, posiblemente mediante la competencia por sitios en el DNA con CTCF o a través de la formación de heterodímeros con CTCF, que eventualmente lleva a cambios en el programa transcripcional en la célula neoplásica⁵⁵.

1.10 BORIS está presente en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario.

Previamente se ha reportado que *CTCFL* está sobreexpresado y se asocia con mal pronóstico en cáncer de ovario¹³⁶. Nuestros resultados muestran que en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario hay presencia de BORIS a nivel de transcrito y proteína. En nuestros resultados encontramos una banda de ~100 kDa que podría corresponder a homodímeros, heterodímeros o modificaciones

postraduccionales de BORIS, tales como la poli-(ADP)-ribosilación, que ha sido identificada en CTCF y que tiene un papel crucial en la regulación de su función²⁴. En relación a esto, no se han reportado modificaciones postraduccionales de BORIS; sin embargo, se sabe que comparte con CTCF aminoácidos clave que son susceptibles a estas modificaciones⁴⁷. De hecho, 3 de 5 sitios donde CTCF es poli-(ADP)-ribosilado se encuentran conservados en BORIS^{47,145}.

Por otra parte, observamos que no hay una relación directa entre los niveles de transcrito y de proteína, lo cual sugiere la participación de mecanismos post-transcripcionales en la regulación de BORIS. En este contexto, se ha reportado que *CTCF* es blanco del miR-709¹⁴⁶, el cual podría estar relacionado con el fenómeno observado en nuestros resultados; sin embargo, desconocemos de este microRNA en nuestro modelo celular empleado.

Otro mecanismo que podría explicar la falta de relación entre los niveles de transcrito y proteína, es la expresión diferencial de las diferentes variantes de *splicing*. En el caso de *CTCF*, sus 23 variantes pueden transcribirse a partir de distintos TSS⁴⁹, las cuales contienen distintas secuencias 5' y 3'UTRs⁵¹. En relación a esto, se ha reportado previamente que estas secuencias UTRs participan en la regulación del inicio de la traducción¹⁴⁷. Por lo tanto, la presencia de variantes de *splicing* específicas de *CTCF* en cada línea celular podrían estar relacionados con diferentes niveles de proteína de BORIS encontrados en cada una de éstas. Dicho esto, nuestros resultados muestran que existe una expresión

diferencial de variantes de *splicing* entre líneas celulares, lo cual sugiere que éste podría ser un mecanismo presente en las líneas derivadas de cáncer de ovario.

Hasta ahora existen pocos blancos génicos descritos para BORIS, entre estos se encuentran genes relacionados con el linaje celular de testículo. Uno de los abordajes relevantes en el presente estudio fue evaluar la relación entre los niveles de transcrito de *CTCF* y los genes *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1*.

MUC1 y *MUC16* son mucinas transmembranales que se sobreexpresan en cáncer^{110,149}. *MUC16* se utiliza como biomarcador de recurrencia en cáncer de ovario y *MUC1* en cáncer de mama. Ambas proteínas son unas de las pocas moléculas que están aprobadas por la FDA para su uso como biomarcadores^{100,101}. *MALAT1*, es un RNA largo no codificante sobreexpresado en cáncer de ovario asociado con metástasis y progresión del tumor^{130,150}. A pesar de la demostrada relevancia en cáncer de estos tres genes, poco se sabe sobre los mecanismos que regulan su transcripción. En este trabajo encontramos que los genes involucrados en el cáncer de ovario como *MUC1*, *MUC16* y el RNA no codificante *MALAT1* pueden estar siendo regulados por BORIS.

Se ha demostrado que *CTCF* se sobreexpresa en cáncer de ovario, al igual que *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1*, por lo que gran parte de los estudios en estos genes reportan que tienen propiedades oncogénicas^{102,108,150}. Debido a esto, esperábamos encontrar que la disminución de BORIS provocaría una disminución en los transcritos de *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1*; sin embargo, nuestros resultados muestran que los niveles de *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1* aumentan con el KD y KO

de BORIS. Es importante señalar que desconocemos las implicaciones en cáncer de ovario del aumento de estos genes con la disminución de BORIS, ya que trabajo únicamente aborda el papel de BORIS en líneas de cáncer de ovario a nivel transcripcional, la cual es una red compleja y desconocemos los procesos post-transcripcionales o post-traduccionales que puedan estar participando.

A pesar de lo anterior, nuestros resultados indican que BORIS está involucrado en la regulación de la transcripción de estos genes, sugiriendo que BORIS podría tener una participación importante en cáncer mediante la regulación de *MUC1*, *MUC16* y *MALAT1*.

Se ha propuesto a las proteínas de MUC1 y MUC16 podrían utilizarse para distinguir entre tipos histológicos de cáncer de ovario^{112,151}. Nuestros resultados indican que BORIS es un posible regulador de estos genes, lo cual sugiere que la utilización de BORIS en conjunto con estos dos genes, no sólo ayudaría en el monitoreo de la progresión de la enfermedad, sino también en el diagnóstico histológico del cáncer de ovario. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para evaluar la utilidad de BORIS como biomarcador de pronóstico o en el diagnóstico histológico en cáncer de ovario.

1.11 BORIS participa en la represión transcripcional de RNAs pequeños no codificantes, tales como SNORDs, SNORAs y SCARNAs.

BORIS puede ocupar del ~29–38 % del total de sitios reconocidos por CTCF⁵⁵; lo cual, sumado a que una gran parte de los sitios de CTCF son tejido-específico

(64%)¹⁷, sugiere que un alto porcentaje de sitios en el DNA a los que BORIS tiene capacidad de reconocer pueden ser tejido-específico. Por lo tanto, los genes que BORIS regula en podrían ser distintos dependiendo del tipo de cáncer del que se trate. Es por esta razón, que la identificación de aquellos genes que son regulados directa o indirectamente por BORIS en cáncer de ovario es de especial importancia.

En 2015, el grupo de V. Lobanenkov, realizó experimentos de RNA-seq en líneas celulares con Knock Down de BORIS con el fin de identificar aquellos genes que cambian su expresión. En ellas se identificó que BORIS está involucrado en la regulación de genes que participan en múltiples procesos celulares asociados a cáncer. Nuestros resultados obtenidos a partir del análisis de expresión de las células KD y KO de BORIS muestran que la disminución de BORIS provoca una mayor activación transcripcional, indicando que BORIS podría estar actuando principalmente como un represor. Esto contrasta con datos previos donde se describe la función de activador transcripcional de BORIS como en el caso de los genes *h-TERT*^{60,139}, *NOTCH3*⁵⁹ y gran parte de los estudios sobre BORIS en genes específicos^{56,58,61,152-154}. Sin embargo, análisis de transcriptoma usando RNA-seq en las líneas celulares K562 y MCF7 del grupo de V. Lobanenkov, se encontró un fenómeno similar a nuestros resultados, en el que ~65% de los genes identificados aumentan su expresión y ~35% disminuye⁵⁵. Estos hallazgos fortalecen nuestros resultados donde cabe la posibilidad de que BORIS esté participando principalmente como un represor de la transcripción independientemente del tipo celular.

Adicionalmente, varios de los genes identificados en los análisis de expresión en las células KD y KO de BORIS son RNAs pequeños nucleares (RNUs), nucleolares (SNORDs y SNORAs) y de cuerpos de Cajal (SCARNAs). El hecho de observar que todos estos RNAs pequeños aumentan su expresión con la disminución de BORIS, sugiere un mecanismo de regulación en común. En relación a lo anterior, se sabe que los genes que codifican para estos RNAs están distribuidos a lo largo del genoma, y más del 90% de estos se localizan en intrones de genes que codifican para proteínas¹⁵⁵; sin embargo, se desconocía el mecanismo de regulación de estos RNAs no codificantes. Recientemente Wang Q. et al. (2015) identificaron mediante experimentos de 4C las regiones del genoma asociadas con Cuerpos de Cajal en células HeLa¹⁵⁵. Entre los genes identificados, reportan que RNAs no codificantes como RNUs, SNORDs, SNORAs y SCARNAs, se localizan en los territorios cromosómicos cercanos a los Cuerpos de Cajal y la disrupción de estas estructuras provoca una disminución en la expresión de estos RNAs pero no un cambio en la expresión de los genes huésped, sugiriendo que la regulación de la expresión de estos RNAs es dependiente de la estructuración de los Cuerpos de Cajal. Adicionalmente, en este mismo estudio identifican al RNA no codificante *MALAT1*, como uno de los genes que disminuye sus niveles de expresión como resultado de la alteración en la estructura de los cuerpos de Cajal. Es decir, *MALAT1* y RNAs pequeños nucleolares, nucleares y de cuerpos de Cajal, disminuyen su transcripción tras la disrupción de los cuerpos de Cajal. Nuestros resultados muestran que la disminución de BORIS provoca cambios en la expresión de *MALAT1*, RNUs, SNORDs, SNORAs y SCARNAs, lo cual sugiere

que BORIS podría participar, directa o indirectamente, en la represión transcripcional de estos, posiblemente favoreciendo la formación de asas inter o intracromosómicas que participan en la arquitectura de estructuras nucleares como los cuerpos de Cajal, similar a la función que cumple CTCF en el núcleo. En relación a lo anterior, V. Lobanenkov et al. reportaron que BORIS podría participar en la organización de asas de cromatina⁵⁵. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para conocer el mecanismo por el cual BORIS podría participar en la organización de la cromatina en el núcleo y en la regulación transcripcional de RNAs pequeños asociados a cuerpos de Cajal.

Finalmente, se sabe que algunas familias de SNORDs están regulados mediante impronta génica, estas familias se encuentran en el locus asociado con el síndrome de Prader-Willi¹⁵⁶, sugiriendo que algunos de los cambios de expresión observados en estos ncRNAs podrían ser ocasionados, no solamente mediante posibles interacciones inter-cromosómicas mediadas por BORIS y CTCF, sino también por alteraciones en la presencia de BORIS en regiones reguladoras como los ICR, donde se sabe que BORIS y CTCF participan en impronta⁴⁷. De esta manera, se apoya el papel de BORIS en la regulación de genes improntados, los cuales tienen una participación importante en procesos neoplásicos¹⁵⁷.

1.12 BORIS participa en la regulación transcripcional de genes expresados en testículo y asociados a cáncer.

La expresión de *CTCF* ha sido extensamente asociada con cáncer¹⁵⁸, donde se ha observado que regula a varios genes relacionados con un estado no diferenciado en la célula^{59,60,139}. Sin embargo, desde el punto de vista genómico, la participación de BORIS en cáncer no se conoce a detalle. Nuestros datos muestran que gran parte de los genes identificados a partir de los perfiles de expresión, están asociados con diferentes procesos celulares como la vía EGFR, respuesta a hipoxia, adhesión celular, etc; sugiriendo que BORIS participa en la regulación de genes que participan en múltiples vías asociadas a cáncer.

En este trabajo se analizaron los genes diferencialmente expresados con el propósito de encontrar una red de interacción asociada al KD o KO de BORIS. Este método consiste en extraer una red enriquecida de genes diferencialmente expresados e integrarla con una base de datos con información de interacciones proteína-proteína. Esta red enriquecida está compuesta por proteínas que podrían estar participando en conjunto para regular un proceso específico^{142,143}.

Nuestros resultados muestran que la red identificada está formada por proteínas que participan en múltiples funciones celulares, tales como procesos neurológicos, o con expresión preferencial en testículo, los cuales también están asociados a proteínas conocidas por su relevancia en cáncer. Un primer ejemplo es el caso del Receptor de Andrógenos (AR) que participa en procesos

neoplásicos^{159,160} y SELENBP1 que está asociado con procesos neurológicos y neoplásicos¹⁶¹⁻¹⁶⁶. Un segundo ejemplo es el caso de la proteína ELAVL1, cuyo gen tiene expresión preferencial en testículo^{167,168} e interacciona con proteínas que participan en la vía de respuesta a hipoxia (P4HA1), adhesión celular (MKX) o diferenciación celular (CPM y FOXC1). En particular, ELAVL1 es necesario para la espermatogénesis, al igual que BORIS, indicando que BORIS regula genes que son necesarios para la espermatogénesis¹⁶⁸ y también en un contexto neoplásico^{169,170}.

El caso de ELAVL1 es de especial importancia ya que no es un gen diferencialmente expresado en las células con KD o KO de BORIS; sin embargo, nuestro análisis permitió identificarlo como una posible proteína asociada con la disminución de BORIS que podría tener un papel relevante en cáncer de ovario, donde se ha reportado su sobreexpresión¹⁷¹.

Lo anterior sugiere que una de las funciones de BORIS en cáncer es la regulación de genes que participan en la espermatogénesis, los cuales se reactivan en tumores con expresión de *CTCF*. En relación a lo anterior, existen reportes previos de genes que participan en la espermatogénesis regulados por BORIS, tal es el caso de *TSP50*¹⁷² y *CST*⁶¹; y que tienen una relevancia en cáncer. Nuestro estudio identificó genes importantes en la espermatogénesis no reportados previamente como blancos de BORIS y que podrían tener un papel relevante en cáncer de ovario.

Por otro lado, también obtuvimos la red transcripcional asociada con el KD o KO de BORIS. Nuestro análisis nos permitió identificar Factores de Transcripción, tales como ETS1 y FOXP3, los cuales no cambiaron su expresión con la disminución de BORIS, pero que podrían participar en conjunto con BORIS. ETS1 es un Factor de Transcripción que regula genes asociados con angiogénesis y está relacionado con resistencia a quimioterapia en cáncer de ovario^{173,174}, donde su sobreexpresión correlaciona con mal pronóstico¹⁷⁵. Por su parte, *FOXP3* es un gen supresor de tumor que disminuye su expresión en cáncer de ovario y su sobreexpresión inhibe la proliferación^{176,177}.

Finalmente, identificamos que un grupo de genes con expresión diferencial son blancos del Receptor de Andrógenos, el cual disminuye sus niveles con el KD o KO de BORIS, indicando que BORIS podría participar directamente en la activación transcripcional de AR, y en consecuencia se observan cambios en los niveles de transcritos de los blancos regulados por AR. Se sabe que AR se expresa de manera normal en ovario¹⁷⁸ y está involucrado en procesos como la ovulación¹⁷⁹; en cáncer se ha observado que estimulación del Receptor de Andrógenos promueve la proliferación celular¹⁵⁹. Nuestros resultados indican que el KD o KO de BORIS provoca una disminución en los transcritos de AR, sugiriendo que BORIS es un activador de la transcripción de AR.

El receptor de andrógenos ha sido ampliamente estudiado en cáncer de próstata^{180,181} y se ha visto expresado también en cáncer de mama¹⁸². La relación entre BORIS y la expresión de receptores hormonales había sido previamente

identificada en cáncer de endometrio, donde pacientes con altos niveles de BORIS tienen cambios en la expresión no sólo el AR, sino también el receptor de estrógeno y de progesterona⁸⁵. Sin embargo, la expresión de AR no había sido identificada como un proceso asociado directamente a la disminución de BORIS en un modelo de cáncer de ovario y son necesarios estudios adicionales para evaluar a BORIS como un regulador directo de la transcripción de AR.

En relación a lo anterior, el NCI (*National Cancer Institute, USA*) inició un proyecto piloto en 2009 con el propósito de generar una lista de antígenos de cáncer que tienen prioridad en la investigación en medicina traslacional para el desarrollo de vacunas dirigidas contra estas moléculas. Este proyecto propone a 75 antígenos seleccionados, entre ellos se encuentran BORIS, MUC1 y AR¹⁸³. Adicionalmente se reportaron otros antígenos prioritarios según el NCI, tales como MAGE-A1, MAGE-A3 y NY-ESO-1¹⁸³, los cuales son CTAs y blancos directos de BORIS^{56,57,80}. El hecho de haber identificado a BORIS como un regulador de *MUC1*, *MUC16* y *AR*, indica que BORIS podría tener una posible utilidad como biomarcador de pronóstico en cáncer de ovario, dado que también se ha detectado su presencia en suero al igual que CA125 (MUC16) en pacientes con cáncer⁸¹.

Por lo tanto, encontramos con nuestros resultados que BORIS regula la expresión de genes que participan en múltiples procesos, tales RNAs no codificantes y vías de señalización asociadas con cáncer como EGFR, HIF y β -Cateninas. De igual manera, identificamos genes asociados con la disminución de

BORIS que participan en la espermatogénesis y que podrían tener un papel relevante en cáncer de ovario.

Conclusión

Identificamos los perfiles de expresión asociados con la disminución de BORIS, ya sea mediante Knock Down o Knock Out, donde encontramos que BORIS participa en la regulación transcripcional de RNAs no codificantes como *SNORDs*, *SNORAs* y *SCARNAs*, al igual que los genes *MUC1*, *MUC16*, *MALAT1* y *AR*. De igual manera, genes con expresión preferencial en testículo que participan en vías desreguladas en cáncer alteran su expresión con la disminución de BORIS.

Por lo tanto, identificamos que BORIS participa en la regulación transcripcional de multiples genes y que BORIS podría tener una participación relevante en cáncer de ovario, donde esta proteína podría ser un novedoso biomarcador de pronóstico.

Perspectivas

1. Se identificó a BORIS como un posible regulador de la transcripción de *MUC1*, *MUC16*, *MALAT1* y *AR*; sin embargo, se desconoce si BORIS participa de manera directa en esta regulación. Por lo tanto, experimentos de Inmunoprecipitación de la Cromatina son necesarios para evaluar la presencia de BORIS en los promotores de dichos genes.
2. Experimentos de CHIP-seq y RNA-seq son necesarios para caracterizar de mejor manera los sitios de unión de BORIS en el genoma y los genes a los que regula.
3. Es necesaria la caracterización de la expresión de *CTCF*, *MUC1*, *MUC16* y *AR* en muestras de pacientes con cáncer de ovario, con el fin de determinar si los resultados obtenidos en el modelo de líneas celulares están representados en muestras.

Metodología

1.13 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares HeLa, OVCAR3, SKOV3 y SW626 obtenidas de ATCC en las condiciones recomendadas por el proveedor, mostradas en la siguiente tabla.

<i>LÍNEA CELULAR</i>	<i>MEDIO SUPLEMENTADO</i>	<i>CONDICIONES</i>
HELA (CCL-2)	DEMEM (Cat. 11965-092, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 10%.	Aire, 95%; CO ₂ 5%, 37°C
NIH: OVCAR3 (HTB-161)	RPMI-1640 (Cat. 11875-093, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 20% Insulina Bovina (Cat. I0516-5ML, Sigma) 0.01mg/mL	Aire, 95%; CO ₂ 5%, 37°C
SKOV3 (HTB-77)	McCoy's 5a (Cat. 16600082, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 10%.	Aire, 95%; CO ₂ 5%, 37°C
SW626 (HTB-78)	Leibovitz's L-15 (Cat. 11415064, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 10%.	Aire, 100%, 37°C

1.14 RT-PCR y PCR cuantitativa

Se extrajo RNA de las líneas celulares crecidas a una confluencia de 70-90% con TRIzol Reagent (Cat. 15596026, Thermo Fisher Scientific) y el kit Direct-zol RNA Mini Kit (Cat. R2050, Zymo Research).

La concentración del RNA fue cuantificada con NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y la integridad evaluada con 2200 TapeStation (Agilent Technologies). Las imágenes de calidad obtenidas se muestran en la siguiente figura.

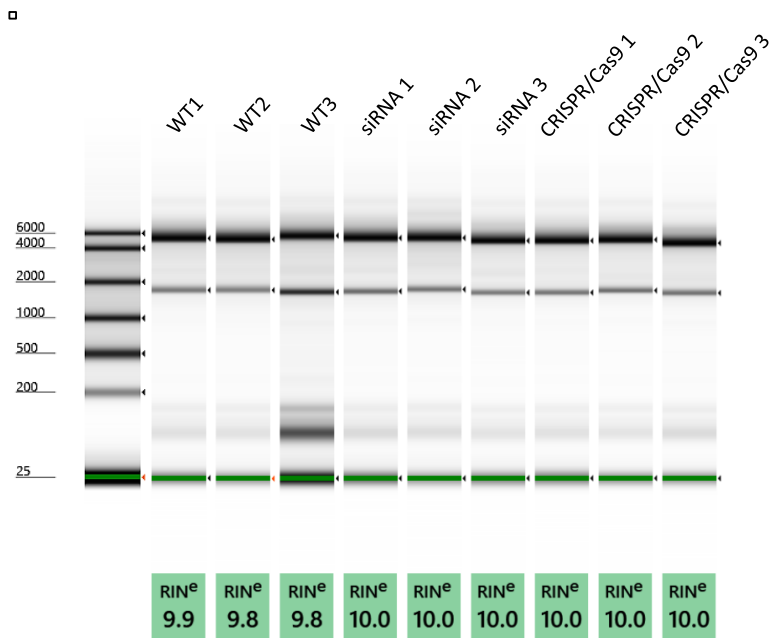


Figura S1. Electroforesis en capital de los RNAs usados para microarreglos de expresión. En la parte superior se indica la calidad en la escala de RIN.

El cDNA fue obtenido con el kit GeneAmp (Cat. N8080143, Thermo Fisher Scientific) usando oligo d(T).

La PCR cuantitativa se realizó en los equipos QuantStudio3 y StepOnePlus (Applied Biosystems) usando SYBR Green PCR Master Mix (Cat. 4309155, Thermo Fisher Scientific).

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se muestran en la siguiente tabla.

<i>NOMBRE</i>	<i>SECUENCIA 5'-3'</i>
<i>CTCFL forward</i>	GGAGCATTTGTAAACAGTCGGG
<i>CTCFL reverse</i>	ATGACCGCTCACATTCGTACC
<i>CTCFL sf1 forward</i>	GAACGGAGACGAAGCTGCTG
<i>CTCFL sf1 reverse</i>	CTCTGCAGGCGACAGGAAAC
<i>MUC1 forward</i>	CTGAACTCCCAGCTCACCAG

<i>MUC1 reverse</i>	GTGCCATTCCACTCCA
<i>MUC16 forward</i>	AAGCTTCTTTGGACCCTGGC
<i>MUC16 reverse</i>	AACAGTGCCCAGGCTACTAC
<i>MALAT1 forward</i>	TCAGGTCTGTCTGTTCTGTTGG
<i>MALAT1 reverse</i>	CAAGCATTGGGGAACACA
<i>GAPDH forward</i>	TGTCAAGCTCATTTCTGGT
<i>GAPDH reverse</i>	TCTTACTCCTGGAGGCCAT

Los resultados de analizaron con el método de $\Delta\Delta C_t$ con *GAPDH* como control interno y como normalizador HeLa en la Figura 10 o un control negativo en las Figura 14Figura 15.

1.15 Extracción de proteína y Western Blot

Se extrajo proteína de células crecidas a una confluencia del 70-90% con Buffer de Lisis (Cat. 9803, Cell Signaling), Coctel de inhibidores de proteasas 1% (Cat. 5871, Cell Signaling), PMSF 1% (Cat. P7626, Sigma) y Ortovanadato de sodio 1% (Cat. 069K0031, Sigma). La proteína fue cuantificada por el método de Lowry (DC Protein Assay Cat. 5000116, Bio-Rad).

Para Western Blot, se utilizaron 10 μ g de proteína que se resolvieron en un gel de Acrilamida al 10% (Cat. SLBHO323V, Sigma). La proteína se transfirió a una membrana de PVDF y se hibridó con los anticuerpos siguientes:

ANTICUERPO	TAMAÑO	ORIGEN	DILUCIÓN	MARCA	CAT. NO.
ANTI-CTCF	80 kDa	Conejo	(1:200)	Sigma-Aldrich	HPA001472
ANTI-GAPDH	40.2 kDa	Conejo	(1:2500)	Santa Cruz Bt.	SC-25778
HRP ANTI-RABBIT		Cabra	(1:5000)	Santa Cruz Bt.	sc-2004

Se revelaron las membranas con Luminol y la densitometría se realizó con el software ImageJ (NIH, USA) con GAPDH como control de carga.

1.16 Transfecciones de siRNAs

Se utilizaron los siRNAs Accell Smart Pool set de 4 (Cat. A-003819-100-0005, Dharmacon) con las secuencias mostradas en la siguiente tabla.

<i>siRNA</i>	<i>SECUENCIA BLANCO</i>
<i>A-003819-13, CTCFL</i>	CCAUUUAUUGCUUAAUUAGUA
<i>A-003819-14, CTCFL</i>	CUAGAAUGUCAAGUUUUAA
<i>A-003819-15, CTCFL</i>	CUCACAGUUUCAAAUUCAA
<i>A-003819-16, CTCFL</i>	CGACUGUUUACAAAUGCUC

Los viales con RNA liofilizado se resuspendieron de acuerdo a las instrucciones del proveedor con el 5x siRNA Buffer (Cat. B-002000-UB-100, Dharmacon) y agua libre de RNAsas (Cat. B-003000-WB-100, Dharmacon).

Se transfectaron 150,000 células crecidas en placas de 12 pozos con una concentración final de siRNAs 1 μ M en 1mL de Accell Delivery Media (Cat. B-005000, Dharmacon) y se incubaron durante 48hrs. Se usó como control negativo el Accell Non-targeting Control Pool (Cat. D-001910-10-05, Dharmacon).

Terminado el tiempo de transfección, las células provenientes de 3 pozos se separaron del fondo con un gendarme y se dividieron para la obtención de RNA y proteína.

1.17 Transfección de plásmido CRISPR/Cas9

Se sembraron 250,000 células en placas de 6 pozos. Para la transfección del plásmido BORIS CRISPR/Cas9 KO Plasmid (h) (Cat. sc-403313, Santa Cruz Biotechnology) con las secuencias guía mostradas en la siguiente tabla:

<i>siRNA</i>	<i>SECUENCIA BLANCO</i>	<i>Exón blanco</i>
<i>sc-403313A1</i>	GTGGAGAACTCGTCCGACAC	6
<i>sc-403313A2</i>	TCCGCAGCAGAGTGACCGTA	5
<i>sc-403313A3</i>	GTTGCAGTTCCACGCTCTAG	3

Se utilizó Xfect transfection reagent (Cat. 631317, Clontech) y se siguieron las instrucciones del proveedor. Se transfectaron 2µg de plásmido, 1µL de polímero y 100µL de Xfect Reaction buffer en 1mL de medio de cultivo completo por cada pozo. Se usó como control negativo el Control CRISPR/Cas9 Plasmid (Cat. sc-418922, Santa Cruz Biotechnology)

Se incubaron las células durante 48 hrs y posteriormente las células se separaron con un gendarme y se dividieron para la extracción de RNA y proteína.

1.18 Análisis de los perfiles de expresión

A partir de RNA total, se amplificó DNA y se biotinizó usando el kit GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit (cat. 902280, Affymetrix). Las muestras se hibridaron en los microarreglos GeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix). El marcaje, hibridación y lectura de los datos se realizó usando el Beckman Coulter Biomek™ FXP Target Prep Express (TPE) System, el Hybridization Oven 640/645, el GeneChip Fluidics Station FS450 y el GCS 3000 Scanner System.

1.18.1 Análisis de expresión diferencial

El pre-procesamiento de los microarreglos de expresión se realizó con los paquetes `oligo`, `oligoData`, `affycoretools`, y `genefilter` de Bioconductor en el lenguaje de programación R.

Para evaluar la calidad de los datos se utilizó el paquete `ArrayQualityMetrics` y el análisis de expresión diferencial se realizó con el paquete `Limma`. Se utilizó un valor p ajustado FDR de 0.1 y un logFC mayor a 1.9 o menor que -1.9.

1.18.2 Análisis de enriquecimiento de vías

Para el Análisis de Enriquecimiento de Vías *de novo* se utilizó la aplicación `KeyPathwayMiner` en la plataforma de Cytoscape con un valor de $k=2$ y $l=0$ y las bases de datos de BioGRID y HTRIdb.

El análisis ontológico se realizó con la base de datos de Molecular Signatures Database (Broad Institute).

Literatura citada

1. Allis, C. D., Jenuwein, T. & Reinberg, D. *Epigenetics*. (2006).
2. American Cancer Society. Oncogenes and tumor suppressor genes. 1–18 (2014).
3. Esteller, M. Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biol. Rep.* **3**, 1039–1059 (2011).
4. Ong, C. & Corces, V. G. CTCF : an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat. Publ. Gr.* **15**, 234–246 (2014).
5. Ohlsson, R., Renkawitz, R. & Lobanenkov, V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* **17**, 520–527 (2001).
6. Franco, M. M., Prickett, A. R. & Oakey, R. J. The Role of CCCTC-Binding Factor (CTCF) in Genomic Imprinting, Development, and Reproduction. *Biol. Reprod.* **91**, 125 (2014).
7. Klenova, E. M., Morse, H. C., Ohlsson, R. & Lobanenkov, V. V. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin. Cancer Biol.* **12**, 399–414 (2002).
8. Marshall, A. D., Bailey, C. G. & Rasko, J. E. J. CTCF and BORIS in genome regulation and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **24**, 8–15 (2014).
9. 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**, 2217–27 (2010).
10. Filippova, G. N. *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. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2802–13 (1996).
11. Bell, A. C., West, A. G. & Felsenfeld, G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**, 387–396 (1999).
12. Bell, A. C. & Felsenfeld, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* **405**, 482–485 (2000).
13. Sun, S. *et al.* XJpx RNA activates *xist* by evicting CTCF. *Cell* **153**, 1537–1551 (2013).
14. Lu, Y., Shan, G., Xue, J., Chen, C. & Zhang, C. Defining the multivalent functions of CTCF from chromatin state and three-dimensional chromatin interactions. *Nucleic Acids Res.* **44**, 6200–6212 (2016).
15. Zambrano-Galván, G., Reyes-Romero, M., Bologna-Molina, R., Almeda-Ojeda, O. E. & Lemus-Rojero, O. CTCFL (BORIS) mRNA Expression in a Peripheral Giant Cell Granuloma of the Oral Cavity. *Case Rep. Dent.* **2014**, 4 (2014).
16. Ohlsson, R., Lobanenkov, V. & Klenova, E. Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? *BioEssays* **32**, 37–50 (2010).
17. Wang, H. *et al.* Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res.* **22**, 1680–1688 (2012).
18. Nakahashi, H. *et al.* A genome-wide map of CTCF multivalency redefines the CTCF code. *Cell Rep.* **3**, 1678–89 (2013).
19. Kim, T. H. *et al.* Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* **128**, 1231–1245 (2007).
20. Schmidt, D. *et al.* Waves of retrotransposon expansion remodel genome organization and CTCF binding in multiple mammalian lineages. *Cell* **148**, 335–48 (2012).
21. Renda, M. *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. *J. Biol. Chem.* **282**, 33336–33345 (2007).

22. Zampieri, M. *et al.* ADP-ribose polymers localized on Ctfp-Parp1-Dnmt1 complex prevent methylation of Ctfp target sites. *Biochem. J.* **441**, 645–52 (2012).
23. Guastafierro, T. *et al.* CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. *J. Biol. Chem.* **283**, 21873–21880 (2008).
24. Yu, W. *et al.* Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat. Genet.* **36**, 1105–10 (2004).
25. Saldaña-Meyer, R. *et al.* CTCF regulates the human p53 gene through direct interaction with its natural antisense transcript, Wrap53. *Genes Dev.* **28**, 723–34 (2014).
26. Phillips, J. E. & Corces, V. G. CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell* **137**, 1194–1211 (2009).
27. Bartolomei, M. S., Webber, A. L., Brunkow, M. E. & Tilghman, S. M. Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene. *Genes Dev.* **7**, 1663–1673 (1993).
28. Ferguson-Smith, A. C., Sasaki, H., Cattanaeh, B. M. & Surani, M. A. Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature* **362**, 751–755 (1993).
29. Demars, J. & Gicquel, C. Epigenetic and genetic disturbance of the imprinted 11p15 region in Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes. *Clin. Genet.* **81**, 350–361 (2012).
30. Gaszner, M. & Felsenfeld, G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 703–13 (2006).
31. Barski, A. *et al.* High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* **129**, 823–837 (2007).
32. Shen, Y. *et al.* A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature* **488**, 116–120 (2012).
33. Splinter, E. *et al.* CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the ??-globin locus. *Genes Dev.* **20**, 2349–2354 (2006).
34. Handoko, L. *et al.* CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. *Nat. Genet.* **43**, 630–638 (2011).
35. Chen, H., Tian, Y., Shu, W., Bo, X. & Wang, S. Comprehensive identification and annotation of cell type-specific and ubiquitous CTCF-binding sites in the human genome. *PLoS One* **7**, (2012).
36. Cuddapah, S. *et al.* Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res.* **19**, 24–32 (2009).
37. Dixon, J. R. *et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376–380 (2012).
38. Rao, S. S. P. *et al.* A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* **159**, 1665–1680 (2014).
39. Pederson, T. The Nucleolus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a000638–a000638 (2011).
40. Guerrero, P. A. & Maggert, K. A. The CCCTC-binding factor (CTCF) of drosophila contributes to the regulation of the ribosomal DNA and nucleolar stability. *PLoS One* **6**, (2011).
41. Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. & Bar-Sagi, D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.* **1**, 20–6 (1999).
42. Martindill, D. M. J. *et al.* Nucleolar release of Hand1 acts as a molecular switch to determine cell fate. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1131–1141 (2007).
43. van Koningsbruggen, S. *et al.* High-Resolution Whole-Genome Sequencing Reveals That Specific Chromatin Domains from Most Human Chromosomes Associate with Nucleoli. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3735–3748 (2010).
44. Dillinger, S., Straub, T. & Németh, A. Nucleolus association of chromosomal domains is largely maintained in cellular senescence despite massive nuclear reorganisation. *PLoS One* **12**, e0178821

- (2017).
45. Matheson, T. D. & Kaufman, P. D. Grabbing the genome by the NADs. *Chromosoma* **125**, 361–371 (2016).
 46. GeneCards. CTCFL Gene. Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CTCFL&keywords=ctcfl>.
 47. Loukinov, D. I. *et al.* BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6806–11 (2002).
 48. Hore, T. A., Deakin, J. E. & Marshall Graves, J. A. The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCFL in amniotes. *PLoS Genet.* **4**, e1000169 (2008).
 49. Renaud, S. *et al.* Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7372–7388 (2007).
 50. Woloszynska-Read, A. *et al.* DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCFL expression in ovarian cancer. *Cancer Immun. a J. Acad. Cancer Immunol.* **7**, 21 (2007).
 51. Pugacheva, E. M. *et al.* The Structural Complexity of the Human BORIS Gene in Gametogenesis and Cancer. *PLoS One* **5**, e13872 (2010).
 52. Hark, A. T. *et al.* CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**, 486–489 (2000).
 53. Nguyen, P. *et al.* CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-Binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res.* **68**, 5546–5551 (2008).
 54. Libby, R. T. *et al.* CTCF cis-regulates trinucleotide repeat instability in an epigenetic manner: A novel basis for mutational hot spot determination. *PLoS Genet.* **4**, (2008).
 55. Pugacheva, E. M. *et al.* Comparative analyses of CTCF and BORIS occupancies uncover two distinct classes of CTCF binding genomic regions. *Genome Biol* **16**, 161 (2015).
 56. Hong, J. A. *et al.* Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res.* **65**, 7763–7774 (2005).
 57. Bhan, S. *et al.* BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4267–4276 (2011).
 58. Fiorentino, F. P. *et al.* CTCF and BORIS regulate Rb2/p130 gene transcription: a novel mechanism and a new paradigm for understanding the biology of lung cancer. *Mol. Cancer Res.* **9**, 225–233 (2011).
 59. Zampieri, M. *et al.* The epigenetic factor BORIS/CTCFL regulates the NOTCH3 gene expression in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1839**, 813–825 (2014).
 60. Alberti, L., Renaud, S., Losi, L., Leyvraz, S. & Benhattar, J. High Expression of hTERT and Stemness Genes in BORIS/CTCFL Positive Cells Isolated from Embryonic Cancer Cells. *PLoS One* **9**, (2014).
 61. Suzuki, T. *et al.* Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2473–2484 (2010).
 62. Sati, L., Zeiss, C., Yekkala, K., Demir, R. & McGrath, J. Expression of the CTCFL Gene during Mouse Embryogenesis Causes Growth Retardation, Postnatal Lethality, and Dysregulation of the Transforming Growth Factor beta Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3436–3445 (2015).
 63. Monk, M., Hitchins, M. & Hawes, S. Differential expression of the embryo/cancer gene ECS A (DPPA 2), the cancer/testis gene BORIS and the pluripotency structural gene OCT 4, in human preimplantation development. *Mol. Hum. Reprod.* **14**, 347–355 (2008).
 64. Jelinic, P., Stehle, J. C. & Shaw, P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein

- methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol.* **4**, 1910–1922 (2006).
65. Gilbert, S. F. *Developmental biology, Seventh edition.* (2003).
 66. Scanlan, M. J., Gure, A. O., Jungbluth, A. A., Old, L. J. & Chen, Y. T. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* **188**, 22–32 (2002).
 67. Rivero-Hinojosa, S., Kang, S., Lobanenko, V. V. & Zentner, G. E. Testis-specific transcriptional regulators selectively occupy BORIS-bound CTCF target regions in mouse male germ cells. *Sci. Rep.* **7**, 41279 (2017).
 68. Hernández-Hernández, A., Lilienthal, I., Fukuda, N., Galjart, N. & Höög, C. CTCF contributes in a critical way to spermatogenesis and male fertility. *Sci. Rep.* **6**, 28355 (2016).
 69. Gatewood, J. M., Cook, G. R., Balhorn, R., Bradbury, E. M. & Schmid, C. W. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science (80-.)*. **236**, 962–964 (1987).
 70. Arpanahi, A. *et al.* Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* **19**, 1338–49 (2009).
 71. Kaneda, M. Genomic Imprinting Genomic Imprinting in Mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 51–56 (2011). doi:10.1016/j.diff.2011.05.004
 72. Zhao, Y. & Garcia, B. A. Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a025064 (2015).
 73. Greer, E. L. & Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 343–57 (2012).
 74. Wang, H. *et al.* Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Facilitating Transcriptional Activation by Nuclear Hormone Receptor. *Science (80-.)*. **293**, 853–857 (2001).
 75. Jones, T. A. *et al.* Widespread expression of BORIS/CTCF in normal and cancer cells. *PLoS One* **6**, (2011).
 76. Rosa-Garrido, M. *et al.* A cell cycle role for the epigenetic factor CTCF-L/BORIS. *PLoS One* **7**, (2012).
 77. van de Nobelen, S. *et al.* CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats. *Epigenetics Chromatin* **3**, 19 (2010).
 78. Ogunkolade, B. W. *et al.* BORIS/CTCF is an RNA-binding protein that associates with polysomes. *BMC Cell Biol.* **14**, 52 (2013).
 79. Kholmanskikh, O., Lorient, A., Brasseur, F., De Plaen, E. & De Smet, C. Expression of BORIS in melanoma: Lack of association with MAGE-A1 activation. *Int. J. Cancer* **122**, 777–784 (2008).
 80. Vatolin, S. *et al.* Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res.* **65**, 7751–7762 (2005).
 81. Joosse, S. a, Müller, V., Steinbach, B., Pantel, K. & Schwarzenbach, H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br. J. Cancer* **111**, 1–9 (2014).
 82. D’Arcy, V. *et al.* BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. *Br. J. Cancer* **98**, 571–9 (2008).
 83. Cheema, Z. *et al.* Expression of the cancer-testis antigen BORIS correlates with prostate cancer. *Prostate* **74**, 164–176 (2014).
 84. Looijenga, L. H. J. *et al.* Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: Primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene. *Cancer Res.* **66**, 290–302 (2006).
 85. Hoivik, E. A. *et al.* Hypomethylation of the CTCFL / BORIS promoter and aberrant expression during endometrial cancer progression suggests a role as an Epi-driver gene. *Oncotarget* (2014).

86. Novak Kujundžić, R. *et al.* Possible prognostic value of BORIS transcript variants ratio in laryngeal squamous cell carcinomas - A pilot study. *Pathol. Oncol. Res.* **20**, 687–695 (2014).
87. Velázquez-Hernández, N. *et al.* BORIS and CTCF are overexpressed in squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. *Genet. Mol. Res.* **14**, 6094–6100 (2015).
88. Chen, K. *et al.* BORIS, brother of the regulator of imprinted sites, is aberrantly expressed in hepatocellular carcinoma. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* **17**, 160–5 (2013).
89. Okabayashi, K. *et al.* Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. *Cancer Sci.* **103**, 1617–1624 (2012).
90. Freitas, M. *et al.* Expression of cancer/testis antigens is correlated with improved survival in glioblastoma. *Oncotarget* **4**, 636–46 (2013).
91. Feinberg, A. P., Cui, H. & Ohlsson, R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* **12**, 389–398 (2002).
92. Tiffen, J. C. *et al.* The cancer-testis antigen BORIS phenocopies the tumor suppressor CTCF in normal and neoplastic cells. *Int. J. Cancer* **133**, 1603–1613 (2013).
93. D'Arcy, V. *et al.* The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5978–5986 (2006).
94. Risinger, J. I. *et al.* Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. *Clin. Cancer Res.* **13**, 1713–1719 (2007).
95. Sopik, V., Rosen, B., Giannakeas, V. & Narod, S. A. Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part III. Prospects for the future. *Gynecol. Oncol.* **138**, 757–61 (2015).
96. Sopik, V., Iqbal, J., Rosen, B. & Narod, S. A. Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part I. Incidence. *Gynecol. Oncol.* **138**, 741–749 (2015).
97. Sopik, V., Iqbal, J., Rosen, B. & Narod, S. A. Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part II. Case-fatality. *Gynecol. Oncol.* **138**, 750–756 (2015).
98. Hatrup, C. & Gendler, S. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 431–457 (2008).
99. O'Brien, T. J. *et al.* The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol.* **22**, 348–66
100. ry, A. K. F. z, Levin, J., Chan, M. M. & Chan, D. W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clin. Proteomics* **10**, 1 (2013).
101. Kirwan, A., Utratna, M., O'Dwyer, M. E., Joshi, L. & Kilcoyne, M. Glycosylation-Based Serum Biomarkers for Cancer Diagnostics and Prognostics. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
102. Felder, M. *et al.* MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. *Mol. Cancer* **13**, 129 (2014).
103. Fawzy, A., Mohamed, M. R., Ali, M. A. M., Abd El-Magied, M. H. & Helal, A. M. Tissue CA125 and HE4 Gene Expression Levels Offer Superior Accuracy in Discriminating Benign from Malignant Pelvic Masses. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **17**, 323–33 (2016).
104. Ueland, F. R. A Perspective on Ovarian Cancer Biomarkers: Past, Present and Yet-To-Come. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* **7**, (2017).
105. Morgado, M. *et al.* Tumor necrosis factor- α and interferon- γ stimulate MUC16 (CA125) expression in breast, endometrial and ovarian cancers through NF κ B. *Oncotarget* **7**, 14871–84 (2016).
106. Paulsen, F. *et al.* Regulation of MUC16 by inflammatory mediators in ocular surface epithelial cell lines. *Ann. Anat. - Anat. Anzeiger* **190**, 59–70 (2008).
107. Yamada, N. *et al.* Epigenetic regulation of mucin genes in human cancers. *Clin. Epigenetics* **2**, 85–96 (2011).

108. Gendler, S. J. MUC1, The Renaissance Molecule. **6**, (2001).
109. Peat, N., Gendler, S. J., Lalani, E.-N., Duhig, T. & Taylor-Papadimitriou, J. Tissue-specific Expression of a Human Polymorphic Epithelial Mucin (MUC1) in Transgenic Mice. *Cancer Res.* **52**, (1992).
110. Wang, L. *et al.* Expression of MUC1 in primary and metastatic human epithelial ovarian cancer and its therapeutic significance. *Gynecol. Oncol.* **105**, 695–702 (2007).
111. Siroy, A. *et al.* MUC1 is expressed at high frequency in early-stage basal-like triple-negative breast cancer. *Hum. Pathol.* **44**, 2159–2166 (2013).
112. Cancer Genome Atlas Research Network *et al.* Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609–615 (2011).
113. Clark, S., McGuckin, M. A., Hurst, T. & Ward, B. G. Effect of interferon-gamma and TNF-alpha on MUC1 mucin expression in ovarian carcinoma cell lines. *Dis. Markers* **12**, 43–50 (1994).
114. Morris, J. R. & Taylor-Papadimitriou, J. The Sp1 Transcription Factor Regulates Cell Type-Specific Transcription of MUC1. *DNA Cell Biol.* **20**, 133–139 (2001).
115. Zaretsky, J. Z. *et al.* MUC1 gene overexpressed in breast cancer: structure and transcriptional activity of the MUC1 promoter and role of estrogen receptor alpha (ERalpha) in regulation of the MUC1 gene expression. *Mol. Cancer* **5**, 57 (2006).
116. Dharmaraj, N., Wang, P. & Carson, D. D. Cytokine and Progesterone Receptor Interplay in the Regulation of MUC1 Gene Expression. *Mol. Endocrinol.* **24**, 2253–2266 (2010).
117. Rajabi, H., Joshi, M. D., Jin, C., Ahmad, R. & Kufe, D. Androgen receptor regulates expression of the MUC1-C oncoprotein in human prostate cancer cells. *Prostate* **71**, n/a-n/a (2011).
118. Yamada, N. *et al.* MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 2708–16 (2008).
119. Yokoyama, S. *et al.* Aberrant methylation of MUC1 and MUC4 promoters are potential prognostic biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinomas. *Oncotarget* **7**, 42553–42565 (2016).
120. Guo, F. *et al.* Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **42**, 224–9 (2010).
121. Ying, L. *et al.* Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol. Biosyst.* **8**, 2289 (2012).
122. Gutschner, T. *et al.* The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res.* **73**, 1180–1189 (2013).
123. Tano, K. *et al.* MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Lett.* **584**, 4575–4580 (2010).
124. Hutchinson, J. N. *et al.* A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics* **8**, 39 (2007).
125. Spector, D. L. & Lamond, A. I. Nuclear Speckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a000646–a000646 (2011).
126. Tian, X. & Xu, G. Clinical value of lncRNA MALAT1 as a prognostic marker in human cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* **5**, e008653 (2015).
127. Jin, Y., Feng, S.-J., Qiu, S., Shao, N. & Zheng, J.-H. LncRNA MALAT1 promotes proliferation and metastasis in epithelial ovarian cancer via the PI3K-AKT pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 3176–3184 (2017).
128. Wu, L., Wang, X. & Guo, Y. Long non-coding RNA MALAT1 is upregulated and involved in cell proliferation, migration and apoptosis in ovarian cancer. *Exp. Ther. Med.* **13**, 3055–3060 (2017).
129. Zhou, Y. *et al.* The Long Noncoding RNA MALAT-1 Is Highly Expressed in Ovarian Cancer and

- Induces Cell Growth and Migration. *PLoS One* **11**, e0155250 (2016).
130. Zou, A., Liu, R. & WU, X. Long non-coding RNA MALAT1 is up-regulated in ovarian cancer tissue and promotes SK-OV-3 cell proliferation and invasion. *Neoplasma* **63**, 865–872 (2016).
 131. Chen, Q. *et al.* Plasma long non-coding RNA MALAT1 is associated with distant metastasis in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncol. Lett.* **12**, 1361–1366 (2016).
 132. Gutschner, T., Hämmerle, M. & Diederichs, S. MALAT1 - A paradigm for long noncoding RNA function in cancer. *J. Mol. Med.* **91**, 791–801 (2013).
 133. Li, S. *et al.* Sp1-mediated transcriptional regulation of MALAT1 plays a critical role in tumor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 1909–1920 (2015).
 134. Hu, Q. *et al.* 17 β -Estradiol treatment drives Sp1 to upregulate MALAT-1 expression and epigenetically affects physiological processes in U2OS cells. *Mol. Med. Rep.* **15**, 1335–1342 (2017).
 135. Sallı̇ $\frac{1}{2}$ -Lefort, S. *et al.* Hypoxia upregulates Malat1 expression through a CaMKK/AMPK/HIF-1 α axis. *Int. J. Oncol.* **49**, 1731–6 (2016).
 136. Link, P. A., Zhang, W., Odunsi, K. & Karpf, A. R. BORIS / CTCFL mRNA isoform expression and epigenetic regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immun.* **13**, 6 (2013).
 137. Woloszynska-Read, A. *et al.* Coordinated Cancer Germline Antigen Promoter and Global DNA Hypomethylation in Ovarian Cancer: Association with the BORIS/CTCF Expression Ratio and Advanced Stage. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2170–2180 (2011).
 138. Alberti, L., Losi, L., Leyvraz, S. & Benhattar, J. Different effects of BORIS/CTCFL on stemness gene expression, sphere formation and cell survival in epithelial cancer stem cells. *PLoS One* **10**, e0132977 (2015).
 139. Renaud, S. *et al.* BORIS/CTCFL-mediated transcriptional regulation of the hTERT telomerase gene in testicular and ovarian tumor cells. *Nucleic Acids Res.* **39**, 862–873 (2011).
 140. de Necochea-Campion, R. *et al.* Expression of the epigenetic factor BORIS (CTCFL) in the human genome. *J. Transl. Med.* **9**, 213 (2011).
 141. The Human Protein Atlas. CTCFL - Antibodies - The Human Protein Atlas. Available at: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000124092-CTCFL/antibody>. (Accessed: 4th April 2017)
 142. Batra, R. *et al.* On the performance of de novo pathway enrichment. *npj Syst. Biol. Appl.* **3**, 6 (2017).
 143. Alcaraz, N. *et al.* KeyPathwayMiner 4.0: condition-specific pathway analysis by combining multiple omics studies and networks with Cytoscape. *BMC Syst. Biol.* **8**, 99 (2014).
 144. Holwerda, S. J. B. & de Laat, W. CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120369 (2013).
 145. Farrar, D. *et al.* Mutational analysis of the poly(ADP-ribosyl)ation sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosyl)ation. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1199–216 (2010).
 146. Tamminga, J., Kathiria, P., Koturbash, I. & Kovalchuk, O. DNA damage-induced upregulation of miR-709 in the germline downregulates BORIS to counteract aberrant DNA hypomethylation. *Cell Cycle* **7**, 3731–3736 (2008).
 147. Brodersen, P. & Voinnet, O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 141–148 (2009).
 148. Hoffmann, M. J., Müller, M., Engers, R. & Schulz, W. A. Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1577–1588 (2006).
 149. Kloudová, K. *et al.* Expression of tumor antigens on primary ovarian cancer cells compared to established ovarian cancer cell lines. *Oncotarget* **7**, 1–7 (2016).
 150. Zhang, J., Zhang, B., Wang, T. & Wang, H. LncRNA MALAT1 overexpression is an unfavorable prognostic factor in human cancer: evidence from a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* **8**, 5499–5505

- (2015).
151. Ricardo, S. *et al.* Detection of glyco-mucin profiles improves specificity of MUC16 and MUC1 biomarkers in ovarian serous tumours. *Mol. Oncol.* **9**, 503–512 (2015).
 152. Nguyen, P. *et al.* BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6720–9 (2008).
 153. Kang, Y., Hong, J. a, Chen, G. a, Nguyen, D. M. & Schrupp, D. S. Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells. *Oncogene* **26**, 4394–4403 (2007).
 154. Sun, L. *et al.* DNA methyltransferase 1 and 3B activate BAG-1 expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation. *Cancer Res.* **68**, 2726–2735 (2008).
 155. Yang, Z. *et al.* Downregulation of long non-coding RNA MALAT1 induces tumor progression of human breast cancer through regulating CCND1 expression. *Open Life Sci.* **11**, 232–236 (2016).
 156. Gallagher, R. C., Pils, B., Albalwi, M. & Francke, U. Evidence for the role of PWCR1/HBII-85 C/D box small nucleolar RNAs in Prader-Willi syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 669–78 (2002).
 157. Joyce, J. A. & Schofield, P. N. Genomic imprinting and cancer. *J Clin Pathol Mol Pathol* **51**, 185–190 (1998).
 158. Martin-Kleiner, I. BORIS in human cancers - A review. *Eur. J. Cancer* **48**, 929–935 (2012).
 159. Zhu, H. *et al.* The role of the androgen receptor in ovarian cancer carcinogenesis and its clinical implications. *Oncotarget* **8**, 29395–29405 (2017).
 160. Zhou, Y., Bolton, E. C. & Jones, J. O. Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. *J. Mol. Endocrinol.* **54**, R15–R29 (2015).
 161. Zeng, G.-Q. *et al.* The Function and Significance of SELENBP1 Downregulation in Human Bronchial Epithelial Carcinogenic Process. *PLoS One* **8**, e71865 (2013).
 162. Chen, F. *et al.* Selenium-binding protein 1 in head and neck cancer is low-expression and associates with the prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e4592 (2016).
 163. Ha, Y.-S. *et al.* Decreased selenium-binding protein 1 mRNA expression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* **12**, 288 (2014).
 164. Kanazawa, T. *et al.* The utility of SELENBP1 gene expression as a biomarker for major psychotic disorders: Replication in schizophrenia and extension to bipolar disorder with psychosis. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **147B**, 686–689 (2008).
 165. Amar, S. *et al.* Copy number variation of the SELENBP1 gene in schizophrenia. *Behav. Brain Funct.* **6**, 40 (2010).
 166. Udawela, M. *et al.* SELENBP1 expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Transl. Psychiatry* **5**, e615 (2015).
 167. Nguyen Chi, M. *et al.* Temporally Regulated Traffic of HuR and Its Associated ARE-Containing mRNAs from the Chromatoid Body to Polysomes during Mouse Spermatogenesis. *PLoS One* **4**, e4900 (2009).
 168. Chi, M. N. *et al.* The RNA-binding protein ELAVL1/HuR is essential for mouse spermatogenesis, acting both at meiotic and postmeiotic stages. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2875–2885 (2011).
 169. Kakuguchi, W. *et al.* HuR Knockdown Changes the Oncogenic Potential of Oral Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* **8**, 520–528 (2010).
 170. Zhu, H. *et al.* HuR Suppresses Fas Expression and Correlates with Patient Outcome in Liver Cancer. *Mol. Cancer Res.* **13**, 809–818 (2015).
 171. Davidson, B. *et al.* HUR mRNA expression in ovarian high-grade serous carcinoma effusions is associated with poor survival. *Hum. Pathol.* **48**, 95–101 (2016).
 172. Kosaka-Suzuki, N. *et al.* Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites)

- directly induces expression of a cancer-testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter. *J. Biol. Chem.* **286**, 27378–27388 (2011).
173. Khatun, S., Fujimoto, J., Toyoki, H. & Tamaya, T. Clinical implications of expression of ETS-1 in relation to angiogenesis in ovarian cancers. *Cancer Sci.* **94**, 769–73 (2003).
 174. Verschoor, M. L. & Singh, G. Ets-1 regulates intracellular glutathione levels: key target for resistant ovarian cancer. *Mol. Cancer* **12**, 138 (2013).
 175. Takai, N., Miyazaki, T., Nishida, M., Nasu, K. & Miyakawa, I. c-Ets1 is a promising marker in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Mol. Med.* **9**, 287–92 (2002).
 176. Milne, K. *et al.* Systematic Analysis of Immune Infiltrates in High-Grade Serous Ovarian Cancer Reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as Positive Prognostic Factors. *PLoS One* **4**, e6412 (2009).
 177. Zhang, H.-Y. & Sun, H. Up-regulation of Foxp3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.* **287**, 91–97 (2010).
 178. Wang, Q. *et al.* Cajal bodies are linked to genome conformation. *Nat. Commun.* **7**, 10966 (2016).
 179. Wang, P. H. & Chang, C. Androgens and ovarian cancers. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **25**, 157–63 (2004).
 180. Lamb, A. D., Massie, C. E. & Neal, D. E. The transcriptional programme of the androgen receptor (AR) in prostate cancer. *BJU Int.* **113**, 358–366 (2014).
 181. Culig, Z. & Santer, F. R. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 413–427 (2014).
 182. Fioretti, F. M., Sita-Lumsden, A., Bevan, C. L. & Brooke, G. N. Revising the role of the androgen receptor in breast cancer. *J. Mol. Endocrinol.* **52**, (2014).
 183. Cheever, M. A. *et al.* The prioritization of cancer antigens: A National Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5323–5337 (2009).

Anexos varios: Información académica

Durante mis estudios de maestría, tuve la oportunidad de participar y colaborar en las siguientes actividades:

1. Asistí a la 3^a y 4^a reuniones anuales del Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer (C-MIC) en los años 2016 y 2017, respectivamente. En particular, en la 4^a reunión del C-MIC participé con la presentación de cartel con mis resultados obtenidos durante mi proyecto de maestría.
2. Colaboré con la realización de experimentos que redituaron en una publicación recientemente aceptada para publicación en la revista *Oncotarget*:

CTCF-KDM4A complex correlates with histone modifications that negatively regulates CHD5 gene expression in cancer cell lines.

Lissania Guerra-Calderas, Rodrigo González-Barríos, Carlos César Patiño, Marisol Salgado-Albarrán, David Cantú de León, Nicolás Alcaraz, Clementina Castro Hernández, Héctor Aquiles Maldonado-Martínez, Inti A. De la Rosa Velázquez, Fernanda Vargas-Romero, Luis A. Herrera, Alejandro García Carrancá, and Ernesto Soto-Reyes.

3. Realicé una estancia de investigación con duración de tres meses con el Dr. Jan Baumbach, en la Universidad del Sur de Dinamarca, donde realicé los análisis bioinformáticos presentados en este proyecto de tesis.