



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL PROMOTOR
DEL GEN *RETINOBLASTOMA (Rb1)* HUMANO**

TESIS

**Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS**

Presenta

Biol. Inti Alberto De La Rosa Velázquez

Tutor: Dr. Félix Recillas Targa

Ciudad Universitaria

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, laboratorio 122-Norte de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Félix Recillas Targa quien recibió apoyos de DGAPA-UNAM (IN203200, IX230104 y IN209403), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 33863-N y 42653-Q), The Third World Academy of Science (01-055 RG/BIO/LA) y la Fundación Miguel Alemán.

Parte de este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), bajo la tutoría del Dr. Luis Benítez Bribiesca quien recibió apoyo de CONACyT (38168-M)

Los estudios de doctorado del Biol. Inti Alberto De La Rosa Velázquez fueron apoyados con una beca doctoral del CONACyT (166346), el complemento de beca de la Dirección General de Estudios de Postgrado – UNAM (DGEP-UNAM) y por el IMSS mediante el programa de apoyo a becarios de investigación (99091230).

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Luis Benítez Bribiesca	UIMEO, CMN-SXXI, H de Oncología, IMSS
Dr. Fabio Salamanca Gómez	CMN- S XXI, H de Pediatría, IMSS

La Biol. Georgina Guerrero Avendaño brindó una excelente asesoría técnica durante el desarrollo de esta investigación.

Los experimentos de citometría de flujo y la secuenciación de ADN se llevaron a cabo con la colaboración de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular a cargo de la Dra. Laura Ongay.

Se agradece al Prof. Thomas Jenuwein, las facilidades para realizar la estancia de investigación en el Instituto de Investigación en Patología Molecular en Viena, Austria. Esta estancia fue posible gracias al apoyo del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Juan Patricio Gariglio Vidal
Vocal	Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo
Vocal	Dr. Alfonso Dueñas González
Vocal	Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Secretario	Dr. Félix Recillas Targa
Suplente	Dr. Héctor Mayani Viveros
Suplente	Dr. Fabio Salamanca Gómez

AGRADECIMIENTOS

A MI FAMILIA... Les dedico con todo mi corazón esta tesis a mi Papa Raymundo, a mi Mama Evila y mis hermanos Ricardo y Nataly por estar siempre conmigo, apoyándome y dándome ánimo en todos los momentos. Por demostrarme que a pesar de todo siempre logramos salir adelante, unidos, como familia.

También a mis abuelos, tíos, primos, sobrinos padrinos, etc. gracias por su apoyo.

A MIS AMIGOS, MI OTRA FAMILIA... Mil gracias a todos por estar siempre presentes, por apoyarme en las buenas y en las malas, por disfrutar y festejar conmigo mis victorias y curar mis derrotas, por aguantarme! No me voy a atrever a poner una lista de nombres por que quizá me falte alguno pero todos saben quienes son y cuantos los quiero.

A ADRI... Gran parte de esto se debe a ti y sabes lo que significas en mi vida.

A FÉLIX RECILLAS... Gracias Doc. por permitirme crecer en la ciencia, por brindarme tu confianza y tu amistad, por compartir conmigo tus conocimientos y por aguantarme, que se que fue difícil! Pero a final de cuentas creo que los dos obtuvimos lo que esperábamos, un gran trabajo y una fuerte amistad.

A LOS “VIEJITOS” DEL LAB!!!!!!... Este trabajo no habría podido llevarse a cabo sin ustedes y lo saben muy bien!! gracias por ayudarme a crecer y corregirme en todo momento, gracias por formar un grupo inolvidable, Fuerte, una gran familia que nos apoyamos en todo momento y crecimos juntos en este difícil camino que hemos seguido, pero junto a ustedes siempre lució mas fácil. Gracias Vivis, Hectorin, Martincito, Paul, Geito, Gianelli, Félix.... ustedes son lo máximo.

A LOS “JOVENES” DEL LAB... Realmente son muchos los que están y los que han pasado y de cada uno aprendí muchas cosas, gracias Neto, TZK,

Abraham, Truchita, Mayruchis, que también fueron fundamentales para esta experiencia, gracias también a los “**NIÑOS**”... los tocayos, Mis queridísimas alumnitas Alita y Carlita, a las que espero no las haya ahuyentado de la ciencia con mi inexperiencia jeje!! Y a todos los nuevos del lab., les deseo lo mejor en sus posgrados, están en un gran laboratorio.

AL DR. BENÍTEZ... Gracias por su constante apoyo y guía que inició desde la licenciatura, por enseñarme que la ciencia es mas que hacer experimentos. Gracias también a la Dra. Quiñónez, a Rita y a mi gran amigo Miguel Ángel por su constante apoyo y su amistad de todos estos años.

A MI COMITÉ TUTORAL... Gracias Dr. Salamanca, Dr. Benítez, Dr. Recillas. Ha sido un gran honor el haber sido formado por tres grandes científicos, cada uno ha aportado grandes cosas a mi desarrollo profesional y es algo invaluable.

A MI JURADO DE TESIS... Gracias por enriquecer mi trabajo con sus consejos y sugerencias.

AL IFC Y LA UNAM... Que fue mi casa en los últimos años..... gracias por todo el apoyo y la formación recibida.

Úrsula lo comparaba en aquel tiempo con su hermano y no podía entender cómo los dos gemelos que parecieron una sola persona en la infancia habían terminado por ser tan distintos.

Gabriel García Márquez
Cien Años de Soledad

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. LA EPIGENÉTICA	10
1.2. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS	12
1.3. LA METILACIÓN DEL ADN	14
1.3.1. Mecanismos de represión mediados por metilación de ADN.	15
1.3.2. Metilación del ADN y cáncer	17
1.4. LOS GENES SUPRESORES DE TUMORES	20
1.5. EL RETINOBLASTOMA Y LA HIPÓTESIS DE KNUDSON	23
1.6. LA ENFERMEDAD DE RETINOBLASTOMA	24
1.6.1. Epidemiología	24
1.6.2. Características físicas, histológicas y de tratamiento	25
1.7. EL GEN RETINOBLASTOMA (<i>Rb1</i>)	26
1.7.1. Estructura física del gen <i>Rb1</i>	26
1.7.2. La región promotora del gen <i>Rb1</i>	27
1.7.3. La región codificante del gen <i>Rb1</i>	30
1.7.4. Alteraciones genéticas del gen <i>Rb1</i> relacionadas con cáncer	31
1.8. LA PROTEÍNA RETINOBLASTOMA (pRb)	33
1.8.1. Dominios estructurales de la pRb	33
1.8.2. La pRb y el ciclo celular	35
1.8.3. Mecanismos de represión génica mediada por la pRb	38
1.8.4. La pRb, senescencia y formación de heterocromatina	42
2. RESULTADOS	45
2.1. PRIMERA PARTE: EFECTO DE LA METILACIÓN DEL ADN Y MODIFICACIONES DE LAS HISTONAS EN LA FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN <i>Rb1</i> HUMANO	45
2.1.1. Antecedentes	45
2.1.2. Planteamiento del problema	47
2.1.3. Objetivo	47
2.1.4. Resultados particulares	48
2.1.4.1. <i>Efecto de la metilación del ADN en el promotor del gen <i>Rb1</i></i>	48
2.1.4.2. <i>Búsqueda de una línea celular con el promotor endógeno de <i>Rb1</i> metilado.</i>	54
2.1.5. Discusión y conclusiones	56
2.2. SEGUNDA PARTE: IDENTIFICACIÓN DE CTCF Y KAISO COMO NUEVOS REGULADORES EPIGENÉTICOS DEL GEN <i>Rb1</i>	60
2.2.1. Antecedentes	60

2.2.2.	Planteamiento del problema	64
2.2.3.	Objetivo	64
2.2.4.	Resultados particulares	65
2.2.4.1.	<i>Unión del factor CTCF in vitro a una secuencia conservada presente en el promotor del gen Rb1 humano</i>	65
2.2.4.2.	<i>La unión de CTCF se da in vivo en el promotor del gen Rb1</i>	70
2.2.4.3.	<i>Contribución funcional de CTCF en la actividad del promotor del gen Rb1</i>	71
2.2.4.4.	<i>Efecto de CTCF en la actividad del promotor del gen Rb1 en un contexto cromatínico</i>	76
2.2.4.5.	<i>CTCF protege al promotor del gen Rb1 del silenciamiento epigenético</i>	77
2.2.4.6.	<i>El promotor del gen Rb1 se asocia a la matriz nuclear</i>	79
2.2.4.7.	<i>Generación de una línea celular estable para el estudio del silenciamiento epigenético del promotor Rb1</i>	80
2.2.4.8.	<i>La unión de CTCF es sensible a la metilación y esta marca es reconocida por Kaiso</i>	83
2.2.5.	Discusión y conclusiones	87
3.	<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	92
4.	<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	96
4.1.	CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS	96
4.2.	CULTIVO CELULAR	97
4.3.	ÁNALISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN	98
4.4.	TRANSFECCIONES TRANSITORIAS Y ESTABLES EN CÉLULAS HELA Y K562	98
4.5.	TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE SIRNA EN CÉLULAS HELA	99
4.6.	WESTERN BOT	100
4.7.	TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i>	100
4.8.	EXPERIMENTOS DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)	101
4.9.	INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)	101
5.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	103
6.	<u>ANEXOS</u>	115
6.1.	PROTOCOLOS AMPLIADOS	116
6.2.	TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS	127
6.3.	ARTÍCULOS PUBLICADOS	129

RESUMEN

Las alteraciones epigenéticas como la metilación aberrante del ADN y patrones alterados de modificaciones covalentes de las histonas en el cáncer, son una característica más común de lo que se había anticipado. En el presente estudio identificamos, por medio de transfecciones transitorias y estables de un plásmido con el promotor del gen retinoblastoma humano (*Rb1*) dirigiendo la expresión de un gen reportero (*luciferasa* o *GFP*), que la metilación del ADN es una modificación epigenética capaz de inducir el silenciamiento del promotor del gen *Rb1*. Así mismo, identificamos al factor CTCF, como un regulador positivo del promotor del gen *Rb1*. Demostramos que la unión de CTCF contribuye a la estabilidad epigenética del promotor. Al eliminar o mutar el sitio CTCF del promotor se induce un silenciamiento epigenético muy rápido en la expresión de un gen reportero integrado en el genoma. La unión de CTCF al ADN es sensible a la metilación y la metilación de esta secuencia en el promotor es reconocida por Kaiso, una proteína que se une al ADN metilado. Esta es la primer evidencia que demuestra directa y funcionalmente que la metilación de ADN inactiva al promotor del gen *Rb1*. Además se demuestra que CTCF protege al promotor del gen *Rb1*, una isla CpG clásica, contra la metilación del ADN y que cuando dicha región se metila anormalmente, Kaiso y probablemente su complejo represor asociado N-CoR, inducen el silenciamiento epigenético del promotor correlacionando con los datos de diferentes tipos de cáncer donde la metilación del promotor correlaciona con la falta de proteína retinoblastoma. Nuestros resultados identifican a CTCF como un regulador epigenético del promotor del gen *Rb1* humano.

ABSTRACT

Epigenetic miss-regulation like aberrant DNA methylation or altered patterns of histone covalent modifications, is a more common feature in human cancer than previously anticipated. In the present investigation we identified by means of transient and stable transfection of a plasmid harboring the human retinoblastoma gene (*Rb1*) promoter driving the expression of a reporter gene (*Luciferase* or *GFP*) that DNA methylation is an epigenetic modification capable to induce the silencing of the *Rb1* gene promoter. We also identified CTCF, the multivalent 11-zinc-finger nuclear factor, as a positive regulator of the human retinoblastoma gene promoter. We demonstrate that its binding contributes to *Rb1* gene promoter epigenetic stability. Ablation of the CTCF binding site from the human *Rb1* gene promoter induced a rapid epigenetic silencing of reporter gene expression in an integrated genome context. CTCF DNA binding is methylation-sensitive and the methylated Rb-CTCF sequence is recognized by the Kaiso methyl-CpG-binding protein. This is the first evidence that demonstrates directly and functionally that DNA methylation can inactivate the human *Rb1* gene promoter. We also show that CTCF protects the *Rb1* gene promoter, a classical CpG-island, against DNA methylation and when such control region is abnormally methylated, Kaiso and probably its associated repressor complex N-CoR, induce epigenetic silencing of the promoter in a clear correlation with reports that in different kinds of cancer the methylation of the *Rb1* gene promoter correlates with the lack of retinoblastoma protein. Our results identify CTCF as a novel epigenetic regulator of the human retinoblastoma gene promoter.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA EPIGENÉTICA

Las modificaciones epigenéticas han cobrado gran importancia en los últimos años ya que se han visto asociadas, además de la regulación normal del genoma, a la generación y progresión de procesos neoplásicos¹. La epigenética engloba a todas aquellas modificaciones que regulan el patrón de expresión de un gen sin que ocurran cambios en la secuencia del ADN, además de ser heredadas mitóticamente. De manera general, los procesos que intervienen en la regulación epigenética son: La metilación del ADN y la modulación de la estructura de la cromatina mediada, principalmente, por modificaciones en las histonas¹. En particular, las alteraciones epigenéticas se han relacionado principalmente a la regulación transcripcional de genes tanto en condiciones normales como patológicas².

La regulación epigenética tiene como blanco principal la estructura de la cromatina. El ADN de una célula eucarionte mide, de manera "lineal", entre 5mm en levadura hasta 1m en humanos o más en otras especies y este ADN se organiza al interior de un organelo sub-celular de alrededor de 10 μm de diámetro: el núcleo. Para lograr el grado de compactación necesario y permitir que el genoma de dicha célula pueda ser contenido al interior del núcleo, el ADN se enrolla en segmentos de aproximadamente 146 pares de bases (pb) alrededor de octámeros de histonas compuestos por 2 moléculas de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 formando la unidad fundamental de la cromatina que es el nucleosoma^{3,4}. Los nucleosomas tienen la capacidad de organizarse a tal grado de formar estructuras tan compactas como los cromosomas que se encuentran en la fase M del ciclo celular (Fig. 1). De manera funcional, la

compactación del ADN en cromatina tiene consecuencias directas en la expresión de los genes, ya que esta compactación hace que muchas secuencias regulatorias y por lo tanto información genética clave, no queden accesibles, impidiendo el reconocimiento de las mismas por la maquinaria transcripcional. Es justamente en estos casos, donde las modificaciones epigenéticas, que describiremos más adelante, tienen la capacidad de modular la expresión de los genes, ya sea promoviendo la apertura o relajación de la estructura de la cromatina o su mayor compactación⁵.

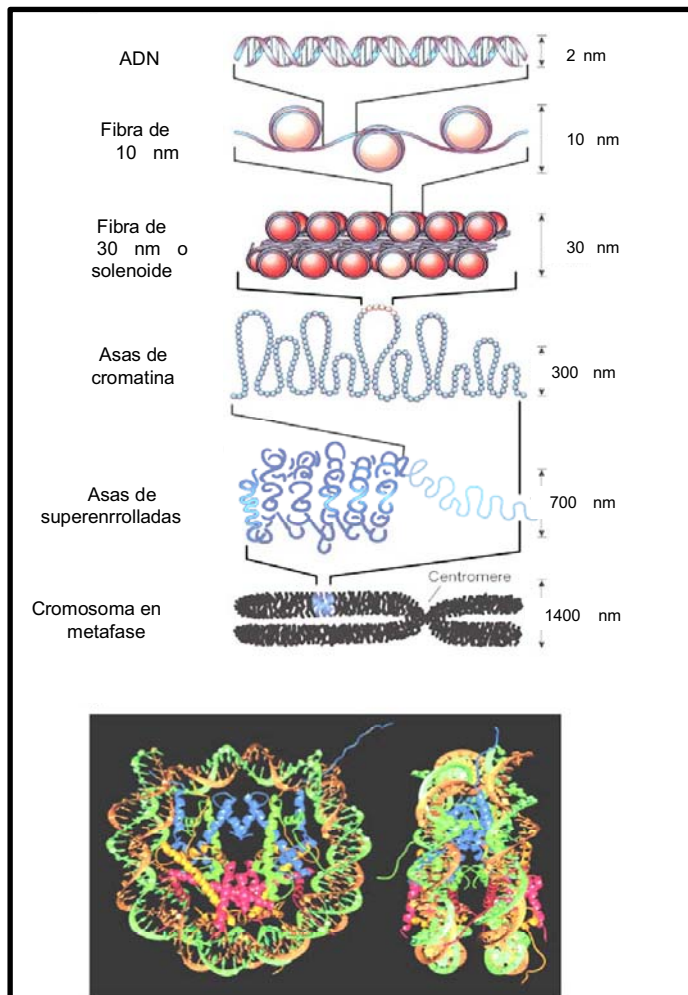


Figura 1: Niveles de compactación del ADN. El ADN se enrolla alrededor de un octámero de histonas para dar lugar al nucleosoma. El cual con la ayuda de la histona H1 se organiza en la fibra de 30 nm. Posteriormente, esta fibra forma asas de gran tamaño que constituye parte fundamental de niveles superiores de compactación hasta la formación de cromosomas metafásicos. Imagen inferior. Estructura cristalográfica del nucleosoma a una resolución de 2.5 amstrongs. Esquema tomado de Felsenfeld y Groudine³ e imagen de Luger⁴.

1.2. LAS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

Uno de los blancos principales de la regulación epigenética son las histonas consideradas como los componentes básicos de la cromatina. Estas proteínas contienen carga positiva mediada principalmente por aminoácidos como la lisina. Dicha carga favorece la fuerte asociación que posee con el ADN el cual tiene carga negativa. Por lo que la inducción de una modificación en la carga de las histonas puede alterar su asociación con el ADN y la subsiguiente relajación o compactación de la misma.

Las modificaciones en las histonas se dan preferencialmente en los extremos N-terminales (Fig. 2). Estos extremos sobresalen del nucleosoma por lo que representan un blanco accesible para las enzimas responsables de dichas modificaciones y aunque se han descrito modificaciones en el dominio globular de la histona las más estudiadas son las que se dan en el extremo N-terminal⁵.

Las principales modificaciones en las histonas son la metilación, acetilación, fosforilación, entre otras (Fig. 2). Cada una de estas modificaciones tienen un efecto específico en la dinámica de la cromatina y el estatus transcripcional de distintas regiones genómicas, siendo la acetilación de histonas una marca asociada a cromatina “abierta” y correlacionando con una transcripción activa mientras la metilación puede ser marca de activación o de represión, dependiendo del aminoácido y la combinatoria de histonas modificadas en el nucleosoma (Tabla 1)⁶.

Modificaciones en el extremo amino-terminal de las histonas en humanos

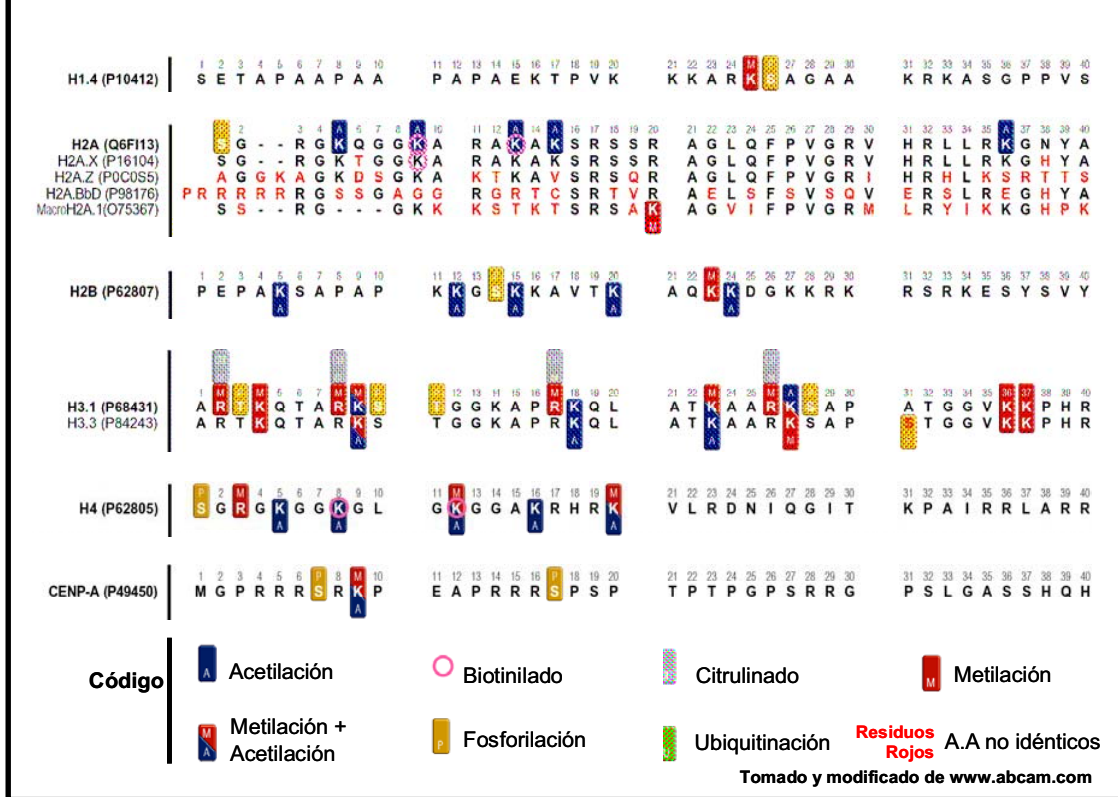


Figura 2. Modificaciones post-traduccionales de los extremos amino terminal de las histonas. Se presentan las diferentes histonas, así como las isoformas hasta el momento caracterizadas de estas proteínas. Las modificaciones señaladas en la figura pertenecen a las caracterizadas, hasta el momento, en humanos.

Tabla 1. Principales modificaciones post-traduccionales de las histonas.

Modificación	Aminoácidos modificados	Histona	Efecto
Fosforilación	Treonina/ Serina	H3, H4, H2A y H2B	Condensación de cromosomas y activación de genes
Acetilación	Lisina	H3, H4, H2A y H2B	Activación de genes
Metilación	Lisina/Arginina	H3, H4, H2A y H2B	Activación y represión de genes
Ubiquitinación	Lisina	H2A y H2B	Activación de genes
Isomerización	Prolina	H3	Activación de genes

1.3. LA METILACIÓN DEL ADN

La metilación del ADN representa uno de los procesos epigenéticos más estudiados y consiste en la incorporación de un grupo metilo (-CH₃) en el carbono 5 de las citosinas que se encuentran formando un dinucleótido C^mpG, y en menor grado se puede encontrar la metilación en secuencias del tipo C^mC(A/T)GG o C^mpNpG^{7,8}. La metilación del ADN está mediada por enzimas denominadas ADN metil-transferasas (Dnmts, por sus siglas en inglés). Las enzimas Dnmt3a y Dnmt3b son Dnmts *de novo*, mientras que la Dnmt1 es de mantenimiento, esta última hemi-metila el ADN donde una hebra ya está metilada y se encuentra asociada a la maquinaria de duplicación del ADN. La metilación del ADN participa de manera normal en la inactivación de transposones, secuencias repetidas y secuencias retrovirales evitando su movilidad y por ende, manteniendo la estabilidad genómica⁸. También se ha encontrado asociada a eventos de regulación en etapas tempranas de desarrollo silenciando genes que no van a volver a expresarse, en la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X⁸.

Las técnicas utilizadas para estudiar la metilación del ADN son variadas y van desde las muy generales como la digestión del ADN con enzimas de restricción metilo-sensibles (como MspI/HpaII) revelando la zona de interés por Southern Blot⁹ y la PCR específica de metilación (MS-PCR)^{10,11} a los métodos más sensibles como la PCR mediada por ligación (LM-PCR, por sus siglas en inglés) y la secuenciación genómica por bisulfito de sodio¹²⁻¹⁴.

Dentro del genoma humano se encuentran muy pocos dinucleótidos CpGs pero se han caracterizado secuencias genómicas que varían de 100 pb a varias kilo bases (kb) en donde el contenido de Cs y Gs es mayor al 60%, por

lo que aumenta la posibilidad de encontrarse dinucleótidos CpGs. A estas zonas se les denominó “islas CpGs”¹⁵. Estas islas se encuentran principalmente en los extremos 5' de muchos genes coincidiendo con la región promotora y con cierta frecuencia los primeros exones. Paradójicamente, en condiciones normales, estas islas CpGs no se encuentran metiladas, con excepción de las islas relacionadas a genes de expresión tejido específico, islas presentes a lo largo del cromosoma X inactivo y genes de expresión mono-alélica (improntados)¹⁶⁻¹⁸.

Se ha propuesto que en las islas CpG se da un proceso de “sembrado” de la metilación, es decir que constantemente se metilan las citosinas, pero esta marca es borrada durante la transcripción en los genes activos por un mecanismo aun desconocido¹⁹. Alternativamente se propone que la constante unión del factor general de transcripción Sp1 evita la metilación de los promotores que regula^{20,21}. Se ha propuesto que Sp1 tiene la capacidad de unirse a su secuencia aun cuando exista C^mpG con lo cual favorece la estructura abierta de la cromatina y la constante transcripción evita la hipermetilación de los promotores. A pesar de ello, Sp1 es incapaz de unirse si hay metilación del tipo C^mpC^mpG resultando en una zona hipermetilada²².

1.3.1. MECANISMOS DE REPRESIÓN MEDIADOS POR METILACIÓN DEL ADN

A la fecha se han propuesto tres mecanismos generales para explicar el efecto de la metilación del ADN en la inactivación transcripcional de los genes y que son aplicables a genes con promotores con alto contenido en CpGs como el caso del promotor del gen retinoblastoma humano (*Rb1*):

- a) *Por interferencia*: La unión de los factores de transcripción a su secuencia blanco que contenga CpGs se ve afectada si la citosina está metilada. Excepto para el factor Sp1, el cual se sabe que solo se bloquea cuando hay metilación C^mpC^mpG (Fig. 3).
- b) *Por la unión de proteínas que reconocen el ADN metilado denominadas "Methyl-CpG-binding proteins"*: Su efecto epigenético se encuentra mediado a través de la generación de una cromatina compacta y refractaria a la actividad transcripcional²³. Estas proteínas a su vez son capaces de reclutar co-represores los cuales atraen a desacetilasas de histonas (HDACs) favoreciendo una zona de cromatina altamente compacta e incompatible con la expresión transcripcional (Fig. 3)^{24,25}. La capacidad de estas proteínas para reclutar otras modificaciones epigenéticas ha llevado a proponer un "código de histonas" como medio de regulación del remodelaje de la estructura de la cromatina^{6,26,27}. La asociación de este tipo de proteínas, como mecanismo de silenciamiento en cáncer, se ha descrito ampliamente en el locus *p14 / p16* que corresponde a una región genómica del cromosoma 9q21, que contiene al gen que codifica para el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina *p16^{ink4a}* y al gen *p14^{ARF}*²⁸. Estudios recientes realizados *in vitro* han descrito que la metilación en la secuencia de unión del factor E2F presente en la región promotora del gen *Rb1* ofrece un sitio de unión para la proteína MeCP2 (ver más adelante)²⁹.
- c) *Por reclutamiento de HDACs mediado por la Dnmt1*. Diversos estudios han demostrado que la Dnmt1 se une a la HDAC1 (Desacetilasa de histonas 1, por sus siglas en inglés) en su porción N-terminal y que al momento de metilar una zona del ADN, la HDAC1 va desacetilando las histonas dando

como resultado una zona de cromatina más compacta y represiva para la actividad transcripcional. Las Dnmt3a y Dnmt3b también tienen la capacidad de reclutar HDACs (Fig. 3)³⁰.

Recientemente se han podido realizar análisis de múltiples islas CpGs por medio de micro-arreglos o Chips de ADN combinados con inmunoprecipitaciones de cromatina los cuales han permitido determinar qué proteínas tienen la capacidad de unirse a estas zonas al estar metiladas y contribuir con el proceso represor de manera global^{31,32}.

1.3.2. METILACIÓN DE ADN Y CÁNCER

Como se mencionó, en condiciones normales las islas CpGs se encuentran no metiladas, pero las células neoplásicas se han caracterizado por presentar un patrón de metilación aberrante,^{2,33-35} definido por una hipometilación generalizada. Esto trae como consecuencia la expresión de genes normalmente silenciados (por ejemplo los genes improntados), movilización de transposones y retroelementos, eventos que inducen una grave e irreversible inestabilidad genómica que en ocasiones conlleva a la apoptosis. Paradójicamente, también se presenta una hipermetilación específica de islas CpGs^{36,37}. Los genes que más frecuentemente se han encontrado metilados son los asociados al control del ciclo celular y la diferenciación celular (Tabla 2) entre otros genes cuyas vías de transducción pueden ser afectadas³⁸⁻⁴².

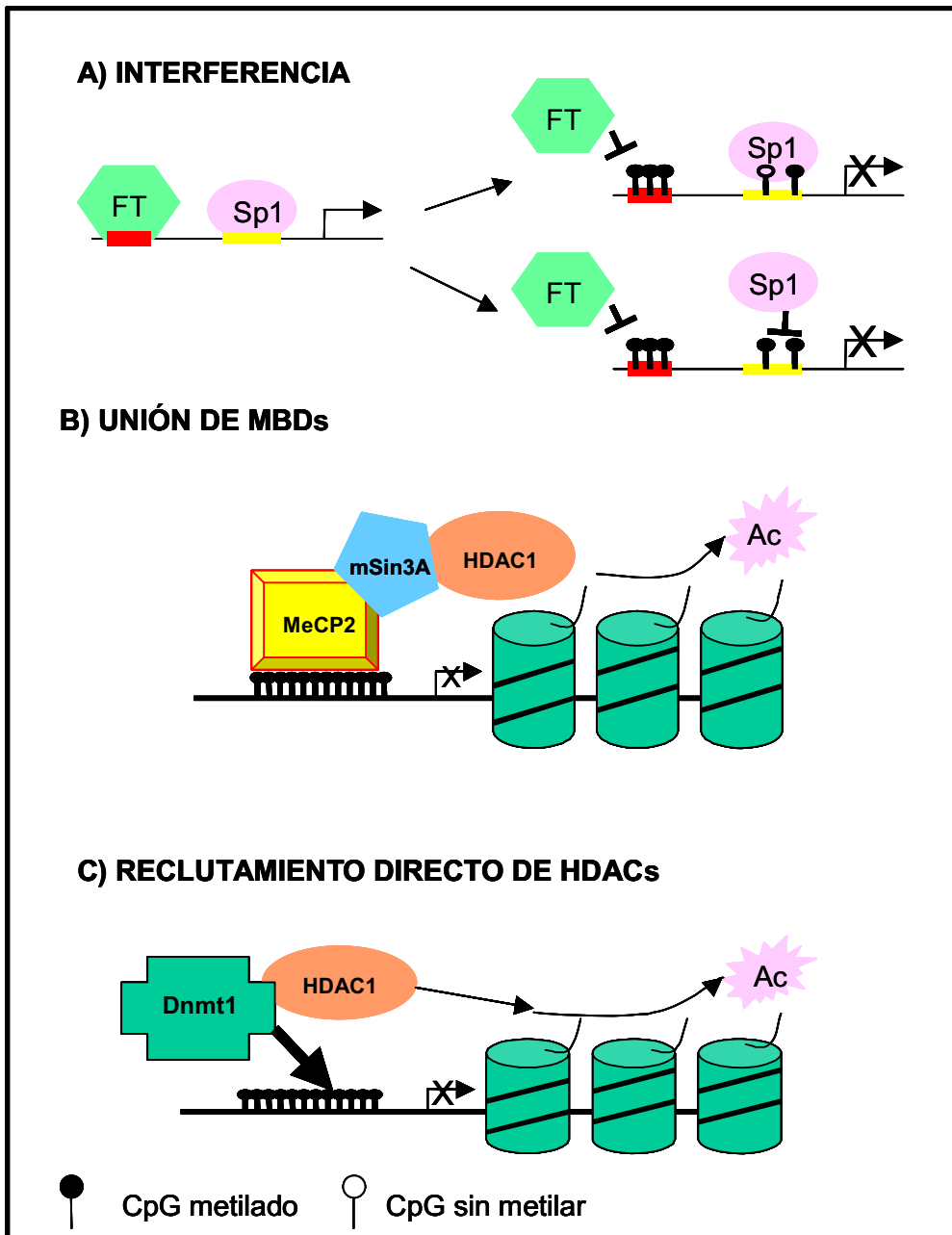


Figura 3. Modelo propuestos para explicar el mecanismo de silenciamiento génico mediado por metilación del ADN. **A)** Modelo de interferencia de la unión de factores de transcripción. **B)** Modelo de represión estable mediada por metilación del ADN, unión de proteínas con dominio MBD y reclutamiento de co-represores y remodeladores de la cromatina. **C)** Modelo de reclutamiento de HDAC1 por la Dnmt1. Para los modelos mostrados en **B)** y **C)** El efecto final tiene que ver con la formación de una estructura de la cromatina altamente compacta, en particular, a través de la desacetilación de histonas

Tabla 2. Genes cuyos promotores se han encontrado metilados en cáncer y vía celular que regulan.

Vía celular afectada	Gen
Ciclo Celular	<i>Retinoblastoma (RB)</i> <i>p16^{INK4a}</i> <i>p15^{INK4b}</i> <i>14-3-3σ</i> <i>p14^{ARF}</i> <i>MYO18B</i>
Transducción de señales	<i>RASSF1</i> <i>LKB1/STK11</i> <i>APC</i>
Apoptosis	<i>"Death- associated protein kinase (DAPK)"</i> <i>Caspasa-8</i>
Reparación del ADN	<i>O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferasa (MGMT)</i> <i>MLH1</i> <i>BRCA1</i>
Metabolismo	<i>Glutathione S-transferase P1 (GSTP1)</i> <i>Calcitonina</i>
Respuesta hormonal	<i>Receptor de estrógeno (RE)</i> <i>Receptor de progesterona (RP)</i> <i>Receptor de ácido retinoico β2 (RAR- β2)</i>
Senescencia	<i>TERT</i> <i>TERC</i>
Invasión / Metástasis	<i>Inhibidor de metaloproteínasa de tejido 3 (TIMP-3)</i> <i>E- Cadherina</i> <i>Von Hippel- Lindau (VHL)</i>

En la actualidad se sabe que gran parte de los genes cuyos promotores se encuentran inactivados por metilación de ADN en las células tumorales corresponden a genes supresores de tumores (Tabla 2)⁴³. Estos genes son de gran importancia ya que como veremos más adelante, la pérdida de expresión de sus dos alelos es una condición detonante del desarrollo neoplásico.

1.4. LOS GENES SUPRESORES DE TUMORES

Theodor Boveri, uno de los grandes genetistas de finales del siglo XIX y principios del XX, fue el primero que predijo la existencia de los genes supresores de tumores, denominándolos “cromosomas inhibitorios”. Postuló que estos cromosomas inhibitorios forman parte del mecanismo que mantiene a la célula sin dividirse hasta que un estímulo extracelular específico induce su división y que estos cromosomas estarían alterados en el cáncer⁴⁴. Las predicciones de Boveri se confirmaron desde antes de que estuvieran disponibles las técnicas de biología molecular ya que los estudios epidemiológicos mostraron que existían cánceres que tendían a asociarse en familias y que el patrón de frecuencia de estos era consistente con la susceptibilidad heredada a través de un gen mutado, es decir un “cromosoma inhibitorio”⁴⁵. De lo anterior surge la propuesta que enmarca a los procesos tumorales como esporádicos o segregables donde los procesos genéticos y recientemente los epigenéticos juegan un papel central en su origen y desarrollo.

El concepto actual de *Genes Supresores de Tumores* (GST) se deriva a partir de experimentos de fusión celular donde una célula normal en cultivo, fusionada a una célula capaz de producir tumores en animales, con frecuencia resultaba en un híbrido capaz de mantenerse en cultivo pero perdía la capacidad de producir tumores en animales. En los casos donde la línea híbrida llegaba a producir tumores se encontró una asociación con la pérdida de cromosomas específicos derivados de la célula no tumorigénica, lo cual indicaba la existencia de diferentes loci asociados a la supresión del crecimiento tumoral^{46,47}. Estos datos, en conjunto con los estudios

epidemiológicos realizados por Knudson en 1971 (ver más adelante) sugirieron la existencia de los GST.

Estudios posteriores basados en numerosas observaciones del cariotipo de las células cancerosas apoyaron aun más la idea de la existencia de los GST. Con los años, se fueron describiendo diferentes alteraciones cromosómicas asociadas al desarrollo del cáncer. Como se explica más adelante, el gen *Rb1* fue el primer gen supresor de tumores en ser clonado como consecuencia de los estudios asociados a las alteraciones en el cromosoma 13 presentes en células de retinoblastomas y osteosarcomas. Otro claro ejemplo fue el descubrimiento del gen responsable del tumor de Wilm's relacionado con alteraciones en el cromosoma 11.

A la fecha, son múltiples los genes supresores de tumores que se han descrito (Tabla 3), muchos de los cuales fueron identificados por las deleciones, translocaciones, mutaciones o polimorfismos presentes en sus regiones promotoras o codificantes capaces de inactivar su expresión o la función de su producto proteico, promoviendo la transformación neoplásica^{48,49}. Así mismo, se demostró que algunos virus son capaces de codificar para proteínas que inactivan a las producidas por los GST, tal es el caso de las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano, las cuales inactivan a las proteínas p53 y pRb, respectivamente básicamente induciendo su degradación⁴⁷.

En la última década, se ha visto que el desarrollo del cáncer no solo depende de las alteraciones genéticas antes descritas. Se ha acumulado evidencia que apoya la participación de defectos en la memoria celular asociada a procesos epigenéticos que llevan a una expresión genética anormal

y heredable, que es crítica para la iniciación y progresión del cáncer. Estos procesos epigenéticos aberrantes se manifiestan tanto en cambios globales a nivel del empaquetamiento de la cromatina al interior del núcleo celular, como en cambios más locales, en particular aquellos localizados en los promotores y primeros exones de diversos genes que influyen en su transcripción y promueven el desarrollo neoplásico^{2,33,50}.

Tabla 3. Algunos genes supresores de tumores y tipo de cáncer y síndrome asociados a su alteración.

Gen Supresor de Tumores	Tumores asociados y tejidos afectados	Síndrome asociado
<i>APC</i>	Colon, tiroides, estómago, intestino	FAP
<i>AXIN2</i>	Colon	Polyposis atenuada
<i>CDH1 (E-caderina)</i>	Estómago	Carcinoma gástrico familiar
<i>SUFU</i>	Piel, meduloblastoma	Predisposición a meduloblastoma
<i>VHL</i>	Riñón	Síndrome Von Hippel-Lindau
<i>p53</i>	Múltiples tejidos	Síndrome Li-Fraumeni
<i>WT1</i>	Wilm's	Tumor familiar de Wilm's
<i>PTEN</i>	Glioma, útero, hamartoma	Síndrome de Cowden
<i>CDKN2A (p16^{INK4A}, p14^{ARF})</i>	Melanoma, páncreas	Melanoma maligno familiar
<i>CDK4</i>	Melanoma	Melanoma maligno familiar
<i>Rb1</i>	Ojo, múltiples tejidos	Retinoblastoma hereditario
<i>NF1</i>	Neurofibroma	Neurofibromatosis tipo 1
<i>HRPT2</i>	Paratiroide, fibroma de mandíbula	Hiperparatiroidismo
<i>NF2</i>	Meningioma	Neurofibromatosis tipo 2

1.5. EL RETINOBLASTOMA Y LA HIPÓTESIS DE KNUDSON

El retinoblastoma es una neoplasia pediátrica poco frecuente que se puede presentar tanto en formas hereditarias como esporádicas. Ambas formas pueden desarrollarse a partir de la misma serie de alteraciones genéticas. En 1971 Knudson postuló que para el desarrollo del retinoblastoma deberían alterarse los dos alelos de un solo gen como causa para la aparición de esta neoplasia. En el caso de la variante hereditaria, los cuales representan del 5% al 10% de los procesos tumorales⁵¹, una de las alteraciones debería transmitirse por uno de los padres a través de la línea germinal teniendo como consecuencia que los tumores se presentan a edades más tempranas, mientras que en los casos esporádicos, las mismas alteraciones han sido adquiridas a lo largo de la vida del individuo. Este postulado se conoce como la hipótesis de los dos “hit’s” de Knudson y es aplicable para todos los genes supresores de tumores⁵².

Tradicionalmente, la inactivación de ambos alelos se había asociado a alteraciones genéticas (translocaciones, deleciones, mutaciones, etc.). Actualmente, existe un número creciente de evidencias experimentales que demuestran que los procesos de inactivación epigenética son capaces de silenciar cada uno de los alelos, dando como consecuencia la falta de expresión del gen sin que se altere su secuencia genómica^{2,33}.

Recientemente se ha descrito el fenómeno de haploinsuficiencia como una alternativa al modelo de tumorigénesis explicado por la hipótesis de Knudson⁵³. La haploinsuficiencia implica, básicamente, que la mutación o la pérdida de un solo alelo e incluso la inactivación proteica parcial por acción de oncoproteínas virales puede ser suficiente para inducir un fenotipo celular que

conlleve al desarrollo del cáncer sin la inactivación del segundo alelo. Lo anterior ocasiona la disminución de la concentración o la dosis de la proteína en cuestión transgrediendo un umbral que la incapacita para llevar a cabo sus funciones normales y puedan incluso, derivarse en cáncer. Hasta el momento se han encontrado al menos trece genes supresores de tumores afectados por haploinsuficiencia, entre ellos p53, ATM y p27^{Kip1}, cuya concentración proteica anormal, conllevan al desarrollo de tumores^{54,55}. Los tumores causados por el fenómeno de haploinsuficiencia generalmente aparecen en individuos con edades mayores respecto a los causados por la inactivación del segundo alelo (pérdida de la Heterocigocidad o LOH). Hasta el momento no hay reportes de que este fenómeno suceda para el caso del gen retinoblastoma, pero no se descarta que pueda participar en la génesis del retinoblastoma.

1.6. LA ENFERMEDAD DE RETINOBLASTOMA

1.6.1. EPIDEMIOLOGÍA

El retinoblastoma es un tumor pediátrico que se presenta en la retina en desarrollo. Se calcula que 1 niño en 20,000 desarrolla la enfermedad, sin importar la raza, zona geográfica o nivel de desarrollo socio-económico⁵⁶. En México, del total de pacientes menores de 15 años que desarrollan algún tipo de cáncer el 8.5% corresponde a retinoblastoma y el 6.5% a osteosarcoma, y estas dos neoplasias están asociadas a la alteración del mismo gen retinoblastoma⁵⁷. La gran mayoría de los casos se presentan antes de los tres años de vida y la posibilidad de desarrollar el retinoblastoma disminuye con la edad. Se considera que la incidencia edad-específica para el cáncer depende de la tasa mitótica de las células blanco, de la tasa mutacional por mitosis, del

número de eventos mutacionales necesarios para el desarrollo del cáncer y del proceso selectivo que ocurre en cada paso en la evolución de los tumores⁵⁸. Como veremos más adelante, los procesos ligados a la regulación epigenética del gen *Rb1*, también pueden participar en el desarrollo de dichos tumores.

1.6.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, HISTOLÓGICAS Y TRATAMIENTO.

La mayoría de los retinoblastomas se detectan cuando uno o ambos ojos están a tal grado invadidos por el tumor que la pupila se muestra blanca con una apariencia de “ojo de gato”. Se han descrito cuatro tipos de desarrollo tumoral: 1) El endofítico donde el tumor crece a partir de la superficie interna de la retina hacia el vítreo, 2) El exofítico donde el tumor crece a partir de la superficie externa de la retina hacia el corioide, 3) El tipo mixto que combina ambas características y 4) El tipo difuso o infiltrante donde el tumor crece dentro de la retina. Este último es relativamente raro y difícil de diagnosticar⁵⁹.

Histológicamente las células tumorales del retinoblastoma presentan un núcleo basofílico, grande y con poco citoplasma y se asocian alrededor de los vasos sanguíneos debido a que los requerimientos nutricionales son muy elevados. Además las células se agrupan en las características “rosetas” en un intento de diferenciación hacia células fotorreceptoras⁵⁹. El tratamiento del retinoblastoma va desde extirpar totalmente el ojo a cirugías más conservativas con láser y crioterapia, combinadas en algunos casos con radiaciones y quimioterapia. En los casos en que el tumor se extiende por fuera del ojo la mortalidad es mayor⁵⁶.

Se ha demostrado que la inactivación de la proteína Rb (pRb) es universal en las células de retinoblastoma, validando la hipótesis de los dos

“hits” de Knudson, es decir que los dos alelos se encuentren inactivados⁵². Existen neoplasias que presentan un alto índice de inactivación del gen *Rb1* como el carcinoma pulmonar de células pequeñas, con 90% de casos con inactivación de *Rb1* y cerca del 35% de los cánceres de vejiga⁶⁰. Otros cánceres donde se ha detectado la pérdida o la disminución de expresión del gen *Rb1* incluyen colon, próstata y mama. Un dato interesante surgió del estudio de líneas celulares de cáncer de mama, donde se demostró que la pérdida de la función de la proteína correlaciona con un mayor grado de malignidad⁶¹.

1.7. EI GEN RETINOBLASTOMA (*Rb1*)

1.7.1. ESTRUCTURA FÍSICA DEL GEN *Rb1*

Hasta mediados de los 80s solo se tenían datos aportados por estudios de citogenética que relacionaban la presencia de la enfermedad con alteraciones localizadas en el cromosoma 13q14. Fue hasta 1986 que se aisló por primera vez un segmento de ADN complementario (ADNc) correspondiente a la región del cromosoma donde se sospechaba residía el gen que predisponía al desarrollo del retinoblastoma y osteosarcoma⁶². Con la información proporcionada por este segmento de ADN cromosómico se pudo determinar, antes de conocerse por completo el gen, que el producto se trataba de una fosfoproteína nuclear con actividad de unión al ADN y fue hasta 1989 que se conoció la estructura completa del gen presente en ese segmento cromosómico denominándolo gen retinoblastoma (*Rb1*), el cual abarca una región genómica de 200 kb⁶³.

En la actualidad se han descrito otros dos miembros de la familia retinoblastoma *pRb2*, también conocido como *p130* cuyo gen reside en el cromosoma 16q12.2 y codifica para una proteína de 130 kDa y *p107* localizado en el cromosoma 20q11.2 cuya proteína es de 107 kDa, ambas proteínas presentan similitudes tanto estructurales como funcionales con *Rb1* y se encuentran conservadas a lo largo de la evolución. Los tres miembros de la familia Rb forman parte de la vía de señales de transducción llamada “Rb Pathway”, la cual es una de las principales vías dentro del control del ciclo celular y por ende una de las vías frecuentemente alterada en eventos neoplásicos⁶⁴. Los tres miembros de la familia comparten muchas propiedades biológicas y tienen la capacidad de unirse a la familia de factores transcripcionales E2F⁶⁵.

1.7.2. LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *Rb1*

Análisis detallados del costado 3' no-codificante del gen *Rb1* determinaron la localización del promotor basal entre -208 y -179 nucleótidos relativos al inicio de la transcripción. Esta secuencia de ADN contiene sitios esenciales para la actividad del promotor con secuencias de unión para los factores transcripcionales ATF, SP1, RBF1, E2F y p53. El promotor del gen *Rb1* no posee la típica caja TATA y su región promotora es rica en nucleótidos citosinas y guaninas (Fig. 4)⁶⁶.

La secuencia del sitio RBF-1 presente en el promotor del gen *Rb1* es reconocida por las proteínas hGABP α y hGABP β 1, además de sobrelaparse con una secuencia de unión al factor transcripcional Sp1 aunque este no tiene preferencia de unión⁶⁷⁻⁷².

La secuencia de unión a ATF es reconocida por dos miembros de la familia, ATF-1 y ATF-2. Estudios *in vitro* revelaron que la mutación de este sitio es capaz de abolir la expresión de un gen reportero, demostrando que este factor es de gran importancia para la funcionalidad del promotor y como veremos más adelante, es donde se han encontrado mutaciones en casos de retinoblastoma hereditario ⁷³.

El sitio de unión a E2F presente en el promotor funciona como un regulador negativo. Estudios *in vitro* han demostrado que mutaciones o deleciones de esta secuencia incrementa la transcripción de un gen reportero, indicando que este sitio reprime al promotor⁷⁴⁻⁷⁷. Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio postulan la unión del factor E2F6 como regulador negativo en este promotor.

El factor Sp1 posee otro sitio de unión aparte del compartido con el factor RBF-1. En este sitio si se puede unir este factor y se especula que pudiera estar participando en la protección contra el “sembrado” de metilación de ADN en el promotor.

Finalmente, el factor transcripcional p53 también reconoce una secuencia en el promotor del gen *Rb1*. A pesar de ello, su función sigue siendo poco clara ya que dosis bajas de p53 pueden activar la transcripción del gen *Rb1* mientras que dosis altas tienden a reprimirla ⁷⁸.

A pesar de conocerse los sitios de unión para los factores ya mencionados, sorprendentemente aun no queda clara la aportación de cada uno de ellos, por lo que no se sabe cual es su contribución en la regulación de la expresión del gen *Rb1*. Incluso, se desconoce si la región promotora de *Rb1* descrita es suficiente para dirigir de manera específica la expresión de este gen

en los diversos tipos celulares o si se requiere de elementos de regulación a distancia tales como silenciadores, potenciadores (enhancers) o elementos de control del locus (LCR).

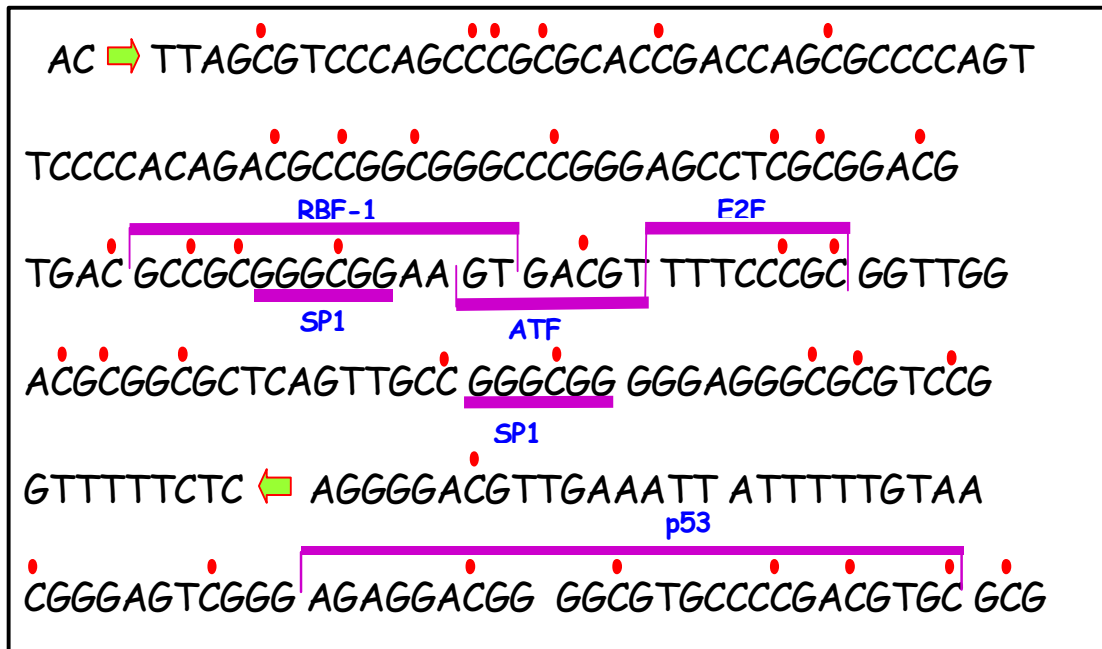


Figura 4: Esquema de la región promotora del gen *RB1* y posición de los sitios de unión de los factores de transcripción además se indican los sitios CpG susceptibles de metilación (indicados con un círculo en la parte superior). Las flechas indican el promotor central.

Aunque existen datos que apoyan la idea de que el gen *Rb1* se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos y sin variaciones aparentes durante el ciclo celular, estudios realizados en ratones transgénicos han demostrado que el promotor descrito con estos elementos reguladores dirigen la expresión del gen *Rb1* en el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico, incluyendo la retina en desarrollo⁷⁹. Por otra parte, resultados previos indican que el sitio ATF es el responsable de la expresión de *Rb1* durante la diferenciación miogénica⁸⁰. A su vez, se plantea la posibilidad de que existan otros sitios de regulación que dirijan la expresión de *Rb* en el sistema hematopoyético, en el músculo esquelético y en el hígado en desarrollo.

En resumen, estos antecedentes demuestran como la mayoría de los estudios se han enfocado exclusivamente en la función de la proteína Rb y desde la perspectiva neoplásica, en las mutaciones en el cuerpo del gen. Además, como se mencionará más adelante, la regulación epigenética puede constituir un aspecto central en la expresión del gen *Rb1*.

1.7.3. LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN *Rb1*

El transcrito del gen *Rb1* está codificado por 27 exones dispersos a lo largo de ~200 kb de ADN genómico en el cromosoma 13q14.1. La longitud de cada exón varía entre 81 y 1889 pb⁸¹. El análisis de su localización genómica sitúa al gen de retinoblastoma entre un posible mensajero denominado *Loc220425* a su costado 5' y el gen de la proteína "Chromosome condensation 1- like" y se desconoce si en las secuencias intergénicas exista algún elemento regulador (Fig. 2)⁸².

En la actualidad se sabe que cerca de un tercio de todas las neoplasias presentan alterada la expresión del gen *Rb1*, o la proteína se encuentra mutada. Además, se han descrito múltiples alteraciones genéticas en la región codificante las cuales se han relacionado con el desarrollo de procesos neoplásicos aunque a diferencia del gen *p53*, donde se han descrito secuencias de tasa mutacional elevada ("hot spots"), en el gen retinoblastoma no se ha detectado ninguno y las mutaciones se encuentran dispersas a lo largo de la región codificante y al ser tan grande, es muy difícil identificar mutaciones en este gen.

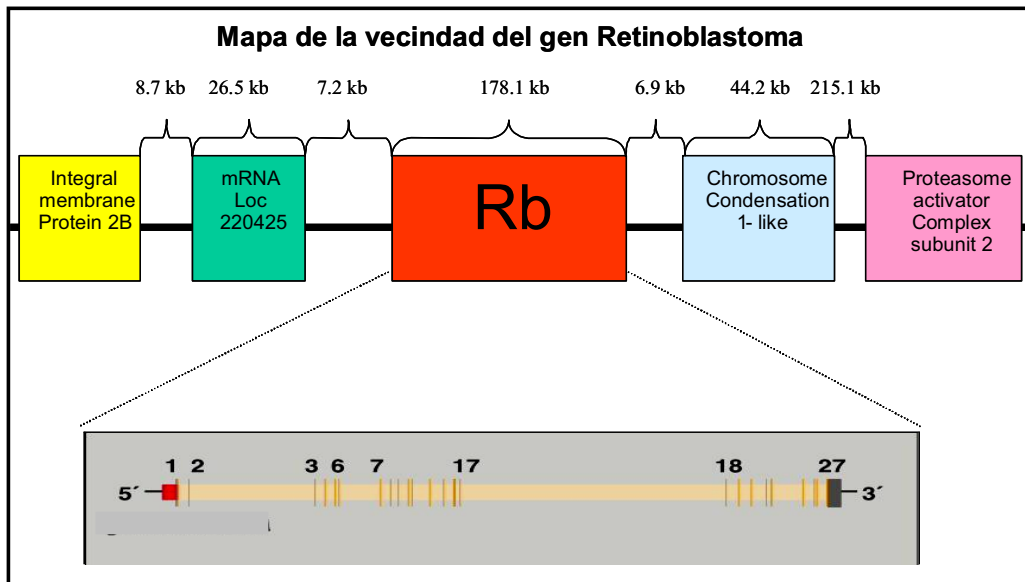


Figura 5: Esquema de la región genómica del cromosoma 13, q14 donde se encuentra el gen *RB1* y sus genes vecinos. www.d-lohmann.de/Rb/mutations.html
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?view=graph&val=NT_033922.2&_gene=RB1

1.7.4. ALTERACIONES GENÉTICAS DEL GEN *Rb1* RELACIONADAS CON CÁNCER

Hasta el momento solo se han descrito 4 mutaciones puntuales en la secuencia promotora del gen *Rb1*, las cuales cambian de manera específica a los sitios de unión de los factores Sp1 y ATF des-regulando la transcripción del gen (Fig. 6)⁸³. Estas mutaciones se han encontrado en la línea germinal confiriéndole a sus portadores predisposición para desarrollar retinoblastoma del tipo hereditario^{67,84}. Por otra parte, no se han encontrado deleciones ni inserciones de algún tipo en este elemento de regulación

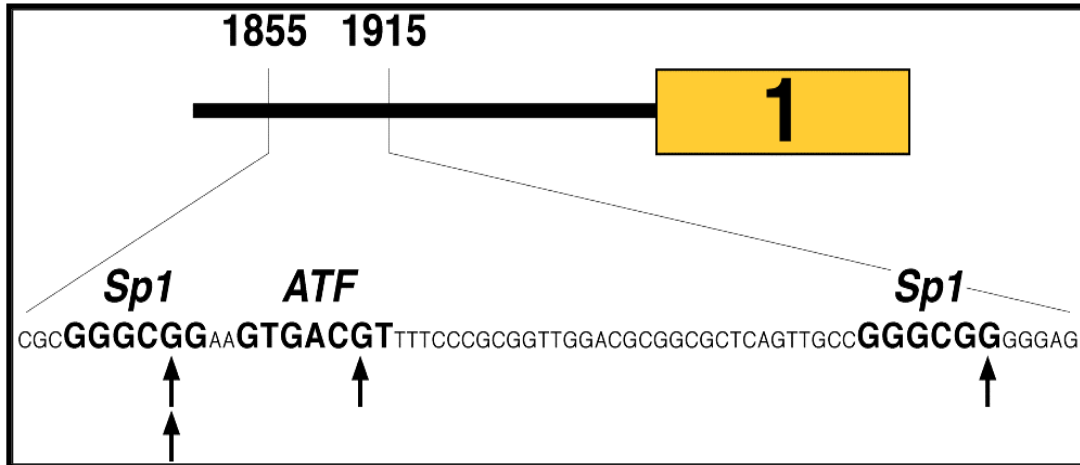


Figura 6.: Posición de las mutaciones que han sido reportadas en la región promotora del gen retinoblastoma. Como se puede apreciar, cada una de las mutaciones puntuales coinciden con las secuencias de unión a los factores transcripcionales Sp1 (en dos posiciones distintas) y ATF. www.d-lohmann.de/Rb/mutations.html

En lo que corresponde a la región codificante, se han descrito 223 sustituciones de bases tanto en secuencias intrónicas como exónicas⁸³ y además se han reportado 96 deleciones pequeñas de entre 1 y 139 pb y 38 inserciones en un rango de 1 a 55 pb tanto en intrones como en exones. Por otra parte, se han detectado 7 mutaciones complejas presentándose deleciones e inserciones, todas ellas en los exones (para la información detallada ver Lohmann, 2002)⁸⁵. La mayoría de las mutaciones afectan los sitios de procesamiento y se ha visto que la metilación de dinucleótidos CpGs en las secuencias codificantes facilita la transición mutacional de C^mpG a TpG, creando codones de término prematuros y por lo tanto proteínas truncadas⁸⁶. En resumen, la región genómica que comprende el gen humano *Rb1* es el blanco de un gran número de defectos genéticos que son altamente complejos, de forma proporcional a la organización genómica de este gen.

1.8. LA PROTEÍNA RETINOBLASTOMA (pRb)

El producto proteico del gen *Rb1* es la proteína retinoblastoma. Esta es una fosfoproteína nuclear de 110 kDa compuesta por 928 amino ácidos. A pesar de encontrarse mayoritariamente en el núcleo, también se ha identificado en el citoplasma de las células aunque aun no se le atribuye alguna función en el citoplasma⁸⁷. Los diferentes miembros de la familia *Rb* difieren en sus patrones de expresión caracterizados en distintos tejidos y fases del ciclo celular. El primer miembro, pRb, se expresa en todos los tejidos y a lo largo del ciclo celular con variaciones mínimas en los niveles de expresión y es regulada por fosforilación. El segundo miembro, p107, no se expresa durante la fase G0 del ciclo celular y tiene un alto nivel de expresión en células que están en proliferación. Por último, p130 se detecta en altos niveles particularmente en células no proliferativas⁸⁸.

La función general de la pRb es la de regular la transición entre la fase G1 y la fase S del ciclo celular, permitiendo a la célula pasar a la siguiente fase o impidiendo su progresión a la fase duplicativa del ciclo celular, de manera dependiente de su estado de fosforilación básicamente a través de regularla negativamente, reprimiendo la expresión de genes promotores del ciclo (ver más adelante)^{89,90}.

1.8.1. DOMINIOS ESTRUCTURALES DE LA pRb

La pRb se estructura en varios dominios funcionales (Fig. 7):

El dominio N-terminal: En esta región se encuentran los sitios de fosforilación responsables de regular la actividad de la proteína a lo largo del ciclo celular. Además, con este dominio tiene la capacidad de interactuar con proteínas

como MCM7 que es un co-factor asociado al proceso de duplicación del ADN, entre otras funciones⁹¹. De manera complementaria, se ha visto que la reintroducción del gen *Rb1* carente del dominio N-terminal en ratones mutantes para el gen *Rb1*, retrasa la letalidad embrionaria causada por un fenotipo $Rb^{-/-}$ pero no la previene, sugiriendo que la región N-terminal es crítica para la función *in vivo* de la proteína durante el desarrollo embrionario⁹².

Dominios A/B: Los dominios A y B situados en la parte central de la pRb conforman el denominado dominio “pocket” característico de los tres miembros de la familia. Estos dominios estructurales están altamente conservados en distintos organismos que van desde las plantas hasta los humanos. En esta región, p107 y p130 comparten una identidad a nivel de residuos de amino ácidos cercana al 50%, siendo evolutivamente más relacionados entre ellos que con la pRb, con el cual solo comparten entre un 30 y 35% de identidad, respectivamente⁸⁸. Este dominio es en donde recae en gran medida la función supresora de la pRb y es en esta región donde se localizan los sitios de unión de diversas proteínas virales, tales como la oncoproteína E7 del Virus del Papiloma Humano, la proteína E1A del Adenovirus, el antígeno T grande de SV40 y otras proteínas con motivos peptídicos tipo LXCXE. Estas proteínas virales tienen la capacidad de inactivar a la pRb desencadenando diferentes procesos tumorales o están involucradas en el silenciamiento de genes regulados por la pRb^{93,94}.

Dominio C-terminal: El otro dominio funcional de la pRb es la región C-terminal, y es ahí donde se localizan los dominios de unión de oncoproteínas como MDM2 y cAbl⁹⁵. Además, es en este dominio, junto con la región

“pocket” donde se unen los miembros de la familia de factores de transcripción E2F.

En resumen, la pRb presenta múltiples interacciones peptídicas con reguladores tanto positivos como negativos que modulan el funcionamiento de la misma⁷², la alteración de estas interacciones puede dar como consecuencia una mala función de la proteína y desencadenar un proceso neoplásico.

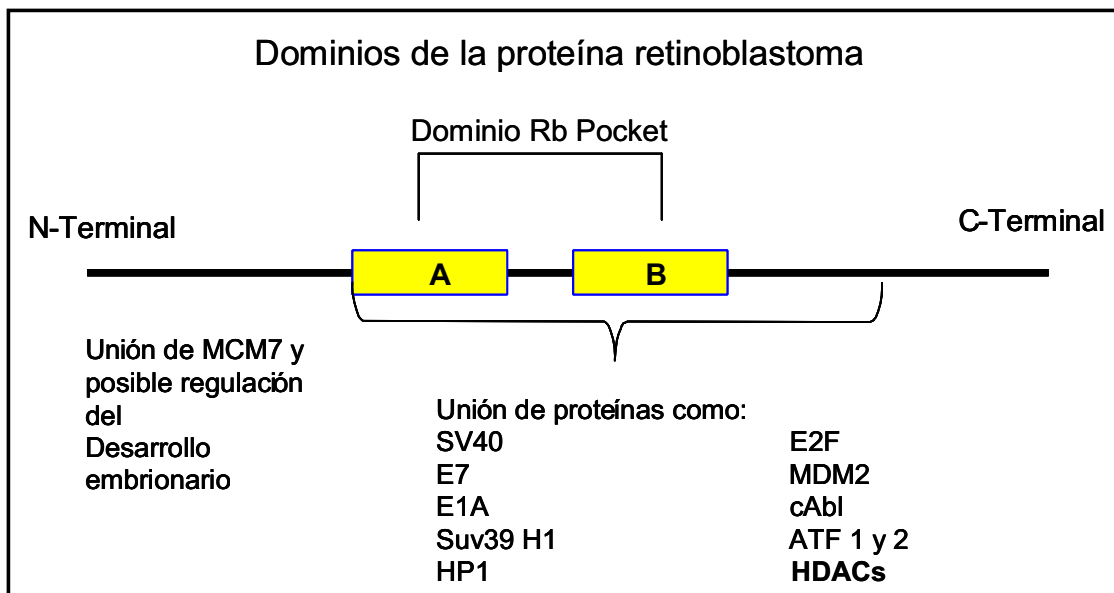


Figura 7: Estructura de la proteína retinoblastoma. Los sitios de interacción con otras proteínas se encuentran indicados. Cabe resaltar los dominios de unión a oncoproteínas virales (SV40 y E7) y en particular, proteínas involucradas en el remodelaje de la cromatina como Suv39H1, Hp1 y HDAC's.

1.8.2. LA PROTEÍNA Rb Y EL CICLO CELULAR

La progresión del ciclo celular está regulada por una compleja red de mecanismos tanto intracelulares como extracelulares. El ciclo celular consta básicamente de cuatro fases (G1 – S - G2 - M) y la transición de una fase a otra está finamente coordinada por diversas proteínas reguladoras del ciclo celular. Como se había mencionado previamente, la transición entre las fases G1 – S del ciclo celular está regulada en gran medida por la acción de la pRb.

Durante la mayor parte de la fase G1, la pRb se encuentra en estado hipofosforilado y formando un complejo proteínico con factores transcripcionales de la familia E2F y la proteína heterodimérica DP (estos factores tienen la capacidad de unirse al ADN)⁶⁵. La formación de dicho complejo permite que los genes que se regulan por los factores E2F puedan ser activados en una etapa precisa del ciclo celular. La visión clásica sugiere que durante la transición de la fase G1 – S, E2F es liberado por la fosforilación de la pRb y activa genes necesarios para la fase duplicativa del ciclo.

Se sabe que de los seis miembros de la familia E2F y sus heterodímeros DP1, DP2 y DP3, la pRb interactúa con E2F -1,-2,-3 y -4. El miembro p130 de la familia Rb, interactúa con E2F-4 y -5 y por último p107 interactúa con E2F-4⁹⁶. E2F-6 es el único miembro de la familia que carece del dominio de unión a la pRb y por consiguiente del dominio de *trans*-activación, y su función está más enfocada a la regulación negativa de la transcripción de ciertos genes blanco de los miembros activadores de la familia E2F, presumiblemente reclutando complejos el tipo Polycomb cuya función es la de generar una estructura cromatínica represora para la actividad transcripcional⁹⁷. Hacia el final de la fase G1, y solo si la célula está lista para dividirse, la proteína p53 permite la fosforilación de pRb en los motivos de serina/treonina-prolina mediada por cinasas dependientes de ciclinas, principalmente por el complejo ciclina D1/Cdk^{4/6}, aunque no se descarta la participación de los complejos ciclina E/Cdk2 o ciclina A/Cdk2^{98,99} (Fig.8). Esta fosforilación rompe la interacción de la pRb con el complejo E2F-DP, los cuales tienen la capacidad de activar la transcripción de múltiples genes involucrados en la progresión del ciclo celular tales como: *c-myc*, *c-myb*, *dehidrofolato reductasa (DHFR)*, *timidín cinasa (TK)*,

timidín sintetasa, DNA polimerasa $\alpha^{100,101}$, y genes involucrados en mitosis y apoptosis entre otros, permitiendo la progresión controlada del ciclo celular^{72,102,103}.

Por el contrario, si las condiciones tanto intrínsecas de la célula como del ambiente (nutrientes, señales de crecimiento, etc) no favorecen la división celular, p53 induce la expresión de la proteína p21, la cual es un inhibidor de las ciclinas dependientes de cinasas (Cdks) manteniendo a la pRb en un estado hipofosforilado lo cual no permite la liberación del complejo E2F-DP y esto en conjunto, frena el ciclo celular en la fase G1¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

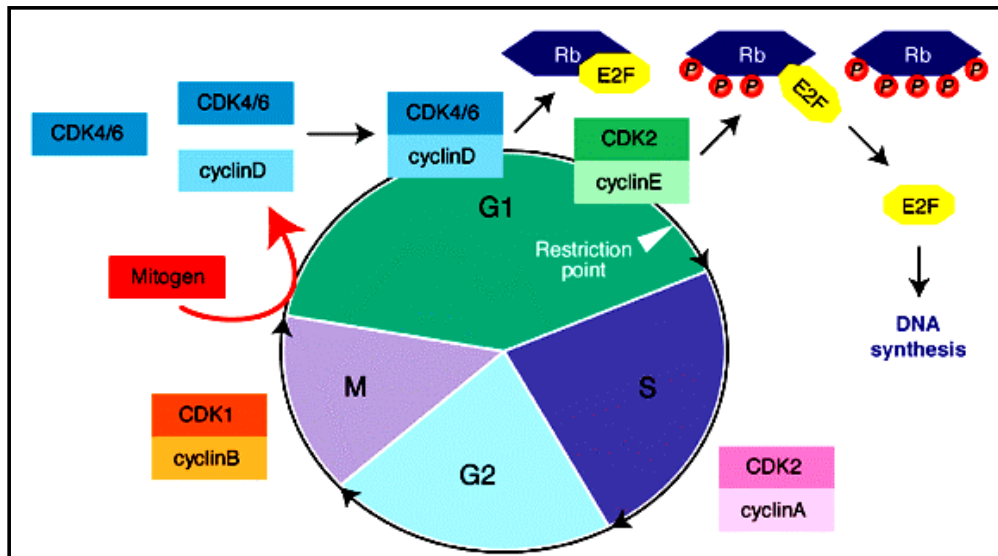


Figura 8. Visión clásica de la regulación del ciclo celular por pRb. La fosforilación de pRb por el complejo CDK^{4/6}/ciclina D permite la liberación del factor transcripcional E2F, lo que inicia la transcripción de genes indispensables para la síntesis de ADN.

Esta regulación tan fina del ciclo celular demuestra la importancia de la pRb y explica la estrecha relación entre la falta de la pRb y su contribución en el desarrollo del cáncer. Esta relación se ve ejemplificada con la generación de modelos en ratón en los cuales la inactivación de la pRb en células de retina, mediada por proteínas virales ocasiona la formación de Retinoblastomas⁷². Pero los fenotipos más notorios se dan en ratones heterocigotos (Rb^{+/-}) los

cuales desarrollan diversos tumores, principalmente de sistema nervioso central (SNC), mientras que los efectos más severos se ven en ratones $Rb^{-/-}$ los cuales mueren en los primeros días de gestación¹⁰⁷. En contraste, los fenotipos $p107^{-/-}$ y $p130^{-/-}$ no tienen ningún efecto en la viabilidad, estos datos, en conjunto con la baja incidencia de mutaciones de estos dos genes en los cánceres humanos, ha llevado a pensar que p107 y p130 no se comportan como genes supresores de tumores clásicos, aunque actualmente su contribución dentro del ciclo celular sigue siendo controversial⁶⁵. Con esto, queda clara la importancia de la pRb en el desarrollo de los organismos y el papel que juega en los procesos tumorales a partir de su papel central en el control de la progresión del ciclo celular.

1.8.3. MECANISMOS DE REPRESIÓN GÉNICA MEDIADO POR LA pRb

La represión de la transcripción génica mediada por la formación del complejo pRb-E2F, va más allá del simple secuestro del factor E2F y su incapacidad para activar la transcripción. Diversos estudios demuestran que el complejo pRB-E2F se une a las regiones promotoras de los genes regulados por miembros de la familia de factores transcripcionales E2F y ejercen su acción represiva reclutando diversos factores y co-factores que influyen sobre la estructura de la cromatina favoreciendo la represión transcripcional de manera regulada durante las distintas etapas del ciclo celular. Entre estos factores se incluyen desacetilasas de histonas las cuales tienen la capacidad de desacetilar los extremos N-terminal de las histonas que sobresalen de los nucleosomas, además de la proteína Rbp2 que desmetila la H3k4me3 resultando en la compactación de la cromatina^{108,109}.

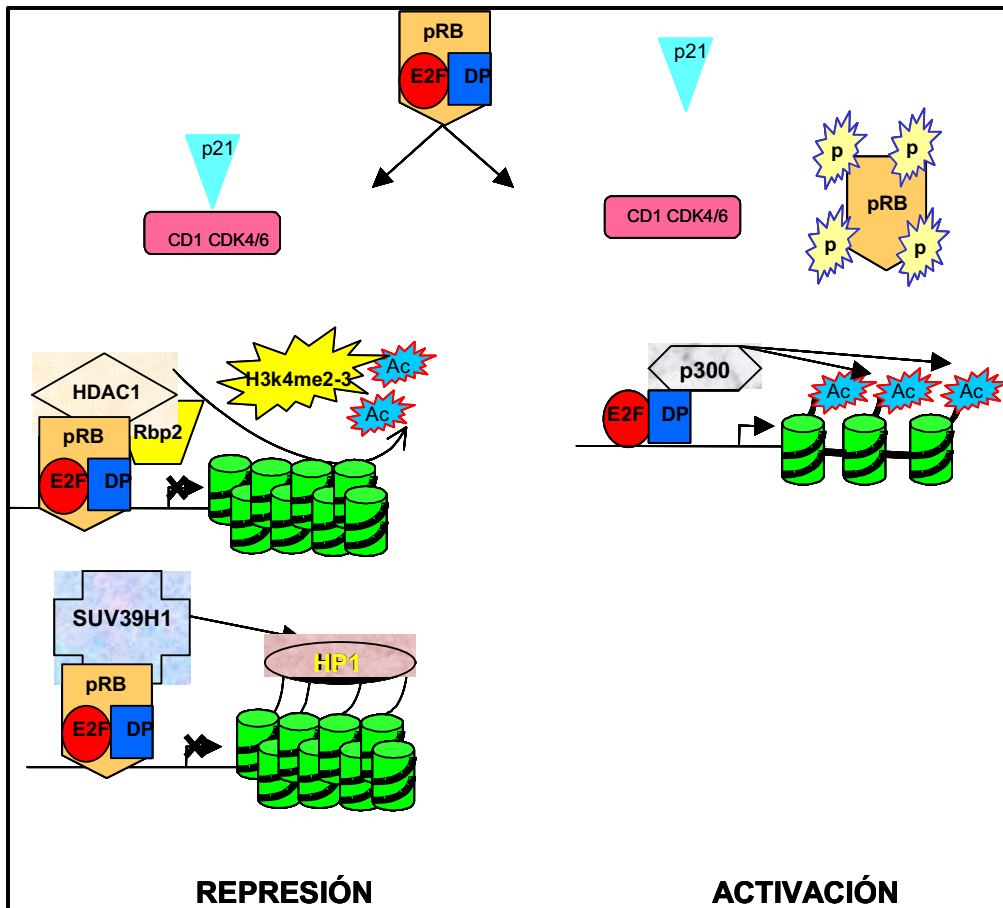


Figura 9: Funciones de la proteína Rb:

Represión: p21 inhibe la fosforilación de pRb manteniendo el complejo pRb-E2F-DP el cual se sitúa sobre los promotores que regula y se recluta a la desacetilasa de histonas 1 (HDAC1), a los complejos remodeladores de la cromatina como SWI/SNF con lo cual se compacta la cromatina en la zona, además de la Rbp2 que desmetila la H3K4me3 que es una marca de activación. Posteriormente la HDAC1 es reemplazada por la metiltransferasa de histonas SUV39H1, la cual metila la lisina 9 de la región amino-terminal de la histona H3 creándose un sitio de unión para la proteína de heterocromatina 1 (HP1) dando como resultado la represión transcripcional del locus. Estas señales se dan principalmente en regiones promotoras y pueden propagarse a lo largo del cuerpo del gen⁶⁵.

Activación: La cinasa dependiente de ciclina CDK4 fosforila a pRb liberando al complejo E2F-DP el cual se une a sus sitios consenso en los promotores de diversos genes. Posteriormente se recluta la proteína p300, la cual es una acetil-transferasa de histonas, lo que provoca un relajamiento en la estructura de la cromatina, dando como consecuencia una activación transcripcional⁶⁵.

También se ha demostrado la interacción de la pRb con miembros de la familia de genes tritorax, entre ellos el gen humano relacionado a *brahma* (*BRG1*) y el miembro de esta familia *hBRM*, el cual posee actividad represora sobre la

estructura de la cromatina⁶⁵. Recientemente se ha demostrado que la pRb es capaz de interactuar con metiltransferasas de histonas (SUV39H1) y con remodeladores de la cromatina ATP-dependientes como SWI/SNF, favoreciendo la formación de heterocromatina. Estas asociaciones dan como resultado una inactivación a nivel transcripcional donde la estructura de la cromatina posee un papel represor esencial⁶⁵ (Fig. 9).

Uno de los genes donde se ha descrito este tipo de regulación es el gen *dehidrofolato reductasa (DHFR)*. Se sabe que la región promotora de *DHFR* es regulado positivamente por los factores de la familia E2F encontrándose silenciado durante la fase G1 temprana para ser activada de manera regulada durante la transición G1-S¹¹⁰. Estudios *in vivo* demostraron una disociación progresiva de la desacetilasa de histonas 1 (HDAC1) al promotor del gen *DHFR* durante la transición G1-S y que a la vez se da un incremento en el nivel de acetilación de la histona H4¹¹⁰. Otros promotores donde se ha descrito este fenómeno incluyen al de la *Ciclina E* (entre otros) donde las modificaciones son tan específicas que se dan en un solo nucleosoma¹¹¹.

En los últimos años se ha ahondado en el estudio de los mecanismos de control de la expresión génica, enfocándose a las modificaciones post-traduccionales de las histonas con efectos directos sobre la modulación de la estructura de la cromatina. Se ha visto que mientras la fosforilación de la serina 10 y la acetilación de la lisina 9 presentes en la región N-terminal de la histona H3 tienen que ver con la activación de la expresión génica, la metilación de la lisina 9 de la histona H3 se ha relacionado con silenciamiento¹¹². La metilación de este dominio peptídico de la histona H3 la llevan a cabo enzimas denominadas metiltransferasas de histonas (no confundir con las DNMTs que

metilan al ADN) y la primera proteína de este género descrita fue la Suv39H1¹¹³. El efecto inmediato de la metilación de la lisina 9 de la histona H3 es la inhibición de la fosforilación de la serina 10, generando un silenciamiento génico. Además, la marca H3k9me3 favorece la unión de la proteína de heterocromatina 1 (HP1), la cual a través de su cromodominio, es capaz de reconocer y unirse a la H3k9me3 de manera estable y establecer el estado silenciado¹¹⁴.

Por otro lado, se ha descrito recientemente una estrecha relación entre la metilación del ADN y la metilación de las histonas en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* y en la planta *Arabidopsis Thaliana*. En este organismo se descubrió una mutante en el gen dim-5 que borra toda la metilación del ADN genómico, pero lo sorprendente es que dim-5 codifica para una metiltransferasa de la H3k9 lo cual revela una dependencia de la metilación del ADN en la metilación de las histonas¹¹⁵.

Hasta el momento, en mamíferos no se ha demostrado una dependencia entre ambas modificaciones epigenéticas, pero si se ha visto que la H3k9me3 y HP1 no están confinados únicamente a las regiones de heterocromatina constitutiva sino que también participan en el silenciamiento de genes eucromáticos. Este es el caso del gen de la ciclina E, donde la pRb (capaz de unirse a HP1 y a Suv39H1 a través de su dominio "pocket") atrae la metilación de la H3k9, reclutando a Suv39H1 y además en el mismo complejo incorpora a la HP1, lo cual induce la represión vía una cromatina altamente compacta de este gen eucromático¹¹⁶. Además, si tomamos en cuenta que en este mismo promotor se demostró la presencia del complejo pRb-E2F-HDAC1 como medio de represión, se podría especular que E2F dirige el complejo E2F-pRb-HDAC1-

Suv39H1-HP1 hacia el promotor de la ciclina E y lo reprime¹¹¹. Ahora bien, surge una nueva pregunta ¿Por qué se necesitan varios procesos epigenéticos, aparentemente redundantes, para silenciar epigenéticamente un gen? Esta pregunta sigue sin tener una respuesta clara actualmente.

En resumen, la visión asociada al secuestro de la familia E2F por pRb y la subsiguiente liberación mediada por la fosforilación de pRb, es parcial. En gran medida las funciones de la vía de Rb asociadas al control del ciclo celular se encuentran íntimamente relacionadas a procesos epigenéticos donde la modulación negativa de la estructura de la cromatina es un proceso preponderante.

1.8.4. LA pRb, SENESCENCIA Y LA FORMACIÓN DE HETEROCROMATINA.

Datos recientes demuestran que la familia Rb (*Rb1*, *p107* y *p130*) junto con el gen *p53*, además de sus funciones clásicas, son de los principales reguladores del proceso de senescencia celular^{117,118}. Las células senescentes se caracterizan por un freno en su ciclo celular acompañada por la interrupción en su capacidad duplicativa. Las células senescentes aunque se mantienen metabólicamente activas, presentan cambios morfológicos y fisiológicos incluyendo cambios en su patrón de expresión génica, en particular, estas células no expresan genes ligados a la proliferación celular. Uno de los métodos más utilizados para definir si una célula se encuentra en estado senescente es la actividad de β -galactosidasa asociada a este estado (SA- β -Gal, del inglés: Senescence-associated β -galactosidase activity)¹¹⁷.

Un estudio reciente demuestra la participación de la pRb en la formación de células senescentes, mediante la promoción de la formación de centros de heterocromatina que engloban a todo el genoma, lo cual favorece un estado senescente permanente e irreversible principalmente sobre genes regulados por los factores E2F¹¹⁸. Diversos estudios moleculares y de inmunocitocalización, han demostrado cambios al interior del núcleo de una célula senescente, donde se forman agregados de ADN en diversos conglomerados de heterocromatina dentro del núcleo denominados SAHF (del inglés: “Senescence Associated Heterochromatin Foci”). Los SAHFs de las células senescentes se caracterizan por presentar marcas de heterocromatina (H3k9me3 y HP1) y la formación de estos centros de formación de heterocromatina está dada por la participación de la pRb, lo que constituye el primer mecanismo descrito para el control y arresto del ciclo celular en una célula senescente y dicho proceso resulta ser dependiente de la vía de pRb¹¹⁸ aunque se especula que los otros miembros de la familia (p107 y p130) pudieran estar asociados a este proceso mediante la heterocromatinización de sus genes blanco ¹¹⁸⁻¹²⁰.

Finalmente, debemos recordar que una célula senescente tiene *per se* características anti-tumorales al ya no permitir la proliferación de la célula afectada, consecuentemente, el entender los mecanismos de control de la senescencia, que además utiliza mecanismos epigenéticos, resulta ser un aspecto relevante que pudiera llevarnos a contrarrestar el desarrollo de un proceso neoplásico con posibles perspectivas terapéuticas.

En resumen, la funcionalidad del gen *Rb1* es necesaria para mantener la regulación de la división celular e inhibir la formación de tumores. Como hemos

mencionado, las modificaciones epigenéticas han probado ser una vía alterna a las alteraciones genéticas para la inactivación de genes supresores de tumores desencadenando diversos procesos neoplásicos.

En este contexto y dado que el la inactivación del gen *Rb1* se ha asociado a alteraciones epigenéticas, decidimos estudiar cuales son estas alteraciones y como afectan a este gen. El presente trabajo está organizado en dos partes. En la primera, nos enfocamos a estudiar el efecto de la metilación de ADN en la funcionalidad del promotor del gen *Rb1*. En la segunda parte nos enfocamos a buscar algún elemento responsable de mantener al promotor en un estado libre de metilación y probar que su desregulación provoca el silenciamiento epigenético.

2. RESULTADOS

2.1. PRIMERA PARTE: EFECTO DE LA METILACIÓN DEL ADN Y MODIFICACIONES DE LAS HISTONAS EN LA FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN *Rb1* HUMANO

2.1.1. ANTECEDENTES

Como se mencionó previamente, la inactivación del gen *Rb1* es un evento determinante en el desarrollo de un proceso neoplásico. Esta inactivación se ha descrito que puede llevarse a cabo por alteraciones genéticas sobre la región promotora del gen o su región codificante, y a nivel de proteína, por la inactivación de la pRb por unión de proteínas de origen viral¹⁰⁷. Sin embargo, las alteraciones genéticas no son las únicas capaces de inactivar al gen *Rb1*, actualmente, además de los defectos genéticos, se han reportado casos donde el promotor del gen retinoblastoma se encuentra metilado, correlacionando con la ausencia de la proteína. Por otra parte, al no encontrarse mutaciones ni deleciones tanto en la región promotora como codificante podemos pensar en una relación entre la metilación del promotor y la represión transcripcional por mecanismos epigenéticos¹²¹.

La inactivación epigenética del gen *Rb1* parece ser específica en ciertos tipos de cánceres, ya que se conocen diversas neoplasias donde no se ha encontrado la participación de la metilación de ADN del promotor del gen *Rb1* como mecanismo de su inactivación, como es el caso de las leucemias mieloides y linfoblásticas, mientras que en otros tipos de cáncer como los retinoblastomas y los tumores de sistema nervioso central, la metilación de la región promotora es un evento común y en todos los casos se ha descrito una

estrecha correlación con la ausencia de la proteína¹²²⁻¹⁵⁰. Esta correlación se ha demostrado en diversos tipos de tumores (Tabla 4) y además se ha encontrado que en glioblastomas la metilación del promotor es un evento tardío ya que a mayor grado de la enfermedad es mayor la frecuencia de hipermetilación¹⁴⁵. Por otro lado y de manera totalmente opuesta, en el carcinoma hepatocelular se ha visto que la hipermetilación del promotor de *Rb1* y de otros genes reguladores del ciclo celular como son *p15*, *p16* y *p18*, se da en etapas muy tempranas, incluso en cirrosis que es un estado que puede evolucionar a cáncer¹⁴⁶, apoyando la idea que la hipermetilación de las regiones promotoras de diversos genes puede ser un evento tanto de causa como de consecuencia del cáncer¹⁵¹.

Tabla 4. Metilación del promotor del gen Rb1 en diferentes tipos de cáncer

Tipo de cáncer	Metilación en Rb1	Referencias ¹²¹⁻¹⁴⁹
Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) en niños, adultos y reincidencia en niños.	0%	Yang Y, et al. 2006 Matsushita C, et al. 2004 Chim CS, et al. 2003
Leucemia Mieloide Aguda (LMA)	0%	Chim CS, et al. 2003 Melki JR, et al. 1999
Mielofibrosis con metaplasia mieloide	0%	Kumagai T, et al. 2005
Osteosarcoma	0%	Otte C, et al. 2004
Carcinoma Hepatocelular	0%	Park HJ, et al. 2006
Cáncer de Vejiga (tumores y líneas celulares)	0%	Dulaimi E, et al. 2004
Sarcomas de tejidos blandos	2%	Kawaguchi K, et al. 2006
Tumores de cerebro (1 meningioma y 1 Hemangioma)	4%	Yin D, et al. 2002
Carcinoma de células escamosas cutáneas	5%	Murao K, et al. 2006
Astrocitoma Maligno	6%	Ohta T, et al. 2006
Retinoblastoma esporádico unilateral	6.6% - 13%	Sakai T, et al. 1991 Greger V, et al. 1994 Ohtani-Fujita, et al. 1997 Joseph B, et al. 2004
Síndrome Mielodisplásico	14%	Hofmann W, et al. 2006
Neurofibromas / Neurofibromatosis	14%	González-Gómez P, et al. 2003
Schwannomas	15%	González-Gómez P, et al. 2003
Liposarcoma dediferenciado	15%	Takahira T, et al. 2005
Cáncer de mama esporádico	17%	Zemliakova VV, et al. 2003
Gliomas astrocíticos (dependiendo del tipo)	10%-40%	González-Gómez P, et al. 2003
Glioblastomas Primario	14%	Nakamura M, et al. 2001

	Secundario	43%	
Hígado	Cirrosis	12%	Roncalli M, et al. 2002
	Carcinoma hepatocelular	21%	
Tumores del sistema nervioso		20%	González-Gómez P, et al. 2003
Cáncer de esófago		40%	Li H, et al. 1998
Carcinoma de glándula salival		41.7%	Kishi M, et al. 2005
Carcinoma gástrico		42%	Zhao Y, et al. 2003
Adenoma Pituitario		60%	Simpson D, et al. 2000

2.1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha, aunque se han descrito múltiples tipos de cáncer donde la metilación de la región promotora del gen *Rb1* correlaciona con la falta de la proteína, son escasos los experimentos funcionales que los vinculen directamente y más aun, no se conocen los posibles mecanismos que estarían participando en la represión del gen *Rb1* mediado por la metilación del ADN de su región promotora.

2.1.3 OBJETIVO

Evaluar el efecto de la metilación del ADN de la región promotora del gen *Rb1* sobre la expresión de un gen reportero.

2.1.4. RESULTADOS PARTICULARES.

2.1.4.1. EFECTO DE LA METILACIÓN DEL ADN EN EL PROMOTOR DEL GEN *Rb1*

La región promotora del gen *Rb1* se encuentra embebida en una isla CpG. Este promotor contiene 27 dinucleótidos CpGs potencialmente metilables y varios de ellos coinciden con la secuencia de unión de los diferentes factores transcripcionales que regulan su expresión, por lo que decidimos evaluar si la metilación de estos sitios induce el silenciamiento del promotor (Fig. 10A).

Para estudiar el efecto de la metilación del ADN en la región promotora del gen *Rb1*, se construyó el plásmido pGLRb el cual contiene el promotor del gen *Rb1* humano (posición genómica 1634-2020, del número de acceso L11910 del GenBank) frente al gen reportero de *Luciferasa (Luc)*. Este plásmido fue metilado *in vitro* a diferentes tiempos utilizando la enzima SssI, la cual agrega un grupo metilo en el dinucleótido 5'-C^mpG-3', con la finalidad de obtener un gradiente de metilación y correlacionarlo con el grado de expresión del reportero (Fig. 10B). Una vez metilados, los plásmidos fueron transfectados de manera transitoria en células HeLa y 48 horas después se prepararon extractos totales de proteínas para evaluar la actividad de luciferasa. Los resultados mostraron que a mayor tiempo de incubación con la enzima SssI, lo que equivaldría a mayor grado de metilación, la actividad de luciferasa detectada es menor (Fig. 10C), sugiriendo que a mayor metilación del plásmido la actividad transcripcional inducida por el promotor se ve disminuida.

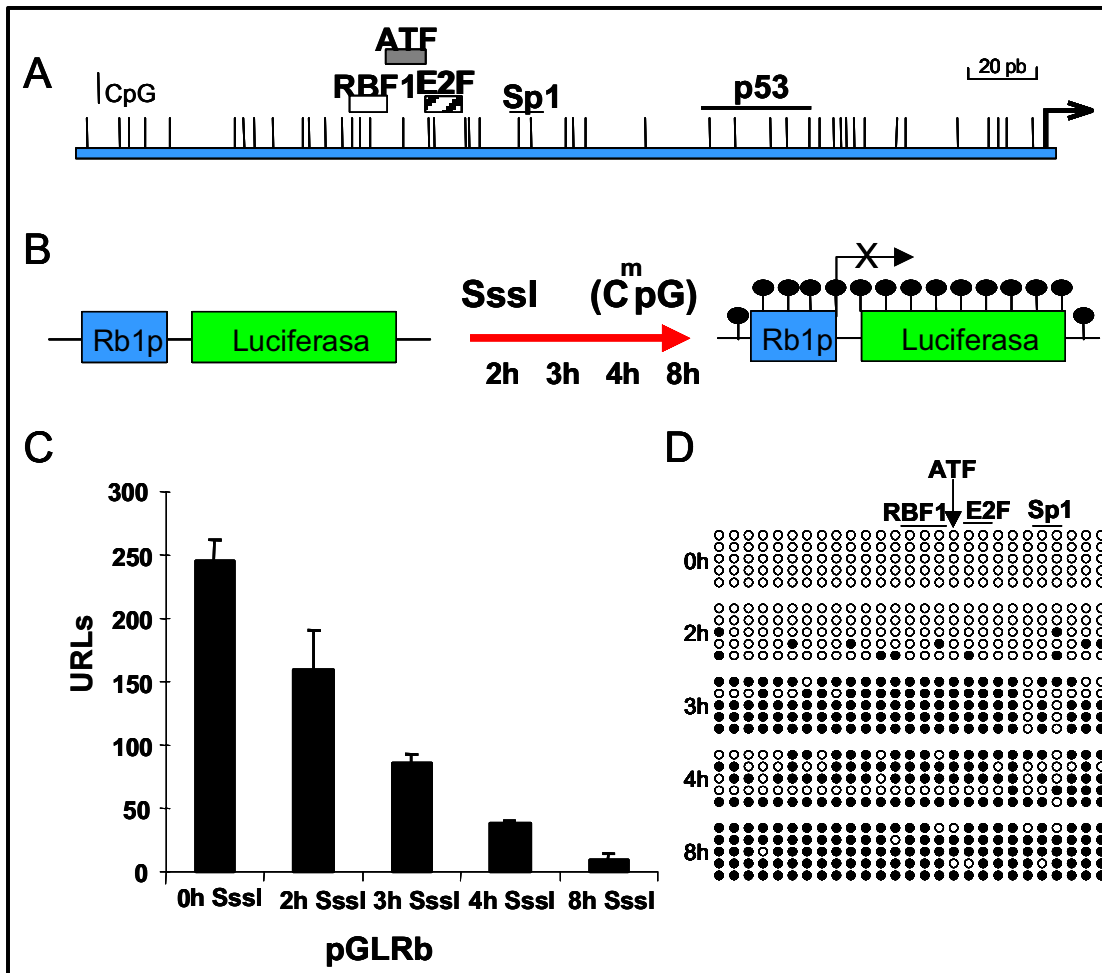


Figura 10: Efecto de la metilación del ADN sobre el promotor del gen *Rb1*. **A**, Esquema del promotor del gen *Rb1* (*Rb1p*) y posición de los sitios CpGs. **B**, Esquema del plásmido utilizado para las transfecciones transitorias conteniendo la región promotora y el gen reportero de la luciferasa, este plásmido se metiló a las horas indicadas. **C**, Cuantificación de luciferasa de los plásmidos metilados y transfectados en células HeLa. **D**, Resultado de la secuenciación genómica con bisulfito de sodio. Los círculos claros representan CpGs no metilados mientras que los negros representan a los metilados.

Dado que en este experimento la enzima tuvo la capacidad de metilar todo el plásmido, se procedió a hacer una secuenciación genómica con bisulfito de sodio sobre la región promotora en particular, para comprobar que esta secuencia estuviese metilada y que la disminución en la expresión del reportero correlacionara con la ganancia de metilación en ella.

La secuenciación del promotor demostró que a mayor tiempo de incubación con la enzima, la cantidad de CpGs metilados, detectados por la secuenciación

es mayor y a las 8 horas de incubación, la mayoría de los 27 sitios CpGs se encontraron metilados, demostrando una relación directa entre la metilación *in vitro* del promotor y el silenciamiento epigenético del gen reportero.

Pero el hecho de que todo el plásmido estuviera siendo metilado en el experimento anterior nos planteó la duda sobre si la metilación en el resto del plásmido pudiera alterar de alguna forma el resultado obtenido. Lo anterior debido a que la reducción de la expresión se debiera, por ejemplo, a que la región codificante del gen *Luc* se hubiera metilado provocando dicho silenciamiento y no la metilación de la región promotora. Para ello procedimos a hacer la metilación diferencial de la región promotora y se ligó de manera direccional al resto del plásmido para después transfectarse transitoriamente en células HeLa. Como controles se incluyeron el plásmido completo sin metilar y metilado.

Los resultados obtenidos demuestran que la metilación del promotor es capaz de silenciarlo epigenéticamente, causando una falta de activación del gen reportero.

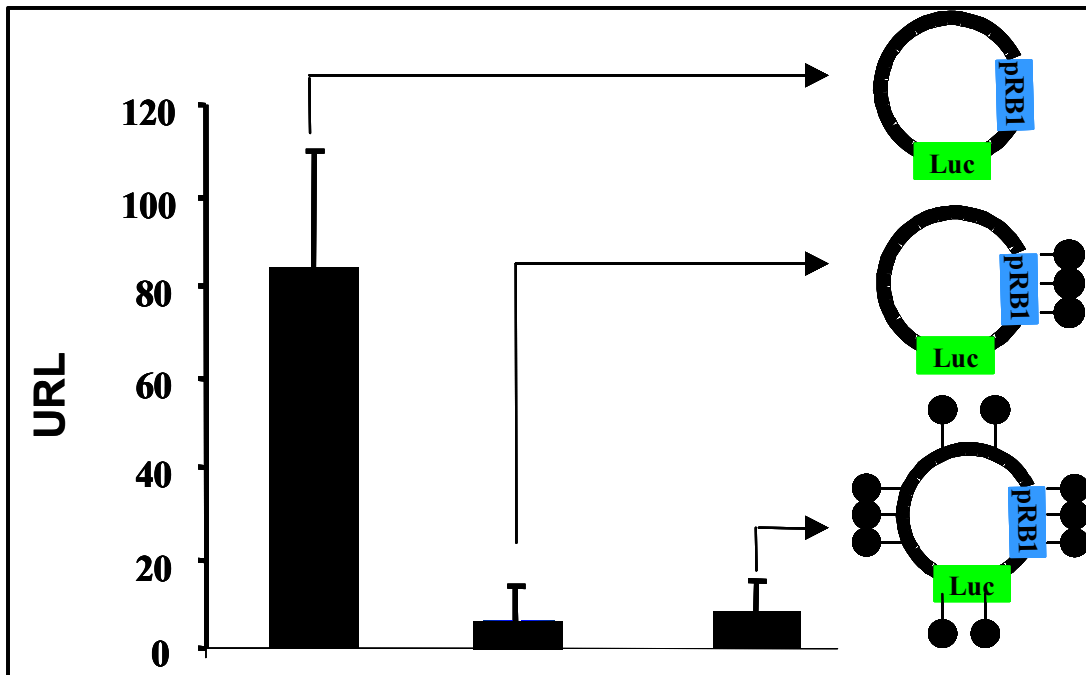


Figura 11: Efecto de la metilación del ADN sobre el promotor del gen *Rb1*. Metilación diferencial del plásmido y efecto de la metilación en la expresión del reportero.

El siguiente paso consistió en demostrar que este mecanismo estuviese operando en un contexto cromatínico ya que es como se encuentra normalmente operando este promotor. Para ello, sustituimos al gen reportero de la luciferasa por el del gen que codifica para la proteína verde fluorescente (*GFP* del inglés, Green fluorescent protein) en cuyo plásmido se incluye un gen de resistencia a neomicina, lo que nos permitió transfectarlo de manera estable en las células HeLa. Nuevamente, el plásmido fue metilado *in vitro* de manera diferencial, conteniendo el promotor metilado y no metilado. Ambas construcciones fueron transfectadas de manera estable en células HeLa y después de ser seleccionadas y se evaluó la expresión del reportero por citometría de flujo.

Se encontró nuevamente que la metilación del promotor es capaz de silenciarlo inhibiendo la expresión del gen reportero en un contexto cromatínico,

mientras que cuando no se metila las células tienen la capacidad de expresarlo (Fig. 12).

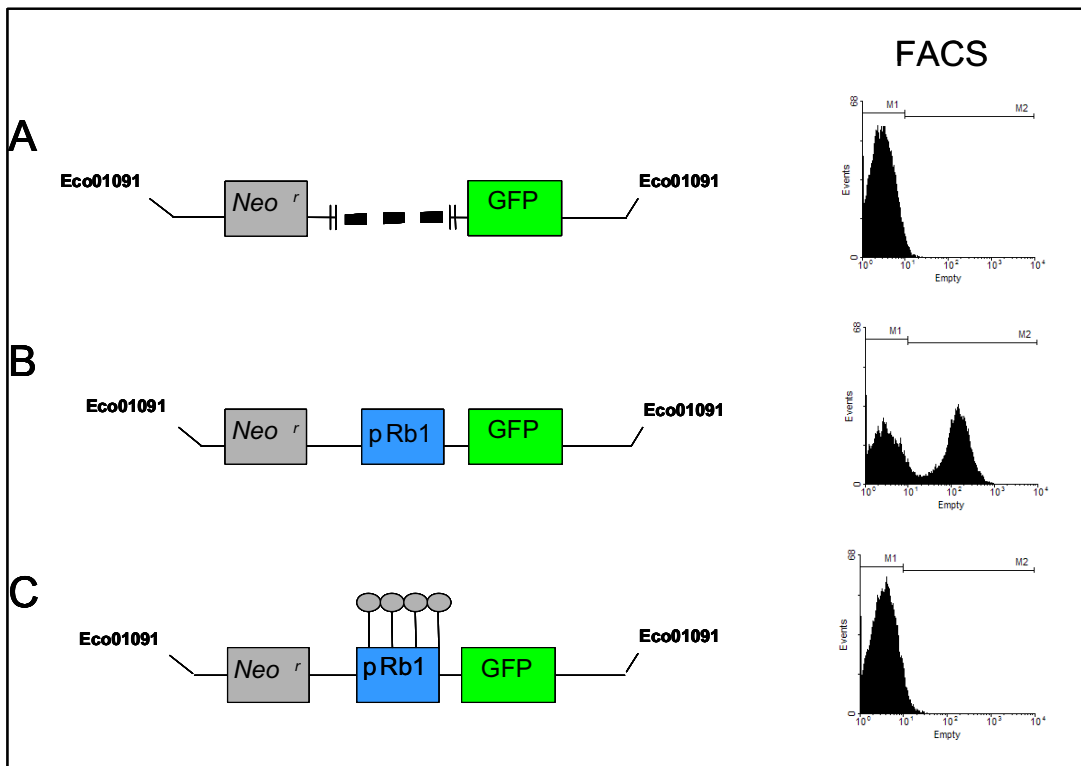


Figura 12: Efecto de la metilación del ADN sobre el promotor del gen *RB1* en transfecciones estables. **A**, Plásmido transfectado sin promotor, las células presentan resistencia a Neomicina pero no expresan a la *GFP* por que esta no tiene promotor. **B**, Células trasfectadas con el promotor sin metilar, las células que expresan la *GFP* aparecen en la parte M2 del histograma del citómetro de flujo. **C**, Células transfectadas con el plásmido con el promotor metilado. No hay células que expresen *GFP*. Cabe resaltar que al metilar diferencialmente el promotor, hay que transfectar las ligaciones por lo que hay células que solo adquieren el gen de resistencia a neomicina en todos los casos sin la parte de la *GFP* como en el panel A. Eco01091 es la enzima con la que se lineariza el plásmido.

Para corroborar que la falta de expresión del transgén se debía a la metilación del promotor y no a que no se hubiese transfectado establemente, las células que incorporaron el transgén con el promotor metilado fueron cultivadas en presencia del inhibidor de la metilación de ADN 5-aza-2-deoxicitidina (5-Aza2C) y con el inhibidor de desacetilasas de histonas Tricostatina A (TSA) además de la combinación de ambos inhibidores por un periodo de 3 días (Fig. 13). Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células

se analizaron por citometría de flujo, mostrando que el TSA no tiene la capacidad de reactivar al transgén por si solo, pero la 5-AzadC lo reactiva en un 50%, demostrando que el silenciamiento fue inducido por la metilación del promotor y que este silenciamiento es reversible con el tratamiento con 5-AzadC (Fig. 13).

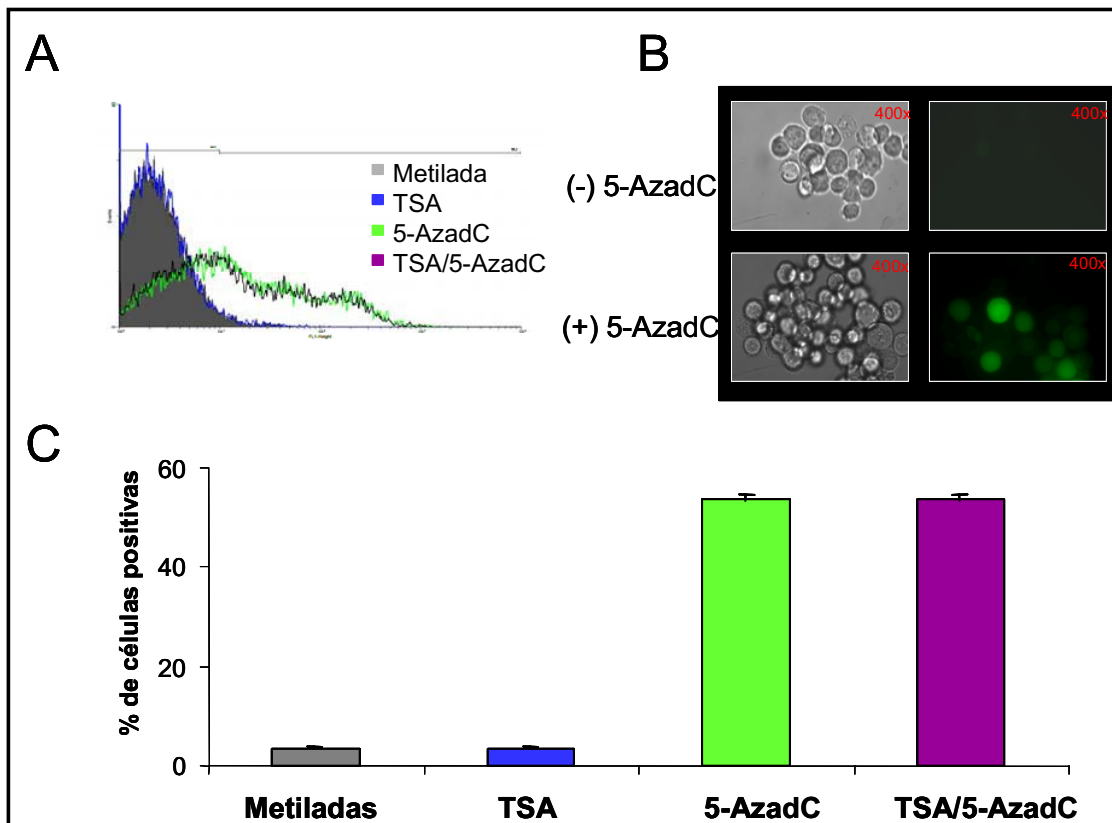


Figura 13: Reactivación de la expresión del transgén por el tratamiento con 5-AzadC. **A**, Las células con el promotor metilado fueron tratadas con 5-AzadC por 3 días (3 μ M). Se detecta a través del citómetro a la población que expresa nuevamente a la GFP. **B**, Fotografía de epifluorescencia de las células tratadas y no tratadas. Se muestra la expresión de GFP en las tratadas con 5-AzadC. **C**, Cuantificación de la reactivación de las células.

Con estos resultados podemos concluir que la metilación del ADN de la región promotora del gen *Rb1* lo silencia epigenéticamente tanto en trasfecciones transitorias como en un contexto cromatínico.

2.1.4.2. BÚSQUEDA DE UNA LÍNEA CELULAR CON EL PROMOTOR ENDÓGENO DE *Rb1* METILADO.

La siguiente parte del trabajo se concentró en la búsqueda de una línea celular de cáncer humano donde se encontrara metilado el promotor del gen *Rb1* de manera endógena para poder corroborar y confirmar los datos obtenidos *in vitro*.

Para este fin, se realizó una PCR específica de metilación (MS-PCR) en diferentes líneas celulares de cánceres humanos (Fig. 14). Esta técnica se basa en la amplificación de la región promotora del gen *Rb1* a partir de ADN genómico tratado con bisulfito de sodio con oligonucleótidos diseñados específicamente para reconocer la secuencia metilada o no metilada. Los resultados mostraron la existencia de líneas que eran sugestivas de presentar el promotor metilado, dado que la mayor amplificación se obtuvo con los oligonucleótidos que amplificaban ADN metilado, como es el caso de las líneas MDA-MB-231 (Cáncer de mama) y U373-MG (astrocitoma) (Fig. 14).

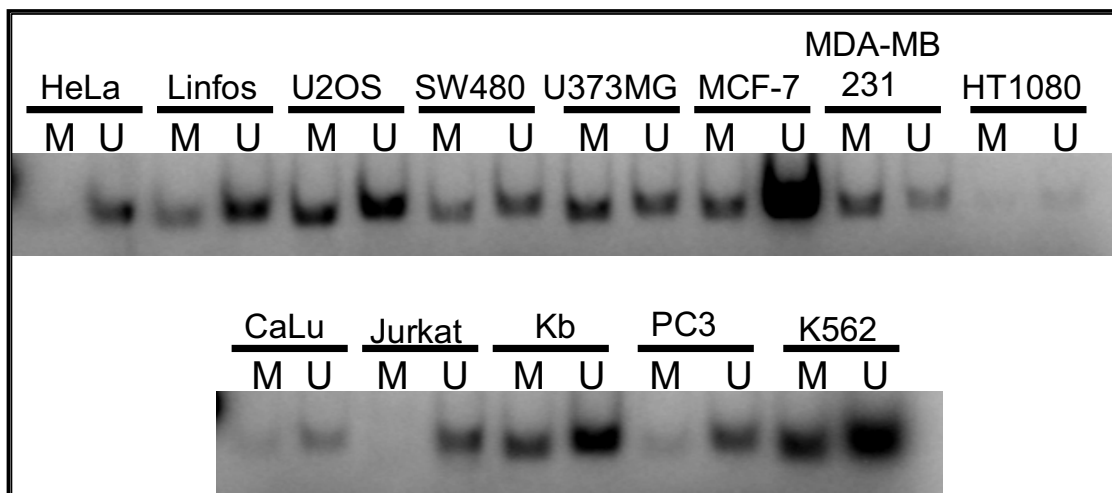


Figura 14: Búsqueda de una línea celular de cáncer con el promotor endógeno de *Rb1* metilado. Se realizó una PCR específica de metilación sobre el ADN genómico de diferentes líneas celulares tratado con bisulfito de sodio. M – Metilado, U – No metilado.

Dado que los resultados obtenidos con la MS-PCR no fueron concluyentes, se procedió a hacer una inmunofluorescencia para detectar a la pRb en las líneas MDA-MB-231 y U373-MG, que eran sugestivas de tener el promotor metilado y que en la literatura no se encontró reportado si expresaban o no a la pRb. Como control se utilizaron las líneas MCF-7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer cervicouterino). En caso de que el promotor estuviera metilado, las líneas no expresarían la pRb.

Los resultado de inmunofluorescencia mostraron que las 4 líneas celulares son positivas a la pRb (Fig. 15), lo que descarta que el promotor se encuentre metilado. Cabe resaltar que los oligonucleótidos utilizados para el experimento de MS-PCR solo pueden detectar 4 de los 27 sitios posibles de metilación, por lo que la amplificación pudo deberse a una metilación residual presente en los CpGs estudiados con esta metodología.

Desafortunadamente, de todas las líneas celulares de los diferentes tipos de cáncer a las que se tuvo acceso, ninguna presentó metilación en la región promotora del gen *Rb1* por lo que aun no se han podido corroborar los resultados de los experimentos *in vitro* con los de algún promotor endógeno. Actualmente, hemos conseguido diferentes líneas celulares de glioblastomas, donde se ha reportado la metilación del promotor *Rb1* en 60% de los casos, y estamos evaluando si estas poseen el promotor metilado para continuar con el estudio en un promotor endógeno.

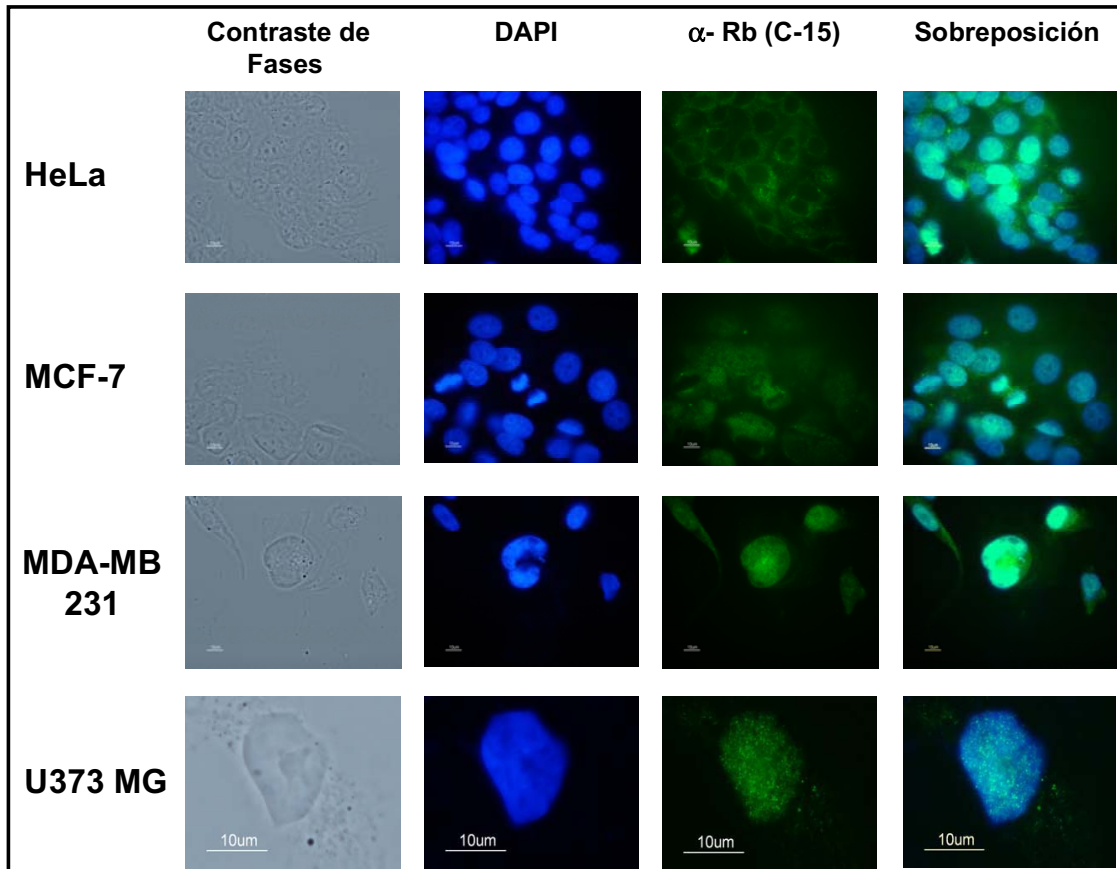


Figura 15: Expresión de la proteína Rb en diferentes líneas celulares. La detección fue positiva en las líneas sugestivas de tener metilado el promotor indicado por la MS-PCR. Nótese que en la línea celular HeLa la proteína Rb es citoplásmica consistente con el secuestro de esta por la proteína E7 del VPH.

2.1.5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El gen supresor de tumores *Rb1* se encuentra mutado en un tercio de los tumores humanos y los restantes poseen alteraciones en algún componente de la vía de *Rb1*, lo que indica que la pérdida de la función de *Rb1* es crítico para el proceso de tumorigénesis¹⁵².

En la actualidad, el silenciamiento epigenético del gen *Rb1* por metilación del ADN, está tomando gran importancia, debido a que puede constituir un nuevo mecanismo de represión que pueda dar como resultado la falta de la proteína Rb y el subsiguiente desarrollo neoplásico. Hasta la fecha, los datos proporcionados por los estudios clínicos, muestran una clara

correlación entre la metilación de la región promotora del gen *Rb1* y la falta de la pRb (Tabla 4). Además se ha demostrado que en transfecciones transitorias la metilación del promotor correlaciona con la falta de expresión de un reportero aunque los sitios específicos de metilación no fueron definidos¹⁵³.

En el presente estudio, demostramos que la metilación de los 27 sitios CpGs presentes en la región promotora del gen *Rb1* tiene la capacidad de inactivar al promotor en transfecciones transitorias, corroborando los estudios previos¹⁵³, pero además se demostró que este silenciamiento también se da en un contexto cromatínico a través de transfecciones estables. Este silenciamiento es parcialmente reversible al tratar a las células con un inhibidor de la metilación del ADN como la 5-AzadC, pero la incapacidad para reactivarlo completamente indica la participación de otras marcas epigenéticas involucradas en el proceso de silenciamiento, como pueden ser modificaciones post-traduccionales en las histonas como la metilación de la lisina 9 de la histona H3 o la participación de otros componentes como los miembros de polycomb^{34,151}. Estudios *in vitro* han demostrado que los factores ATF, RBF-1 y E2F presentes en la región promotora de *Rb1*, no tienen la capacidad de unirse cuando su secuencia se encuentra metilada¹⁵³, pero a la secuencia de E2F se puede unir la proteína de unión a ADN metilado denominada MeCP2, la cual es capaz de reclutar a otras proteínas represoras como Desacetilasas de histonas y metiltransferasas de histonas²⁹, lo que correlacionaría con la formación de una estructura compacta en la región promotora de *Rb1* incompatible con la transcripción.

Con el objetivo de caracterizar la estructura de la cromatina en el promotor del gen *Rb1* silenciado por metilación del ADN, nos dimos a la tarea

de identificar una línea celular de cáncer humano que presentara el promotor silenciado por metilación de ADN. Desafortunadamente de 12 líneas celulares estudiadas, ninguna presentó el promotor metilado y todas expresaban la pRb. Actualmente, nos encontramos estudiando otras líneas celulares; además estamos iniciando con los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en las líneas transfectadas establemente con el promotor metilado y no metilado, para tener una primera caracterización de la región promotora del gen *Rb1* silenciado por metilación de ADN.

Recientemente, se reportó un modelo para el estudio del retinoblastoma en *Drosophila*¹⁵⁴, el cual, de manera sorprendente, induce la metilación del promotor del gen Rbf (homólogo a Rb1). En este estudio, se utilizó una cepa de *Drosophila* que sobre-expresa al ligando Delta del receptor Notch. Se sabe que la señalización mediada por este receptor juega un papel importante en el desarrollo del ojo de la *Drosophila* y que la sobre-actividad de esta cascada induce un sobre-crecimiento del ojo conocido como el fenotipo de “ojo grande”. Los autores demostraron que la sobre-activación de la señalización mediada por la sobre-expresión del ligando Delta de Notch, en conjunto con la sobre-expresión de dos silenciadores epigenéticos del grupo de proteínas *Polycomb* llamados *longitudinal lacking (lola)* y *pipsqueek (psq)* inducen el silenciamiento del gen Rbf mediado por la metilación de su región promotora, resultando en mayor crecimiento del tumor e incluso metástasis^{154,155}. Cabe mencionar que no se sabe si la vía de señalización de Notch participe en la regulación del gen *Rb1* en humanos y que este mecanismo pudiera estar operando en los casos de cáncer donde el promotor se encuentra metilado.

Pero, como se mencionó previamente, el promotor del gen *Rb1* se encuentra normalmente en un estado no metilado, y esta alteración solo se ha identificado en procesos neoplásicos, lo que sugiere la existencia de algún elemento de protección de este promotor contra la metilación aberrante, por lo que la segunda parte de este trabajo está enfocada en la identificación de este elemento de protección.

2.2. SEGUNDA PARTE: IDENTIFICACIÓN DE CTCF Y KAISO COMO NUEVOS REGULADORES EPIGENÉTICOS DEL GEN *Rb1*

2.2.1. ANTECEDENTES

Como se mencionó previamente, en los últimos años se ha demostrado que las alteraciones epigenéticas tienen un papel muy importante en el origen y progresión del cáncer. Un gran número de investigaciones han demostrado que la ganancia o pérdida de la metilación del ADN y patrones alterados de modificaciones en las histonas ocurren en la mayoría de los cánceres, sin embargo, existen pocos reportes acerca de la regulación normal de estos mecanismos epigenéticos, principalmente los enfocados a explicar por qué en una célula normal una isla CpG no se metila, como es el caso del promotor del gen *Rb1*^{34,151}.

Hasta la fecha, los mecanismos epigenéticos que controlan la expresión del gen *Rb1* no se han elucidado. Se sabe que su promotor de manera normal nunca se encuentra metilado para garantizar su constante y ubicua expresión. Sin embargo, existen diversos tipos de cánceres donde la metilación del promotor del gen *Rb1* es común y más aun, que el grado de metilación puede correlacionar con la progresión del cáncer¹²¹. El gen *Rb1* presenta un patrón de hipermetilación cáncer específico, es decir, mientras en algunos tipos de cáncer como las leucemias y osteosarcomas no se ha reportado metilado, hay otros como los tumores de sistema nervioso central donde la metilación es muy común. Estos datos, aunados al hecho de que de manera normal este promotor nunca se encuentra metilado, nos llevaron a preguntarnos si existía algún tipo de elemento que proteja contra la metilación del ADN de la región promotora

del gen *Rb1* y que la falla en este mecanismo desencadenara el silenciamiento epigenético de este gen en cáncer. Por medio de análisis detallados de la literatura escogimos al factor CTCF (CCCTC-binding factor) como un posible candidato para llevar a cabo dicha función protectora. CTCF se caracterizó inicialmente como un regulador tanto positivo como negativo de diferentes genes como *c-myc* y el gen de la apolipoproteína¹⁵⁶. También se demostró que es una proteína ligada al funcionamiento de los “insulators” donde es la responsable de la actividad de bloqueo de enhancer^{156,157}, pero las evidencias más directas sobre la protección contra la metilación del ADN provienen de la participación de CTCF en la regulación de los genes improntados.

La impronta genómica se puede definir como la regulación epigenética de un loci específico donde solo un alelo de un gen es expresado mientras el otro es silenciado¹⁵⁸. La regulación diferencial para la expresión de los alelos depende principalmente de un elemento de regulación denominado “región de control del imprinting” (ICR por sus siglas en inglés) o también conocido como “dominio de metilación diferencial” (DMD por sus siglas en inglés). Este sitio funciona básicamente por la unión de CTCF cuando no se encuentra metilado pero este reconocimiento no se da cuando la zona se metila¹⁸. Uno de los loci más estudiados es el *Igf2/H19* donde CTCF interacciona con el DMD materno induciendo un bloqueo en la activación del gen *Igf2* por su enhancer y permitiendo la expresión del gen *H19* (Fig. 16). En contraste, el DMD paterno se encuentra hipermetilado inhibiendo la unión de CTCF y esta metilación se extiende hasta la región promotora de *H19* silenciándolo y por ende, esto permite la activación de *Igf2* por su enhancer, por lo que se plantea que CTCF se encuentra protegiendo al alelo materno de la hipermetilación^{18,158}.

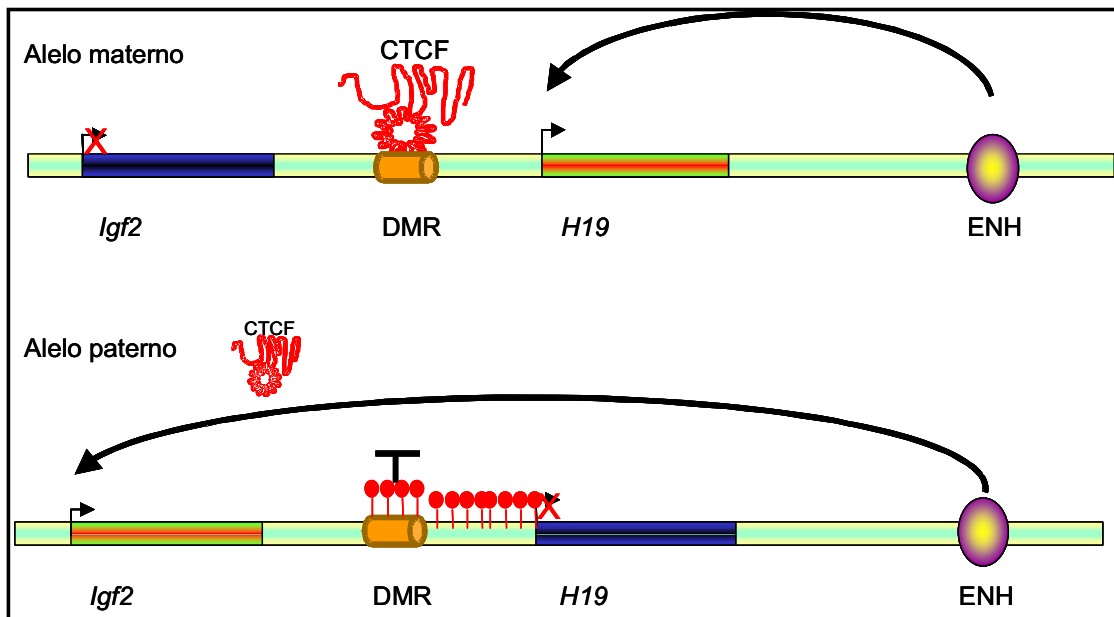


Figura 16: Ejemplo de regulación de genes improntados por CTCF. En el alelo materno, CTCF se une al DMR inhibiendo la acción del enhancer (ENH) sobre el gen *Igf2*, el cual permanece inactivo. En el alelo paterno, el DMR se encuentra metilado por lo que CTCF no puede unirse. Esta metilación invade la región promotora del *H19* silenciándolo. En este caso, el enhancer tiene la capacidad de activar al *Igf2*.

Pero la protección de CTCF contra el silenciamiento epigenético no solo incluye la metilación del ADN, sino que también se encuentra participando en la creación de límites de silenciamiento en el cromosoma X inactivo, permitiendo que un bajo porcentaje de genes presentes en este cromosoma (entre un 10 y 20%) escape de la inactivación transcripcional¹⁵⁹. La unión de CTCF a zonas cercanas de estos genes crea un ambiente epigenético permisivo a la expresión, mediado por un incremento local en la acetilación de las histonas y la ausencia de marcas represoras como la H3k9me3 y la H3k27me3 entre otras, además de la ausencia de metilación del ADN¹⁶⁰.

Por otra parte, se sabe que la sobre-expresión de CTCF inhibe el crecimiento celular y estudios de micro-arreglos de expresión, han relacionado indirectamente a CTCF con la regulación de genes involucrados en el control

del ciclo celular como *p19^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *BRCA1*, *p27*, *p53*, *E-caderina*, *TERT*, entre otros y lo que llama la atención es que las regiones promotoras de estos genes se encuentran anormalmente metilados en diversos tipos de cáncer¹⁶¹. En el caso específico del promotor de *BRCA1* existe un sitio de unión para CTCF que funciona como una barrera para evitar la expansión de la metilación de ADN proveniente de las secuencias río arriba, lo que permite que la expresión de *BRCA1* sea normal¹⁶²⁻¹⁶⁴. La proteína CTCF también se ha encontrado alterada en algunos cánceres como tumores de Wilm's o cáncer de mama y en estos últimos la falta o inactivación de CTCF correlaciona con una mayor agresividad del tumor, aunque no se ha estudiado si aumenta la cantidad de metilación de ADN en estas muestras¹⁶⁵.

Basados en todos estos antecedentes, decidimos estudiar a CTCF como un posible candidato para proteger la isla CpG que contiene al promotor del gen *Rb1* contra la metilación de ADN aberrante.

2.2.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha, no se conoce cuales son los mecanismos epigenéticos que regulan al promotor del gen *Rb1*, se sabe que este promotor es sensible a la metilación del ADN y que dicha modificación epigenética se ha encontrado en diversos tipos de cáncer. Sin embargo, de manera normal, este promotor nunca se metila, por lo que sugerimos que debe existir algún mecanismo de protección contra la metilación aberrante.

Los datos de la literatura nos hacen pensar que la proteína CTCF pudiera estar llevando a cabo esta protección dado que se ha encontrado presente regulando epigenéticamente a genes improntados, además de encontrarse asociada a zonas libres de metilación del ADN.

2.2.3. OBJETIVOS

-Investigar si existen sitios de unión al factor CTCF en la región promotora del gen *Rb1*.

-Estudiar si CTCF está participando en la regulación epigenética del promotor del gen *Rb1* protegiéndolo contra la metilación aberrante.

2.2.4. RESULTADOS PARTICULARES

2.2.4.1. UNIÓN DEL FACTOR CTCF *IN VITRO* A UNA SECUENCIA CONSERVADA PRESENTE EN EL PROMOTOR DEL GEN Rb1 HUMANO

Para investigar la posible participación de CTCF en el control transcripcional del gen *Rb1* humano, se hizo un análisis de la secuencia nucleotídica a lo largo de 2 kb río arriba del sitio de inicio de transcripción del gen. Dado que la proteína CTCF no posee un sitio consenso de unión, ya que su interacción con el ADN está mediada por distintos números y combinatorias de sus 11 dedos de zinc¹⁶⁶, se utilizó como punto de referencia la secuencia del “insulator” presente en el locus β -globina de pollo denominado cHS4-FII (solo FII de aquí en adelante) en la cual se ha demostrado que CTCF tiene la capacidad de unirse^{157,167}. Como criterio principal de búsqueda, se tomó en cuenta el motivo 5'-CTAG-3' de la secuencia FII y se encontró un posible sitio de unión inmediatamente río arriba de los factores transcripcionales conocidos presentes en el promotor Rb (Fig. 17). Esta secuencia se comparó, además, con otras secuencias que previamente se habían caracterizado que unían a CTCF y aunque la identidad fue muy poca, se encontraron algunos puntos de concordancia lo que ejemplifica claramente la variedad de secuencias que es capaz de reconocer este factor (Fig. 17B).

Una vez identificada la secuencia, se procedió a demostrar si CTCF tenía la capacidad de unirse *in vitro* esta. Para ello, se sintetizó un par de oligonucleótidos complementarios con la secuencia de 53 pb (Rb-CTCF), que es el promedio de bases reconocidas por CTCF, para hacer experimentos de movilidad electroforética retardada (EMSA, por sus siglas en inglés).

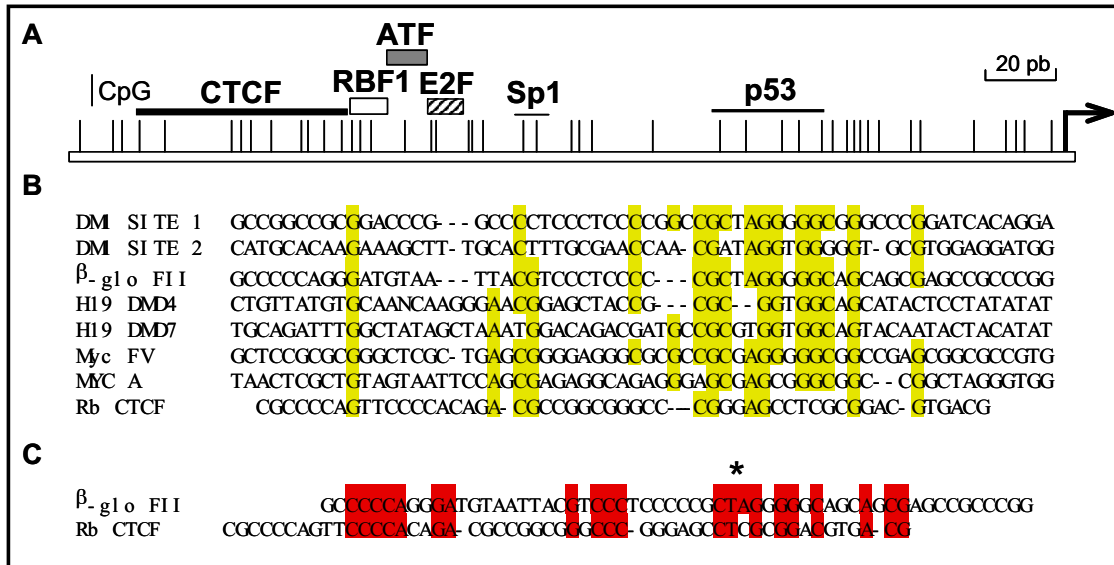


Figura 17: Interacción de CTCF en el promotor del gen *Rb1*. **A**, Esquema del promotor del gen *Rb1* donde se muestran los sitios de unión a los diferentes factores de transcripción, el sitio de unión de CTCF y la posición de los dinucleótidos CpGs. **B**, Comparación entre el sitio de unión de CTCF en el promotor del gen *Rb1* (Rb-CTCF) y otros sitios identificados. **C**, Comparación entre el sitio de unión Rb-CTCF y el sitio de unión de CTCF presente en el locus β -globina de pollo cHS4-FII.

En una primer aproximación, la sonda Rb-CTCF se incubó con extractos nucleares de células HeLa en cantidades crecientes y se observó la formación de un complejo que era dependiente de la cantidad de extracto (Fig. 18). Para ver si dicho complejo se formaba por la unión de CTCF a la sonda Rb-CTCF, se usó la sonda FII como competidor específico en la condición de mayor concentración de extractos y se observó que tenía la capacidad de competir específicamente al complejo formado con la sonda Rb-CTCF lo que sugería que CTCF era la proteína responsable de la formación del complejo en la sonda Rb-CTCF (Fig. 18 comparar carriles 8 y 9).

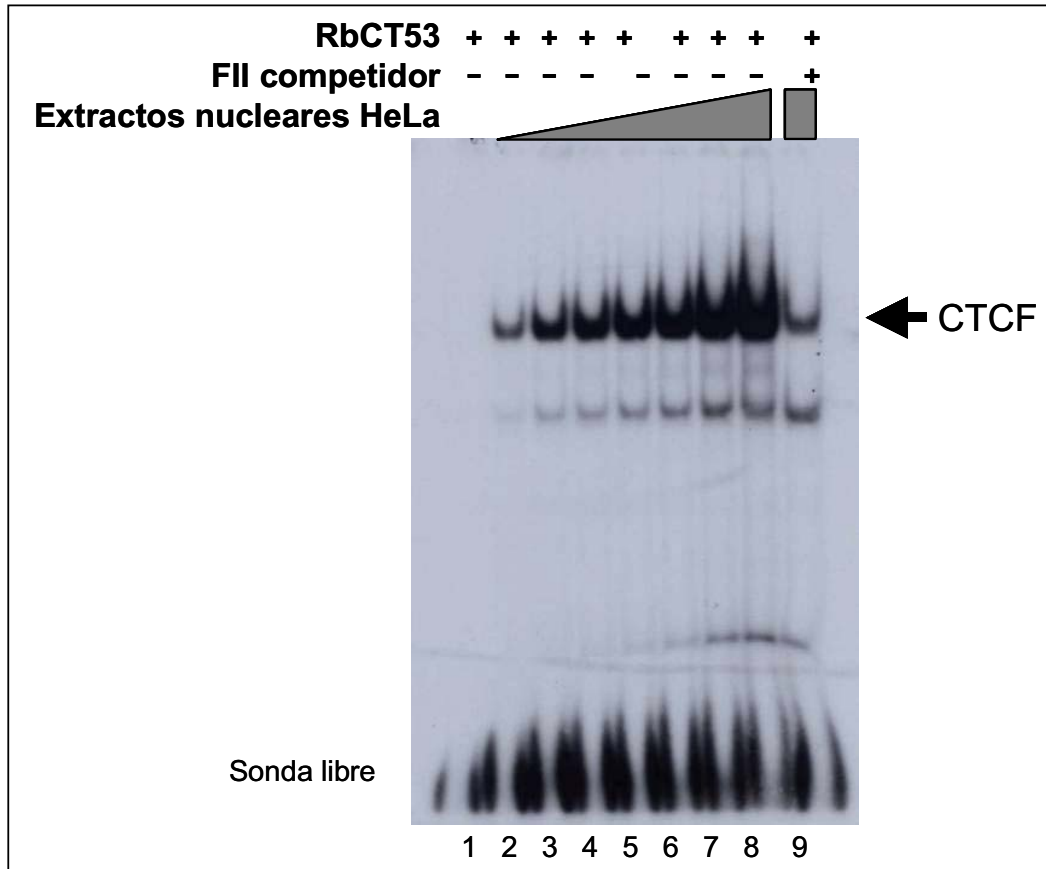


Figura 18: Unión *in vitro* de CTCF al sonda Rb-CTCF. Experimento de EMSA donde la sonda Rb-CTCF fue incubada con cantidades crecientes de extractos proteicos nucleares de células HeLa y se observó la formación de un complejo dependiente de la cantidad de extractos. Este complejo es competido específicamente y en la mas alta concentración de extractos por la sonda FII, que se sabe une a CTCF. * representa un complejo no específico.

Para demostrar que la formación del complejo se debía a la unión de CTCF a la sonda Rb-CTCF, se llevaron a cabo experimentos de competencias específicas y de súper-retardos. Como se esperaba, las secuencias Rb-CTCF y FII, sin marcar radiactivamente, fueron capaces de competir la formación del complejo, mientras que la sonda consenso para el factor Sp1 no tuvo la capacidad de hacerlo (Fig. 19). Para demostrar la presencia de la proteína CTCF en el complejo, se hizo un experimento de súper-retardo utilizando un anticuerpo policlonal elaborado en nuestro laboratorio (α -CTCF[86-233])¹⁵⁷ y un anticuerpo α -Sp1 como control. Se observó una clara reducción en la

intensidad de la banda cuando se utilizó en anticuerpo contra CTCF pero no en el de Sp1, lo que indica la asociación de CTCF al complejo formado (Fig. 19A comparar carriles 6 y 7). Para corroborar este resultado, se repitió el experimento utilizando dos anticuerpos comerciales contra CTCF (α -CTCF N-17 y α -CTCF BD). Se observó el mismo resultado, pero en este caso se formó una banda de súper-retardo con el anticuerpo α -CTCF N-17 (Fig. 19B flecha interna).

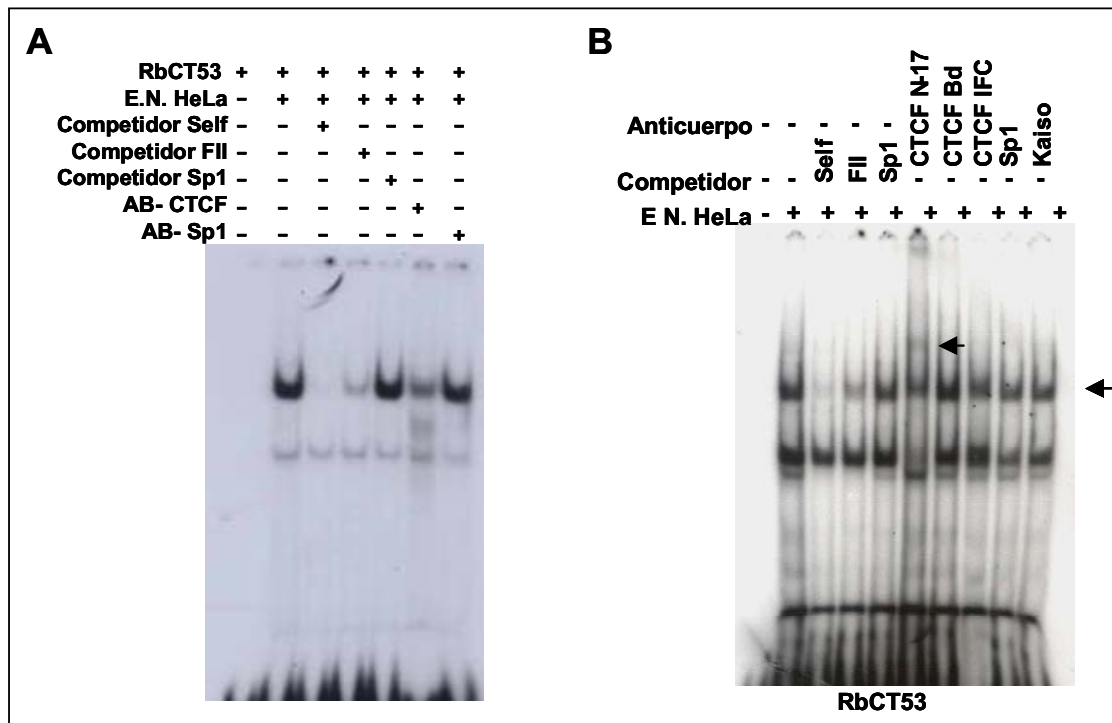


Figura 19: Unión *in vitro* de CTCF al sonda Rb-CTCF. **A**, Experimento de EMSA mostrando competencias específicas y súper-retardos utilizando un anticuerpo específico contra CTCF. **B**, Experimento de súper-retardo utilizando un juego complementario de anticuerpos contra CTCF la flecha interna indica la banda de súper-retardo formada por el anticuerpo contra CTCF.

Para complementar los estudios *in vitro*, se hizo un experimento de “footprinting” con DNasa I y se encontró una ventana de protección que abarca los 53 pb que habíamos definido en el análisis de secuencia y confirmado por interacciones *in vitro* de proteína-ADN (Fig. 20). Este resultado fue corroborado por datos de la literatura donde, con un “footprint” de mayor resolución, los autores reportaron 4 ventanas de protección dentro de los 53 pb que habíamos definido, lo cual interpretamos que son los puntos de contacto formados por una combinatoria específica de dedos de zinc de CTCF (Fig. 20). Cabe mencionar que en ese trabajo, los autores no reportaron la unión de ninguna proteína a esa zona¹⁶⁸.

En resumen, nuestros datos *in vitro* y los de la literatura, apoyan la idea de la interacción de CTCF con el promotor del gen *Rb1*.

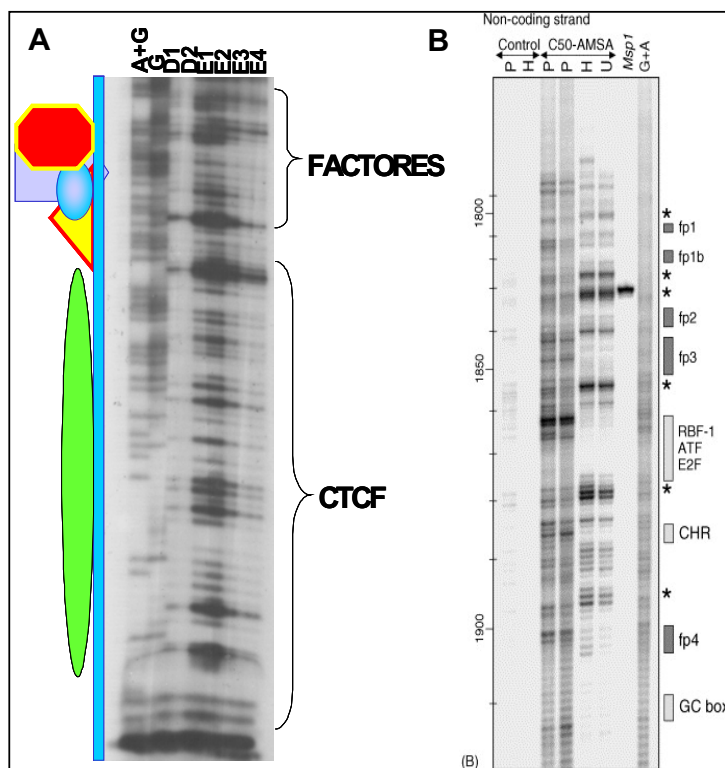


Figura 20: Unión *in vitro* de CTCF al promotor del gen *Rb1*. **A**, Experimento de protección a la DNasa I (footprint) donde se muestra la ventana de protección producida por la unión de los factores conocidos al promotor del gen *Rb1* y la producida por CTCF. **B**, Footprint de alta resolución del promotor del gen *RB1* publicada por Temple y Murray donde se muestran 4 ventanas de protección (Fp1, Fp1b-3) presentes en la región de la sonda Rb-CTCF.

2.2.4.2. LA UNIÓN DE CTCF SE DA *IN VIVO* EN EL PROMOTOR DEL GEN *Rb1*

Para investigar la unión de CTCF con el promotor del gen *Rb1* en células normales y transformadas, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando el anticuerpo α -CTCF N17 y se evaluó por PCR sobre la región promotora y el exón 27 del gen *Rb1* como control negativo.

Los resultados mostraron que CTCF se encuentra asociado *in vivo* al promotor del gen *Rb1* en células HeLa y en linfocitos humanos de sangre periférica quiescentes y ciclando (estimulados con fitohemaglutinina) y no se encuentra asociada a la secuencia genómica correspondiente al exón 27 utilizada como control negativo (Fig. 21). En conclusión, CTCF interactúa *in vitro* en una secuencia de 53 pb (Rb-CTCF) presente en el promotor del gen *Rb1* y su asociación también se da *in vivo* en el promotor endógeno de la línea celular HeLa y en linfocitos de sangre periférica.

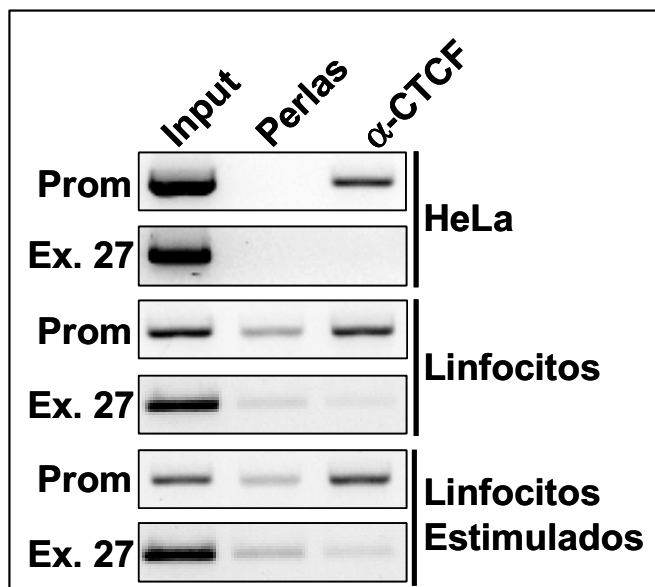


Figura 21: Unión *in vivo* de CTCF al promotor del gen *Rb1*. Experimento de inmunoprecipitación de cromatina en células HeLa, linfocitos humanos y linfocitos estimulados con fitohemaglutinina utilizando el anticuerpo anti-CTCF (N17). Se muestra la unión de CTCF en la región promotora del gen *Rb1* y como control negativo se muestra la ausencia de esta proteína en el exón 27 del mismo gen (posición 175819-176365 del numero L11910 de Genbank). Input, DNA genómico total, Perlas, control sin anticuerpo con las perlas utilizadas para la inmunoprecipitación.

2.2.4.3. CONTRIBUCIÓN FUNCIONAL DE CTCF EN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN *Rb1*

El estudio del efecto de CTCF sobre el promotor de *Rb1* se abordó en primera instancia a través de transfecciones transitorias utilizando el plásmido pGLRb (el cual contiene el promotor de *Rb1* dirigiendo la expresión del gen reportero de luciferasa) y experimentos de trans-activación sobre-expresando la proteína CTCF mediante la co-transfección con el plásmido pCI-7.1, el cual contiene el ADNc de CTCF (Donado por la Dra. Elena Klenova, Universidad de Essex, Reino Unido). Con estos experimentos, se observó un incremento de 2 veces en la expresión del gen reportero al sobre-expresar a CTCF (Fig. 22; Rb+CTCF). Posteriormente se probó el plásmido pGLRb Δ CTCF, en el cual se eliminó un fragmento de ADN de aproximadamente 200 pb río arriba del factor RBF-1, para omitir al sitio de unión de CTCF pero dejando intacta las secuencias de reconocimiento de los otros factores asociados al promotor. Demostramos que la carencia del sitio CTCF muestra una reducción modesta en la expresión del gen reportero (Fig. 22; Rb Δ CTCF). De manera sorpresiva, este plásmido es capaz de ser trans-activado al sobre-expresar el ADNc de CTCF, lo que sugeriría que quizá CTCF tiene la capacidad de interactuar con alguno de los otros factores asociados al promotor, lo que explicaría su capacidad de trans-activación (Fig. 22; Rb Δ CTCF+ CTCFcDNA).

Para ahondar en esta caracterización funcional, al plásmido pGLRb Δ CTCF, se le integró el fragmento Rb-CTCF usado en los experimentos de EMSA en una y dos copias (pGLRb Δ CTCF1X y pGLRb Δ CTCF2X) y ambos fueron transfectados solos y sobre-expresándoles el ADNc de CTCF encontrándose que los dos responden a la trans-activación de manera lineal

(Fig. 22). Como control se utilizó el plásmido pGLRb Δ CTCF-FII, el cual contiene la secuencia del “insulador” β -globina (FII) y este no tiene la capacidad de responder a la trans-activación de CTCF como con la secuencia Rb-CTCF, aunque los dos unen a la proteína (Fig. 22).

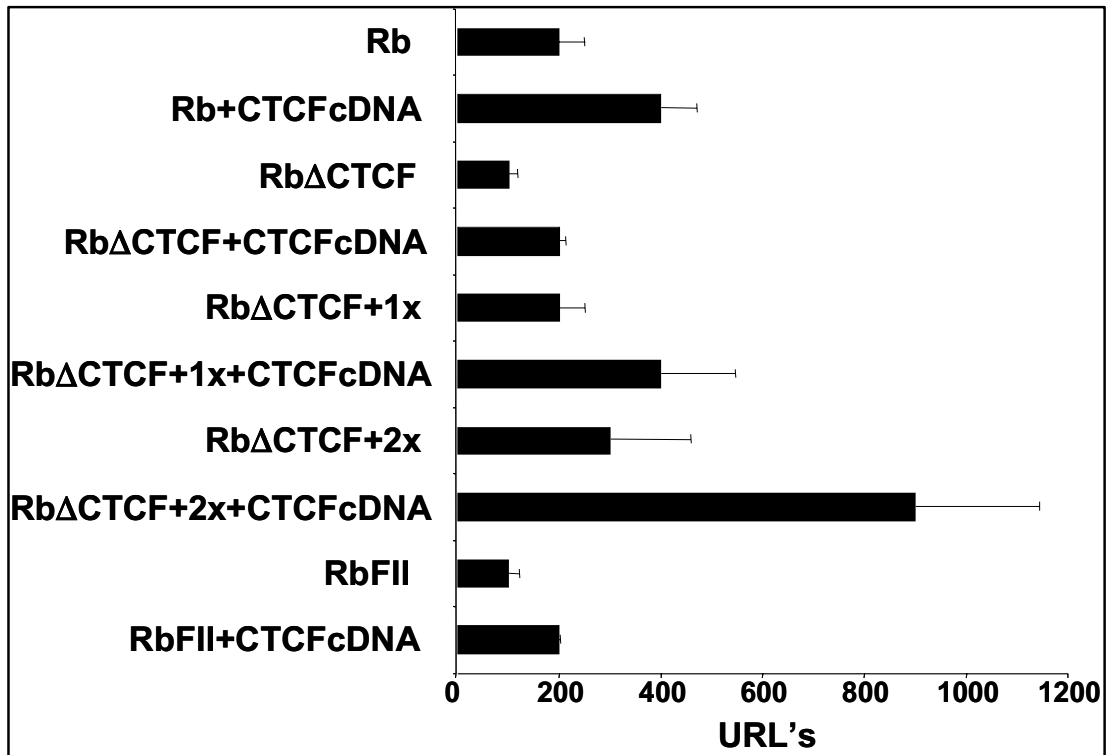


Figura 22: Contribución funcional de CTCF en la actividad del promotor *Rb1*. Transfección transitoria en células Hela de las diferentes construcciones del promotor de *Rb1* y trans-activación con CTCF en los puntos indicados con CTCFcDNA. Las barras indican la desviación estándar, n= 12.

Estos resultados sugieren que CTCF requiere de un contexto específico dentro del promotor del gen *Rb1* para llevar a cabo su función, posiblemente interactuando con otros co-factores, lo que determinaría el uso de las diferentes combinatorias de los dedos de zinc para unirse a la secuencia del promotor del gen *Rb1*.

Para demostrar la especificidad de tales interacciones, se diseñaron 7 mutaciones diferentes sobre la secuencia de 53 pb del promotor que une a

CTCF, basadas en nuestro experimento de “footprinting” y el reportado en la literatura¹⁶⁸. Estas mutaciones fueron probadas primero en experimentos de EMSA, donde se demostró que las mutaciones E y G no compiten por la unión de CTCF (Fig. 23).

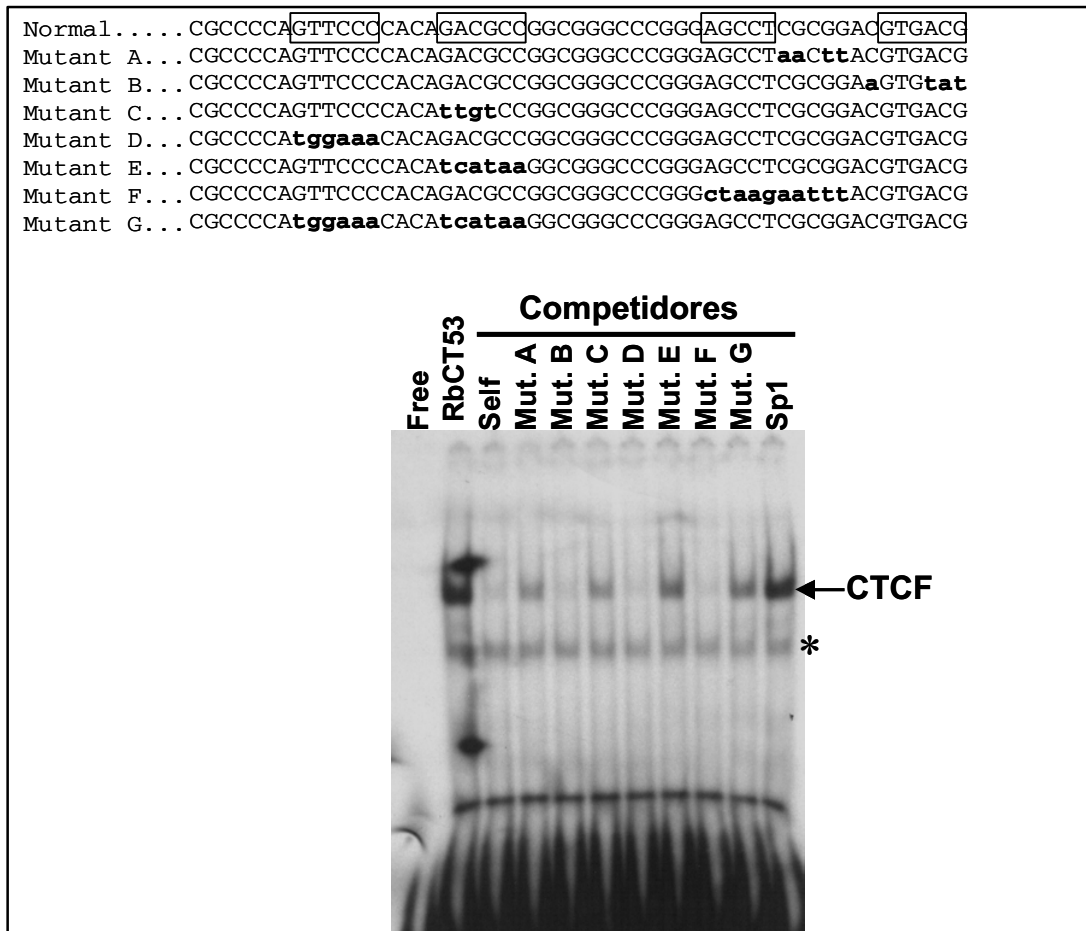


Figura 23: Unión *in vitro* de CTCF al promotor del gen *Rb1*. Experimento de EMSA para determinar las mutaciones en la sonda Rb-CTCF que inhiben la unión de CTCF. Las secuencias mutantes (mostradas con letras minúsculas) A-G se usaron como competidores y la mutación E se escogió para los siguientes experimentos funcionales.

Posteriormente, la mutación E fue incorporada en el contexto del promotor completo y se demostró que esta mutación causa una disminución de 2 veces en la expresión del reportero en transfecciones transitorias y la tasa de trans-activación con CTCF es menor que la del promotor normal (Fig. 24). Debido a que la trans-activación es baja, lo que sugiere un efecto no específico, se utilizó como control al promotor del gen *p53* y se demostró que este no tiene la capacidad de ser trans-activado por CTCF validando nuestros resultados (Fig. 24).

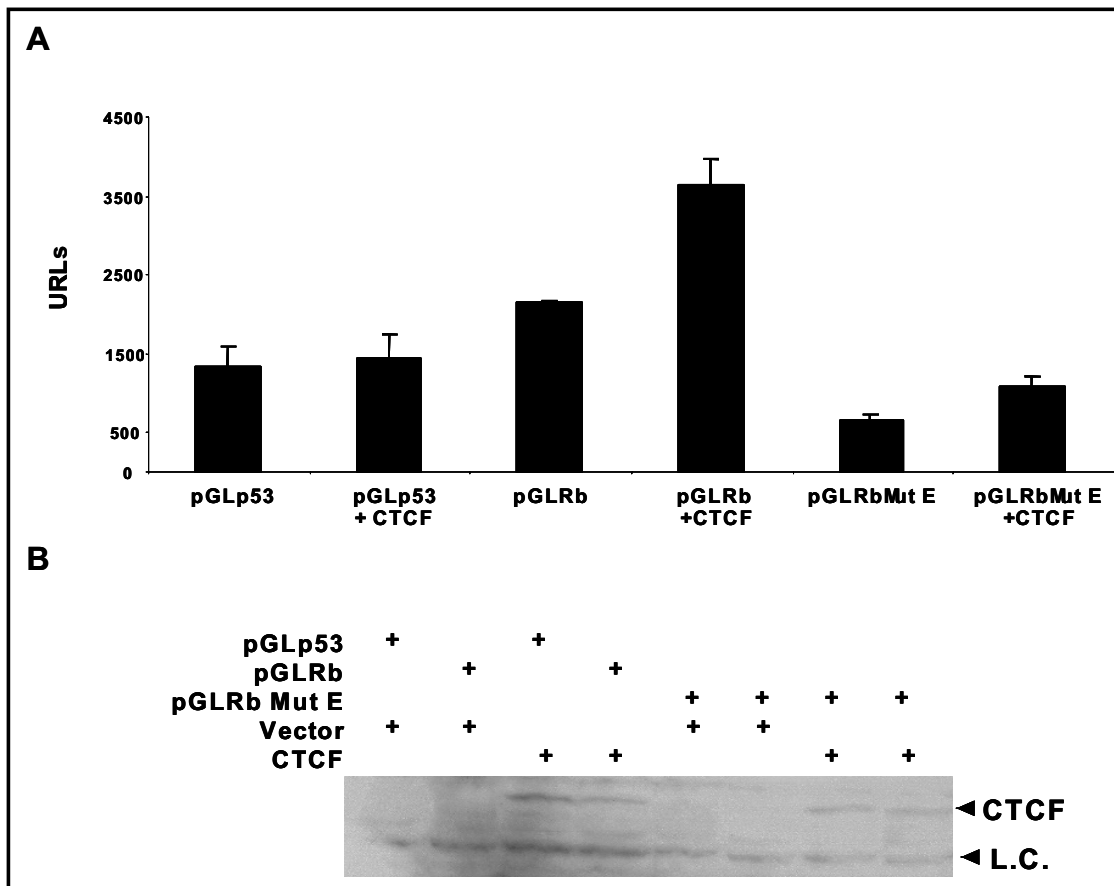


Figura 24: Efecto de la mutación E del sitio CTCF a la actividad del promotor del gen *Rb1*. **A**, transfección transitoria de los plásmidos reporteros con el promotor completo y con la mutación E mas la trans-activación con CTCF. Como control negativo se usó el promotor del gen *p53* que no es activado por CTCF. **B**, Western Blot para mostrar la sobre-expresión de CTCF en los puntos indicados.

Para complementar los resultados anteriores, se utilizó un ARN de interferencia (ARNi) contra CTCF para abolir la presencia de la proteína y otro contra GFP como control negativo. Una vez que las células presentaron una disminución en la cantidad de proteína CTCF, fueron transfectadas con el plásmido pGLRb y se vio que la falta de CTCF provoca una disminución en la expresión del reportero (Fig. 25).

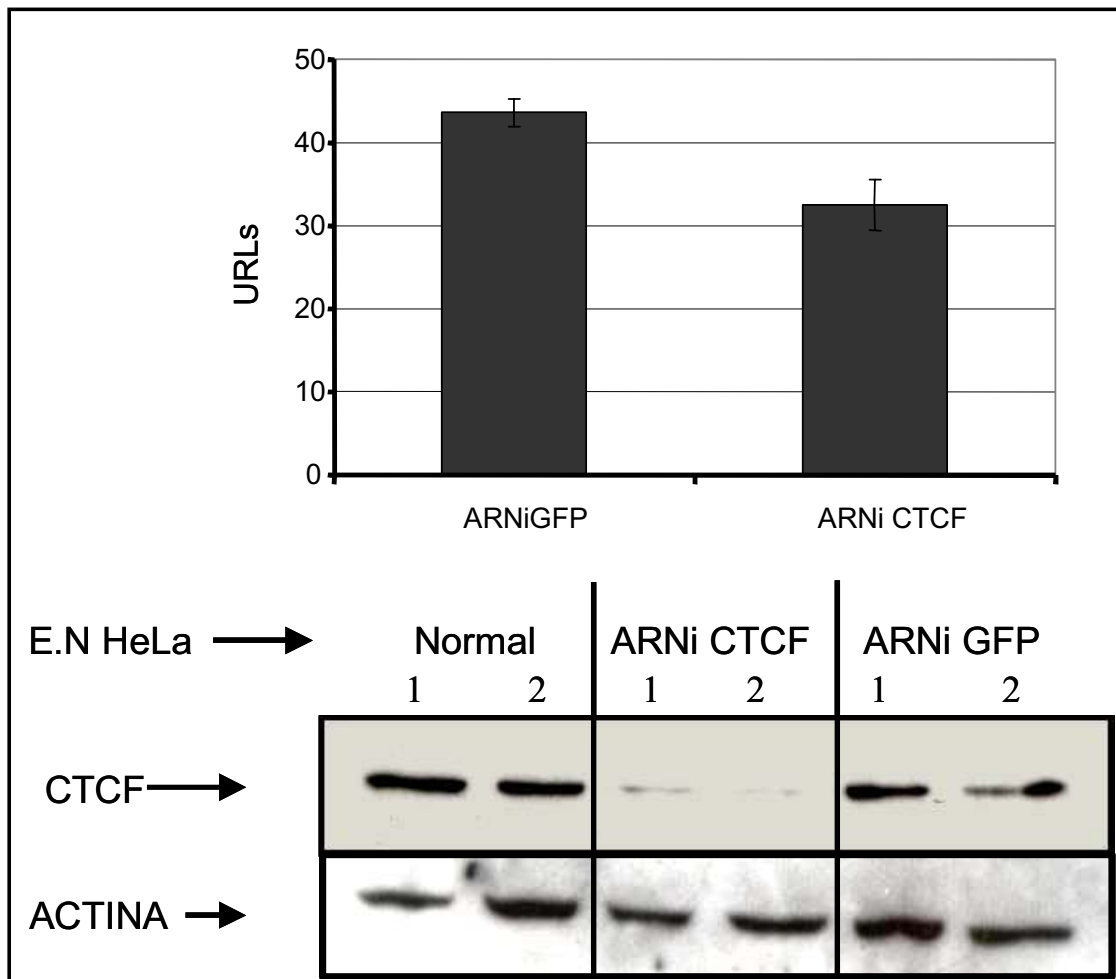


Figura 25: ARN de interferencia contra CTCF y su efecto en a la actividad del promotor del gen *Rb1*. La disminución de la proteína CTCF por ARNi causa un modesto decremento en la expresión del reportero con el promotor completo. En la parte inferior se muestra un western blot para corroborar el decaimiento en la cantidad de proteína CTCF.

En resumen, aunque los resultados de las transfecciones transitorias apoyan un papel regulador por parte de CTCF sobre el promotor del gen *Rb1* humano también parecen favorecer la idea de que CTCF no está jugando un papel de un activador transcripcional clásico dado que la eliminación o mutación de su secuencia de reconocimiento, o el ARNi afectan la expresión del reportero de manera modesta (de 1 a 2 veces la expresión). Debido a esto, nos interesó saber si CTCF estaba jugando otro papel en la regulación del promotor, básicamente a través de la modulación de la estructura de la cromatina¹⁶⁹, por lo que decidimos explorar si CTCF tenía alguna función epigenética en el promotor del gen *Rb1*.

2.2.4.4. EFECTO DE CTCF EN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN *Rb1* EN UN CONTEXTO CROMATÍNICO

Dado que CTCF se ha encontrado regulando epigenéticamente diversos loci, decidimos probar si estaba ejerciendo este efecto a través de transfecciones estables. Para ello, se generaron una serie de líneas celulares estables en células K562 (eritroleucemia humana) usando a la *GFP* como gen reportero y con el promotor en sus versiones: completa (Rb), carente de todo el sitio de unión a CTCF (Δ CTCF), y completo con la mutación E que inhibe la unión de CTCF (RbmutE) (Fig. 26). Como primer punto, quisimos saber si existía alguna diferencia en el nivel de expresión del gen reportero para las diferentes versiones del promotor. Para ello, se evaluó la media de expresión de cada transgén por citometría de flujo y se encontró que cuando la secuencia de CTCF es removida (Δ CTCF) o mutada (RbmutE), la media de expresión del transgén es menor y la fluorescencia de las células se extiende a lo largo de la

escala de intensidad logarítmica, comparado con los valores de las células con el promotor completo (Fig. 26).

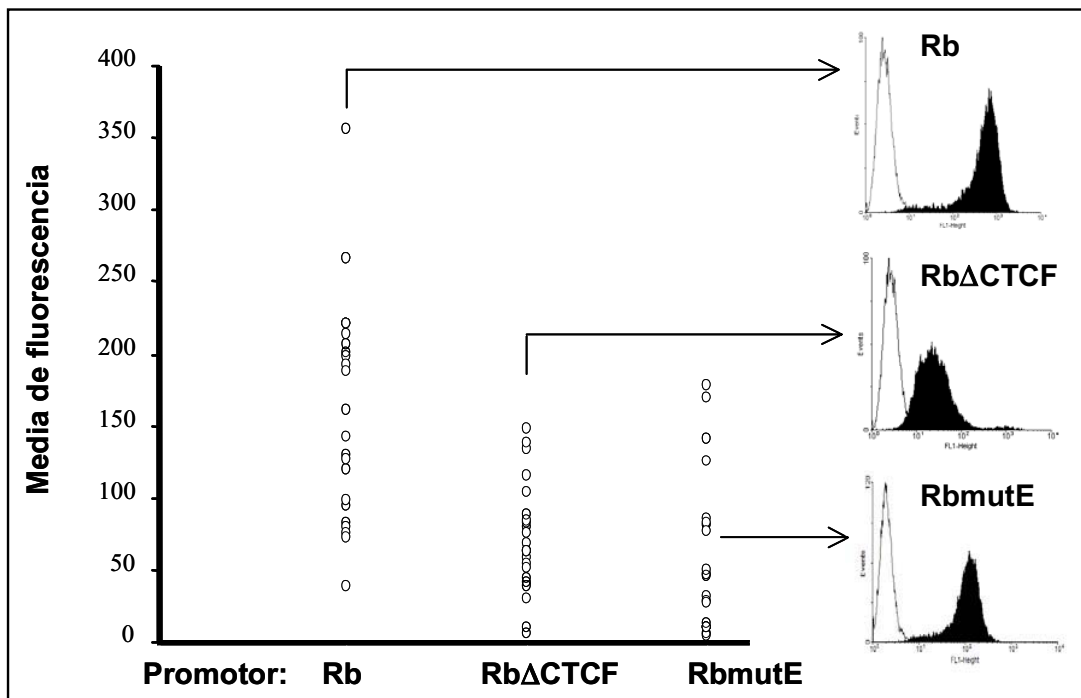


Figura 26: Contribución funcional de CTCF en la actividad del promotor *Rb1* en un contexto cromatínico. Gráfica de puntos que muestra la media de fluorescencia de 22 clones independientes conteniendo un transgén con el reportero de *GFP* y las diferentes modalidades del promotor *Rb1*. Se muestra un histograma de citometría de flujo representativo de cada condición. Nótese el decrecimiento y el perfil variegado de la intensidad en el punto *RbΔCTCF* y el decrecimiento de intensidad en el punto *RbmutE*.

Este resultado sugiere que CTCF está contribuyendo con la formación de un ambiente cromatínico local que contribuye a la regulación apropiada del promotor.

2.2.4.5. CTCF PROTEGE AL PROMOTOR DEL GEN *Rb1* DEL SILENCIAMIENTO EPIGENÉTICO

Para ahondar en la función de CTCF dentro del promotor del gen *Rb1*, las líneas estables con los promotores *Rb*, Δ CTCF, y *RbmutE* se mantuvieron en cultivo continuo en ausencia del antibiótico de selección y se vio que los transgenes que contenían al promotor del gen *Rb1* completo tuvieron la capacidad de mantener su expresión por más de 140 días en cultivo continuo

(Fig. 27). Por el contrario, los transgenes con los promotores Δ CTCF, y RbmutE, además de presentar la disminución en los niveles de expresión, sufren un silenciamiento muy rápido (15 días en promedio) (Fig. 27). Este silenciamiento es causado por factores epigenéticos ya que las clonas silenciadas, al tratarse con 5-AzadC recuperan parcialmente la expresión del transgén, sugiriendo que CTCF protege al promotor del gen *Rb1* contra un silenciamiento epigenético progresivo.

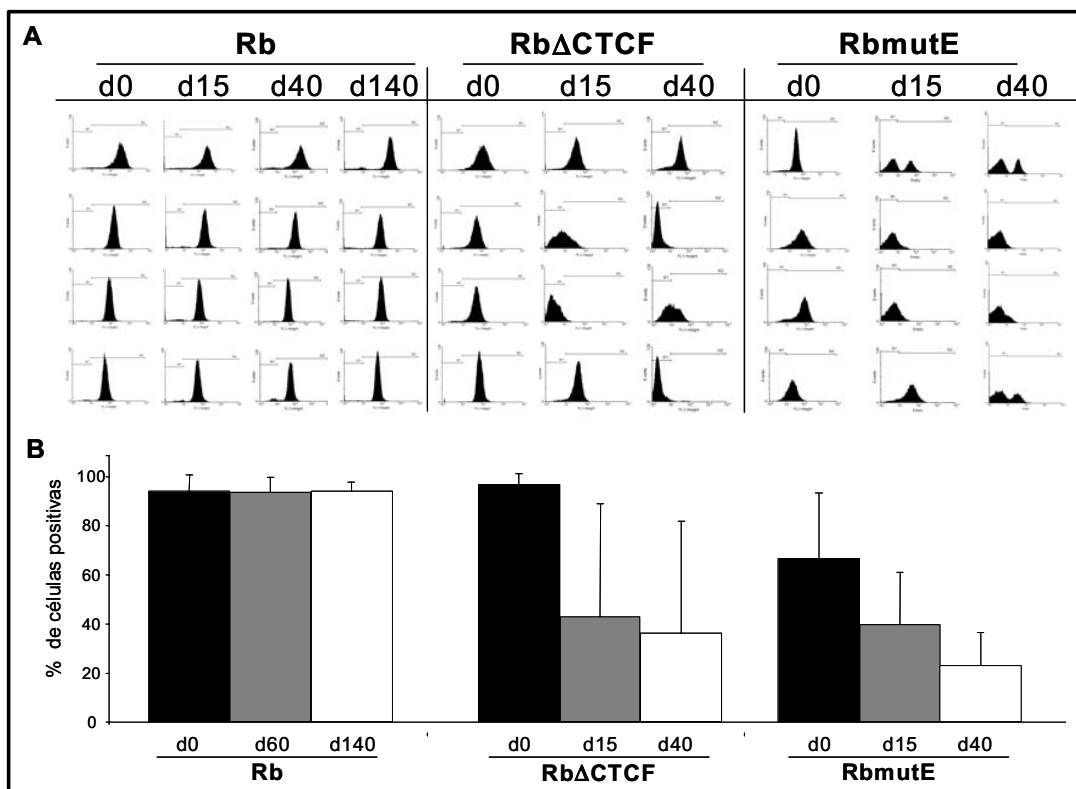


Figura 27: Silenciamiento rápido del transgén con el promotor del gen *Rb1* cuando el sitio CTCF está eliminado o mutado. **A**, Resultados del análisis por citometría de flujo de la expresión de *GFP* a los 140 días con el promotor completo o 40 días con los mutantes. Se muestran cuatro líneas representativas de un total de ocho. **B**, La gráfica resume el silenciamiento epigenético a través del tiempo. Nótese la diferencia de expresión entre el transgén con el promotor completo a los 140 días con los mutantes a los 15 días consistente con el fenotipo de variegación.

2.2.4.6. EL PROMOTOR DEL GEN *Rb1* SE ASOCIA A LA MATRIZ NUCLEAR

Dado que CTCF tiene la capacidad de regular epigenéticamente al gen *Rb1*, quisimos ver que mecanismos estarían participando en esta regulación. Estudios previos indican que CTCF tiene la capacidad de interactuar con la proteína Nucleofosmina^{170,171}. Esta proteína es constituyente de la matriz nuclear, lo que permite que CTCF reclute a las secuencias que regula a estas zonas. Además se sabe que en estas zonas existe mayor actividad transcripcional lo que permitiría que el gen *Rb1* mantuviera su estabilidad de expresión.

Para abordar este punto llevamos a cabo experimentos de asociación a la matriz nuclear en células HeLa (Fig. 28). Se encontró que tanto la región promotora del gen *Rb1*, como el exón 27, se encuentran asociados a esta estructura nuclear y proponemos que esta asociación le permite la estabilidad de expresión al gen *Rb1*.

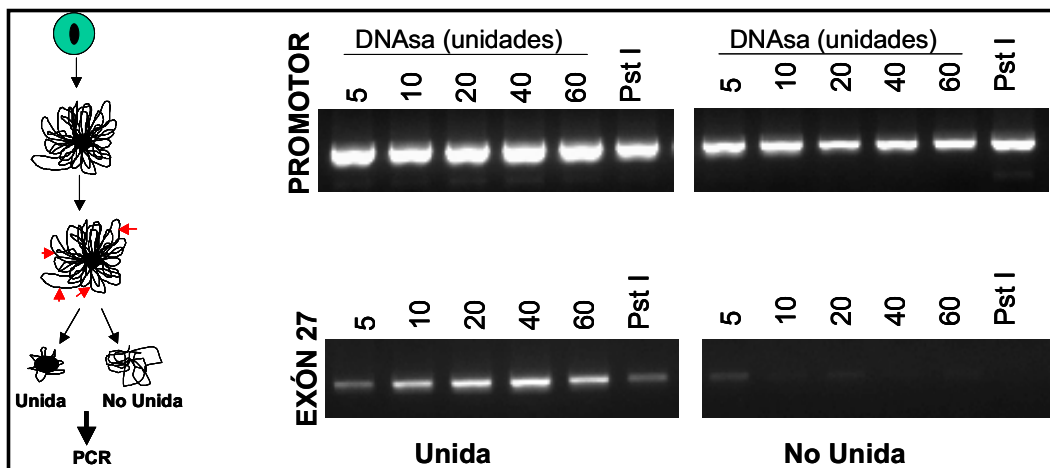


Figura 28: Interacción del promotor del gen *Rb1* con la matriz nuclear. **A**, Esquema del protocolo de asociación a matriz nuclear. Las células son tratadas con soluciones hipertónicas para extraer la matriz nuclear y el ADN asociado (representado por las asas de ADN), estas son digeridas con diferentes cantidades de Dnasa I (representado por las flechas) y posteriormente el ADN asociado a la matriz nuclear y el liberado por la digestión con Dnasa I es recuperado y purificado para los análisis por PCR. **B**, PCR de la región del promotor RB1 y el exón 27 que muestra mayor amplificación en el ADN perteneciente a la fracción unida a matriz nuclear que a la no unida.

2.2.4.7. GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR ESTABLE PARA EL ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO EPIGENÉTICO DEL PROMOTOR *Rb1*

Dado que la metilación anormal de los promotores de los genes supresores de tumores es un fenómeno frecuente en cáncer, decidimos investigar cual pudiera ser el papel de CTCF en la regulación del promotor *Rb* en condiciones de silenciamiento epigenético. Para abordar este objetivo, generamos líneas estables en células HeLa con un transgén conteniendo el promotor *Rb1* completo. Estas líneas se mantuvieron en cultivo continuo por más de 100 días hasta que se aisló una clona que presentó un patrón de expresión bifásico del gen reportero *GFP* (Fig. 29A). Nuestro grupo y otros han demostrado que la expresión de un transgén va disminuyendo cuando las células se mantienen en cultivo continuo en ausencia de antibióticos de selección, lo cual es atribuible a cambios epigenéticos en la estructura de la cromatina tales como desacetilación de histonas, metilación de histonas y metilación de ADN^{167,172,173}.

Una vez identificada la clona bifásica, las poblaciones positivas y negativas a GFP fueron separadas mediante dos rondas de “sorter” en el citómetro de flujo para tener poblaciones puras de células positivas y negativas (Fig. 29A). Para corroborar que la falta de expresión del transgén se debía a procesos epigenéticos y no a que el promotor hubiera sufrido alguna mutación o la eliminación de todo el transgén durante el proceso de cultivo indefinido, las células fueron tratadas con 5-AzadC y con TSA. Los resultados demostraron que el TSA por si solo es incapaz de reactivar a las células con el transgén silenciado. Por el contrario, el tratamiento con 5-AzadC resultó en una reactivación del 60% de células (Fig. 29B). El hecho de que la reactivación

fuera parcial refleja, posiblemente, la presencia de otras marcas represivas que no son influenciadas por el TSA o la 5-AzadC.

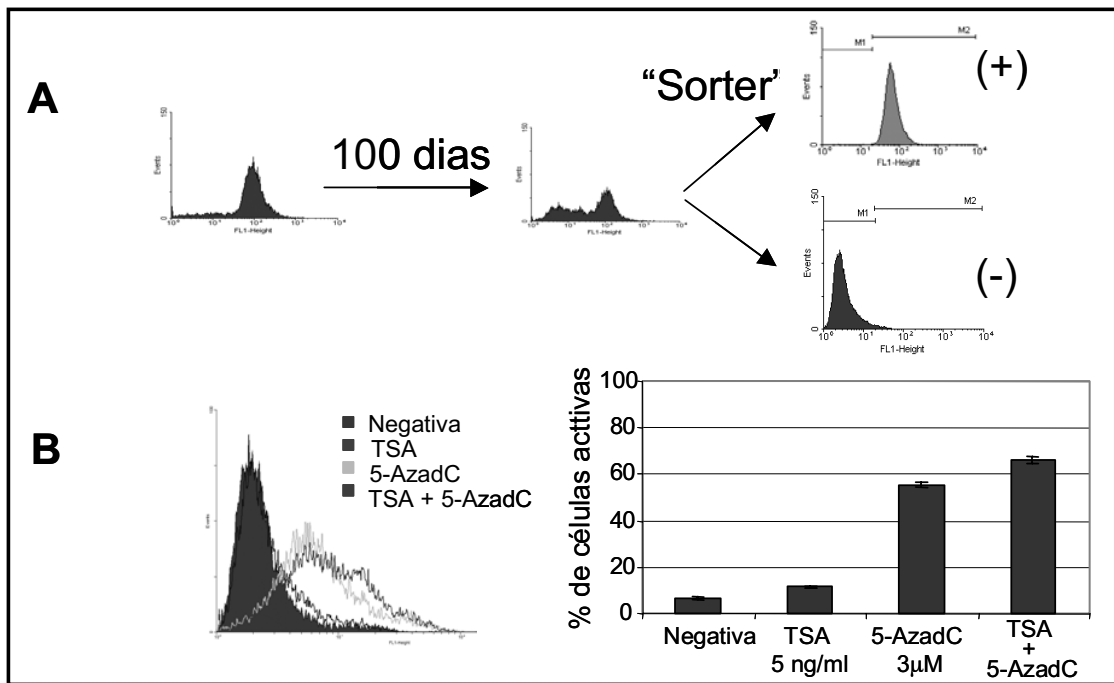


Figura 29: Sistema experimental para estudiar el silenciamiento epigenético del promotor del gen *Rb1*. **A**, Se generó una línea estable en células HeLa con el promotor del gen *Rb1* completo y el reportero de GFP y se mantuvo en cultivo por 100 días hasta alcanzar un patrón de expresión bifásico. Basado en esto, se dieron dos rondas de separación por sorter en el citómetro de flujo de las poblaciones con expresión positiva y negativa. **B**, La población negativa se trató con TSA y 5-AzadC para reactivar la expresión y comprobar la integridad del transgén.

Para confirmar la participación de la metilación del ADN en el silenciamiento del transgén, la región promotora de ambas poblaciones fueron secuenciadas con el método de bisulfito de sodio. Se encontró un aumento en la metilación del ADN en el promotor de la línea silenciada en comparación con la activa (Fig. 30A). De manera sorprendente, la metilación no fue tan extensa como se esperaba, reflejando que aunque el transgén se encuentra silenciado, las marcas epigenéticas aun no se establecen por completo y que quizá otras modificaciones epigenéticas están participando en el silenciamiento del transgén.

Para estudiar las modificaciones epigenéticas presentes en las histonas del promotor de estas clonas, se llevaron a cabo una serie de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina sobre las líneas estables, activas y silenciadas. Interesantemente, solo se encontraron diferencias drásticas en los niveles de acetilación de la histona H3 (acH3) y la di-metilación de la H3 lisina 4 (H3K4me2) y en menor grado, en la presencia de Sp1 que son marcas de activación (Fig. 30B). No se encontraron diferencias en otras marcas represivas como la mono-, di- o tri-metilación de la lisina 9 de la H3 (H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3) o la tri-metilación de la lisina 27 (H3K27me3). Los anticuerpos contra histonas metiladas fueron donados por el Dr. Thomas Jenuwein (Instituto de Investigación en Patología Molecular, Viena, Austria).

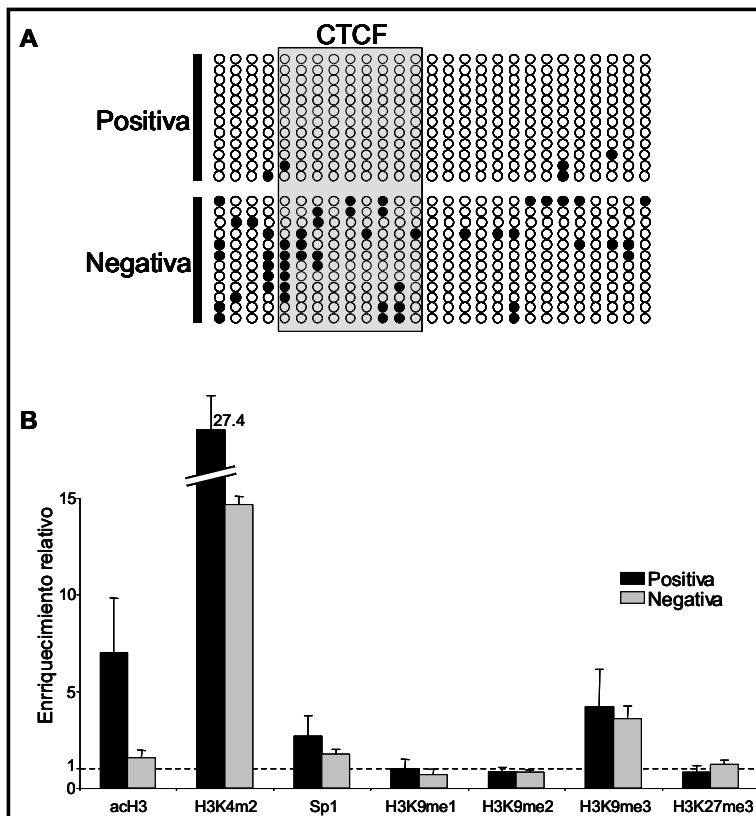


Figura 30: Caracterización de marcas epigenéticas presentes en el promotor del transgén silenciado. **A**, secuenciación genómica con bisulfito de sodio para identificar la metilación en los 27 sitios CpGs presentes en el promotor del gen Rb del transgén. Doce clonas independientes de las poblaciones positivas y negativas fueron secuenciadas. **B**, Perfil de modificaciones covalentes en las histonas en la región promotora del transgén identificadas por inmunoprecipitación de cromatina.

Estos resultados nos llevan a concluir que la hipo-acetilación de la H3, la pérdida de la H3K4me2 y la metilación del ADN son las marcas epigenéticas responsables del silenciamiento del transgén en la población negativa.

2.2.4.8. LA UNIÓN DE CTCF ES SENSIBLE A LA METILACIÓN Y ESTA MARCA ES RECONOCIDA POR KAISO

Con el objetivo de determinar si la unión de CTCF al promotor del gen *Rb1* es sensible a la metilación del ADN (ya que existen 9 dinucleótidos CpG en su secuencia de unión) la sonda Rb-CTCF fue metilada *in vitro* y se hicieron experimentos de retardo en gel utilizando extractos nucleares de células HeLa. Mediante el uso de una sonda parcialmente metilada, pudimos observar la formación de un complejo de menor movilidad electroforética que el complejo formado por la unión de CTCF (Fig. 31A). Este complejo fue competido específicamente por la sonda Rb-CTCF metilada *in vitro* y no marcada (Fig. 31A carril 3) en contraste, cuando se utiliza una sonda no-metilada como competidor, solo el complejo CTCF es competido y el complejo de menor movilidad permanece (Fig. 31A carril 4), lo que indica que mientras la unión de CTCF es sensible a la metilación, al estar presente esta modificación existe otra u otras proteínas capaces de unirse de manera dependiente de metilación.

Como se mencionó anteriormente, existe diversas proteínas que poseen dominios de unión a ADN metilado²³ que pudieran ser las responsables de la formación de dicho complejo, pero un análisis más detallado de la zona destacó la presencia de la secuencia 5'-CGCG-3', la cual al ser metilada (5'-C^mGC^mG-3') forma el sitio de unión para la proteína Kaiso¹⁷⁴. Kaiso es una proteína con la capacidad de unirse al ADN metilado y es la única que

reconoce a una secuencia específica (5'-C^mGC^mG-3'). De manera complementaria, Kaiso tiene la capacidad de reclutar al complejo represor N-CoR, al cual se asocian desacetilasas de histonas y metil-transferasas de histonas principalmente de H3K9me3, por lo que el silenciamiento se ve reforzado¹⁷⁴.

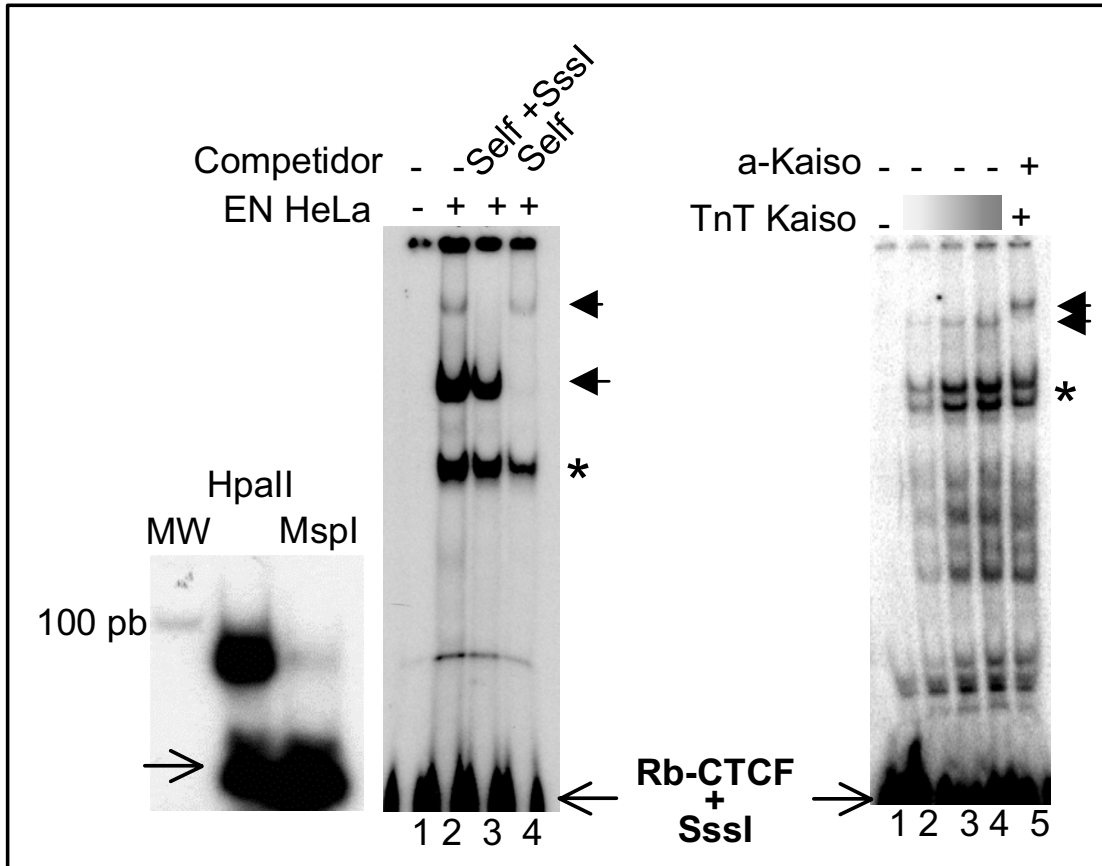


Figura 31: La unión de CTCF a la sonda Rb-CTCF es sensible a la metilación y esta marca es reconocida por Kaiso. **A**, La sonda Rb-CTCF se metiló parcialmente in vitro, corroborado por la digestión con Hpa II/Msp I (la flecha muestra la metilación parcial). La sonda parcialmente metilada se utilizó para EMSA y se encontró la formación simultánea de 2 complejos, el ya caracterizado formado por CTCF y un segundo complejo de menor movilidad electroforética que es competido solo con la sonda metilada. **B**, La unión de Kaiso se demostró por transcripción y traducción in vitro de esta proteína y el posterior experimento de EMSA. En el carril 5 se muestra un súper-retardo usando un anticuerpo contra Kaiso.

Con estos datos, decidimos explorar si Kaiso tenía la capacidad de unirse *in vitro* a esta secuencia. Utilizando un plásmido que contiene el ADNc de Kaiso, donado por el Dr. Jieming Wong (Baylor college of Medicine, Houston, TX) hicimos una transcripción y traducción *in vitro* de la proteína para usarla en un gel de retardo. Con esto, encontramos la formación de un complejo específico al incrementar la concentración de proteína y se corroboró la especificidad de la unión con un súper-retardo utilizando un anticuerpo α -Kaiso (Fig. 32).

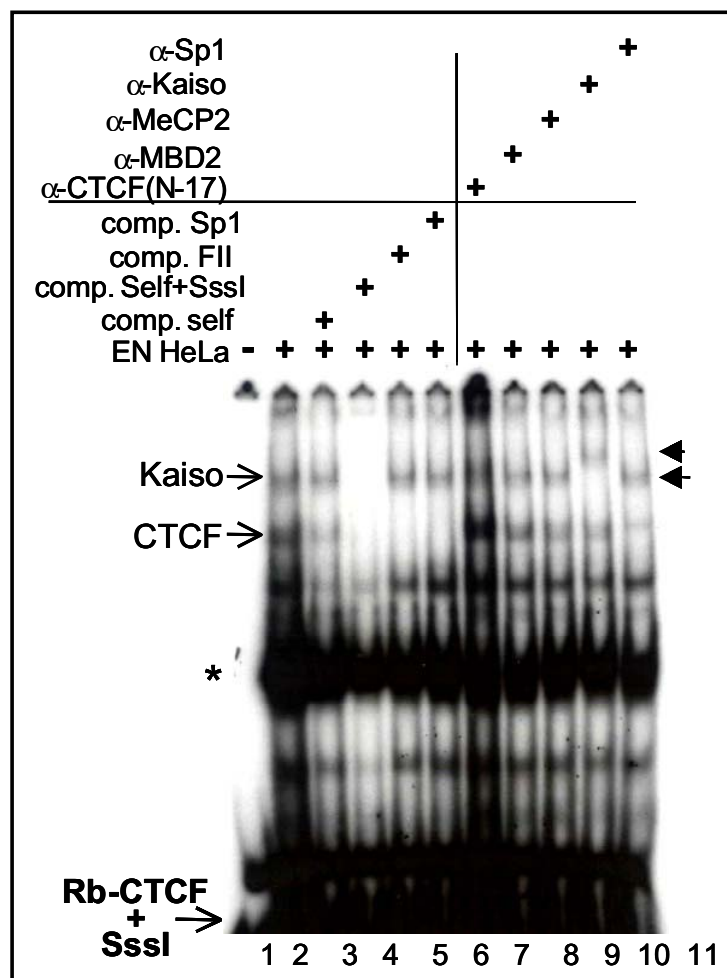


Figura 32: Kaiso es la única proteína de unión a ADN metilado que reconoce el sitio Rb-CTCF cuando está metilado. Experimento de EMSA con extractos nucleares de HeLa. Se muestran competencias específicas y súper-retardos contra diferentes proteínas de unión a ADN metilado. Solo se observa un súper-retardo con el anticuerpo contra Kaiso.

Para explorar la posibilidad de que otras proteínas de unión a ADN metilado pudieran unirse a la misma zona del gen *Rb1*, realizamos otros experimentos de súper-retardo utilizando anticuerpos α -MeCP2, α -MBD2 y α -Kaiso, con extractos nucleares de células HeLa, pero el único anticuerpo con el que se observó un súper-retardo claro fue el α -Kaiso (Fig. 32). Dado que habíamos sugerido que CTCF pudiera estar implicado en la protección del promotor Rb contra la metilación de ADN, decidimos explorar la presencia *in vivo* tanto de CTCF como de Kaiso en las líneas celulares estables activa y silenciada por CHIP. Como esperábamos, CTCF se encontró enriquecido en el promotor de las células activas pero ausente en las silenciadas (Fig. 33). En contraparte, Kaiso no estuvo presente en las células activas, pero si en las silenciadas (Fig. 33).

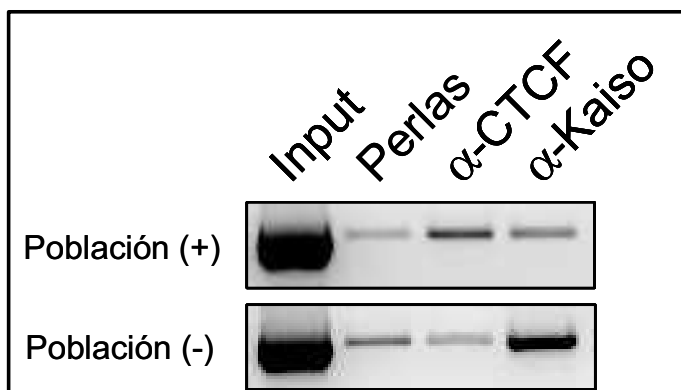


Figura 33: La unión de Kaiso se da en las poblaciones silenciadas. Inmunoprecipitación de cromatina contra CTCF y Kaiso. CTCF está presente solo en la población activa mientras que Kaiso solo en la silenciada.

En conclusión, hemos demostrado la existencia de un nuevo sitio regulador presente en el promotor del gen *Rb1* humano. Este sitio es capaz de ser reconocido por la proteína CTCF y protege al promotor de la metilación del ADN además de crearle un contexto cromatínico y epigenético permisivo para su propia regulación. Esta protección se pierde cuando esta zona se metila de manera aberrante, como sucede en los procesos neoplásicos, y ahora, la

misma zona es reconocida por la proteína Kaiso, la cual recluta co-represores silenciando epigenéticamente al gen *Rb1*.

Estos resultados abren nuevas expectativas para el estudio de los mecanismos de protección de los promotores contenidos en islas CpGs contra el silenciamiento epigenético.

2.2.5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Actualmente, se sabe que existen numerosas alteraciones epigenéticas incluyendo la hipermetilación de las regiones promotoras de genes supresores de tumores, capaces de silenciar genes y desencadenar el desarrollo de diversos cánceres en humanos. En la búsqueda de nuevos reguladores epigenéticos del gen *Rb1* humano, decidimos estudiar los posibles mecanismos responsables de mantener la región promotora de este gen en un estado hipometilado.

Descubrimos que la proteína CTCF está involucrada en la regulación del promotor del gen *Rb1* y proponemos que CTCF está participando en el mantenimiento de este promotor en un estado libre de metilación de ADN. Los experimentos funcionales demostraron que CTCF influye de manera positiva al promotor cuando éste está controlando al gen reportero de la luciferasa. Diferentes experimentos *in vitro* e *in vivo* determinaron que CTCF tiene la capacidad de reconocer y unirse a una secuencia de 53 pb, presente en la región 5' del promotor inmediatamente río arriba de los sitios de unión a los factores de transcripción que previamente se habían reportado para este promotor (Fig. 17). Al remover o hacer mutaciones puntuales en el sitio de unión a CTCF, se encontró que los genes reporteros presentaron un patrón de

expresión variegado en transfecciones estables, además de estar sujetos a un rápido silenciamiento epigenético.

Asimismo, se demostró que la unión de CTCF en el contexto del promotor del gen *Rb1*, es sensible a la metilación del ADN dado que esta proteína se encontró interactuando con el promotor en las líneas celulares con el transgén activo, pero no cuando este se había silenciado por metilación de ADN. En lugar de CTCF, la proteína Kaiso es la que reconoce la misma secuencia pero en su estado metilado y su unión, junto con su capacidad de reclutar al complejo represor N-CoR¹⁷⁴, contribuye al silenciamiento epigenético del gen *Rb1*.

La contribución de CTCF a la regulación epigenética del promotor del gen *Rb1* parece estar más ligada a proveerle a éste un ambiente cromatínico permisible para la expresión y protegerlo contra la metilación del ADN, más que estar participando como un factor transcripcional clásico, ya que la mutación del sitio de unión, la depleción de la proteína por ARNi o la sobre-expresión de CTCF, no afectan drásticamente la expresión de los genes reporteros pero si afectan la estabilidad de su expresión a lo largo del tiempo.

En la actualidad existe una gran cantidad de reportes concernientes al rol de CTCF en la regulación de genes improntados, en particular, en la habilidad de CTCF para mantener uno de los alelos libre de metilación y también en la regulación de los genes que escapan al silenciamiento del cromosoma X, donde CTCF mantiene zonas de cromatina abierta, permitiendo la expresión de estos^{18,160,169,175,176}.

Pero CTCF también puede estar participando en la protección contra la metilación de zonas no improntadas, ya que se ha encontrado unido en más de

200 sitios del genoma que no corresponde a genes improntados y que están libres de metilación de ADN¹⁷⁷. Las evidencias más recientes que implican a CTCF con una función protectora contra el silenciamiento epigenético están presentes en el gen *DM1*, el cual está relacionado al desarrollo de distrofia miotónica inducida por una amplificación de repetidas CTG en la zona promotora y el posterior silenciamiento epigenético. En este gen, la unión de CTCF se encuentra restringiendo la producción de un transcrito intergénico bidireccional, la incorporación de marcas represoras en las histonas, entre ellas la H3K9me3, además de proteínas accesorias al silenciamiento como la HP1 y evitando la metilación de ADN en la zona, manteniendo la estabilidad de la región intergénica y las cantidades normales de las repetidas CTG¹⁷⁸.

Los resultados presentados en esta tesis, tienen una relevancia particular ya que estructuran un modelo en el que CTCF tiene la capacidad de proteger a un loci dado contra el silenciamiento epigenético progresivo y proponemos que es un mecanismo para mantener una isla CpG libre de metilación. Este modelo es consistente con el modelos del “fenotipo metilador de islas CpG” propuesto por Jean Pierre Issa, donde plantea la existencia de centros de expansión de la metilación del ADN en todo el genoma, a partir de los cuales se extiende esta marca invadiendo a las islas CpG, por lo que debería existir un mecanismo de protección contra tal invasión¹⁷⁹. La función de CTCF en el promotor del gen *Rb1* sería la de protección contra este tipo de invasión de la metilación¹⁶⁹ (Fig. 34).

Otro aspecto interesante de nuestra investigación, es la demostración de que la proteína de unión a ADN metilado, Kaiso, tiene la capacidad de interactuar en la misma zona de unión de CTCF en el promotor del gen *Rb1*

cuando la secuencia se encuentra metilada (Fig. 34). Este descubrimiento es relevante en términos del mecanismo de silenciamiento epigenético, dado que estudios previos reportaron que Kaiso tiene la capacidad de interactuar con el complejo represor N-CoR¹⁷⁴, el cual contiene proteínas con actividad de desacetilasas de histonas y metiltransferasas de histonas, las cuales participan en la creación de zonas de cromatina represiva a la transcripción.

Nuestros resultados se ven complementados con los estudios en el *gen asociado a metástasis 2 (MTA2)*, en el cual la unión del complejo Kaiso/N-CoR a su región promotora induce la presencia de H3K9me3 y metilación del ADN, desencadenando el silenciamiento de este gen¹⁷⁴. Basado en esto, proponemos que Kaiso y sus complejos represores asociados pueden contribuir con el silenciamiento epigenético del gen *Rb1* en los diferentes tumores donde el promotor de este gen se ha encontrado hipermetilado. Como se mencionó previamente, CTCF también se ha encontrado participando en la actividad de “insulator”, por lo que no descartamos que otra función dentro del promotor del gen *Rb1* sea la de regular la acción de secuencias reguladoras a larga distancia sobre la región central del promotor de *Rb1*, ya que existen estudios que sugieren la existencia de estos posibles enhancers, aunque no se han descrito hasta el momento⁷⁹.

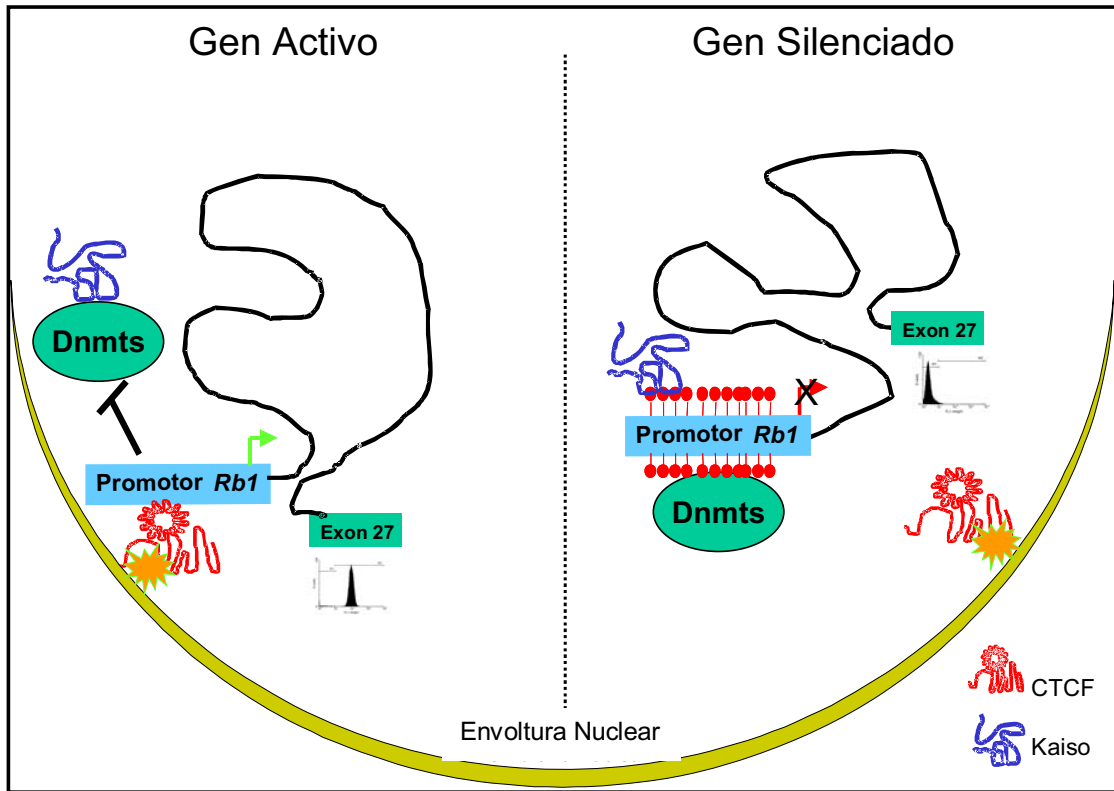


Figura 34: Modelo de regulación epigenética del gen RB1 mediada por CTCF. Cuando el gen se encuentra activo, CTCF lo recluta cerca de la matriz nuclear e inhibe la metilación del promotor, lo que le garantiza una expresión estable. Por el contrario, en los padecimientos neoplásicos, la metilación aberrante del promotor inhibe la unión de CTCF, lo que lo separa de la matriz nuclear y es reconocido por Kaiso, lo que induce el silenciamiento epigenético del gen.

Con todo esto, este trabajo muestra uno de los primeros modelos de cómo una isla CpG puede ser protegida contra el silenciamiento epigenético y proponemos que CTCF pueda jugar un papel relevante en mantener a este y quizás otros promotores contenidos en islas CpGs en estados libres de metilación.

3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

En el presente estudio se demostró funcionalmente que la metilación del ADN en la región promotora del gen *Rb1* tiene la capacidad de inactivarlo, dándole gran soporte a la hipótesis sugerida ampliamente por los estudios clínicos, donde la metilación de los promotores de diferentes genes correlaciona con la falta de la proteína correspondiente permitiendo el desarrollo neoplásico⁴³.

Sin embargo, lo que llama la atención es que de manera normal estos genes no se encuentran metilados, lo que sugirió la existencia de algún mecanismo que protegiera a estos promotores de la metilación aberrante y que dicho mecanismo de protección se viera alterado en el cáncer¹⁷⁹.

Para el promotor del gen *Rb1*, que es de los que normalmente se encuentra en un estado no metilado, encontramos que la proteína CTCF es la encargada de proveerle dicha protección. La unión de CTCF al promotor de *Rb1* le permite expresarse de manera estable y la protege contra la invasión de marcas epigenéticas represoras, sugiriendo que su presencia contribuye al mecanismo que le permite a este gen expresarse constitutivamente en todos los tejidos.

De manera complementaria, diversos estudios han descrito que los cromosomas al interior de un núcleo en interfase se encuentran organizados en regiones definidas del núcleo, denominándolos territorios cromosomales y que estos territorios tienen la capacidad de regular la actividad transcripcional de los genes contenidos en el cromosoma¹⁸⁰. Esta regulación está mediada por la posición de los genes en el contexto del territorio cromosomal. Los genes que se están transcribiendo, generalmente se encuentran en la periferia del territorio donde la cromatina es más laxa y cerca de las “fábricas de

transcripción”, que son zonas del núcleo donde se acumulan los factores necesarios para dicha función entre ellos la ARN polimerasa II (ARNpol II)^{180,181}. Por otro lado, los genes que no se van a transcribir se encuentran hacia el centro del territorio cromosomal, donde la cromatina es más compacta y los factores transcripcionales no son tan accesibles^{180,181}.

Para el caso del gen *Rb1*, estudios previos indican que este gen se encuentra cerca de la envoltura nuclear y en la periferia del territorio del cromosoma 13¹⁸², incluso, se ha llegado a plantear que se forma una asa de cromatina que sale del territorio cromosomal situándose en el espacio intercromosomal que es donde hay mayor tasa de transcripción¹⁸² y dado que nuestros resultados muestran que el promotor está asociado a la matriz nuclear, planteamos que CTCF, mediante la unión al promotor, es el responsable de relocalizar al gen *Rb1* del centro del territorio del cromosoma 13 y dirigirlo a la periferia del territorio mediante la interacción de CTCF con nucleofosmina, que es componente de la matriz nuclear^{170,171}. Asimismo, CTCF tiene la capacidad de interactuar con la ARNpol II¹⁸³, lo que sugiere que CTCF tendría la capacidad de relocalizar al gen a zonas de transcripción activa en la periferia del territorio cromosomal, lo que le permitiría su expresión constante y ubicua en todos los tejidos. Estos datos se ven apoyados por reportes de casos clínicos de pacientes que sufren translocaciones entre el cromosoma 13 y el cromosoma X. Se han reportado casos donde en la t(X;13) se mantiene intacto al locus del gen *Rb1*, pero estos pacientes desarrollan retinoblastoma¹⁸⁴. Estudios moleculares detallados encontraron que el cromosoma derivativo 13 t(X;13) es inactivado por la célula al identificarlo como un cromosoma X extra y la inactivación de la sección correspondiente al cromosoma X se extiende

sobre la sección del cromosoma 13 inactivando al gen *Rb1* por metilación de ADN. A nivel de territorios cromosomales se observó que el gen *Rb1* se encuentra en el centro del territorio del cromosoma derivativo, lo que induce su inactivación epigenética mediada por metilación de ADN y modificaciones post-traduccionales en las histonas^{184,185}.

En resumen, este trabajo demuestra funcionalmente el efecto de la metilación en el silenciamiento del promotor del gen *Rb1* y aporta un nuevo regulador epigenético del promotor del gen *Rb1*.

La potencial reversibilidad de los patrones aberrantes de metilación de ADN en conjunto con la restauración de patrones de acetilación de histonas, sugieren que son un blanco viable para el tratamiento del cáncer. Un objetivo específico de la terapia epigenética sería restaurar los patrones normales de metilación del ADN y prevenir que las células adquieran más metilación del ADN que pudiera dar como resultado el silenciamiento de genes cruciales para el funcionamiento normal de la célula¹⁸⁶. Actualmente, existen diferentes tipos de compuestos diseñados para inhibir la metilación del ADN y a las desacetilasas de histonas, los cuales se encuentran siendo probados desde fases pre-clínicas como la Zebularina (inhibidor de metilación del ADN) y el TSA (inhibidor de las desacetilasas de histonas), a fases clínicas I, II y III como es el caso de la 5-Azacitidina y el butirato. Incluso, ya se han reportado estudios donde se utilizan este tipo de compuestos (hidralazina y valproato de magnesio, que inhiben metilación de ADN y HDACs respectivamente) en conjunto con agentes de quimioterapia clásica (ciclofosfamida y doxorubicina) para el tratamiento de cáncer de mama con resultados prometedores¹⁸⁷.

Para finalizar, consideramos que estudios como el presentado en esta tesis doctoral, donde se empieza a conocer los mecanismos de silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores, permitirá a mediano y largo plazo diseñar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la epigenética altamente específicas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

La región promotora del gen *Rb1* humano (posición genómica de 1634 a 2020, número de acceso en GeneBank L11910) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico extraído de linfocitos de sangre periférica de un donador sano (Ver protocolo de extracción de ADN en anexo 1) utilizando los oligonucleótidos Fp-Rupp. Para la construcción del plásmido pGLRb, que contiene el promotor completo frente al gen reportero de Luciferasa (*Luc*), el fragmento del promotor se ligó en el vector pGL3 (Promega). El plásmido pGLRb Δ CTCF se construyó amplificando el promotor del gen *Rb1* con los oligonucleótidos FTRb-Rupp cuyo fragmento carece del sitio CTCF presente en la región promotora. Para los plásmidos pGLRb Δ CTCF+1X, pGLRb Δ CTCF+2X y pGLRb Δ CTCF+FII, los fragmentos RbCTCF y FII utilizados en los experimentos de EMSA fueron clonados río arriba del promotor carente del sitio CTCF, pGLRb Δ CTCF. Los fragmentos del promotor completo y el carente del sitio CTCF (Rb y Rb Δ CTCF respectivamente) también fueron clonados en el plásmido pEGFP1 (Clontech) para tenerlos con el gen reportero de *GFP* (green fluorescent protein) y seguir la actividad del reportero por citometría de flujo. Para la construcción de los plásmidos con el promotor conteniendo la mutación E frente a los reporteros *Luc* y *GFP*, la mutación en el contexto del promotor completo se realizó mediante PCR de 2 pasos utilizando los oligonucleótidos diseñados para el EMSA. El plásmido pGLp53 fue donado por el Biol. Ernesto Soto-Reyes (IFC-UNAM, México) y contiene la región pormotora del gen supresor de tumores p53 clonado frente al reportero *Luc*. Todos los plásmidos fueron secuenciados

para corroborar la integridad de los fragmentos clonados. Las secuencias de todos los oligonucleótidos se encuentran en el anexo 2.

4.2. CULTIVO CELULAR

Las diferentes líneas celulares utilizadas en el presente estudio fueron cultivadas con las condiciones que se presentan en la siguiente tabla, todas a 37°C , 5% de CO₂ y el medio conteniendo 10% de Suero Fetal Bovino y 1% de penicilina/ estreptomycin. Los medios de cultivo, antibióticos y suero son de Gibco.

Línea celular	Origen	Medio de cultivo
Linfocitos humanos	Aislados de sangre	RPMI 1640
Kb	Carcinoma epidermal de boca	DMEM-F12
U-2OS	Osteosarcoma	Mac Coy's
SW-480	Adenocarcinoma colorectal	DMEM
HT 1080	Fibrosarcoma	DMEM
HeLa	Adenocarcinoma de cervix	DMEM
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama	DMEM-F12
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	DMEM-F12
U373MG	astrocitoma	DMEM-F12
CaLu	Cáncer de pulmón	DMEM
PC3	Cáncer de próstata	DMEM
K562	Eritroleucemia	IMEM
Jurkat	Leucemia linfoblástica	DMEM

Los linfocitos humanos fueron aislados de sangre periférica de un donador sano utilizando el método de centrifugación diferencia con Ficoll-paque plus (Amersham). Para inducir los linfocitos a proliferación, estos fueron tratados con fitohemaglutinina durante 3 días.

4.3. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN

El análisis de metilación mediante conversión del ADN por bisulfito de sodio y posterior secuenciación y/o MS-PCR se llevó a cabo utilizando el método presente en el anexo 1. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el promotor de las líneas estables (EGFPbis 1-4) se diseñaron sobre secuencias de los plásmidos para evitar la amplificación de los promotores endógenos. Para el promotor endógeno se utilizaron los oligonucleótidos A1- A4. en todos los casos se hicieron PCRs anidadas utilizando para el primer ciclo de amplificación el juego de oligonucleótidos 1 y 2 mientras que para el segundo ciclo los oligonucleótidos 3 y 4. Para el análisis de MS-PCR primero se amplificaron las secuencias endógenas con los oligonucleótidos A1- A4, se purificó la banda y sobre ese templado se utilizaron los oligonucleótidos específicos para MS-PCR. Para los análisis de secuenciación, los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM11zf (promega) y secuenciados utilizando el oligonucleótido T7.

4.4. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS Y ESTABLES EN CÉLULAS HELA Y K562

Para las transfecciones transitorias de los plásmidos con el reportero de *luc*, en células HeLa, se utilizaron cultivos 80% confluentes. En todos los casos se transfectaron 1 µg del plásmido con el reportero y 50 ng del plásmido pRL-CMV que contiene el reportero de *Renilla reniformis* utilizado para la normalización. Para las co-transfecciones con CTCF se añadió 500ng del plásmido pCI-7.1, el cual contiene el ADN complementario de CTCF humano. Todas las transfecciones se llevaron a cabo con Lipofectamina 2000 (Invitrogen)

siguiendo las indicaciones del producto. Las unidades relativas de luciferasa se midieron en el luminómetro TD 20/20 (Turner Designs) utilizando el Kit dual de luciferasa (Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las construcciones estables en células HeLa y K562 se realizaron con los plásmidos que contienen el gen reportero de *GFP* además del gen de resistencia a neomicina. En todos los casos el plásmido se linearizó con la enzima Eco0109 y se transfectó con lipofectamina 2000. Las células transfectadas se mantuvieron durante 15 días con el antibiótico de selección y posteriormente las clonas resistentes fueron aisladas y analizadas por citometría de flujo. Las clonas fueron mantenidas en cultivo en medio sin antibiótico de selección de 2 a 23 semanas según el caso, para inducir un silenciamiento epigenético. En los experimentos de reactivación de las clonas silenciadas, estas fueron tratadas con el inhibidor de la metilación de ADN 5-aza-2'-deoxicitidina ($3\ \mu\text{M}$), con el inhibidor de desacetilasas de histonas Tricostatina A ($5\ \text{ng/ml}$) o ambos durante 3 días cambiándoles el medio y añadiendo el fármaco diariamente. Al menos 3 experimentos de reactivación independientes se llevaron a cabo.

4.5. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE ARNi EN CÉLULAS HELA

La transfección de ARNi en células HeLa se llevó a cabo como se describe en el anexo 1. Las células fueron transfectadas con el ARNi contra CTCF (Santa Cruz Biotechnology) o contra la proteína verde fluorescente siGFP-443 como control. El ARNi contra GFP fue donado por el Dr. Luis Vaca (IFC-UNAM, México). Las células HeLa fueron transfectadas con $10\ \text{mM}$ de cada siRNA cada 24 horas durante 3 días usando lipofectamina 2000. En el día 3, la transfección incluyó, además de los siRNAs a los plásmidos pGLRb y pRL-

CMV para evaluar la falta de CTCF sobre la expresión del gen reportero *Luc* controlado por el promotor completo de *Rb1*. Las células fueron cosechadas al día 4 y los extractos proteicos totales fueron analizados para medir la actividad de luciferasa.

4.6. WESTERN BLOT

Los extractos proteicos totales provenientes de los análisis de luciferasa (50 μ g por muestra) fueron aislados para evaluar la presencia de la proteína CTCF siguiendo el protocolo presente en el anexo 1. Para detectar la proteína CTCF se utilizó el anticuerpo α -CTCF N17 en dilución 1:500 y como control de carga el anticuerpo α -actina (H300) en dilución 1:1000 (ambos de Santa Cruz Biotechnology) los anticuerpos secundarios anti-cabra y anti-conejo contra CTCF y actina, respectivamente se utilizaron en concentración 1:10000 (ambos de Zymed).

4.7. TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN *IN VITRO*

El plásmido pKaiso, que contiene el ADN complementario completo de la proteína Kaiso, fue transcrito y traducido *in vitro* usando el kit -TnT reticulocyte lysate-coupled system- (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.8. EXPERIMENTOS DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)

Los EMSA y la obtención de extractos de proteínas nucleares se llevaron a cabo como se describen en el anexo 1. Las competencias específicas se llevaron a cabo utilizando 200pmoles de sondas no marcadas radioactivamente. En los experimentos de metilación *in vitro* las sondas se metilaron con la enzima SssI (New England Biolabs) la cual agrega un grupo metilo en los dinucleótidos C^mpG. La metilación de las sondas se determino por la digestión con las enzimas HpaII/MspI. Los experimentos de súper-retardo se llevaron acabo añadiendo 1 µg de los siguientes anticuerpos: CTCF clone 48 (BD biosciences), CTCF-IFC (86-23), producido en nuestro laboratorio, CTCF (N-17), MBD2 (N-18), Sp1 (pep 2) (todos de Santa Cruz Biotechnology), Kaiso (clona 6F) y MeCP2 (ambos de Upsate). La secuencia de las sondas se encuentra en el anexo 2.

4.9. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)

El ChIP se llevo a cabo como se describe en el anexo 1, utilizando 4 µg de anticuerpo contra las proteínas α-CTCF (N17) y α-Kaiso. Para las marcas epigenéticas de activación en las histonas se utilizaron anticuerpos contra la acH3 y H3K4me2 (Upstate) y para las marcas epigenéticas de represión en las histonas se utilizaron anticuerpos contra H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3 y H3K27me3. El ADN inmunoprecipitado fue analizado por PCR utilizando pares de oligonucleótidos específicos para amplificar el promotor endógeno (Fp-Rupp) o el exón 27 del gen *Rb1* como control y oligonucleótidos situados sobre secuencias plasmidicas para los promotores transfectados establemente (Fp-

Hec02r) para discriminar al promotor endógeno. Para los experimentos de ChIP semi-cuantitativo se realizaron PCRs duplex con los oligonucleótidos del promotor del gen *Rb1* y oligonucleótidos que amplifican una sección del gen *MyoD* o *β -Actina*.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Lund AH, van Lohuizen M.** Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004;18(19):2315-2335.
2. **Jones PA, Baylin SB.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3(6):415-428.
3. **Felsenfeld G, Groudine M.** Controlling the double helix. *Nature* 2003;421(6921):448-453.
4. **Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ.** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;389(6648):251-260.
5. **Jenuwein T, Allis CD.** Translating the histone code. *Science* 2001;293(5532):1074-1080.
6. **Lachner M, Jenuwein T.** The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(3):286-298.
7. **Malone CS, Miner MD, Doerr JR, Jackson JP, Jacobsen SE, Wall R, Teitell M.** CpC(A/T)GG DNA methylation in mature B cell lymphoma gene silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(18):10404-10409.
8. **Singal R, Ginder GD.** DNA methylation. *Blood* 1999;93(12):4059-4070.
9. **Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB.** Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994;7(4):536-540.
10. **Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB.** Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93(18):9821-9826.
11. **Warnecke P, Stirzaker C, Melki J, Millar D, Paul C, Clark S.** Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucl Acids Res* 1997;25(21):4422-4426.
12. **Thomassin H, Oakeley EJ, Grange T.** Identification of 5-methylcytosine in complex genomes. *Methods* 1999;19(3):465-475.
13. **Frommer M, McDonald L, Millar D, Collis C, Watt F, Grigg G, Molloy P, Paul C.** A Genomic Sequencing Protocol that Yields a Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual DNA Strands. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89(5):1827-1831.
14. **Clark S, Harrison J, Paul C, Frommer M.** High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl Acids Res* 1994;22(15):2990-2997.
15. **Antequera F.** Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(8):1647-1658.
16. **Kaffer CR, Srivastava M, Park K-Y, Ives E, Hsieh S, Batlle J, Grinberg A, Huang S-P, Pfeifer K.** A transcriptional insulator at the imprinted H19/Igf2 locus. *Genes Dev* 2000;14(15):1908-1919.
17. **Mann JR, Szabo PE, Reed MR, Singer-Sam J.** Methylated DNA sequences in genomic imprinting. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000;10(3-4):241-257.
18. **Recillas-Targa F.** DNA methylation, chromatin boundaries, and mechanisms of genomic imprinting. *Arch Med Res* 2002;33(5):428-438.
19. **Clark SJ, Melki J.** DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 2002;21(35):5380-5387.

20. **Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird A.** Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 1994;8(19):2282-2292.
21. **Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H.** Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 1994;371(6496):435-438.
22. **Clark SJ, Harrison J, Molloy PL.** Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene* 1997;195(1):67-71.
23. **Wade PA.** Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 2001;23(12):1131-1137.
24. **Bird AP, Wolffe AP.** Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999;99(5):451-454.
25. **Feng Q, Zhang Y.** The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 2001;15(7):827-832.
26. **Strahl BD, Allis CD.** The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403(6765):41-45.
27. **Marmorstein R.** Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(6):422-432.
28. **Magdinier F, Wolffe AP.** Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(9):4990-4995.
29. **Di Fiore B, Palena A, Felsani A, Palitti F, Caruso M, Lavia P.** Cytosine methylation transforms an E2F site in the retinoblastoma gene promoter into a binding site for the general repressor methylcytosine-binding protein 2 (MeCP2). *Nucl Acids Res* 1999;27(14):2852-2859.
30. **Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T.** DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 2000;24(1):88-91.
31. **Gitan RS, Shi H, Chen CM, Yan PS, Huang TH.** Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res* 2002;12(1):158-164.
32. **Shi H, Yan PS, Chen CM, Rahmatpanah F, Lofton-Day C, Caldwell CW, Huang TH.** Expressed CpG island sequence tag microarray for dual screening of DNA hypermethylation and gene silencing in cancer cells. *Cancer Res* 2002;62(11):3214-3220.
33. **Jones PA, Laird PW.** Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21(2):163-167.
34. **Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG.** Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10(7):687-692.
35. **Brown R, Strathdee G.** Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol Med* 2002;8(4 Suppl):S43-48.
36. **Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R, Tudor M, Fambrough D, Csankovszki G, Dausman J, Lee P, Wilson C, Lander E, Jaenisch R.** Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 2001;27(1):31-39.
37. **Ehrlich M.** DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002;21(35):5400-5413.

38. **Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG.** Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 2000;275(4):2727-2732.
39. **Graff JR, Herman JG, Myohanen S, Baylin SB, Vertino PM.** Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem* 1997;272(35):22322-22329.
40. **Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG.** Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* 1998;58(4):591-593.
41. **Huang TH, Perry MR, Laux DE.** Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 1999;8(3):459-470.
42. **Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B.** DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002;416(6880):552-556.
43. **Esteller M.** Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *The Journal of Pathology* 2005;205(2):172-180.
44. **Balmain A.** Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer* 2001;1(1):77-82.
45. **Eng C, Stratton M, Ponder B, Murday V, Easton D, Sacks N, Watson M, Eeles R.** Familial cancer syndromes. *Lancet* 1994;343(8899):709-713.
46. **Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T.** Suppression of Malignancy by Cell Fusion. *Nature* 1969;223:363-368.
47. **Levine AJ.** Tumour suppressor genes, the cell cycle and cancer. Levine AJ, editor: Imperial cancer research fund; 1992. 225.
48. **Vogelstein B, Kinzler KW.** Cancer genes and the pathway they control. *Nature Medicine* 2004;10(8):789-799.
49. **Payne RS, Kemp CJ.** Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* 2005;26(12):2031-2045.
50. **Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB.** The cancer epigenome-- components and functional correlates. *Genes Dev* 2006;20(23):3215-3231.
51. **Lynch HT, Watson P, Shaw TG, Lynch JF, Harty AE, Franklin BA, Kapler CR, Tinley ST, Liu B.** Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer. Part I: Studies of cancer in families. *Cancer* 1999;86(11 Suppl):2449-2456.
52. **Knudson A.** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 1971;68:820-823.
53. **Gruber SB, Ellis NA, Rennert G, Offit K, Scott KK, Almog R, Kolachana P, Bonner JD, Kirchhoff T, Tomsho LP, Nafa K, Pierce H, Low M, Satagopan J, Rennert H, Huang H, Greenson JK, Groden J, Rapaport B, Shia J, Johnson S, Gregersen PK, Harris CC, Boyd J.** BLM heterozygosity and the risk of colorectal cancer. *Science* 2002;297(5589):2013.

54. **Fodde R, Smits R.** Cancer biology. A matter of dosage. *Science* 2002;298(5594):761-763.
55. **Yoon H, Liyanarachchi S, Wright FA, Davuluri R, Lockman JC, de la Chapelle A, Pellegata NS.** Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(24):15632-15637.
56. **DiCiommo D, Gallie BL, Bremner R.** Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. *Semin Cancer Biol* 2000;10(4):255-269.
57. Rivera-Luna R. *Asociacion Mexicana de Pediatria*. Volume 2002; 2002.
58. **Knudson AG.** Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1(2):157-162.
59. Armstrong R, Smith S. Retinoblastoma and the new genetics. *Optometry today*; 1999.
60. **Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA.** Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(7):2775-2779.
61. **Botos J, Barhoumi R, Burghardt R, Kochevar DT.** Rb localization and phosphorylation kinetics correlate with the cellular phenotype of cultured breast adenocarcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002;38(4):235-241.
62. **Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP.** A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986;323(6089):643-646.
63. **Lee WH, Shew JY, Hong FD, Sery TW, Donoso LA, Young LJ, Bookstein R, Lee EY.** The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 1987;329(6140):642-645.
64. **Claudio PP, Tonini T, Giordano A.** The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biol* 2002;3(9):reviews3012.
65. **Trimarchi JM, Lees JA.** Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(1):11-20.
66. **Gill RM, Hamel PA, Zhe J, Zacksenhaus E, Gallie BL, Phillips RA.** Characterization of the human RB1 promoter and of elements involved in transcriptional regulation. *Cell Growth Differ* 1994;5(5):467-474.
67. **Sakai T, Ohtani N, McGee TL, Robbins PD, Dryja TP.** Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature* 1991;353(6339):83-86.
68. **Savoysky E, Mizuno T, Sowa Y, Watanabe H, Sawada J, Nomura H, Ohsugi Y, Handa H, Sakai T.** The retinoblastoma binding factor 1 (RBF-1) site in RB gene promoter binds preferentially E4TF1, a member of the Ets transcription factors family. *Oncogene* 1994;9(7):1839-1846.
69. **Sowa Y, Shio Y, Fujita T, Matsumoto T, Okuyama Y, Kato D, Inoue J, Sawada J, Goto M, Watanabe H, Handa H, Sakai T.** Retinoblastoma binding factor 1 site in the core promoter region of the human RB gene is activated by hGABP/E4TF1. *Cancer Res* 1997;57(15):3145-3148.

70. **Sawa C, Goto M, Suzuki F, Watanabe H, Sawada J, Handa H.** Functional domains of transcription factor hGABP beta1/E4TF1-53 required for nuclear localization and transcription activation. *Nucl Acids Res* 1996;24(24):4954-4961.
71. **Watanabe H, Sawada J, Yano K, Yamaguchi K, Goto M, Handa H.** cDNA cloning of transcription factor E4TF1 subunits with Ets and notch motifs. *Mol Cell Biol* 1993;13(3):1385-1391.
72. **Taya Y.** RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem Sci* 1997;22(1):14-17.
73. **Park K, Choe J, Osifchin NE, Templeton DJ, Robbins PD, Kim SJ.** The human retinoblastoma susceptibility gene promoter is positively autoregulated by its own product. *J Biol Chem* 1994;269(8):6083-6088.
74. **Ouellette MM, Chen J, Wright WE, Shay JW.** Complexes containing the retinoblastoma gene product recognize different DNA motifs related to the E2F binding site. *Oncogene* 1992;7(6):1075-1081.
75. **Mudryj M, Hiebert SW, Nevins JR.** A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J* 1990;9(7):2179-2184.
76. **Lees JA, Saito M, Vidal M, Valentine M, Look T, Harlow E, Dyson N, Helin K.** The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol* 1993;13(12):7813-7825.
77. **Ohtani_Fujita N, Fujita T, Takahashi R, Robbins PD, Dryja TP, Sakai T.** A silencer element in the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 1994;9(6):1703-1711.
78. **Osifchin NE, Jiang D, Ohtani_Fujita N, Fujita T, Carroza M, Kim SJ, Sakai T, Robbins PD.** Identification of a p53 binding site in the human retinoblastoma susceptibility gene promoter. *J Biol Chem* 1994;269(9):6383-6389.
79. **Jiang Z, Guo Z, Saad FA, Ellis J, Zacksenhaus E.** Retinoblastoma gene promoter directs transgene expression exclusively to the nervous system. *J Biol Chem* 2001;276(1):593-600.
80. **Okuyama Y, Sowa Y, Fujita T, Mizuno T, Nomura H, Nikaido T, Endo T, Sakai T.** ATF site of human RB gene promoter is a responsive element of myogenic differentiation. *FEBS Lett* 1996;397(2-3):219-224.
81. **Hong FD, Huang HJ, To H, Young LJ, Oro A, Bookstein R, Lee EY, Lee WH.** Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(14):5502-5506.
82. NCBI NCfBI. Chromosome 13 map viewer. 2002.
83. **Lohmann DR.** RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mutat* 1999;14(4):283-288.
84. **Cowell JK, Bia B, Akoulitchev A.** A novel mutation in the promotor region in a family with a mild form of retinoblastoma indicates the location of a new regulatory domain for the RB1 gene. *Oncogene* 1996;12(2):431-436.
85. Lohman D. RB1 gene mutation database. Volume 2002; 2002.
86. **Alonso J, Garcia-Miguel P, Abelairas J, Mendiola M, Sarret E, Vendrell MT, Navajas A, Pestana A.** Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat* 2001;17(5):412-422.

87. **Yen A, Coder D, Varvayanis S.** Concentration of RB protein in nucleus vs. cytoplasm is stable as phosphorylation of RB changes during the cell cycle and differentiation. *Eur J Cell Biol* 1997;72(2):159-165.
88. **Tonini T, Hillson C, Claudio PP.** Interview with the retinoblastoma family members: do they help each other? *J Cell Physiol* 2002;192(2):138-150.
89. **Weinberg RA.** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81(3):323-330.
90. **Lewin B.** *Genes VII*. Press OU, editor. USA; 2000. 990.
91. **Durfee T, Mancini MA, Jones D, Elledge SJ, Lee WH.** The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear matrix protein that co-localizes to centers for RNA processing. *J Cell Biol* 1994;127(3):609-622.
92. **Riley DJ, Liu CY, Lee WH.** Mutations of N-terminal regions render the retinoblastoma protein insufficient for functions in development and tumor suppression. *Mol Cell Biol* 1997;17(12):7342-7352.
93. **Qin XQ, Chittenden T, Livingston DM, Kaelin WG.** Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev* 1992;6(6):953-964.
94. **Harbour JW, Dean DC.** The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 2000;14(19):2393-2409.
95. **Welch PJ, Wang JY.** Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment. *Genes Dev* 1995;9(1):31-46.
96. **DeGregori J.** The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602(2):131-150.
97. **Trimarchi JM, Fairchild B, Wen J, Lees JA.** The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(4):1519-1524.
98. **Taya Y, Yasuda H, Kamijo M, Nakaya K, Nakamura Y, Ohba Y, Nishimura S.** In vitro phosphorylation of the tumor suppressor gene RB protein by mitosis-specific histone H1 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164(1):580-586.
99. **Resnitzky D, Hengst L, Reed SI.** Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* 1995;15(8):4347-4352.
100. **Sala A, Nicolaidis NC, Engelhard A, Bellon T, Lawe DC, Arnold A, Grana X, Giordano A, Calabretta B.** Correlation between E2F-1 requirement in the S phase and E2F-1 transactivation of cell cycle-related genes in human cells. *Cancer Res* 1994;54(6):1402-1406.
101. **Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, Dynlacht BD.** E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 2002;16(2):245-256.
102. **Dyson N.** The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998;12(15):2245-2262.
103. **Stevaux O, Dyson NJ.** A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(6):684-691.
104. **Picksley SM, Lane DP.** p53 and Rb: their cellular roles. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(6):853-858.

105. **Cooper S, Shayman JA.** Revisiting retinoblastoma protein phosphorylation during the mammalian cell cycle. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(4):580-595.
106. **Sherr C, McCormick F.** The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;2(2):103.
107. **Classon M, Harlow E.** The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(12):910-917.
108. **Ferreira R, Magnaghi-Jaulin L, Robin P, Harel-Bellan A, Trouche D.** The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95(18):10493-10498.
109. **Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T.** Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 1998;391(6667):597-601.
110. **Ferreira R, Naguibneva I, Mathieu M, Ait-Si-Ali S, Robin P, Pritchard LL, Harel-Bellan A.** Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep* 2001;2(9):794-799.
111. **Morrison AJ, Sardet C, Herrera RE.** Retinoblastoma protein transcriptional repression through histone deacetylation of a single nucleosome. *Mol Cell Biol* 2002;22(3):856-865.
112. **Arenas-Huertero F, Recillas-Targa F.** [Chromatin epigenetic modifications in cancer generation]. *Gac Med Mex* 2002;138(6):547-555.
113. **Rea S, Eisenhaber F, O_Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T.** Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000;406(6796):593-599.
114. **Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T.** Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 2001;410(6824):116-120.
115. **Tamaru H, Selker EU.** A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 2001;414(6861):277-283.
116. **Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O_Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T.** Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 2001;412(6846):561-565.
117. **Campisi J.** Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in Cell Biology* 2001;11(Supplement 1):S27-S31.
118. **Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW.** Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003;113(6):703-716.
119. **Rayman J, Takahashi Y, Indjeian V, Dannenberg J, Catchpole S, Watson R, te Riele H, Dynlacht B.** E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* 2002;16(8):933-947.
120. **Takahashi Y RJ, Dynlacht BD.** Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 2000;14(7):804-816.

121. **Stirzaker C, Millar D, Paul C, Warnecke P, Harrison J, Vincent P, Frommer M, Clark S.** Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res* 1997;57(11):2229-2237.
122. **Yang Y, Takeuchi S, Hofmann WK, Ikezoe T, van Dongen JJM, Szczepanski T, Bartram CR, Yoshino N, Taguchi H, Koeffler HP.** Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* 2006;30(1):98-102.
123. **Matsushita C, Yang Y, Takeuchi S, Matsushita M, Van Dongen JJ, Szczepanski T, Bartram CR, Seo H, Koeffler HP, H. T.** Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Reports* 2004;12(1):97-99.
124. **Chim CS, Wong AS, YL. K.** Epigenetic inactivation of INK4/CDK/RB cell cycle pathway in acute leukemias. *annals of hematology* 2003;82(12):738-742.
125. **Melki JR, Vincent PC, Clark SJ.** Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999;59(15):3730-3740.
126. **Kumagai T, Tefferi A, Jones L, Koeffler HP.** Methylation analysis of the cell cycle control genes in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leukemia Research* 2005;29(5):511-515.
127. **Otte C, Scholz R, Werner M, Weber B, Delling G, H. K.** Methylation status of the retinoblastoma gene (RB1) in osteosarcoma: no evidence for hypermethylation. *Pediatr Hematol Oncol* 2004;21(1):57-65.
128. **Park H-J, Yu E, Shim Y-H.** DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 2006;233(2):271-278.
129. **Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P.** Detection of Bladder Cancer in Urine by a Tumor Suppressor Gene Hypermethylation Panel. *Clin Cancer Res* 2004;10(6):1887-1893.
130. **Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Takahira T, Kobayashi C, Tamiya S, Tateishi N, Iwamoto Y, M. T.** DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas. *Modern Pathology* 2006;19(1):106-114.
131. **Yin D, Xie D, Hofmann WK, Miller CW, Black KL, HP. K.** Methylation, expression, and mutation analysis of the cell cycle control genes in human brain tumors. *Oncogene* 2002;21(54):8372-8378.
132. **Murao K, Kubo Y, Ohtani N, Hara E, Arase S.** Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *British journal of Dermatology* 2006;155(5):999-1005.
133. **Ohta T, Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yachi K, Ogino A, Komine C, Fukushima T.** Aberrant promoter hypermethylation profile of cell cycle regulatory genes in malignant astrocytomas. *Oncology Reports* 2006;16(5):957-963.
134. **Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, TP. D.** Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *American Journal of Human Genetics* 1991;48(5):880-888.

135. **Greger V, Debus N, Lohmann D, Hopping W, Passarge E, B. H.** Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Human genetics* 1994;94(5):491-496.
136. **Ohtani-Fujita N, Dryja TP, Rapaport JM, Fujita T, Matsumura S, Ozasa K, Watanabe Y, Hayashi K, Maeda K, Kinoshita S.** Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1997;98(1):43-49.
137. **Joseph B, Mamatha G, Raman G, Shanmugam MP, G. K.** Methylation status of RB1 promoter in Indian retinoblastoma patients. *Cancer Biol Ther* 2004;3(2):184-187.
138. **Hofmann W-K, Takeuchi S, Takeuchi N, Thiel E, Hoelzer D, Koeffler HP.** Comparative analysis of hypermethylation of cell cycle control and DNA-mismatch repair genes in low-density and CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research* 2006;30(11):1347-1353.
139. **Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Arjona D AM, Lomas J, De Campos JM, Kusak ME, Gutierrez M, Sarasa JL, JA. R.** Aberrant CpG island methylation in neurofibromas and neurofibrosarcomas. *Oncology Reports* 2003;10(5):1519-1523.
140. **Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Arjona D, Lomas J, Alonso ME, De Campos JM, Vaquero J, Isla A, Gutierrez M, JA. R.** Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas. *international journal of oncology* 2003;22(3):601-608.
141. **Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Arjona D, Lomas J, Campos JMd, Isla A, Rey JA.** CpG island methylation status and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumours. *Br J Cancer* 2003;88(1):109-114.
142. **Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Lomas J, Arjona D, Campos JMd, Vaquero J, Isla A, Lassaletta L, Gutierrez M, Sarasa JL, Rey JA.** CpG Island Methylation in Sporadic and Neurofibromatosis Type 2-Associated Schwannomas. *Clin Cancer Res* 2003;9(15):5601-5606.
143. **Takahira T, Oda Y, Tamiya S, Yamamoto H, Kobayashi C, Izumi T, Ito K, Iwamoto Y T, M. s.** Alterations of the RB1 gene in dedifferentiated liposarcoma. *Modern Pathology* 2005;18(11):1461-1470.
144. **Zemliakova VV, Zhevlova AI, Strel'nikov VV, Liubchenko LN, Vishnevskaja IaV, Tret'iakova VA, Zaletaev DV, MV. N.** Abnormal methylation of several tumor suppressor genes in sporadic breast cancer. *Molecular Biology (Mosk)* 2003;37(4):696-703.
145. **Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* 2001;81(1):77-82.
146. **Roncilli M, Bianchi P, Bruni B, Laghi L, Destro A, Di_Gioia S, Gennari L, Tommasini M, Malesci A, Coggi G.** Methylation framework of cell cycle gene inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;36(2):427-432.
147. **Li H, Lu S, L. F.** Study on the status of methylation of Rb gene promoter in human esophageal cancer and effect of NMBzA on Rb gene promoter

- in monkey esophageal epithelium. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1998;20(6):412-414.
148. **Kishi M, Nakamura M, Nishimine M, Ikuta M, Kirita T, Konishi N.** Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncology* 2005;41(2):161-169.
 149. **Zhao Y, Tian X, Du J, Zhang Y, Liu S, Lin J, J. Z.** Methylation and expression of gene p16INK4a and RB in gastric carcinomas. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2003;35(4):382-385.
 150. **Simpson DJ, Hibberts NA, McNicol AM, Clayton RN, Farrell WE.** Loss of pRb Expression in Pituitary Adenomas Is Associated with Methylation of the RB1 CpG Island. *Cancer Res* 2000;60(5):1211-1216.
 151. **Baylin S, Bestor TH.** Altered methylation patterns in cancer cell genomes: Cause or consequence? *Cancer Cell* 2002;1(4):299-305.
 152. **Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH.** The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991;67(2):293-302.
 153. **Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin N, Robbins P, Sakai T.** CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 1993;8(4):1063-1067.
 154. **Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo DM, Bolivar J, Gutierrez-Avino FJ, Dominguez M.** Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* 2006;439(7075):430-436.
 155. **Dominguez M.** Interplay between Notch Signaling and Epigenetic Silencers in Cancer. *Cancer Res* 2006;66(18):8931-8934.
 156. **Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V.** CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet* 2001;17(9):520-527.
 157. **Valadez_Graham V, Razin SV, Recillas_Targa F.** CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain. *Nucleic Acids Research (Online)* 2004;32(4):1354-1362.
 158. **Tilghman SM.** The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 1999;96:185-193.
 159. **Brown CJ, Gready JM.** A stain upon the silence: genes escaping X inactivation. *Trends Genet* 2003;19(8):432-438.
 160. **Filippova GN, Cheng MK, Moore JM, Truong J-P, Hu YJ, Nguyen DK, Tsuchiya KD, Disteche CM.** Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Developmental Cell* 2005;8(1):31-42.
 161. **Klenova EM, Morse HC, Ohlsson R, Lobanenkov VV.** The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* 2002;12(5):399-414.
 162. **Zhou XL, Werelius B, Lindblom A.** A screen for germline mutations in the gene encoding CCCTC-binding factor (CTCF) in familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6(3):R187-190.
 163. **Butcher D, Mancini-DiNardo D, Archer T, Rodenhiser D.** DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter. *International Journal of Cancer* 2004;111:669-678.

164. **Dobrovic A, Simpfendorfer D.** Methylation of the BRCA1 Gene in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Res* 1997;57(16):3347-3350.
165. **Aulmann S, Blaker H, Penzel R, Rieker RJ, Otto HF, Sinn HP.** CTCF gene mutations in invasive ductal breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80(3):347-352.
166. **Dunn KL, Davie JR.** The many roles of the transcriptional regulator CTCF. *Biochem Cell Biol* 2003;81(3):161-167.
167. **Farrell CM, West AG, Felsenfeld G.** Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human beta-globin loci. *Mol Cell Biol* 2002;22(11):3820-3831.
168. **Temple MD, Murray V.** Footprinting the 'essential regulatory region' of the retinoblastoma gene promoter in intact human cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005;37(3):665-678.
169. **Recillas-Targa F, De La Rosa-Velazquez I, Soto-Reyes E, Benitez-Bribiesca L.** Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J Cell Mol Med* 2006;10(3):554-568.
170. **Yusufzai TM, Felsenfeld G.** The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(23):8620-8624.
171. **Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G.** CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell* 2004;13(2):291-298.
172. **Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, Bell AC, Litt MD, West AG, Gaszner M, Felsenfeld G.** Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(10):6883-6888.
173. **Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F, Simpson M, West A, Felsenfeld G.** The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99 Suppl 4:16433-16437.
174. **Yoon H-G, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J.** N-CoR Mediates DNA Methylation-Dependent Repression through a Methyl CpG Binding Protein Kaiso. *Mol Cell* 2003;12(3):723-734.
175. **Lewis A, Murrell A.** Genomic imprinting: CTCF protects the boundaries. *Curr Biol* 2004;14(7):R284-286.
176. **Lee JT.** Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution of imprinting? *Curr Biol* 2003;13(6):R242-254.
177. **Mukhopadhyay R, Yu W, Whitehead J, Xu J, Lezcano M, Pack S, Kanduri C, Kanduri M, Ginjala V, Vostrov A, Quitschke W, Chernukhin I, Klenova E, Lobanenkov V, Ohlsson R.** The Binding Sites for the Chromatin Insulator Protein CTCF Map to DNA Methylation-Free Domains Genome-Wide. *Genome Res* 2004;14(8):1594-1602.
178. **Cho DH, Thienes CP, Mahoney SE, Analau E, Filippova GN, Tapscott SJ.** Antisense Transcription and Heterochromatin at the DM1 CTG Repeats Are Constrained by CTCF. *Mol Cell* 2005;20(3):483-489.
179. **Issa J-P.** CpG Island Methylator Phenotype in Cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4(12):988-993.

180. **Fraser P.** Transcriptional control thrown for a loop. *Current Opinion in Genetics & Development: Differentiation and gene regulation* 2006;16(5):490-495.
181. **Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, Fraser P.** Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet* 2004;36(10):1065-1071.
182. **Bartova E, Kozubek S, Jirsova P, Kozubek M, Gajova H, Lukasova E, Skalnikova M, Ganova A, Koutna I, Hausmann M.** Nuclear structure and gene activity in human differentiated cells. *Journal of Structural Biology* 2002;139(2):76-89.
183. **Chernukhin I, Shamsuddin S, Kang SY, Bergstrom R, Kwon Y-W, Yu W, Whitehead J, Mukhopadhyay R, Docquier F, Farrar D, Morrison I, Vigneron M, Wu S-Y, Chiang C-M, Loukinov D, Lobanenkov V, Ohlsson R, Klenova E.** CTCF Interacts with and Recruits the Largest Subunit of RNA Polymerase II to CTCF Target Sites Genome-Wide. *Mol Cell Biol* 2007;27(5):1631-1648.
184. **Jones C, Booth C, Rita D, Jazmines L, Brandt B, Newlan A, Horsthemke B.** Bilateral retinoblastoma in a male patient with an X; 13 translocation: evidence for silencing of the RB1 gene by the spreading of X inactivation. *Am J Hum Genet* 1997;60:1558-1562.
185. **Sharp AJ, Spotswood HT, Robinson DO, Turner BM, Jacobs PA.** Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations. *Hum Mol Genet* 2002;11(25):3145-3156.
186. **Yoo CB, Jones PA.** Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(1):37-50.
187. **Arce C, Perez-Plasencia C, Gonzalez-Fierro A, de la Cruz-Hernandez E, Revilla-Vazquez A, Chavez-Blanco A, Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Bargallo E, Villarreal P, Ramirez T, Vela T, Candelaria M, Camargo M, Robles E, A. D-G.** A proof-of-principle study of epigenetic therapy added to neoadjuvant Doxorubicin cyclophosphamide for locally advanced breast cancer. *Plos one* 2006;e98(1):1-11.

6. Anexos

6.1. POTOCOLOS AMPLIADOS

PROCOLO 1:

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

- Centrifugar 1 ml de células ($3 \cdot 10^6$ aprox)
- Resuspender el pellet en 250 μ l de mix I
- Lisar las células añadiendo 250 μ l de mix II
- Incubar a 50°C durante 1 hora
- Añadir 500 μ l de fenol-cloroformo y dar vortex por 3 min.
- Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min. Y recuperar la fase orgánica (arriba) en un tubo nuevo.
- Repetir la limpieza con fenol – cloroformo
- Limpiar una vez con cloroformo
- Recuperar la fase orgánica en un tubo limpio
- Añadir 500 μ l de isopropanol y dar vortex hasta ver el pellet
- Centrifugar el pellet y retirar cuidadosamente el sobrenadante
- Lavar el pellet con 500 μ l de etanol al 70%
- Centrifugar y retirar nuevamente el sobrenadante
- Dejar evaporar el alcohol residual evitando que se seque mucho el pellet
- Resuspender el pellet (DNA) en 50 μ l de TE o H₂O
- Cuantificar el ADN

Mix I	MixII
200 mM de Tris pH: 8.5 400 mM NaCl	0.4% de SDS 10 mM de EDTA 50 μ g de RNAsa (añadir en el momento de lisar) 50 μ g de proteinasa K (añadir en el momento de lisar)

PROTOCOLO 2:

MINIEXTRACTOS A PARTIR DE UN NÚMERO PEQUEÑO DE CÉLULAS

Tomado de Schreiber et al. Nuc Acid Res 17(15):6419. 1989.

1. Se hace un pellet de aproximadamente 500,000 células
2. Se resuspende en 1 ml de PBS y se centrifuga a max. Velocidad por 15 segundos. Se elimina el PBS.
3. La pastilla celular se resuspende en 400ul de Buffer A frío por pipeteo suave.
4. incubar durante 15 min. en hielo para que las células se hinchen.
5. agregar 25µl de NP-40 al 10% y vortexear vigorosamente el tubo por 10 seg.
6. centrifugar a máx. Velocidad por 30 seg.
7. resuspender la pastilla nuclear en 50 µl de de buffer B frio y agitar por 15 minutos a 4°C .
8. centrifugar 5 min. a 4°C a 8,000 rpm.
9. El sobrenadante es el extracto nuclear, usar inmediatamente o guardar a -70°C

Buffer A

10 mM HEPES pH 7.9
10 mM KCL
0.1 mM EDTA
0.1 mM EGTA
1 mM DTT
0.5 mM PMSF

Buffer B

20 mM HEPES pH 7.9
0.4 M NaCL
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 mM DTT
1 mM PMSF

Agregar el DTT y PMSF fresco, antes de usar .

Puede usarse un cóctel de inhibidores de proteasas a la par del PMSF.

PROTOCOLO 3:

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR BRADFORD

Soluciones stock para la curva:

BSA 100 ng/μl

2 μl de BSA

198 μl de agua

BSA 500 ng/μl

10 μl de BSA

190 μl de agua

CURVA DE BSA

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

Añadir a cada pozo 200μl de Bradford diluido 1:5

Todas las muestras se hacen por duplicado

Para las muestras usar 1μl añadir 19μl de agua y el bradford.

Leer en el Elisa con el filtro 4 (570 nm)

PROTOCOLO 4:

GEL DE ACRILAMIDA AL 5%

Preparación de acrilamida al 30%

- 29g de acrilamida
- 1g de bis-acrilamida

Añadir 50 ml de agua estéril, agregar una mosca y disolver con agitación suave y calor bajo hasta que este la solución transparente.

Aforar a 100 ml con agua estéril y filtrar.

Guardar a 4°C en un frasco ámbar o cubierto con papel aluminio.

TBE 5X

- 27 g de Tris
- 13.75 g de ácido bórico
- 10 ml de EDTA 0.5M pH: 8

Llevar a 500 ml con agua y esterilizar.

Persulfato de amonio (PSA)

- 1g de persulfato de amonio.
- 10 ml de agua.

Guardar a 4° C.

Gel de acrilamida.

- 38.81 ml de agua
- 8.3 ml de Acrilamida 30%
- 2.5 ml de TBE 5X
- 350 µl de PSA
- 15µl de TEMED

Correr el gel a 150V con buffer TBE 0.25X (50ml de TBE 5X + 950 ml de agua)

NOTA: Al pesar la acrilamida y bis acrilamida usar guantes, bata y cubrebocas.

PROCOLO 5

INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

- 1) **CÉLULAS:** Para realizar este protocolo se necesitan crecer las células en 6 cajas de 150mm con una confluencia del 80%.
- 2) **CROSSLINKING:** Una vez obtenido la cantidad de células necesarias se adiciona 2ml de buffer crosslinking Mix directamente al medio de las células (nota: su volumen debe de ser de 20 ml) para que quede al 1% de formaldehído. Se dejan moviendo las células por 10 minutos.
- 3) **DETENER EL CROSSLINKING:** Una vez transcurrido el tiempo se detiene la reacción de crosslinking con la adición de 1ml de glicina 2.5M teniendo una concentración final de 125mM. Se dejan 5 minutos agitando las células.
- 4) **LAVADO DE LAS CÉLULAS:** Se retira el medio de crosslink y se lavan las células 3 veces con PBS frío.
- 5) **LISIS:** Posteriormente se remueve el PBS y se adicionan 1ml de Buffer de Lisis a cada una de las cajas, y se incuba a 4°C de 3-5 minutos. Transcurrido el tiempo se cosechan las células con un gendarme y se pasan a un tubo de 50ml.
- 6) **SONICACIÓN:** Para sonicar las células se toma la cromatina y se coloca el tubo en un vaso con hielo, para que se mantenga frío y no produzca mucha espuma. (como ejemplo de sonicación para HeLa se sonica con el programa 3 que tienen 30 segundos pulso 2.0 0.5 amplitud 35%). Mientras se puede guardar la cromatina a 4°C.
- 7) **EVALUACIÓN DE LA SONICACIÓN:** Para determinar si la sonicación fue adecuada, se toman 50ul de muestra y se le adicionan 5ul de RNAsa y proteinasa K, se deja por 30 minutos y posteriormente a 65°C por mínimo 5 horas u O/N. Después se hacen 2 fenoles cloroformos (llevar la muestra a 400ul para ello) y se precipita el DNA (añadir 1ml de ET-0H al 100% mas 165ul de acetato de amonio 10M (0.33 VOL)). Posteriormente se corre un gel al 1% para evaluar el tamaño de la cromatina que debe estar entre 500-700pb.
- 8) **CROMATINA:** Una vez que ya se tiene estandarizada la cromatina se puede medir la concentración de proteína del lisado, y se puede ajustar a 1ug/ul adicionando buffer de lisis (Esto se puede guardar a 4°C por varios meses).
- 9) **INMUNOPRECIPITACIÓN:** Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se centrifugan 420ul (yo usé en los últimos ChIPs 1ml de cromatina) de la cromatina por 5 minutos a máxima velocidad, se puede hacer en la centrifuga no refrigerada. Con cuidado se toma 400ul de la cromatina y se lleva a un volumen final de 4ml de una mezcla de 9 partes de Dilution Buffer y 1 parte de Buffer de lisis todo con inhibidores de proteasas (todo esto en un tubo falcon de 15ml).
- 10) **ANTICUERPOS:** Se adicionará 4µg de anticuerpos por cada IP que se pretenda realizar y se deja rotando a 4°C por mínimo 6hrs u O/N.

- 11) **PREPARACIÓN DE PERLAS:** Se toman 0.2 g de proteína A (Amersahm Protein A sepharose CL-4B) y 100ul de perlas proteína G (Ge Healthcare protein G sepharose) en un volumen final de 2ml de Buffer de dilución 9:1: lisis Buffer (1.8ml de buffer de dilucion 9:1 y 200µl de Lisis Buffer). A esta mezcla se le adicionan 100µg/ml de BSA (20ul de BSA al 10%) y 500ug/ml de esperma de salmón (50µl de esperma a 10µg/ul) y se dejan rotando a la par con los AB de las IPS. Al día siguiente se retira el buffer de las perlas y se lavan dos veces con buffer de dilución y se resuspenden e un buffer de 9:1 de buffer de dilución y buffer de lisis (2ml vol final).
- 12) **AÑADIR PERLAS A LAS IP's:** Se ponen 50ul de perlas a cada uno de los flacon y se incuban 2hrs mientras están rotando a 4°C.
- 13) **LAVADO DE PERLAS:** Se centrifugan los falcon a 2000rpm por 2 minutos y con mucho cuidado se quita el sobrenadante. Se llevan las perlas con 1ml de Buffer Wash y se transfieren a un tubo eppendorf. Se lavan las perlas adicionándoles 3 veces más 1ml de Buffer de Wash (total de lavados 4 con Buffer Wash) y finalmente se lava 1 vez con 1ml de Final Wash (NOTA: No se aspire el líquido, pues se pueden perder las perlas y las centrifugaciones entre lavados es de 2 minutos a 2000rpm).
- 14) **ELUCION DEL DNA:** Para eluir las IPs se adicionan 450µl de Elution Buffer y se adicionan proteinasa K y RNAsa A (500µg/ml cada una) y se incuba a 37°C por 30 minutos.
- 15) **TOMAR EL INPUT:** Para ello de la cromatina restante se toman 400µl de esta y se tratan de la misma forma que las IP's
- 16) **REVERTIR EL CROSSLINKING:** Se dejan las muestras a 65°C por 6 horas u O/N.
- 17) **LIMPIEZA DEL DNA:** Se harán Fenoles/Cloroformo de las IP y se pueden precipitar usan 20µg de glicógeno, o también se pueden utilizar las columnas de Qiagen mini-elute para obtener el DNA.
- 18) **RESUSPENDER DEL DNA:** Se resuspende el DNA con 50µl de agua esteril. Incubando a 37°C por 30 minutos y posteriormente se procede a realizar la PCR.

NOTA: El INPUT se puede diluir 1/100 a 1/400 y de ahí utilizar 2 ul por PCR.

BUFFERS

CROSSLINKING MIX 11% Formaldehido 100mM NaCl 0.5mM de EGTA 50mM de HEPES, pH 8.0	DILUTION BUFFER 1% de Triton X-100 150mM de NaCl 2mM de EDTA pH 8.0 20mM de Tris-HCl pH 8.0	FINAL WASH 1% de Tritón X-100 0.1% de SDS 500mM de NaCl 2mM de EDTA pH 8.0 20mM de Tris-HCl pH 8.0
LYSIS BUFFER 1% de SDS 10mM de EDTA, pH 8.0 50mM de Tris-HCl pH 8.0	WASH BUFFER 1% de Triton X-100 0.1% de SDS 150mM de NaCl 2mM EDTA, pH 8.0 20mM de Tris-HCl pH 8.0	ELUTION BUFFER 1% de SDS 100mM NaHCO3

Protocolo 6:

PROTOCOLO DE BISULFITO DE SODIO

1. Digerir de 200ng a 1.5µg de ADN con una enzima de restricción adecuada (es decir que no corte en la secuencia deseada) en un volumen de 18 µl por 6hrs.
2. Calentar por 2 min a 95°C y pasar inmediatamente a hielo por 2 - 5 minutos.
3. Desnaturalizar el ADN en un volumen final de 20µl añadiendo a la restricción 2µl de NaOH 3M (0.12g en 1ml de agua) (concentración final 0.3M) e incubar 5 minutos a 37°C
4. Durante los pasos 2 y 3 o algunos minutos antes preparar una solución de Hidroquinona (Sigma, H-9003) 100mM (0.022g en 2ml de H2O bidestilada) y de bisulfito de sodio (Sigma, S-8890) 2M (3.8g en 10 ml de H2O bidestilada) ajustar el bisulfito a pH=5 con NaOH 10M (0.8g en 2ml de agua). El bisulfito tarda unos minutos en disolverse, se recomienda prepararlo en un tubo de 15 ml y mezclar muy suavemente, tratar de evitar que le de la luz y mantenerlo cerrado la mayor parte del tiempo.
5. Agregar 12µl de hidroquinona 10 mM (diluir el stock preparado 1:10) al ADN desnaturalizado, Mezclar con la pipeta (la solución se pone ligeramente amarilla) posteriormente añadir 208µl de la solución de Bisulfito de Sodio mezclar ligeramente con el vortex y añadir 100µl de aceite mineral.
6. Incubar a 55°C por 16 horas en obscuridad.
7. Retirar el aceite mineral (congelar a -70°C y retirar el aceite no congelado)
8. Remover el bisulfito pasando la muestra por las columnas Wizard (Promega, A- 7280) y eluir en 50µl de agua bidestilada
9. Añadir 5.5µl de NaOH 3M e incubar 15min a 37°C
10. Añadir 20µg de glicógeno para precipitar y 33.3µl de acetato de amonio 5M pH 7.0 mezclar por vortex y añadir 300µl de etanol 100%. precipitar por 4 horas a -70°C
11. Centrifugar a 13,000 rpm por 1hr a 4°C, retirar el etanol, lavar el pellet con 300µl de etanol 70%, dejar secar el pellet (no demasiado ya que es difícil de resuspender) y resuspender la muestra en 30 µl de H2O bidestilada.
12. Guardar a -20°C
13. Analizar por PCR.

NOTAS:

- Todas las soluciones deben de prepararse en el momento (excepto el acetato de amonio que puede ser de varios días)
- Usar 10µl del final para la PCR
- Diseñar los oligos para que reconozcan la secuencia cambiada
- Hacer una PCR anidada de 35 ciclos C/U

Usualmente en la primer PCR no se ve la banda esperada, pero tomar 10µl de la reacción y hacer la segunda PCR con los oligos internos.

Protocolo 7:

TRANSFECCIÓN DE siRNA CON OLIGOFECTAMINA

Consideraciones iniciales

- Las células a transfectar deben estar al 30-50% de confluencia y > 90% de viabilidad.
- No usar antibióticos durante la transfección ya que inducen muerte celular.
- El stock de trabajo del siRNA se recomienda en 10pmol/ μ l.
- Este protocolo está diseñado para transfecciones en cajas de 6 pozos.

Día 1: Sembrado de células.

- Sembrar 200,000 células en cajas de 6 pozos con 1.5 ml de medio **sin antibióticos** (la cantidad de células es importante ya que al día siguiente debe estar entre el 30-50% de confluencia)

Día 2: Transfección

Para cada muestra que vaya a ser transfectada preparar los complejos de siRNA y oligofectamina como se indica a continuación:

- Diluir 20 μ l de siRNA (stock a 10 μ M) en 180 μ l de **medio solo** (sin antibióticos ni SFB). Mezclar suavemente.
- Mezclar la oligofectamina suavemente antes de usar y diluir 10 μ l en 30 μ l de **medio solo**. Mezclar suavemente e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Después de los 5 minutos de incubación, combinar el siRNA diluido con la oligofectamina diluida (el volumen total es de 240 μ l). Mezclar suavemente e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo siRNA: Oligofectamina.
- Durante esta incubación, retirar el medio a las células, lavarlas con 1ml de **medio solo** y dejarlas con 800 μ l de **medio solo**.
- Añadir los 240 μ l del complejo siRNA: Oligofectamina a las células que están en 800 μ l de **medio solo**. Añadirlo gota a gota con movimiento constante para que se mezcle perfectamente con el medio.
- Incubar las células durante 6 horas y pasado este tiempo retirar el medio de transfección y reemplazarlo con 2ml de medio con 10% de SFB **sin antibióticos**.
- Incubar las células durante aproximadamente 72 horas (o estandarizar el tiempo) y llevar a cabo los experimentos necesarios para determinar el silenciamiento de gen deseado.

Protocolo 8:

WESTERN BLOT

Electroforesis:

- Armar los vidrios con los separadores
- Preparar el gel de acrilamida con el gel de resolución abajo, la concentración dependerá de la proteína a detectar, para CTCF (180 kd) usamos el 10%. Para el gel de separación Arriba siempre se usa al 3%.

	3% (stacking)	7.5% (Resolving)	10% (Resolving)	12% (Resolving)
Resolving Buffer	-----	1.25 ml	1.25ml	1.25ml
Spacer buffer	1.25ml	-----	-----	-----
Acrilamida(40%)	0.75ml	1.875ml	2.5ml	3ml
SDS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Agua	7.8ml	6.67ml	6.04ml	5.54ml
PSA(10%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

- Utilizar entre 30 y 40µg de proteína en un volumen no mayor a 25µl
- A cada muestra se le añade 5µl de bufer de carga y 1µl de DTT ajustar a 30µl volumen final.
- Calentar la muestra a 100 °C durante 5 min. y de ahí incubar en hielo rápidamente.
- Correr las proteínas a 100V hasta que alcance el gel de resolución, una vez ahí aumentar el voltaje a 200.

Transferencia:

- Cortar la membrana PVDF (Millipore) al tamaño del gel y ponerla a remojar en metanol por 1 minuto esto para volver hidrofílica a la membrana. Enjuagar en agua. Colocarla en el buffer de transferencia por lo menos 15 min. a 4 °C antes de usarla.
- Para armar el sándwich se hace lo siguiente todo en un recipiente de plástico con buffer de transferencia:

Arriba

Parte clara del cassette

Esponja

Papeles filtro

Membrana

Gel

Papeles filtro

Esponja

Parte negra del cassette

Abajo

- Se transfiere a 500mA por 2 horas en cuarto frío con agitación. Si es overnight se deja a 75-90 mA.

Detección con anticuerpos:

- Desmontar el sándwich con mucho cuidado. Lavar la membrana con TBS pH7.5
- Sumergir la membrana en buffer de bloqueo por 2 hr. A temperatura ambiente con agitación.
- En buffer de bloqueo, añadir el anticuerpo primario a la dilución requerida. Incubar ON a 4°C
- Desechar el buffer y lavar 5 veces por 5 min con TBS-Tween 0.1%. Esto en agitación
- Añadir el anticuerpo secundario con la dilución requerida diluido en buffer de bloqueo e Incubar en agitación durante 1 hora a °RT.
- Lavar 5x5 min con TBS-Tween
- Enjuagar con TBS sólo por 5 min.

Revelar por quimioluminiscencia.

Soluciones:

Buffer de Transferencia	Buffer de lavado
192mM Glicina	TBS-Tween 0.01%
25mM Tris-HCl	
20% Metanol	
Buffer de Corrida	Buffer de bloqueo
Tris-HCl 250mM	5% leche en polvo
Glicina	descremada
SDS 10%	1% BSA
	TBS-Tween 0.01%

6.2. TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

Nombre	Secuencia	Función
Fp	5'-CGGGATCCAGACTCTTTGTATAGCC-3'	FWD para amplificar el promotor del gen <i>Rb1</i>
Rupp	5'-CGGGATCCCAGCTGTGGAGGAG-3'	REV para amplificar el promotor del gen <i>Rb1</i>
FTRB	5'-CGGGATCCTCGCGGACGTGACGC-3'	FWD para amplificar el promotor del gen <i>Rb1</i> DCTCF
RTRb-F	5'- AAGTACCCATCTAGTACT -3'	FWD para amplificar el exón 27 del gen <i>Rb1</i>
RTRb-R	5'- AAGTTACAGCATCTCTAAA -3'	REV para amplificar el exón 27 del gen <i>Rb1</i>
A3	5'CGGGATCCTTAGGTTTTTTAGTTTAATTTTTTATGAT-3'	FWD para Bisulfito de sodio sobre RB interno
A4	5'CGGGATCCAATAAAAAACCCCAAAAAAAC-3'	REV para Bisulfito de sodio sobre RB interno
EGFPbis1	5'-TTTGGTTTTTTGTTGGTTTTTTGT-3'	FWD para Bisulfito de sodio sobre GFP externo
EGFPbis2	5'-AAATAAACCAAAACACCAACAAC-3'	REV para Bisulfito de sodio sobre GFP externo
EGFPbis3	5'-CGGGATCCTTTTTTTTGTGTTATTTTTTG-3'	FWD para Bisulfito de sodio sobre GFP interno
EGFPbis4	5'CGGGATCCAATCAACTTACCCTAAATAAC-3'	REV para Bisulfito de sodio sobre GFP externo
RBCT53	5'CGCCCCAGTTCCCCACAGACGCCGGCGGGCCCCGGGAGCCTCGCGGACGTGACG-3',	Sonda RbCTCF para EMSA (solo top strand)
FII	5'CCCAGGGATGTAATTACGTCCCTCCCCGCTAGGGGCAGCAGGCGGCCT-3'	Sonda FII para EMSA (solo top strand)
Sp1	5'- ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'.	Sonda Sp1 para EMSA (solo top strand)
HEC02R	5'-ACCATGGTGGCGACC-3'	REV sobre GFP para CHIP
RbCTCF mutA	5'CGCCCCAGTTCCCCACAGACGCCGGCGGGCCCCGGAGCCTAATTACGTGACG-3'	Sonda RbCTCF para EMSA (solo top strand) con mutación A
RbCTCF mutB	5'CGCCCCAGTTCCCCACAGACGCCGGCGGGCCCCGGAGCCTCGCGGAAGTGTAT-3'	Sonda RbCTCF para EMSA (solo top strand) con mutación B
RbCTCF mutC	5'CGCCCCAGTTCCCCACATTGTCCGGCGGGCCCCGGAGCCTCGCGGACGTGACG-3'	Sonda RbCTCF para EMSA (solo top strand) con mutación C
RbCTCF mutD	5'CGCCCCATGGAAACACAGACGCCGGCGGGCCCCGGAGCCTCGCGGACGTGACG-3'	Sonda RbCTCF para EMSA (solo top strand) con mutación D
RbCTCF mutE	5'CGCCCCAGTTCCCCACATCATAAGGCGGGCCCCGGAGCCTCGCGGACGTGACG-3'	Sonda RbCTCF para EMSA (solo top strand) con mutación E
RbCTCF mutF	5'CGCCCCAGTTCCCCACAGACGCCGGCGGGCCCCGGCTAAGATATTACGTGACG-3'	Sonda RbCTCF para EMSA (solo top strand) con mutación F
RbCTCF mutG	5'CGCCCCATGGAAACACATCATAAGGCGGGCCCCGGAGCCTCGCGGACGTGACG-3'	Sonda RbCTCF para EMSA (solo top strand) con mutación G
RbCTCF mutH	5'CGCCCCAGTTCCCCACATCATAAGGCGGGCCCCGGAGCCTAATTACGTGACG-3'	Sonda RbCTCF para EMSA (solo top strand) con mutación H

6.3. ARTÍCULOS PUBLICADOS