



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Cambios en el Estado de Metilación y de Expresión de los Genes de Pluripotencialidad Nanog, Sox2 y Oct4 Inducidos por el Inhibidor de Deacetilasas Apicidina en células de Teratocarcinoma NCCIT

Presenta

Francisco Javier Hernández Solís

Tutor

Dr. Karlen Gazarian

Comité Tutorial

Jesús Chimal Monroy

Iván Velasco Velázquez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

A Conacyt por la beca de maestría # 329879 que permitió la realización de estos estudios.

A toda mi familia.

A todos mis amigos del domino.

A mi tutor Dr. Karlen Gazarian.

A todos mis compañeros de laboratorio.

A los servicios de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas proporcionados por la M. Patricia de la Torre.

A los entes esquizoides que habitaron los últimos reductos de mi mente durante mi internado de 2 años en el IIBM Ricardo, Toshiko y Laura.

Indice

Lista de abreviaturas.....	2
Concepto de Células Troncales de Cáncer.....	4
Teratocarcinomas y Células de Carcinoma Embrionario.....	13
Línea de Carcinoma Embrionario NCCIT.....	14
Metilaciones en Residuos CpG del ADN.....	16
Histonas Deacetilasas y sus Inhibidores.....	19
El Inhibidor de Deacetilasas Apicidina.....	27
Objetivo, Hipótesis y Justificación.....	29
Metodología.....	32
Resultados.....	55
Análisis de Resultados.....	72
Conclusiones.....	78
Perspectivas.....	79
Bibliografía.....	80

Abreviaturas

Asp	Aspartato
DNA Mtases	DNA metil transferasas
EC	Células de carcinoma embrionario
GCT	Tumores de células germinales
HDACs	Histonas deacetilasas
HES	Célula troncal embrionaria humana
His	Histidina
iHDACs	Inhibidores de histonas deacetilasas
OKSIM	Vector policistrónico de los genes Oct-4, Sox2, Klf4 y cMyc
QPCR	PCR cuantitativo
Tir	Tirosina
TSA	Tricostatina
TSS	Sitio de inicio de la transcripción

Resumen

En el año 2006 el grupo de investigación de Yamanaka logró perturbar un estado celular diferenciado para regresarlo a un estado de célula troncal embrionaria mediante la inducción de factores definidos. Posterior al trabajo de Yamanaka Oct4, Sox2 y Nanog son descritos como los factores de transcripción más importantes para el establecimiento del fenotipo pluripotente.

A partir de este descubrimiento diversos laboratorios en todo el mundo han centrado su atención en el estudio de los genes Oct4, Sox2 y Nanog en diferentes sistemas biológicos.

Recientemente se ha demostrado en diversos sistemas de cáncer que los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog son responsables de conferir un fenotipo de células troncales de cáncer.

El presente trabajo de tesis aborda un estudio de los efectos del inhibidor de deacetilasas apicidina en la expresión y el estado de metilación de regiones reguladoras de los genes Oct4, Sox2 y Nanog en el sistema celular NCCIT. Debido a que las células NCCIT son las células troncales pluripotentes de un teratocarcinoma el estudio de los efectos de la apicidina en esta línea celular podrá generar nuevas perspectivas en el tratamiento contra el cáncer bajo el enfoque de células troncales de cáncer.

Marco Teórico

CONCEPTO DE CÉLULAS TRONCALES DE CANCER

Actualmente la masa tumoral es comprendida como un sistema celular heterogéneo en cuanto a las características de proliferación celular, resistencia a fármacos, potencial clonogénico y potencial tumorigénico [1-21].

Basado en estas características se aceptada que no todas las células de un tumor son capaces por sí solas de regenerar todo el sistema tumoral por completo cuando son xenotransplantadas a un hospedero. Las células de cáncer que por sí solas son capaces de regenerar todo el sistema tumoral de forma seriada cuando son xenotransplantadas, son referidas como células troncales de cáncer [1-6].

AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER

La derivación de células troncales de cáncer de tumores sólidos puede efectuarse mediante el uso de una o más combinaciones de las siguientes estrategias metodológicas: [7-21]

- Por medio de la tecnología de citometría de flujo, discriminando células positivas a los marcadores CD44 y CD133 comúnmente expresados en células troncales y en las células troncales de cáncer.
- Por medio de la tecnología de citometría de flujo, discriminando células negativas para tinción de Hoechst 33342. Esta exclusión se debe a la

expresión del transportador dependiente de ATP ABCG2, cuyo fenotipo está asociado a células troncales y células troncales de cáncer.

- Mediante la formación de cuerpos esferoides en medios libres de suero adicionando algunos factores de crecimiento de tumores o células cancerosas.
- Por medio de la tecnología de citometría de flujo discriminando a células infectadas con los vectores lentivirales de GFP-promotor de Nanog, Oct 4 o Sox2 que expresen GFP. Esta exclusión se fundamenta en la expresión de los factores Nanog, Sox 2 y/o Oct4 en células troncales de cáncer

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LOS FACTORES DE PLURIPOTENCIA OCT-4, SOX2 Y NANOG Y EL FENOTIPO DE CÉLULAS TRONCALES DE CANCER.

Las células troncales embrionarias son células derivadas de la masa celular interna del blastocisto. Estas células son inmortales y tienen la capacidad de diferenciarse a cualquier célula de las tres capas embrionarias, esta capacidad es referida como pluripotencia.

En el año 2006 el grupo de investigación de Yamanaka logra perturbar un estado celular diferenciado para regresarlo a un estado de célula troncal embrionaria. Este proceso se conoce como reprogramación celular. La lógica de este trabajo se basó en transfectar un grupo de 24 genes de alta relevancia en el estado pluripotente mediante el uso de vectores lentivirales. Estos genes lograron transformar el fenotipo de células diferenciadas a un fenotipo de células troncales

embrionarias. Yamanaka se ocupó de reducir al mínimo los genes necesarios para llevar adelante el proceso de reprogramación celular. Los genes Oct4, Sox2, Klf4, cMyc y Nanog fueron definidos por Yamanaka como los factores más relevantes en la adquisición del estado pluripotente [22].

Sin embargo estudios anteriores y posteriores al trabajo de Yamanaka establecen que existe jerarquía en los factores Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 y cMyc para el mantenimiento y establecimiento del estado pluripotente. Los factores Oct4, Sox2 y Nanog ejercen y controlan la mayoría de los mecanismos moleculares que gobiernan el estado pluripotente. [23, 24, 25]. Mientras que los factores KLF4 y cMyc están descritos únicamente como factores que facilitan y hacen más eficiente el proceso de reprogramación celular [26, 27, 28, 29].

Los genes Oct4, Sox2 y Nanog codifican para factores de transcripción que presentan uno varios homodominios. La regulación del fenotipo pluripotente no solo depende de la expresión de Oct4 Sox y Nanog, sino de una relación estequiométrica entre estos 3 factores de transcripción. Un desbalance en la expresión de estos genes corresponde a la pérdida del estado pluripotente y diferenciación [30-37].

Los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog comparten una fracción substancial de genes blanco. Se tiene reportado que del total de los genes blancos de Oct4 el 50% también son blancos del factor de transcripción Sox2 y el 90% de los genes blancos de Oct-4 y Sox 2 también son blancos de Nanog [38]. Esto concuerda con la evidencia de que los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog regulan y establecen el fenotipo pluripotencial en complejos combinatorios

que incluyen los homodominios de Nanog y heterodimeros Oct-4-Sox2 y Oct4-Nanog [39].

Los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog intervienen en el establecimiento y mantenimiento del estado pluripotencial de dos formas: Una es co-ocupando y activando genes necesarios para el fenotipo pluripotencial y la otra es reprimiendo la expresión de genes asociados a procesos de diferenciación [40, 41, 42, 43].

En sistemas biológicos pluripotente se ha observado de forma general que los promotores de genes asociados al fenotipo pluripotencial transcripcionalmente activos interactúan con combinaciones de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y/o Nanog. Mientras que los genes de diferenciación transcripcionalmente reprimidos interactúan con uno solo de los factores de transcripción Oct4, Sox2 o Nanog [44].

Los mecanismos involucrados en la activación transcripcional de genes asociados a un fenotipo pluriopotencial por los factores de transcripción Oct4/Sox/Nanog consisten en la interacción de moléculas coactivadoras con los factores de pluripotencia para el reclutamiento de DNAPOLII [45].

Los mecanismos moleculares mediante los cuales los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog reprimen genes asociados a un estado diferenciado es por medio de las proteínas reguladoras de la cromatina SETDB1 y del grupo Policomb (PcG). De tal forma se tiene definido que el factor de transcripción Oct4 interacciona con genes asociados a un fenotipo pluripotencial y recluta a la enzima

SECDB1 que cataliza el estado de cromatina H3K9M3. Posterior a este evento PcG interacciona con H3K9M3 y suscita una represión transcripcional [46, 47, 48].

KLF4 pertenece a la familia de factores de transcripción tipo Kruppel. El factor de transcripción KLF4 ejerce una regulación transcripcional positiva de genes asociados a la inhibición de la proliferación celular y una regulación transcripcional negativa de genes asociados a proliferación celular [26, 27]. Se ha observado que la expresión de KLF4 es nula en diversas líneas celulares de cáncer. En cáncer gastrointestinal el promotor de KLF4 presenta un patrón de metilación de residuos CpG metilados. También se ha observado que la inhibición de KLF4 en sistemas de epitelio gástrico promueve la aparición de fenotipos pre-malignos. Estas evidencias sugieren que KLF4 presenta la función de gen supresor de tumores. Sin embargo este factor de transcripción presenta un carácter dual. Existen reportes en donde se ha demostrado que KLF4 interacciona con P53 y que esta interacción suscita la represión transcripcional de P53. Por otro lado KLF4 incrementa la expresión de P21 [27].

Bajo este punto de vista KLF4 inhibe el ciclo celular pero también inhibe la apoptosis dependiente de P53. En el contexto de reprogramación celular el papel de KLF4 parece estar relacionado a la inhibición de P53. Existen trabajos posteriores al de Yamanaka en el 2006 en donde la inhibición de la expresión de P53 se relaciona con una mayor eficiencia del proceso de reprogramación celular. También se sabe que P53 ejerce una regulación negativa sobre la transcripción de Nanog [49]. De tal forma el factor transcripción Klf4 induce de forma indirecta la

expresión de Nanog y por ende permite el establecimiento y mantenimiento del fenotipo pluripotencial.

Los proto oncogenes Myc codifican para factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de proteínas bHLHZ. Los miembros de esta familia están involucrados en procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis [28,29].

cMyc esta ampliamente expresado durante la embrionogénesis y en tejidos adultos con gran capacidad de proliferación. La desregulación de este gen esta asociado con tumores agresivos y poco diferenciados [29].

Los principales mecanismo mediante los cuales el factor de transcripción cMyc promueve la eficiencia del proceso de reprogramación así como la adquisición de un fenotipo asociado a cáncer están relacionados con la promoción del ciclo celular y bloqueo de procesos de diferenciación celular [28, 29]

cMyc interacciona con el promotor de P21 y recluta DNMT3a que establece un patrón de CpGs metilados en este promotor, lo cual corresponde a un silenciamiento transcripcional de P21 y a una inducción del ciclo celular [50]. Por otra parte cMyc reprime la expresión de genes asociados a procesos de diferenciación que resulta de gran importancia en las etapas iniciales del proceso de reprogramación celular [28].

Posterior al trabajo de Yamanaka en el año 2006 los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog fueron explorados y estudiados en diversos sistemas biológicos. La expresión de los factores de pluripotencia Oct-4, Sox2 y Nanog ya

sea en forma individual o en combinaciones ha sido reportada en varios sistemas tumorales.

En los últimos años varios trabajos han asociado la expresión de los genes Oct4, Nanog y Sox2 al fenotipo de células troncales de cáncer.

El razonamiento metodológico de los trabajos que relacionan los factores de pluripotencia con el fenotipo de células troncales de cáncer presenta gran similitud en los diversos sistemas tumorales donde se ha comprobado esta hipótesis.

El razonamiento metodológico general en la relación célula troncal de cáncer con factores de pluripotencia, involucra la siguiente secuencia de acciones: [8-21]

- ✓ Aislamiento de las células troncales de cáncer del sistema cancerígeno dado, mediante el uso de una estrategia o combinaciones de estrategias descritas anteriormente para la selección de células troncales de cáncer.

- ✓ Valoración de la expresión relativa del mRNA y de proteína de los factores de transcripción Oct-4, Sox2 y/o Nanog en las células troncales de cáncer y en las células parentales de cáncer, mediante QPCR y Western Blot.

- ✓ Valoración del índice de proliferación, resistencia a fármacos oncológicos, potencial clonigénico mediante ensayos en agar suave y potencial tumorigénico mediante xenotransplantes en ratones atímicos de células troncales de cáncer y de las células parentales de cáncer.

- ✓ Comprobación de la dependencia de las características de proliferación celular, resistencia a fármacos oncológicos, clonogenicidad y tumorigenicidad a la expresión de factores de pluripotencia Oct-4, Sox2 y Nanog mediante ensayos de knockdown usando tecnología lentiviral shRNA o siRNA.
- ✓ Formación y comprobación de hipótesis de los posibles mecanismos moleculares suscitados por los factores de transcripción Nanog, Oct4 y Sox2 al fenotipo de células troncales de cáncer.

Aunque son muchos los sistemas biológicos cancerígenos positivos para la expresión de los factores de transcripción Nanog, Oct4 y Sox 2 ya sea de forma individual o en combinaciones, aún no se ha demostrado la relación entre fenotipo de célula troncal de cáncer y la expresión de factores de pluripotencia en el total de los sistemas biológicos Oct4, Sox2 y/o Nanog positivos.

En los sistemas biológicos donde ha sido estudiada la relación entre fenotipo de célula troncal de cáncer con factores de pluripotencia, existe un aumento en la expresión relativa de los genes Oct-4, Nanog y/o Sox2 en células troncales de cáncer con respecto a las células parentales de cáncer. Las características asociadas a fenotipo de células troncales de cáncer como alto índice de proliferación, resistencia a fármacos oncológicos, alto potencial clonigénico y alto potencial tumorigénico están presentes en células Nanog, Oct4 y/o Sox positivas, y no están presentes en las células Nanog, Oct4 y Sox2 negativas. Experimentos knockdown de los factores de transcripción Nanog, Sox2 y/o Oct4 en células troncales de cáncer muestran una franca disminución de las características

asociadas a fenotipo de células troncales de cáncer como son un alto índice de proliferación, resistencia a fármacos oncológicos, alto potencial clonigénico y potencial tumorigénico[8 -21].

Los mecanismos por los cuales los factores de transcripción Oct-4, Sox2 y/o Nanog favorecen el fenotipo de célula troncal de cáncer están descritos parcialmente.

Se sabe que Nanog y P53 promueven estados fisiológicos celulares opuestos; Nanog favorece la proliferación y el fenotipo pluripotencial mientras que P53 está relacionado con arresto del ciclo celular y diferenciación [23]. También se tiene conocimiento de la represión transcripcional que ejerce P53 sobre Nanog y de la represión transcripcional que ejerce Nanog sobre P53 [13]. Por otro lado se ha descrito una isoforma de Nanog, referida como Nanog P8. Aunque Nanog y Nanog P8 guardan una semejanza del 99% a nivel proteico estudios de Chip-Seq indican que Nanog y Nanog P8 difieren en el 25% de sus sitios de unión al genoma.

Nanog P8 es la isoforma más abundante en cáncer y su expresión promueve un fenotipo mayormente ligado a células troncales de cáncer. [10,11, 21]

La influencia que ejerce Sox2 en un fenotipo de célula troncal de cáncer reside parcialmente en la promoción de la transición G1/S en el ciclo celular. Sox2 en asociación con β catenina presentan como blanco de activación al gen CCND1 que codifica para ciclina D1, la expresión de esta ciclina logra inducir la proliferación celular via transición G0/G1. [19]

La influencia del factor de transcripción Oct 4 en el estado fenotipo de una célula troncal de cáncer parece estar relacionado con la inhibición de procesos apoptóticos. [7]

TERATOCARCINOMAS Y CÉLULAS DE CARCINOMA EMBRIONAL (EC)

Los tumores de células germinales (GCT) se dividen en seminomas y no seminomas. Los seminomas consisten de células que asemejan a las células primordiales germinales; los no seminomas son histológicamente heterogéneos y frecuentemente contienen tejidos somáticos como nervio, hueso y músculo etc [51, 52]. Los teratomas están comprendidos dentro de la clasificación de no seminomas, y son tumores encapsulados con componentes de tejidos u órganos que asemejan a los derivados de las 3 capas embrionarias. Un ejemplo de teratomas son los tumores benignos que se desarrollan en los ovarios conocidos comúnmente como quistes ováricos [51].

Tumores similares ocurren en los testículos, pero en este caso estos tumores son altamente malignos y son referidos como teratocarcinomas. Los teratocarcinomas son un subgrupo de tumores de células germinales (GCT) que contienen un arreglo desorganizado de células somáticas, extraembrionarias y células EC (carcinoma embrional). Las células EC son células indiferenciadas y son las células troncales pluripotentes de este sistema tumoral [51, 53].

Las células de teratocarcinoma que comprenden el fenotipo diferenciado derivadas a partir de las células EC son típicamente no malignas, mientras que las células EC son altamente malignas. Esta propiedad de malignidad fue demostrada

al observar la capacidad de una sola célula EC para regenerar todo el sistema tumoral al ser transplantadas a un hospedero murino. Estas características del sistema tumoral teratocarcinoma ilustran de forma destacada el concepto de cáncer y células troncales [53].

Las células EC al igual que las células troncales embrionarias ES expresan los factores Oct4, Sox2 y Nanog descritos a partir del trabajo de Yamanaka en el año 2006 como los responsables de conferir el estado pluripotencial. Estos factores también han sido descritos en publicaciones recientes como responsables del fenotipo asociado a células troncales de cáncer. Bajo esta perspectiva las células ES y EC comprenden 2 versiones de la pluripotencialidad, una encaminada al desarrollo embrionario y otra encaminada al crecimiento tumoral [51, 54].

LÍNEA DE CARCINOMA EMBRIONARIO NCCIT

La línea de carcinoma embrional NCCIT fue aislada de un tumor no seminomatoso ubicado en el mediastino. Esta línea celular presenta diferencias y similitudes con respecto a similares EC y a sus contrapartes HES [55].

Características de las Células NCCIT, EC y HES

- Las células NCCIT expresan los marcadores SSEA 1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-81 y TRA-1-60.
- Las células NCCIT expresan la isoenzima de fosfatasa alcalina placentararia.
- Las células NCCIT son negativas para las proteínas de adhesión celular E-caderina y desmoplakina.
- Las células NCCIT se mantienen en un estado indiferenciado en la ausencia de sistemas alimentadores (feeders).
- El rango de cromosomas en las células NCCIT varía entre 54 a 64 cromosomas
- Las células NCCIT presentan una mayor expresión de los genes Nanog, Oct4 y Sox2 con respecto a las células HES.
- Las células que comprenden el sistema de teratocarcinoma formado a partir de un xenotransplante son capaces de formar un nuevo teratocarcinoma cuando son xenotransplantadas de nuevo
- Al contrario de otros tumores de células germinales las células NCCIT no presentan un isocromosoma 12.
- El ácido retinoico disminuye el crecimiento e induce diferenciación de la línea NCCIT de forma similar a otras líneas de EC.
- A diferencia de otras líneas EC las células NCCIT son negativas a keratina en este contexto las células NCCIT asemejan a los seminomas.
- Las células HES y EC expresan los marcadores SSEA3, SSEA4, TRA-1-81 y TRA-1-60
- Las células EC y HES expresan la isoenzima de fosfatasa alcalina hígado- hueso-riñón.
- Las células HES expresan las moléculas de adhesión E-caderina
- Las células HES requieren la presencia de sistemas alimentadores (feeders) para mantenerse en un estado indiferenciado.
- Las células HES presentan un cariotipo normal.
- Las células HES presentan una menor expresión de los genes Nanog, Oct4 y Sox2 con respecto a las células NCCIT.
- Las células que comprenden el teratoma formado por el xenotransplante de células HES no pueden formar un nuevo teratoma cuando son xenotransplantadas de nuevo.

Tabla 1: Similitudes y diferencias de la línea NCCIT con otras líneas de EC y HES

METILACIONES EN CpG DEL ADN

Aunque el descubrimiento de citosinas metiladas en el carbono 5 en el ADN fue realizado hace medio siglo, en la última década se han realizado grandes descubrimientos en varios campos del conocimiento biológico que destacan la relevancia del estado de metilación de residuos CpG en el genoma.

Estudios experimentales y clínicos demuestran que perturbaciones en el estado de metilación en CpG puede inducir diversos tipos de cáncer, diversas padecimientos tales como enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelar, lupus eritromatosa sistémica, síndrome de anomalías faciales (ICF) entre otras. Adicionalmente la metilación dinámica y programada resulta esencial para el desarrollo embrionario. [56]

Aunque la reacción de metilación sobre el carbono 5 del nucleósido de citocina es realizada de forma casi idéntica por las diferentes variantes de DNA metil transferasas (DNA Mtases), existe diferencia en la selectividad y especificidad por los sustratos y una activación espacial y temporal diferente. [56, 56]

La metilación en mamíferos es regulada por DNA Mtases, DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. La enzima DNMT1 prefiere DNA hemimetilado como sustrato, mientras que DNMT3A y DNMT3B realizan la metilación de novo. [57, 58].

Generalmente la metilación de citosinas en residuos CpG de regiones reguladoras de genes en el ADN es una modificación epigenética asociada con silenciamiento transcripcional. La inactivación transcripcional se da por falta de interacción de los factores de transcripción con sus elementos de respuesta o por la atracción

que tienen los CpG metilados por proteínas MeCP2, que a su vez reclutan HDACs e histonas metil transferasas [58, 59, 60].

MECANISMO DE CATÁLISIS DE LAS DNAMTases

Para lograr la reacción de metilación en el carbono 5 del anillo de citosina debe realizarse un ataque nucleofílico del carbono 5 de la citosina al centro sulfonio de S-adenosilmetionina (Ado-Met). Sin embargo, la distribución de electrones reactivos en el anillo de citosina está deslocalizado, lo cual desfavorece la reacción. Bajo este contexto la aromaticidad en el anillo de citosina debe ser eliminada para llevar a cabo la reacción de metilación. Las DNAMTases facilitan este proceso disminuyendo la barrera energética del proceso. El mecanismo de catálisis, resulta en la formación de un intermediario covalente de la citosina con la DNAMTases [56]. Este mecanismo se origina de un ataque nucleofílico de un residuo de cisteína del asa activa de la DNAMTase al carbono 6 de la citosina. Este proceso es favorecido por la protonación del nitrógeno en posición 3 de la citosina facilitado por un residuo de glutamato del motivo conservado de la DNAMtase (Figura 1A) [56]. Como resultado, una vez que resulta la desprotonación del nitrógeno 3 de la citosina, el C5 es potencialmente activado para llevar a cabo el ataque nucleofílico al centro sulfonio de Ado-Met (Figura2B). Finalmente, el complejo 5-metil-citocina – enzima es eliminado por la eliminación de un protón del carbono 5 de la 5-metil- citosina (Figura1C) [56].

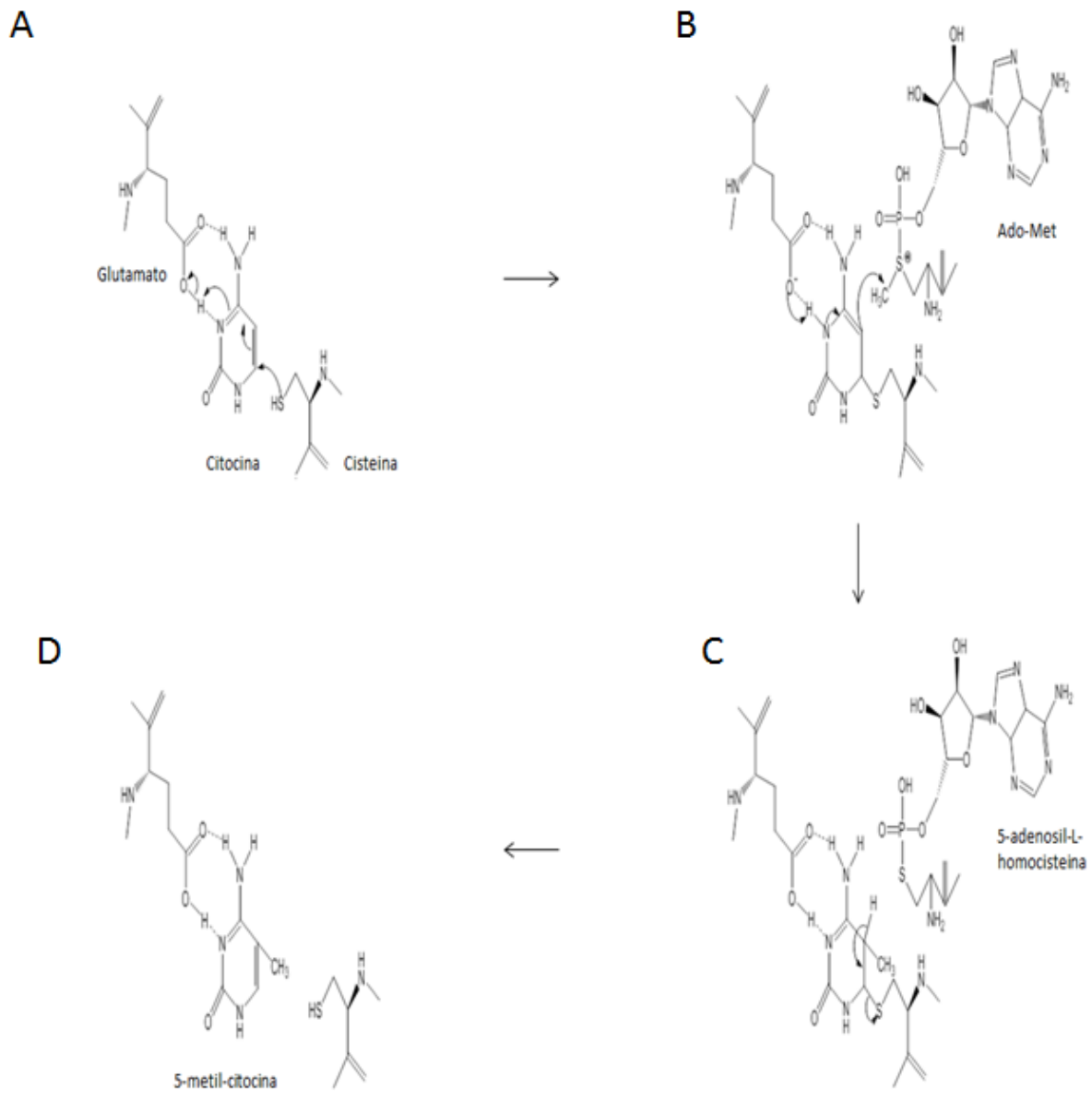


Figura 1: Mecanismo de catálisis de las DNAmTases (Modificado de 56).

Las modificaciones epigenéticas de residuos CpG del ADN juegan un papel relevante en la iniciación y evolución del cáncer así como en el desarrollo embrionario y la diferenciación celular.

Estados de metilación aberrantes en residuos CpG han sido observados en una amplia variedad de sistemas tumorales [61].

Por otra parte, se ha reportado una expresión elevada de la enzima DNMT1 en diversos sistemas cancerígenos. Células de la línea NIH 3T3 han sido transformadas y son capaces de formar tumores cuando se sobre-expresa la enzima DNMT1, lo cual también corresponde a un patrón de metilación en residuos CpG del ADN incrementado [62].

Los mecanismos moleculares por los cuales la enzima DNMT1 promueve transformación celular se han estudiado solo parcialmente. Pero se sabe que la sobreexpresión de DNMT1 promueve la metilación y silenciamiento de genes supresores de tumores [63, 64], lo cual concuerda con documentación sobre genes supresores de tumores metilados en diversos sistemas tumorales [65]. Esta evidencia se ha comprobado al observar una desmetilación y activación de genes supresores de tumores como p16 y p21 posterior al knockdown de DNMT1 [66].

HISTONAS DEACETILASAS Y SUS INHIBIDORES

El nucleosoma es la unidad básica de la cromatina con un peso molecular de aproximadamente 206 KDa. El nucleosoma es un octámero de histonas con dos moléculas de H2A, H2B, H3 y H4. Alrededor del nucleosomas el ADN es enrollado en una extensión de 147 pares de bases [67].

Las proteínas que conforman el nucleosoma son pequeñas y altamente básicas. Las histonas están compuestas de un dominio globular y un dominio amino terminal flexible (colas de histonas). La cola de las histonas presenta una longitud

de 16 a 44 aminoácidos y no adoptan alguna estructura secundaria definida [68]. Las colas de las histonas son objeto de gran diversidad de modificaciones postransduccionales que consecuentemente funcionan como plataformas de regulación en el proceso de transcripción [69].

Se han reportado docenas de proteínas involucradas en el proceso de modificación en la estructura de la cromatina. Estas proteínas pueden expresar diferentes funciones como catalizar la reacción de cierto sustituyente en un residuo específico de histona, reconocimiento de cierta estructura en histona o reconocimiento de proteínas asociadas a histona. [70]

Gran número de experimentos han determinado que la acetilación en residuos de lisina corresponde con transcripción activa y que un estado desacetilado corresponde a un estado transcripcional inactivo. Sin embargo, fue hasta mediados de los años 90 cuando se aislaron las primeras enzimas que acetilan referidas como Histonas Acetilasas (HATs). Dado que todas las modificaciones covalentes a histonas son de carácter reversible tiempo después se reportó la existencia de enzimas capaces de deacetilar referidas como Histona Deacetilasas (HDACs). La actividad de estos dos grupos de enzimas regula el estado de acetilación de los extremos amino de las histonas y es fundamental para la activación o represión transcripcional.

Las enzimas Histonas Deacetilasas (HDACs) catalizan la eliminación de grupos acetilo en los grupos ϵ amino de los residuos de lisina agrupados cerca del amino terminal de las histonas. Esta modificación corresponde a un silenciamiento transcripcional [71].

Basadas en la homología estructural con HDACs en levadura, existen 3 clasificaciones de HDACs en mamíferos HDAC I, HDAC II y HDAC III. Las HDACs I y II comprenden enzimas evolutivamente similares [34] que requieren para su actividad la presencia de Zn^{2+} , estas enzimas presentan homología en los 390 aminoácidos que comprenden el núcleo catalítico de las deacetilasas [45]. Las HDACIII son evolutivamente distintas a las HDACs I y II, con un mecanismo catalítico dependiente de NAD^+ que no está presente en las HDACs I y II. [72]

En estudios cristalográficos de las HDAC I y HDAC II se ha observado que el Zn^{2+} está coordinado por los residuos de aminoácidos Asp 168, His 170, Asp 258 y una molécula de H_2O . Los ligandos proteicos y la molécula de agua que deberían estar coordinando al Zn^{2+} en una geometría tetrahedrica, sin embargo no lo están ya que la molécula de H_2O presenta interacciones de puente de hidrógeno con residuo de His 131 y esta interacción logra perturbar la geometría tetrahedrica [72].

Además de los ligandos del Zn^{2+} , están presentes los residuos de aminoácidos His 131, His132, Asp 166 173 y Tir 297. Los hidrógenos del nitrógeno δ_1 de las histidinas 131 y 132 forman puentes de hidrógeno con el oxígeno de un ácido aspártico ubicado en el plano del anillo de imidazol. Este arreglo His-Asp es característico del sistema “charge relay” común en los sitios activos de serin proteasas. Este sistema genera una polarización del Ne del anillo de imidazol e incrementa su basicidad considerablemente [71].

El mecanismo de acción de las HDACs sobre las lisinas acetiladas comprende la polarización del oxígeno del grupo carbonilo del enlace N-acetilamida por el Zn^{2+} ,

esta polarización genera que el grupo carbonilo sea un mejor electrófilo. El potencial nucleofílico del agua es aumentado por acción de la carga negativa del nitrógeno δ1 de las histinas generada por el sistema charge relay Asp166-His131.

Una vez que se logró aumentar el pontencial nucleofílico del agua se realiza el ataque nucleofílico del agua al grupo carbonilo del enlace N-acetilamida. El oxianión intermediario puede ser estabilizado por el Zn²⁺ y por el hidroxilo de Tyr 297. En el último paso de la reacción se rompe el enlace nitrógeno-oxígeno del residuo de lisina(Figura 2) [71].

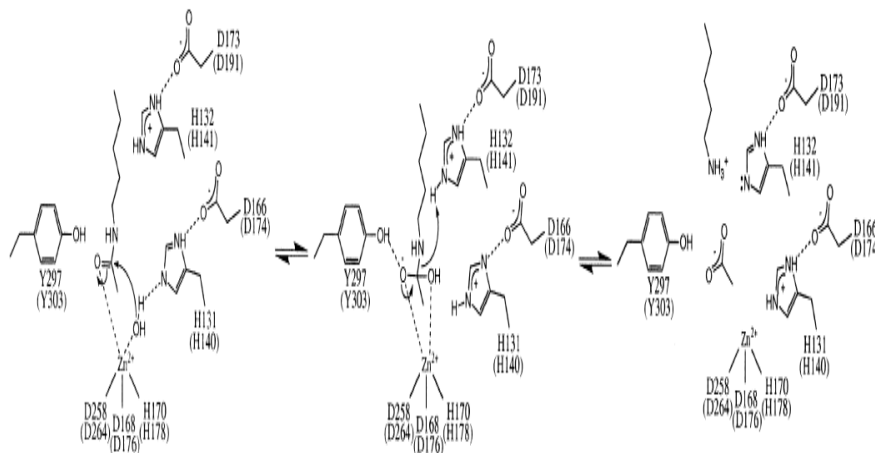


Figura 2: Mecanismo de catálisis de las enzimas HDACs I y II. (Tomado de 71)

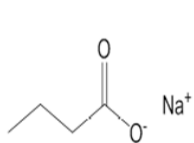
Un estado alterado en el patrón de acetilación/desacetilación en oncogenes o genes supresores de tumores ha sido descrito en varios tipos de cáncer [72, 73].

Los mecanismos que explican un estado de acetilación/desacetilación alterados están parcialmente estudiados pero existen evidencias de una sobreexpresión de HDACs en diversos sistemas de cáncer [73]. De tal forma que en los últimos años se han descubierto o diseñado una amplia gama de moléculas con la facultad de

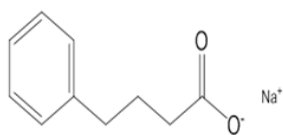
inhibir la actividad catalítica de las HDACs (iHDACs), con el propósito de utilizarse en la terapia contra el cáncer [74].

Los iHDACs están clasificados de la siguiente manera de acuerdo a sus estructuras químicas [74].

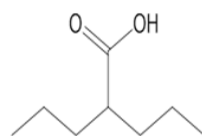
A) Carboxilatos de bajo peso molecular



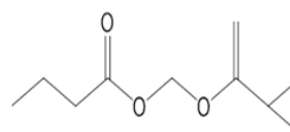
Butirato de Sodio



Fenilbutirato de Sodio

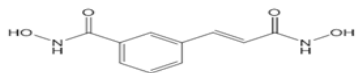


Ácido Valproico

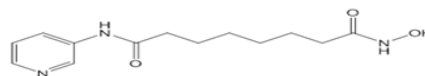


AN-9

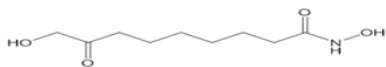
B) Ácidos Hidroxámicos



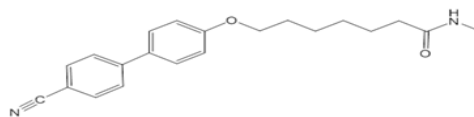
CBHA



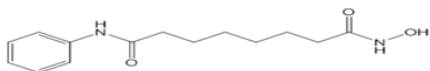
Proxamida



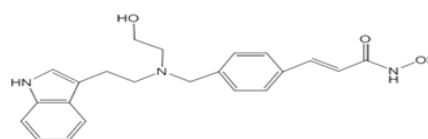
SBHA



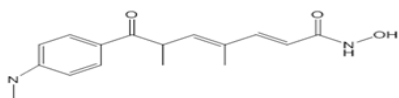
A-161906



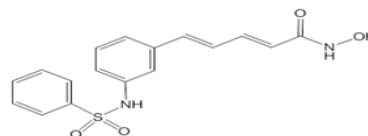
SAHA



NVP-LAQ-824

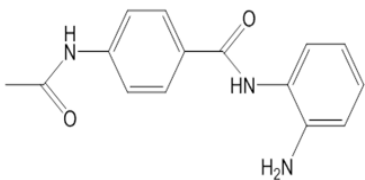


Tricostatina

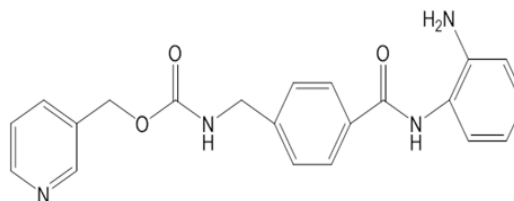


Oxamflatina

C) Benzamidas

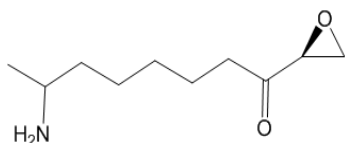


MS-275



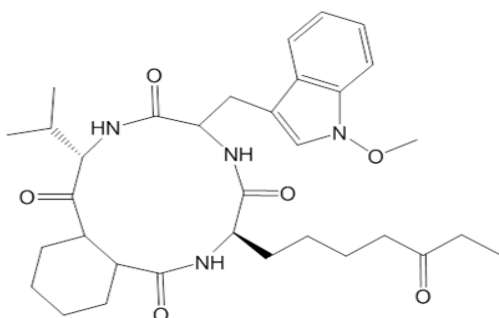
CL-994

D) Epoxicetonas

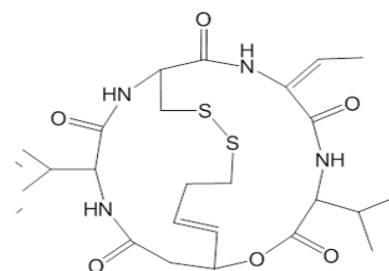


AOE

E) Peptidos Cíclicos



Apicidina



Desipeptido

Figura 3: Estructuras químicas de las principales clasificaciones de iHDACs

La forma general en la cual diversas moléculas con estructuras químicas diferentes inhiben la actividad de las HDACs es formar enlaces de coordinación con el Zn^{2+} y evitar que la molécula de agua ejecute el ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo de la lisina. Un modelo que sirve para ilustrar este mecanismo de inhibición común para la mayoría de los inhibidores de deacetilasas es el del ácido hidroxámico tricostatina A. La tricostatina forma puentes de hidrógeno con las histidinas del sistema “charge relay” y el grupo hidroxilo de Tyr 297 y reemplaza a la molécula de agua mediante su grupo hidroxilo mientras que forma otro enlace

de coordinación con el Zn^{2+} con el grupo carbonilo, lo cual resulta en un Zn^{2+} penta-coordinado. (Figura 4) [71].

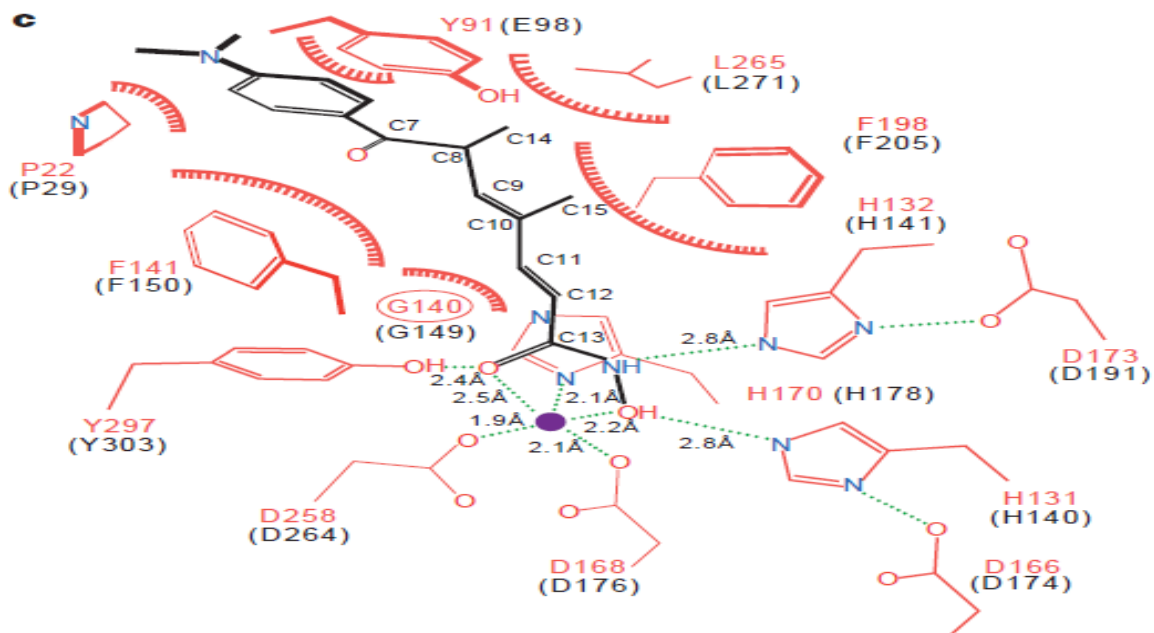


Figura 4: Interacción Tricostatina (TSA) con HDACs I y II. Zn^{2+} (Tomado de 71).

EL INHIBIDOR DE DEACETILASAS APICIDINA.

El inhibidor de deacetilasas apicidina es un tetrapéptido cíclico aislado de *Fusarium* sp (Figura 5). La apicidina se caracteriza por la presencia de una cadena lateral coordinadora de Zn^{2+} que consta del grupo terminal etil cetona y por simular isostéricamente a una lisina acetilada. De tal forma los mecanismos por los cuales la apicidina inhibe la actividad de las HDACs están sustentados en

simular una lisina acetilada y al igual que el resto de los iHDACs sustituye al agua de la estructura de coordinación del Zn^{2+} [75].

La apicidina ha demostrado tener un potente efecto antiproliferativo en diversas líneas de cáncer asociado con la sobreexpresión de P21, efectos apoptóticos vía activación de cascadas de caspasas dependientes de la mitocondria y efectos de cito-diferenciación en diversas células de mamífero [76].

También se ha demostrado que la apicidina disminuye la expresión del gen DNMT1 pero no las de los genes DNMT3A y DNMT3B de forma significativa en varias líneas celulares de cáncer como el cervicouterino HeLa, en la línea de cáncer embrionario NCCIT, en la línea de cáncer de mama MEF-7 y en la línea de carcinoma ductal HCC1954 [58].

La sobreexpresión de la proteína P21 inducida por la apicidina es independiente de la expresión de P53 y se ha demostrado que este incremento está relacionado con la disminución en la expresión de DNMT1 y al efecto directo de la apicidina [58].

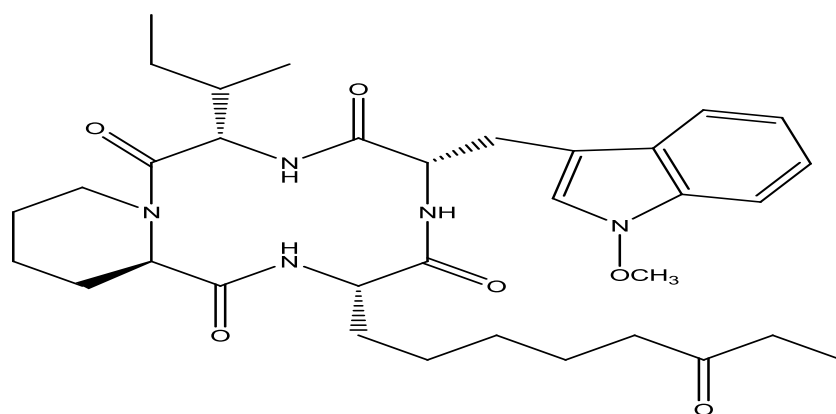


Figura 5: Estructura química del inhibidor de deacetilasas apicidina.

Objetivo General

Investigar los cambios en el estado de metilación de regiones reguladoras del ADN y de expresión de los genes Oct4, Nanog y Sox2 en la línea celular NCCIT al ser administrada con el inhibidor de deacetilasas apicidina. Así como evaluar el efecto de la apicidina y la sobreexpresión de los genes Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc sobre el potencial tumorigénico de las células NCCIT.

Objetivos Específicos

- Determinar cambios en el patrón de metilaciones de regiones reguladoras de los genes Oct4, Sox2 y Nanog al administrar el inhibidor de deacetilasas apicidina a las células NCCIT mediante la metodología de bisulfito de sodio.
- Determinar los cambios de expresión de los genes Oct4, Sox2 y Nanog al administrar el inhibidor de deacetilasas apicidina a las células NCCIT mediante la metodología de QPCR.
- Determinar si el gen Nanog P8 se expresa en células NCCIT y si hay cambios en su expresión al administrar el inhibidor de deacetilasas apicidina mediante la metodología de QPCR.
- Determinar si existe reversibilidad en el tratamiento con apicidina.
- Determinar si existe una disminución del potencial tumorigénico en las células NCCIT tratadas con apicidina mediante la metodología de xenotransplantes.
- Determinar si existe un aumento en el potencial tumor génico de las células NCCIT al sobreexpresar los genes Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc.

- Determinar si la sobreexpresión de los genes Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc puede revertir el efecto antitumorigénico de la apicidina.

Hipótesis

Se propone que la disminución de la expresión de los genes de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog en células NCCIT inducida por el inhibidor de deacetilasas de histonas apicidina perturbará el estado pluripotencial de las células NCCIT y forzará a estas células a diferenciarse de forma irreversible. De tal forma que se espera observar cambios en el estado de metilación de las regiones reguladoras de los genes Oct4, Sox2 y Nanog.

Por otro lado se espera que el potencial tumorigénico de las células NCCIT sea disminuido mediante el tratamiento con apicidina y que la inhibición del potencial tumorigénico ejercido por la apicidina sea contrarestanda mediante la sobreexpresión de los genes Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc.

Justificación

- Las células NCCIT son un buen modelo de células troncales de cáncer ya que estas células representan a las células troncales de un teratocarcinoma y expresan los genes de pluripotencialidad Oct4, Sox2 y Nanog descritos como factores determinantes en el fenotipo de células troncales de cáncer. Estudiar los efectos del inhibidor de deacetilasas apicidina en células NCCIT puede generar nuevas perspectivas en el tratamiento del cáncer.

METODOLOGÍA

Planeación Experimental General del Proyecto

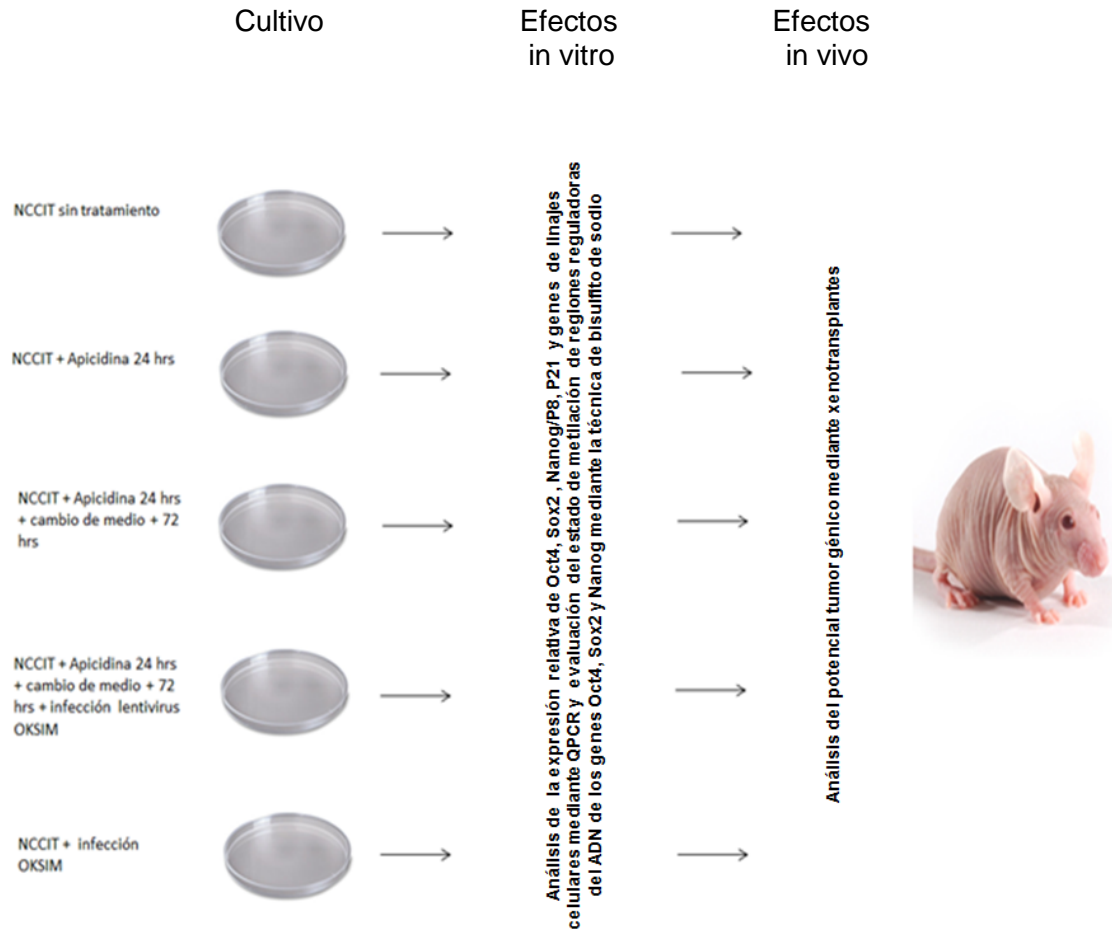


Figura 6: Esquema general de trabajo

1.1 Cultivo de Celular

Las células NCCIT (ATCC # Cat: CRL-2073) se cultivaron de acuerdo con las especificaciones descritas por la casa comercial, con medio RPMI 1640 (ATCC # Cat: 30-2001), suero fetal bovino al 10%. Las condiciones de incubación fueron 37 °C, 5% CO₂.

1.2 Administración de Apicidina

El inhibidor de deacetilasas apicidina (Aldrich # Cat A8851) se disolvió en DMSO y se administró a las células NCCIT a una concentración 1 µM por un lapso de 24 hrs. Posterior a las 24 h se extrajo ADN y RNA o se realizó un cambio de medio y se esperó un tiempo de 72 h posterior a la administración de apicidina para extraer ADN y RNA.

1.3 Metodología del Bisulfito de Sodio

La metodología del bisulfito de sodio se basa en la reacción que se presenta entre el bisulfito de sodio y las citosinas no metiladas del ADN. Esta reacción culmina con la conversión de las citosinas en uracilos. Las citosinas metiladas en el carbono 5 del anillo de pirimidina no reaccionan con el bisulfito de sodio bajo las mismas condiciones

El primer paso en la conversión de citidina a uracilo, es la adición de HSO₃⁻ en el doble enlace 5,6 de los nucleósidos de pirimidina para formar 5,6

dihidropirimidina 6 sulfonato. El segundo paso consiste en la liberación de NH_3 mediante un proceso de hidrólisis, $[\text{C-SO}_3]$ pasa a $[\text{U-SO}_3]$. El tercer paso es un proceso reversible en donde bajo condiciones libres de HSO_3 y condiciones alcalinas el equilibrio de la reacción se desplaza a la desulfonación del uracilo (Figura 7) [77].

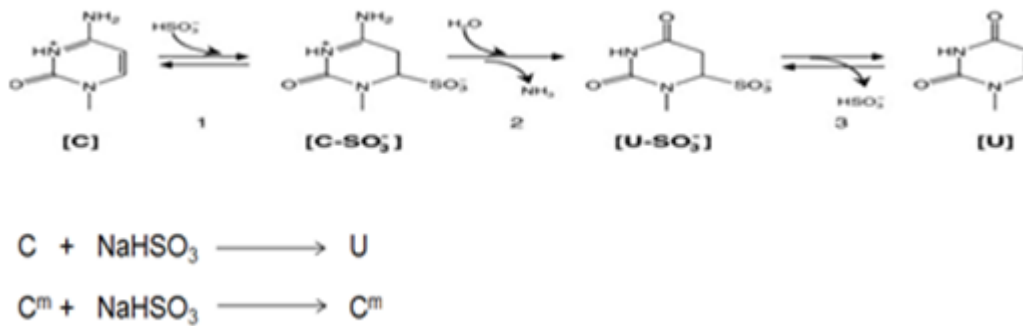


Figura 7: Reacción de citosinas con el bisulfito de sodio

Una vez que termina la reacción del ADN con el bisulfito de sodio, se amplifican las regiones de estudios por PCR y se mandan a secuenciar. Las secuencias obtenidas se comparan con secuencias reportadas en la bibliografía y de esta manera se determina el patrón de metilación de los residuos CpG (Figura 8).



Figura 8: Imagen que ilustra el proceso general de la metodología del bisulfito de sodio. C^m corresponde a una citosina metilada.

1.3.1 Extracción del ADN

Células NCCIT con diferentes tratamientos fueron lavadas con PBS 1X, posteriormente las células NCCIT fueron tripzinizadas. Una vez tripzinizadas las células NCCIT fueron lavadas por triplicado con 10 ml solución de PBS 1X centrifugando entre cada lavado. Después de esta operación las células NCCIT fueron resuspendidas en 3 ml de solución amortiguadora de lisis (Tris EDTA, pH 8.0, 1 ml, NaCl 5 M, 8 ml, EDTA 0.5 M, 0.4 ml, H₂O 90.6 ml) a esta suspensión se le adicionaron 100 µl de proteinasa K(10 mg/ml) y 400 µl de SDS al 10%. La suspensión se incubó con agitación por 10 h a 45 ° C.

Finalizado el tiempo de incubación se adicionó a la suspensión celular 1ml de NaCl 6M y se agitó vigorosamente. Los precipitados se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min. Finalizada la centrifugación se recolectó y centrifugó el sobrenadante a 3500 rpm por 15 min.

La operación de centrifugación y recolección del sobrenadante se realizó por triplicado.

Una vez concluidas las operaciones de cetrifugación, el ADN contenido en el sobrenadante se precipitó adicionando una parte equivalente a 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y una parte equivalente a 3 volúmenes de isopropanol.

El precipitado se lavó con 13 ml de EtOH al 70% por 2 horas. El ADN se lavó y resuspendió en agua mili Q. Finalmente la cuantificación y pureza del ADN se determinó con equipo Nanodrop.

1.3.2 Reacción del ADN con Bisulfito

El tratamiento de DNA con el bisulfito de sodio se realizó con el producto comercial Epiect Bisulfite (Qiagen Cat 59104), siguiendo los pasos descritos en el manual de este producto: 2 μg de DNA se llevaron a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, se adicionaron 85 μl de una solución 5.4 M de bisulfito de sodio y 35 μl de una solución amortiguadora protectora del ADN. La mezcla de reacción se sometió al siguiente programa de temperaturas:

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	25 min	60°C
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	85 min	60°C
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	175 min	60°C

Tabla 2: Condiciones de tiempo y temperatura para la reacción del ADN con el bisulfito de sodio.

Una vez finalizado el protocolo de temperaturas se añadió a la muestra una solución con tiocianato de guanidina y la mezcla se hizo pasar por una columna de afinidad provista en el estuche de reactivos de Quiagen. Posteriormente se realizó un lavado con 500µl de una solución BW y se procedió con la reacción de desulfonación adicionando a la columna 500 µl de una solución de NaOH y se dejó incubar por 15 min a temperatura ambiente. Concluida la reacción, la muestra se lavó con el buffer BW por duplicado y finalmente la muestra fué eluida con 40 µl de agua mili Q.

1.3.3 Amplificación de los genes de estudio

Los oligonucleótidos usados para amplificar las regiones reguladoras de los genes de estudio fueron diseñados para amplificar

exclusivamente DNA tratado con bisulfito. Debido a que los oligonucleótidos diseñados para amplificar DNA tratado con bisulfito presentan una eficiencia baja de amplificación no es posible mandar a secuenciar los productos de PCR directamente con estos oligos.

Por este motivo los primers para amplificar DNA tratado con bisulfito se diseñaron con una cola M13 en el extremo 5' (Figura 9). Los primers M13 son comúnmente usados en reacciones de secuenciación. Los productos de PCR y clonas evaluadas en este trabajo de investigación se mandaron a secuenciar directamente con los primers M13.

5'-- TGTAACGACGGCCAGT TTTT TAGTTTTTTTAGGTTTAA--3'

Primer M13

Oligo diseñado para amplificar

DNA tratado con bisulfito

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con el producto comercial Platinum Taq High Fidelity (Invitrogene Cat 11304) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las condiciones de temperatura y tiempo de las reacciones de PCR para todos los casos fueron las siguientes:

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95°C	1 min
35 ciclos	95°C	1 min
	58°C	1 min
	72°C	1min
1 ciclo	72°C	10min

Tabla 3: Condiciones de tiempo y temperatura usadas en la amplificación de DNA tratado con bisulfito.

1.3.4 Purificación de los productos de PCR.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa y se procedió a cortar la banda correspondiente. El DNA se extrajo de la agarosa empleando el producto comercial Purelink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogene # Cat K2100-12) siguiendo todas las instrucciones descritas por la casa comercial. Los productos de PCR se mandaron a secuenciar con los primers M13.

1.3.5 Clonación de los productos de PCR mediante tecnología método TA

10 µg de plásmido PUC 19 se digirieron con 10 unidades de la enzima SMAI (Invitrogen # Cat 15228-018) a una temperatura de

30°C por una hora. La digestión de la enzima se verificó mediante un gel de agarosa al 1.0%. Posteriormente la enzima se inactivó y el plásmido digerido se pasó por una columna de afinidad del estuche de los reactivos del producto comercial PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogene # Cat K2100-12) siguiendo toda las instrucciones de la casa comercial a partir del inicio de la cromatografía en columna. El plásmido digerido Puc 19 se eluyó con 50 µl de H₂O mili Q.

Posteriormente se realizó la siguiente mezcla de reacción: 50 µl del plásmido Puc19 digerido + 10 µl de buffer para PCR 10x + 5 µl de MgCl₂ 50 mM + 1 µl dTTP 100 mM + 5 unidades de Amplificasa Taq-DNA- polimerasa (Biogénica) + 33 µl de H₂O. La mezcla de reacción se incubó por 2 h a 72 ° C.

Finalizada la incubación el plásmido PUC19 se pasó por una columna de afinidad del estuche de 3 reactivos del kit comercial PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogene # Cat K2100-12) siguiendo toda las instrucciones de la casa comercial a partir del inicio de la cromatografía en columna. El plásmido digerido Puc 19 se eluyó con 50 µl de H₂O mili Q.

Una vez purificado el plásmido Puc19 se realizó la siguiente mezcla de reacción: 44 µl del plásmido Puc19 digerido + 5 µl de solución amortiguadora de ligasa 10X + 3 unidades de T4 DNA ligasa (Invitrogene Cat: 15224-017). La mezcla de reacción se incubó a 16 °C toda la noche.

La mezcla de reacción se corrió en un gel de agarosa al 1.2 % y se recortó la banda correspondiente al plásmido Puc19 digerido. La extracción del plásmido Puc 19 del gel de agarosa se llevó a cabo con el estuche de reactivos del producto comercial PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogene # Cat K2100-12) siguiendo todas las descripciones de la casa comercial.

Finalmente se llevó a cabo la ligación la reacción de ligación entre el plásmido Puc19 digerido con las colas de timidina y los productos de PCR. La mezcla de reacción fue la siguiente:

50 ng de vector Puc19 con colas de timidina + 7 ng del producto de PCR ≤ 2µl(recién purificado) + 1µl de solución amortiguadora de ligación 10x + 3U de DNA ligasa (Invitrogene Cat: 15224-017) y completar un volumen de 10µl con agua esteril. La mezcla de reacción se incubó a 14° C por 16 h.

1.3.6 Transformación en Células DH5 α

Células competentes de la línea e DH5 α se descongelaron y se les adicionaron 2 μ l de la mezcla de reacción producto de PCR – plásmido puc 19. La suspensión celular se incubó por 30 min en hielo. Posteriormente las células se sometieron a un shock térmico de 30 seg a 42°C e inmediatamente se incubaron en hielo por 2 min. Finalizado el tiempo de incubación se les añadió a las células 2 ml de medio LB sin antibiótico y se incubaron por 1 h a 37° C con agitación. Concluida el tiempo de incubación un volumen de 100 μ l fue sembrado en platos de agar LB con ampicilina, Xgal e IPTG. Los platos se incubaron toda la noche y al día siguiente se observó la presencia de colonias blancas.

Se tomó una pequeña porción de las colonias blancas y se adicionó a una mezcla de reacción de PCR para verificar la presencia del inserto (se utilizaron primers para amplificar el promotor de Nanog). Las PCRs positivas para la expresión del inserto se reamplificaron utilizando los primer M13-Nanog. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, se recortó la banda correspondiente y el producto de PCR se extrajo del gel de agarosa con el estuche de reactivos del producto comercial PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogene # Cat K2100-12). Los productos de PCR se mandaron a secuenciar con los primers M13.

1.3.7 Secuenciación de los productos de PCR

Las clonas y los productos de PCR fueron mandados a secuenciar en un equipo Applied Biosystems modelo M300 utilizando los primers M13.

1.4 Metodología de las Reacciones de PCR Tiempo Real

1.4.1 De la extracción del RNA

Las células de NCCIT se cultivaron en pozos de 3.5 cm de diámetro; posterior a su tratamiento se retiró el medio, se lavó con PBS1X y se añadió 1ml de reactivo Trizol (Invitrogene Cat 10296). La mezcla se pipeteó para promover la lisis celular y el homogenizado se dejó incubar por 5 minutos. Concluido el tiempo de incubación se adicionaron 0.2 ml de cloroformo y el homogenizado se agitó vigorosamente por 15 seg. La mezcla se incubó 3 minutos a temperatura ambiente previo a una centrifugación de 12,000 x g por 15 min a 4°C. Una vez concluida la centrifugación se aisló la fase acuosa y se adicionó un volumen de 500 µl de isopropanol. La muestra de RNA se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos e inmediatamente se procedió a centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C. El precipitado de RNA se lavó con 1 ml de EtOH al 75%, la operación de lavado se realizó por duplicado centrifugando a 7,500 por 5 min a 4°C entre cada lavado. Consecutivamente se

procedió a secar el RNA y la muestra fue resuspendida en agua libre de RNAasas. Por último la integridad del RNA fue evaluada en un gel de agarosa.

1.4.2 Tratamiento con DNAsas

El RNA se cuantificó en Nanodrop y se ajustaron las concentraciones de acuerdo a lo requerido por el protocolo de la enzima comercial DNase I, Amplification Grade (Invitrogene # Cat 18068-015). Posterior al tratamiento con DNase se corrió el RNA en un gel de agarosa para ver su integridad y se volvió a cuantificar ocupando el dispositivo tecnológico de cuantificación Nanodrop.

1.4.3 Reacción de QPCR.

Las reacciones de PCR tiempo real se procesaron con el producto comercial Quantifast SYBR Green RT-PCR Kit(Qiagen # Cat 204054) . El volumen de reacción en todos los casos fue de 10 μ l y la cantidad de RNA fue de 15 ng. Todas las reacciones de QPCR se trabajaron a partir de la derivación de mezclas stock. El gen de housekeeping ocupado en todas las reacciones fue la β -actina. El equipo tecnológico de termociclación de tiempo real ocupado fue

Rotorgene y las condiciones de tiempo y temperatura se describen a continuación.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	50°C	15 min
1	95°C	5 min
30	95°C	10 seg
	60°C	30seg

Tabal 4: Condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en las reacciones de QPCR.

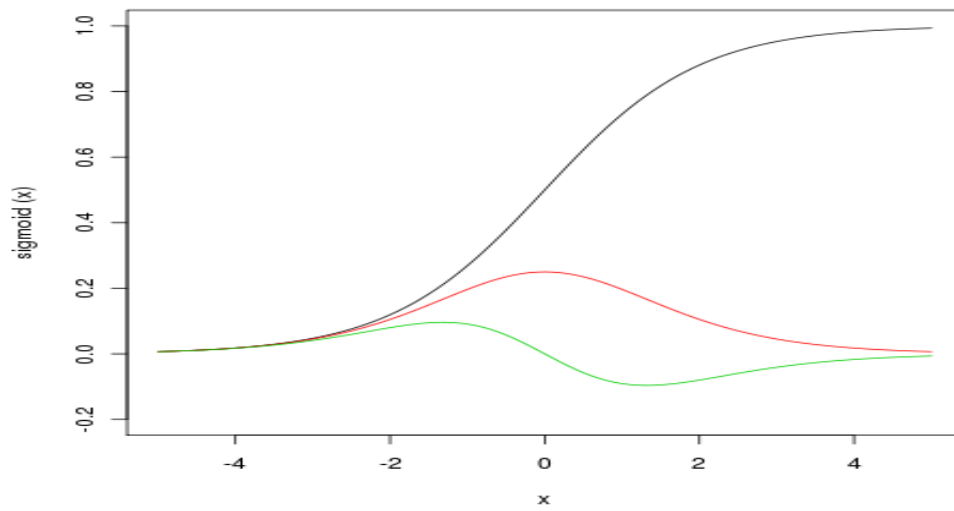
1.4.4 Del análisis de los resultados de QPCR

De forma general existen 2 métodos para establecer o determinar el valor de ciclo, dentro de la fase exponencial de la reacción de PCR, que se utilizará para el análisis cuantitativo.

El método de Ct consiste en trazar una línea horizontal general sobre la fase exponencial de todas las funciones sigmoidales descritas por la reacción de PCR en un gráfico de número de ciclos vs florecencia. El trazo de esta línea basal de amplificación está bajo el criterio del usuario.

El método de C_p consiste en determinar la segunda derivada de las funciones sigmoideas descritas en las reacciones de PCR. Una vez que se tiene la segunda derivada se determina el máximo de esta función. Conceptualmente el máximo de la segunda derivada indica el valor de ciclo exacto en donde la amplificación exponencial no puede ser sostenida y la amplificación toma un crecimiento lineal [78]. Una variación de esta metodología es el punto de despegue o Takeoff, este punto está definido como el 20 % del valor del máximo de la segunda derivada sobre el eje de la fluorescencia. Interpolando este valor sobre el eje de los ciclos se obtiene el valor de ciclo exacto de la transición ruido crecimiento exponencial [79].

En este trabajo se optó por usar el valor de “takeoff” para determinar los valores de C_p .



- Función sigmoidal
- Primera derivada de la función sigmoidal
- Segunda derivada de la función sigmoidal

Figura 9: La función sigmoidal y sus derivadas.

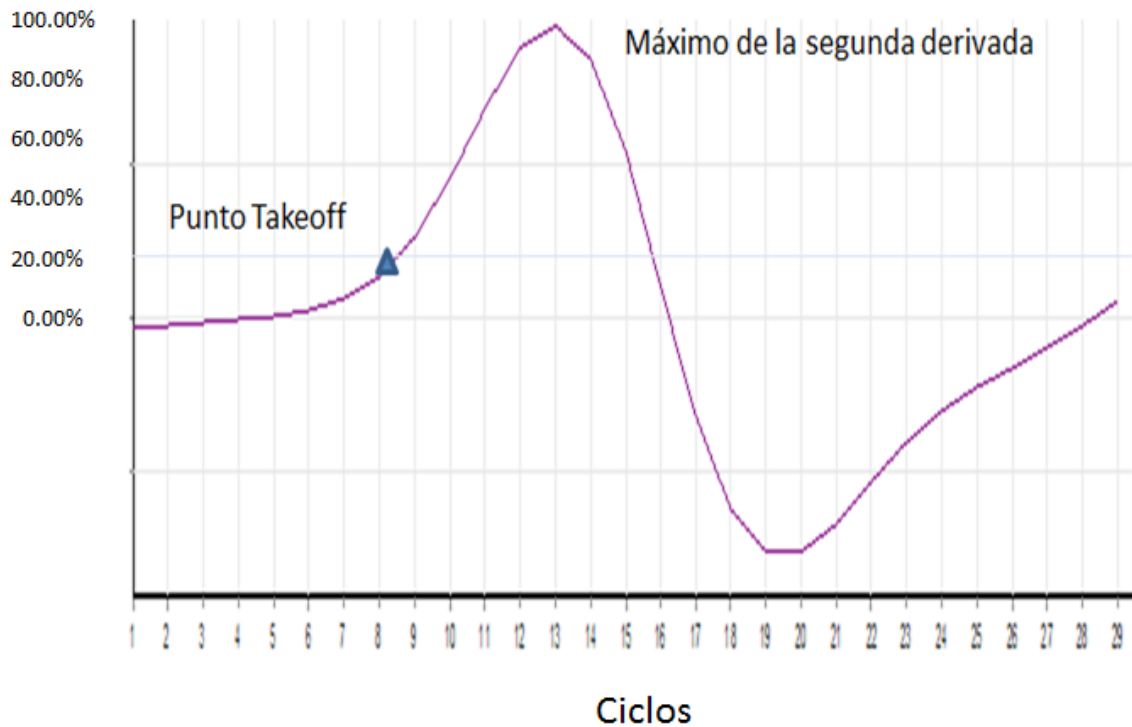


Figura 10: La segunda derivada y el punto de takeoff.

El gen constitutivo elegido para los experimentos de tiempo real fue la β actina y la normalización de los datos se procesó con el método de $2^{\Delta\Delta C_t}$. Sin embargo cuando se presentaron diferencias en la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos se optó por usar la ecuación de Pfaffl [80].

$$R = \frac{(E_{\text{gen de estudio}})^{\Delta C_P(\text{control-muestra})}}{(E_{\text{gen de referencia}})^{\Delta C_P(\text{control-muestra})}}$$

1.5 Ensayos de Apoptosis

Los ensayos de apoptosis se realizaron determinando la expresión de caspasa 3 activa mediante ensayos de “Western Blot”.

1.5.1 Lisis Celular

Células NCCIT con diferentes tratamientos fueron lisadas con buffer RIPA de acuerdo a la siguiente descripción: platos de cultivo con células NCCIT fueron colocados en hielo para evitar la degradación de proteínas, se aspiró el medio de cultivo y los platos se lavaron con PBS 1X, posteriormente se drenó la solución de PBS 1X y se adicionaron 500 μ l de solución amortiguadora Ripa. Las células fueron despegadas por medio de un gendarme y transferidas a un tubo eppendorf frio. El tubo eppendorf se mantuvo con agitación constante por 30 min a 4°C.

1.5.2 Electroforesis

Los lisados celulares fueron hervidos en solución amortiguadora Laemmli por 5 minutos y posteriormente 15 μ g de proteína se corrieron un gel de

poliacrilamida al 15 % con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) utilizando como solución amortiguadora de corrida Tris-Glicina 1X.

1.5.3 Inmunodetección en membrana

Una vez realizada la separación de proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (BioRad, Cat.: 162 0177) de acuerdo al siguiente procedimiento: el gel de poliacrilamida se equilibró durante 15 min en solución amortiguadora de Transferencia; la membrana de PVDF se humedeció durante 5 min en metanol, y posteriormente se equilibró durante 10 min en solución amortiguadora de transferencia; se armó el sándwich de transferencia sobre una cámara de transferencia semi-seca Hoefer TE 70 (Amersham Biosciences), colocando 3 capas de papel filtro del tamaño del gel, previamente humedecido en Buffer de Transferencia, seguidas de la membrana de PVDF, el gel, y otras 3 capas de papel filtro. Las condiciones de transferencia se establecieron en base a las especificaciones del fabricante.

Concluida la transferencia, la membrana se bloqueó con solución amortiguadora TTBS-leche 5% utilizando leche descremada (Svelty, Nestlé®) durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación.

Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente: anticuerpo primario anti-caspasa 3 activa (ABCAM,

catálogo AB13847) por 6 h a una dilución 1:1000 en solución amortiguadora TTBS-leche 1%, a temperatura ambiente con agitación ó el anticuerpo primario Anti -GAPDH clona 6C5 (Millipore, Catálogo CB1001) a una dilución 1:7500 por 1 hora.

Concluido el tiempo de incubación del anticuerpo primario, la membrana se lavó con TTBS-leche 1% por 3 veces, durante 10 min, a temperatura ambiente con agitación.

Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente: anticuerpo secundario anti-conejo IgG- HRP (Abcam catálogo ab6721) ó el anticuerpo secundario anti-ratón HRP (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo sc-2005) a una dilución 1:10000 en TTBS-leche 1% durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación.

La membrana se lavó con buffer TTBS 3 veces, 10 min por lavado y la señal fue desarrollada utilizando el kit SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat.:34095) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y utilizando películas X-OMAT (Kodak, Catálogo 161 1342).

1.5.4 Remoción de anticuerpos de la membrana

Para reutilizar una membrana previamente sometida a inmunodetección de proteínas, la membrana se lavó durante 5 min en agua destilada; posteriormente se trató con Solución de “Stripping” durante 30 min a 50° C, se enjuagó 2 veces con agua destilada y se lavó durante 15 min con agua destilada; posteriormente se prosiguió con el protocolo de inmunodetección descrito anteriormente, retomando el procedimiento desde el bloqueo de la membrana con TTBS-leche 5%.

1.6 Sobreexpresión forzada de los Genes Oct4, Sox2, Klf4 y Sox2 en células NCCIT mediante la infección con el vector lentiviral OKSIM.

El vector policistrónico OKSIM comprende a los genes Oct4, Klf4, Sox2 y cMyc. Este vector no cuenta con genes de resistencia a puromicina ni con un gen reportero de GFP. De tal forma la producción e infección lentiviral del vector OKSIM se trabajó en paralelo con la producción e infección lentiviral de un vector de EGFP. El procedimiento de producción viral e Infección se describen a continuación:

1.6.1 Producción de vectores lentivirales utilizando lípidos catiónicos

Células 293T (ATCC número de catálogo CRL-11268) se descongelaron y se cultivaron en medio DMEM-F12 + piruvato suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Una vez que las células alcanzaron un 80 % de confluencia se tripzinizaron y se pasaron a platos de 100 mm en medio DMEM-F12 (+piruvato) + SFB 10%. Cuando las células alcanzaron una

confluencia del 70% se adicionó nuevo medio DMEM-F12 (+piruvato) + SFB 10% y dos horas después se preparó la mezcla de la transfección que comprende. 6 mL de medio DMEM-F12 alto en glucosa, plásmidos de envoltura, empaque y vector genómico en una proporción de 1:3:4 a un total de 35 ug (envoltura 5ug, empaque 12 ug y el vector genómico correspondiente OKSIM o GFP 18 ug) y 90 ul de reactivo TransFast (Promega # E2431) a 1ug/ul de stock. Después de adicionar el Transfast se agitó en vórtex a la mezcla de transfección y se incubó durante 15 min. Posterior a la incubación se retiró el medio de cultivo de las células 293T, se dio un vortex rápido a la mezcla de transfección y se adicionaron los 6ml de la mezcla de transfección a cada plato y se incubaron durante 1 h a 37°C, 5% CO₂.

Concluida la hora de incubación se adicionaron 12 mL de medio DMEM-F12 + FBS al 7.5% a la mezcla de transfección contenida en cada plato (concentración final de FBS será 5%) y se realizó una incubación de los platos por 12 h a 37°C, 5% CO₂.

Una vez terminada la incubación se retiró la mezcla de transfección y se adicionaron 12 ml de medio DMEM-F12 con FBS al 5% y se realizó una incubación de 24 h 37 °C, 5% CO₂.

Posterior al periodo de incubación se procedió a realizar las cosechas del virus. El sobrenadante de cada plato se recuperó en tubos de 50 ml y se

adicionaron a los platos de células 293T 12 ml de medio fresco con suero al 5%. Los sobrenadantes virales se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

Después de 12 h de incubación se realizaron 3 nuevas cosechas bajo las mismas condiciones señaladas en el punto anterior. El volumen final de cosecha viral se filtró con filtros de 0.45 μm y se almacenó a 4°C hasta su uso.

1.6.2 Transducción de células con el vector lentiviral

A células NCCIT con diversos tratamientos cultivadas en multipozos de 6 con medio RPMI y SFB al 10% se les retiró el medio y se les adicionó 2ml del sobrenadante lentiviral correspondiente (GFP u OKSIM), SFB al 5% y polibreno a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$.

Las células NCCIT con sobrenadante viral se incubaron por 24 h a 37°C, 5% CO₂. Una vez concluido el tiempo de infección se revisó la expresión de GFP en el control de infección. A 4 pozos de células NCCIT infectadas con el vector lentiviral OKSIM se les retiró el sobrenadante de infección y se les adicionó nuevo medio RPMI y SFB al 10% y se esperó un tiempo de 72 h antes de extraer el RNA para la evaluación de la sobreexpresión de los genes de pluripotencia Oct4, Sox2, Nanog y P21. Los otros pozos de las células NCCIT infectadas con el vector policistrónico OKSIM se tripsinizaron

y se pasarón a platos de 10 mm de diámetro para su expansión y futuro xenotransplante en ratones atímicos.

1.7 Formación de Teratomas

Células NCCIT con diversos tratamientos fueron tripzinizadas y resuspendidas en 8 ml de medio RPMI con suero fetal bovino al 10%. El número de células NCCIT fue determinado con la cámara de Neubauer discriminando células vivas o muertas mediante el uso del reactivo azul de tripano. Una vez que se determinó el número de células por ml se ajustaron los volúmenes para tener el mismo número de células por experimento de xenotrasplante. Las células NCCIT fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 min y resuspendidas en 120 μ l de solución amortiguadora PBS 1X.

Ratones atímicos de la cepa FOXN1NU de 5 semanas de edad fueron inyectados con 100 μ l de suspensión celular en forma subcutánea en la zona dorsal a la altura de la cadera. Finalizado el xenotrasplante los ratones fueron criados en el bioterio.

Resultados

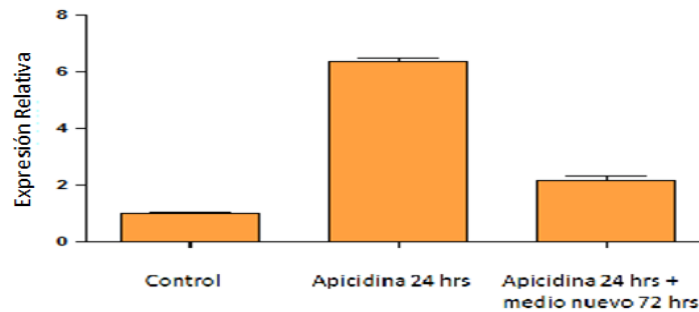
Cambios en la expresión relativa del gen P21 e inducción de apoptosis al tratar a las células NCCIT con apicidina

Es aceptado que la administración de apicidina al igual que otros iHDACs aumenta la expresión del gen P21 e induce apoptosis en diversas líneas de cáncer. Con la finalidad de observar si la apicidina también ejercía estos efectos en la línea NCCIT, se determinaron los cambios en la expresión relativa del gen P21 al igual que la inducción de apoptosis al tratar a las células NCCIT con apicidina.

Las condiciones experimentales de este estudio comprenden células NCCIT sin tratamiento (control), células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h seguidas de un cambio de medio y un tiempo de espera de 72 h después posterior al retiro del tratamiento de apicidina.

La expresión relativa del gen p21 se determinó mediante qPCR normalizando los datos con el gen de housekeeping β actina. En los análisis de qPCR se observa un incremento del 500% en la expresión relativa del gen P21 al tratar a las células NCCIT con apicidina 1 μ M por 24 h con respecto a las células NCCIT control, a las 72 h después de retirar el tratamiento apicidina la expresión de P21 es el doble con respecto a las células NCCIT control (Figura 11).

Efectos de Apicidina: Aumento de la Expresión de P21 su Reversibilidad



Gráfica 1: Expresión relativa del gen P21 en células NCCIT sin tratamiento, células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h seguido de un cambio de medio y un lapso de espera de 72 h antes de la extracción de RNA.

Al igual que otras líneas celulares de cáncer la apicidina aumento la expresión de P21 en el sistema celular NCCIT, la inducción de este gen está relacionado con la inhibición del ciclo celular y por ende con una caída del índice de proliferación. La apicidina mantiene sobrepresado al gen P21 en la línea celular NCCIT inclusive después de retirar el tratamiento.

La inducción de apoptosis se determinó mediante Westerblot, utilizando el anticuerpo anti-caspasa 3 activa. En estos experimentos se observa la expresión de caspasa 3 activa a las 24 h después de haber tratado a las células NCCIT con apicidina 1 μ M. A las 72 h después de haber retirado el tratamiento de apicidina, las células NCCIT dejan de expresar caspasa 3 activa (Figura 11F).

Estos resultados concuerdan con la morfología de las células NCCIT durante el tratamiento. Posterior a la administración de apicidina 1 μ M por 24 h las células

NCCIT adquirieron un aspecto de células muertas y se observó un gran número de células despegadas del medio de cultivo. A las 24 h después de haber retirado el tratamiento con apicidina las células NCCIT ya no presentaban una morfología de células muertas. A los tiempos de 48 y 72 h posteriores al retiro del tratamiento con apicidina las células presentan una morfología similar a las células NCCIT control (Figura 10).

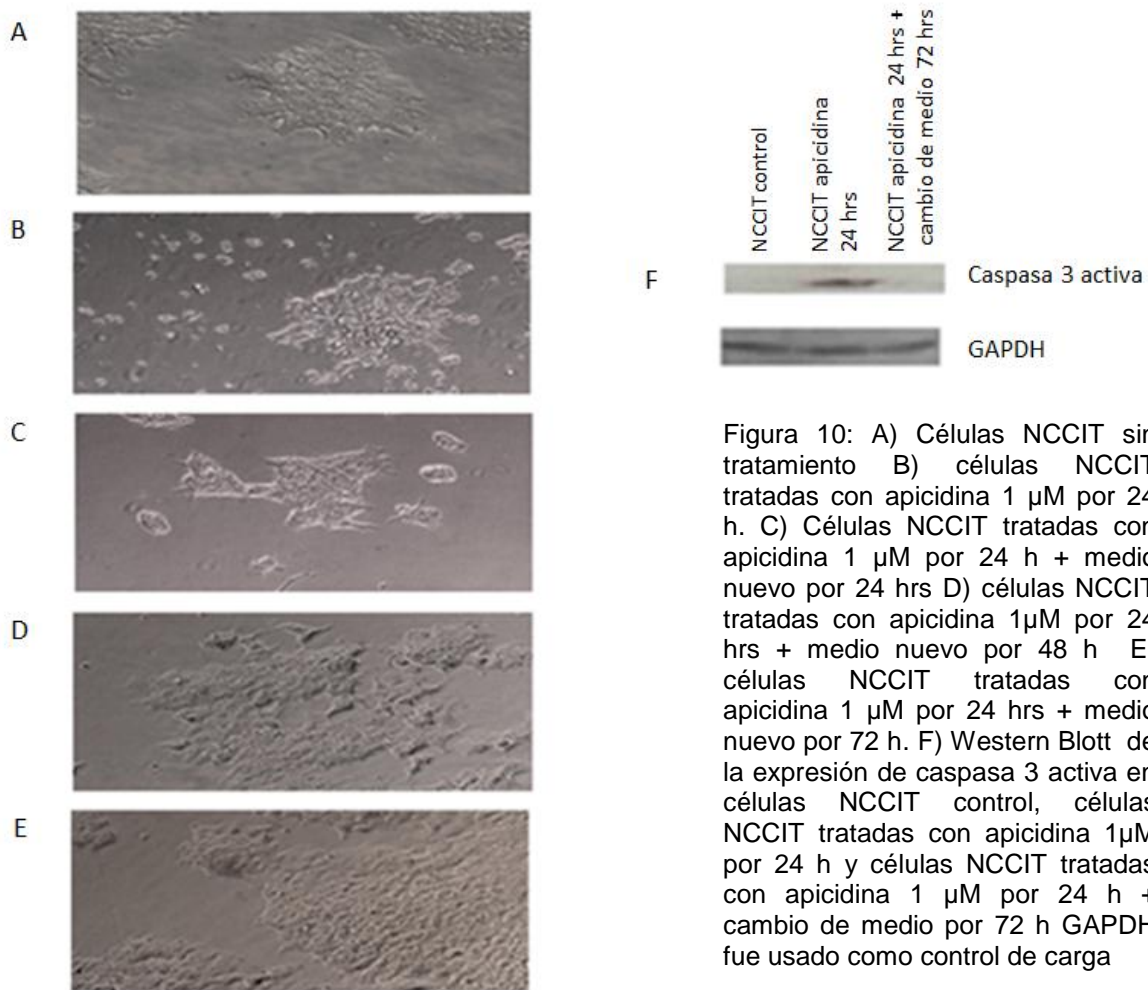
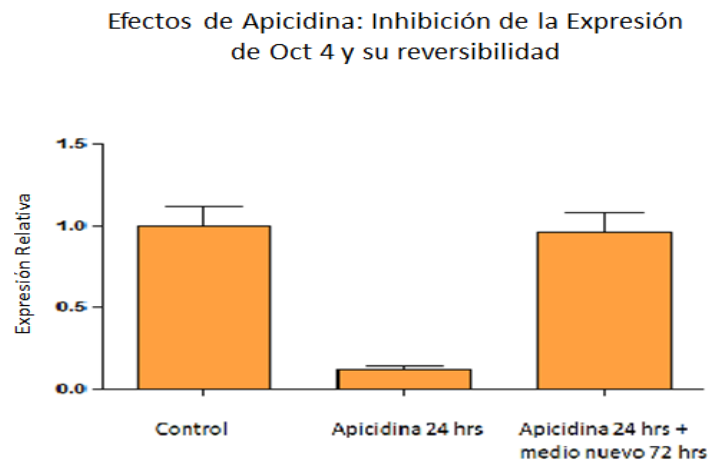


Figura 10: A) Células NCCIT sin tratamiento B) células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h. C) Células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h + medio nuevo por 24 hrs D) células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs + medio nuevo por 48 h E) células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs + medio nuevo por 72 h. F) Western Blott de la expresión de caspasa 3 activa en células NCCIT control, células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h + cambio de medio por 72 h GAPDH fue usado como control de carga

Cambios en la expresión relativa de los genes Oct4, Sox2 y Nanog/p8.

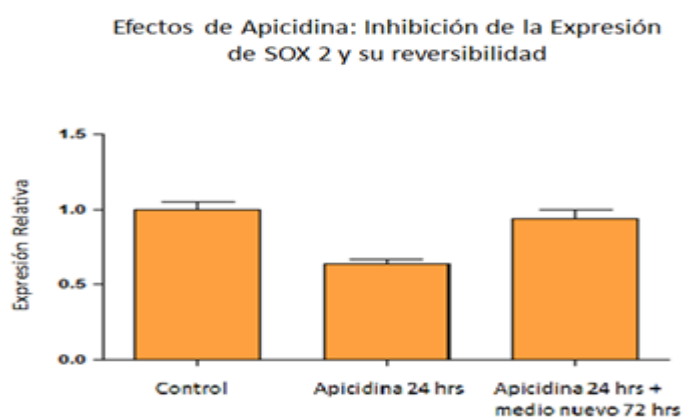
Los cambios en la expresión relativa de los genes Oct4, Sox2 y Nanog/P8 fueron evaluados en 3 condiciones experimentales: células NCCIT sin tratamiento (control), células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h seguidas de un cambio de medio y un tiempo de espera de 72 hrs después posterior al retiro del tratamiento de apicidina

La expresión relativa de los genes Oct4, Sox2, Nanog/P8 se determinó mediante qPCR normalizando los datos con el gen de housekeeping β actina. En los análisis de QPCR se observa una menor expresión del gen Oct4 en las células NCCIT tratadas con apicidina por 24 h con respecto a las células NCCIT control. La expresión de Oct-4 en células NCCIT 72 h después de haber retirado el tratamiento con apicidina es similar a la del control (Gráfica 2).



Gráfica 2: Expresión relativa del gen Oct-4 en células NCCIT sin tratamiento, células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs seguido de un cambio de medio y un lapso de espera de 72 h antes de la extracción de RNA. .

La expresión relativa del gen SOX2 disminuye aproximadamente un 40% después de administrar las células NCCIT con apicidina por 24 hrs con respecto a las células NCCIT control. A las 72 hrs después de retirar el tratamiento con apicidina la expresión relativa de Sox2 es similar al de las células NCCIT sin tratamiento. (Gráfica 3).



Gráfica 3: Expresión relativa del gen SOX 2 en células NCCIT sin tratamiento, células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs seguido de un cambio de medio y un lapso de espera de 72 hrs antes de la extracción de RNA.

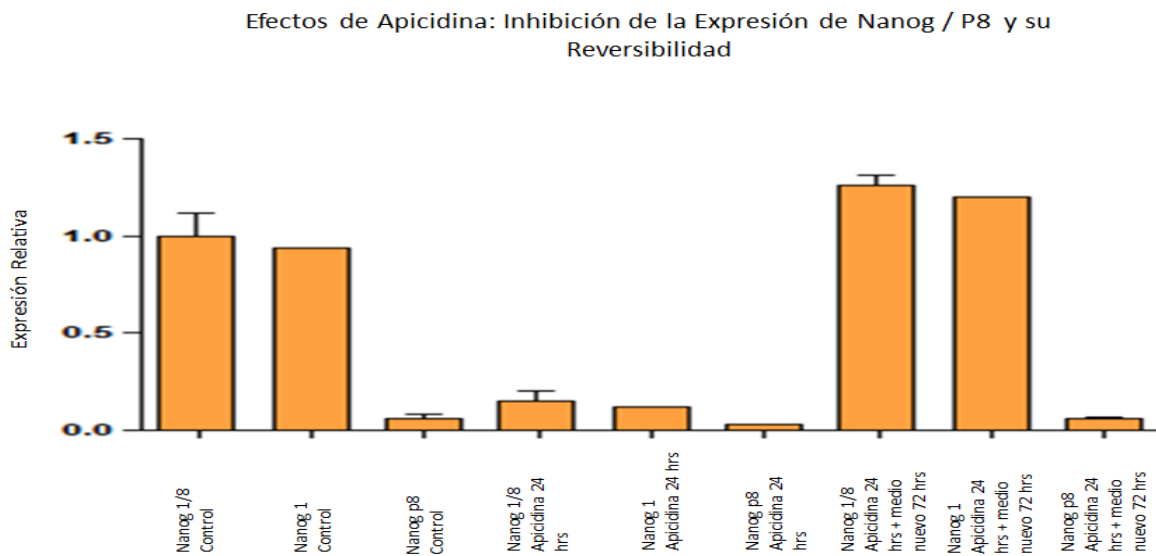
El sistema biológico NCCIT al igual que otras líneas de células troncales de cáncer expresa las dos isoformas de Nanog: Nanog1 y NanogP8. Mediante el uso de primers que amplifican Nanog1/P8 y primers que amplifican específicamente NanogP8 se determinó mediante qPCR que la isoforma predominante en la línea celular NCCIT de Nanog, corresponde a Nanog1 (Gráfica 4).

La expresión relativa de Nanog1 evaluada mediante qPCR, disminuye considerablemente después de administrar las células NCCIT con apicidina por 24

hrs con respecto a las células NCCIT sin tratamiento. A las 72 hrs después de retirar el tratamiento con apicidina la expresión relativa de Nanog1 es similar al de las células NCCIT sin tratamiento (Gráfica 4).

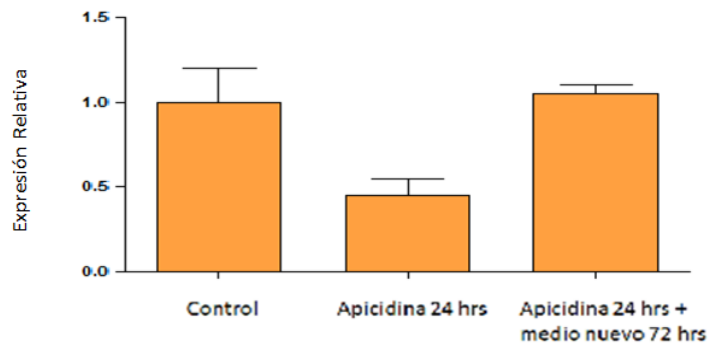
La expresión de NanogP8 es disminuida alrededor de un 50% con el tratamiento de apicidina y su expresión 72 h después de retirar el tratamiento con apicidina es similar a los de las células NCCIT control (Gráfica 4 y 5).

Aunque la apicidina disminuye la expresión de las dos isoformas de Nanog: Nanog1 y Nanog P8, la disminución en la expresión de la isoforma NanogP8 no es similar a la disminución en la expresión de Nanog1. Esto puede explicarse si se considera que estas dos isoformas presentan promotores distintos.



Gráfica 4: Expresión relativa de los genes Nanog 1/8, Nanog1 y Nanog p8 en células NCCIT sin tratamiento, células NCCIT tratadas con apicidina 1 μM por 24 hrs y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μM por 24 h seguido de un cambio de medio y un lapso de espera de 72 h antes de la extracción de RNA. Los datos se encuentran normalizados con respecto a la expresión de Nanog1/P8 del control.

Efectos de Apicidina: Inhibición de la Expresión de Nanog P8 y su reversibilidad



Gráfica 5: Expresión relativa del gen Nanog P8 en células NCCIT sin tratamiento, células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs seguido de un cambio de medio y un lapso de espera de 72 hrs antes de la extracción de RNA. Los datos se encuentran normalizados con respecto a la expresión de NanogP8 control.

La expresión de los genes Oct4, Sox2 y Nanog/P8 es disminuida después de administrar apicidina 1 μ M por 24 h. Bajo la perspectiva de células troncales de cáncer – factores de pluripotencia el efecto inhibitorio ejercido por el inhibidor de deacetilasas apicidina a la expresión de los genes Oct4, Sox2 y Nanog/P8 representa un efecto negativo al fenotipo de células troncales de cáncer.

Cambios en la expresión relativa de los genes de linaje celular FoxA2, fenotipo de las Olig2, NKX3.1 y BMP4

Se tiene bien establecido la dependencia del estado pluripotente a la expresión y balance estequiométrico de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog en los sistemas celulares pluripotentes HES, IPs y EC.

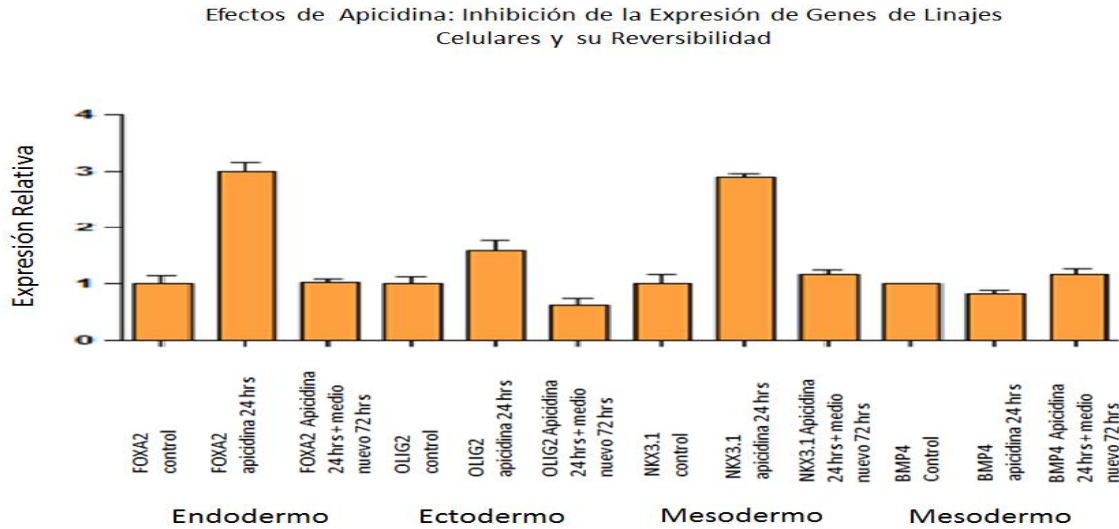
Debido a que la apicidina perturba la expresión de los genes de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog en el sistema biológico NCCIT es lógico esperar que después de la administración de apicidina 1 μ M por 24 h las células NCCIT expresen genes de linajes celulares de las 3 capas embrionarias endodermo, mesodermo y ectodermo.

Con la finalidad de relacionar la disminución de la expresión de los genes de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog con procesos de diferenciación se determinó mediante qPCR la expresión relativa de los genes de linaje celular FoxA2, Olig2, NKX3.1 y BMP4 en las condiciones experimentales que comprenden células NCCIT sin tratamiento (control), células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h seguidas de un cambio de medio y un tiempo de espera de 72 h después posterior al retiro del tratamiento de apicidina.

En estos experimentos se observó un aumento en la expresión de los genes FoxA2, Olig2 y NKX3.1 después de administrar a las células NCCIT con apicidina 1 μ M por 24 hrs. El aumento en la expresión de estos 3 genes concuerda con la disminución de los genes de pluripotencialidad Oct4, Sox2 y Nanog (Grafica 6).

La expresión relativa de los genes Foxa2, Olig2 y NKX3.1 a las 72 h después de retirar el tratamiento de apicidina es similar al de las células NCCIT sin tratamiento, esto también concuerda con la recuperación de la expresión de los genes Oct4, Sox2 y Nanog a las 72 h después de retirar el tratamiento con

apicidina. Por otra parte la expresión relativa del gen BMP4 no varió durante el experimento (Gráfica 6).



Gráfica 6: Expresión relativa de los genes FOXA2, OLIG2, NKX3.1 y BMP4 en células NCCIT sin tratamiento, células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs seguido de un cambio de medio y un lapso de espera de 72 hrs antes de la extracción de RNA .

Reversibilidad del efecto de apicidina ó células NCCIT resistentes a los efectos de la apicidina

La expresión relativa de los genes de pluripotencia y de diferenciación 72 hrs después de haber retirado el tratamiento de apicidina, resultan similares a los de las células NCCIT control, esto puede interpretarse como una recuperación de la expresión de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog o como un incremento de proliferación de una subpoblación población celular resistente a los efectos de arresto celular y de diferenciación de la apicidina.

Los experimentos con un segundo tratamiento de apicidina en donde se compara la expresión relativa de los genes Oct-4, Nanog y P21 en células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h seguido de un cambio de medio por 72 h con respecto a las células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 hrs seguido un cambio de medio por 72 h y un nuevo tratamiento de apicidina 1 μ M por 24 h apoyan la hipótesis de la recuperación de la expresión de los factores de pluripotencia(Figura 11). En estos experimentos se observa un decremento en la expresión de los genes Oct-4 y Nanog a niveles similares a los del primer tratamiento con apicidina. Por otra parte también se observa un incremento en la expresión del gen P21 a niveles similares a los del primer tratamiento con apicidina (Gráfica 7).

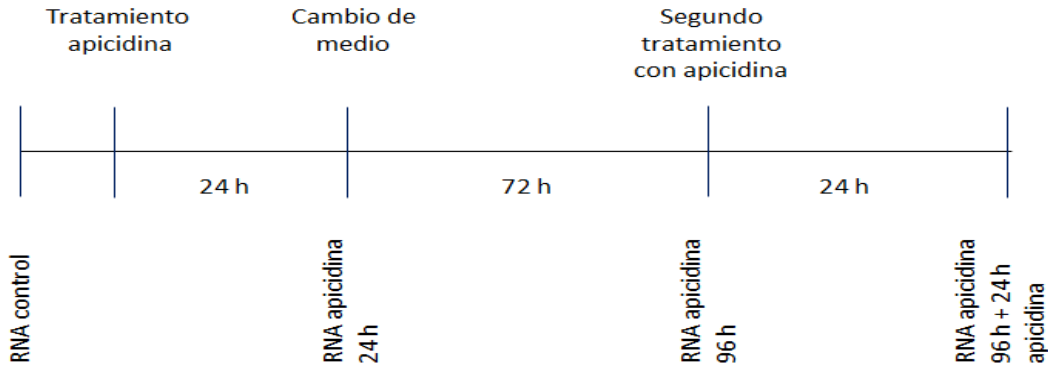
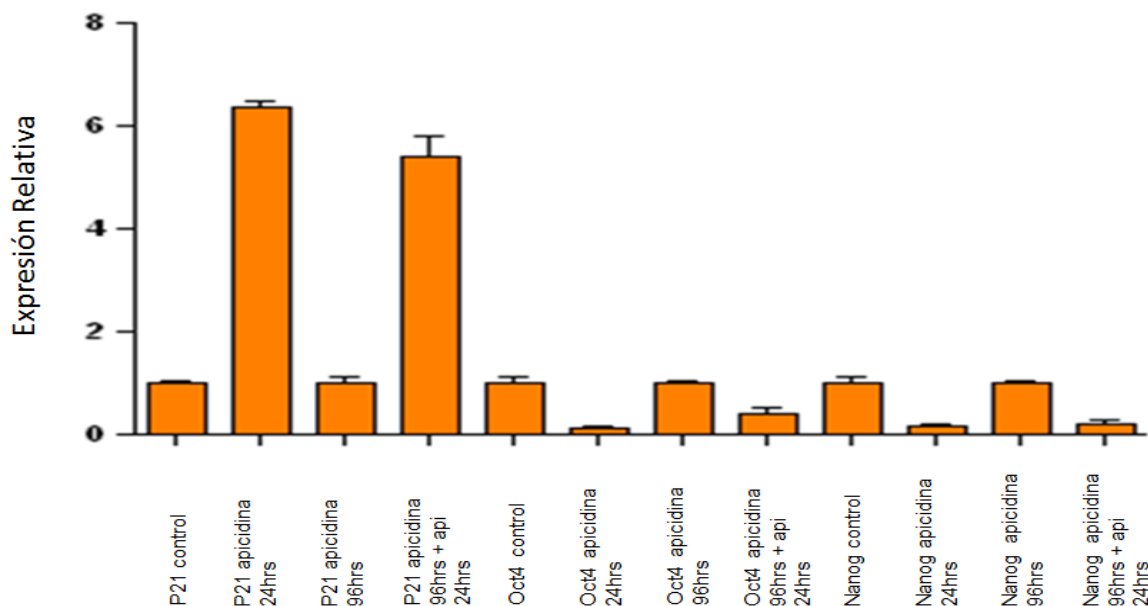


Figura 11: Esquema del experimento reversibilidad o resistencia del efecto de apicidina

Efecto de la Apicidina ¿Reversibilidad o Resistencia?



Gráfica 7: Expresión relativa de los genes Oct-4, Nanog y P21 en células NCCIT control, NCCIT tratadas con apicidina por 24 h y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h + cambio de medio + 72 h, células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h + cambio de medio + 72 h + apicidina 1 μ M por 24 h. Los datos del primer tratamiento con apicidina están normalizados con respecto al control, los datos del segundo tratamiento con apicidina están normalizados con respecto a los datos de la células NCCIT tratadas con apicidina por 24 h +cambio de medio + 72 h.

Evaluación del estado de metilaciones del ADN de regiones reguladoras de los genes Oct4, Sox2 y Nanog.

En los estudios de metilación del ADN se evaluó el estado de metilación de residuos CpG en diversas regiones reguladoras del ADN de los genes Oct4, Sox2 y Nanog. (Fig 12).

Las condiciones experimentales de estos experimentos comprenden células NCCIT sin tratamiento, células NCCIT administradas con apicidina 1 μ M por 24 h y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h seguidas de un cambio de

medio y un tiempo de espera de 72 hrs después posterior al retiro del tratamiento de apicidina.

El estado de metilación fue determinado mediante la metodología de bisulfito de sodio. Como control de esta metodología se usó DNA tratado con bisulfito de células 293T, la región evaluada del control comprende los pares de bases -2073 a -2724 con respecto al sitio de inicio de transcripción (TSS) del gen Oct-4, el patrón de metilación de esta región en la línea células 293T está reportada en la literatura.

Para las reacciones de secuenciación se utilizaron los primers M13 F/R. En la figura 13 se presenta un ejemplo de secuencia de una región amplificada de ADN tratada con bisulfito.

En las 5 clonas del promotor de Nanog evaluadas no se observa ningún residuo CpG metilado en ninguna de las condiciones experimentales. (Figura 14)

En los productos de PCR de las regiones reguladoras de los genes Oct-4 y Sox2 no muestran cambios en el patrón de metilaciones de residuos CpG con respecto a las células NCCIT sin tratamiento (Figura 14).

La ausencia de metilaciones en las regiones reguladoras del ADN sugiere que la epigenética relacionada con el silenciamiento de los genes Oct4, Sox2 y Nanog ejercido por el inhibidor de deacetilasas apicidina está circunscrita a nivel de la cromatina.

Los datos de las metilaciones en residuos CpG concuerdan con la descripción de una recuperación en la expresión de los genes de pluripotencialidad Oct4, Sox2 y Nanog 72 h después de retirar el tratamiento con apicidina, ya que un estado epigenético de CpGs metilados generalmente se asocia a un estado de más difícil reversibilidad con respecto a un estado silenciamiento epigenético asociado únicamente a modificaciones a nivel cromatina [81, 82].

Por otra parte todas las clonas del promotor de Nanog describen un comportamiento homogéneo de las células NCCIT al ser administradas con apicidina. En estos experimentos no se observó una subpoblación de células NCCIT con el promotor de Nanog metilado que pudieran haberse dirigido a un proceso de diferenciación irreversible. Esto sugiere que todas las células en cultivo después de retirar el tratamiento con apicidina están en el estado pluripotente.

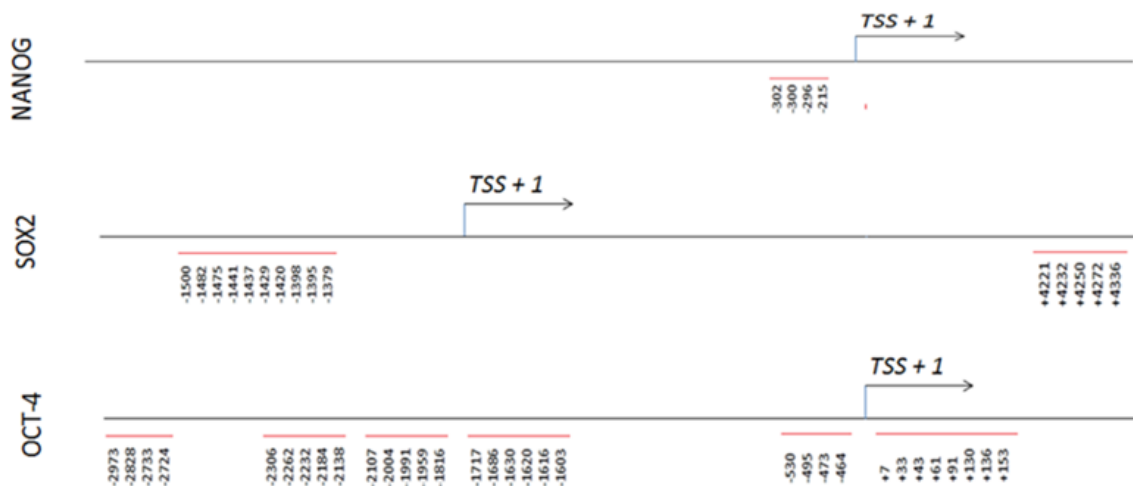
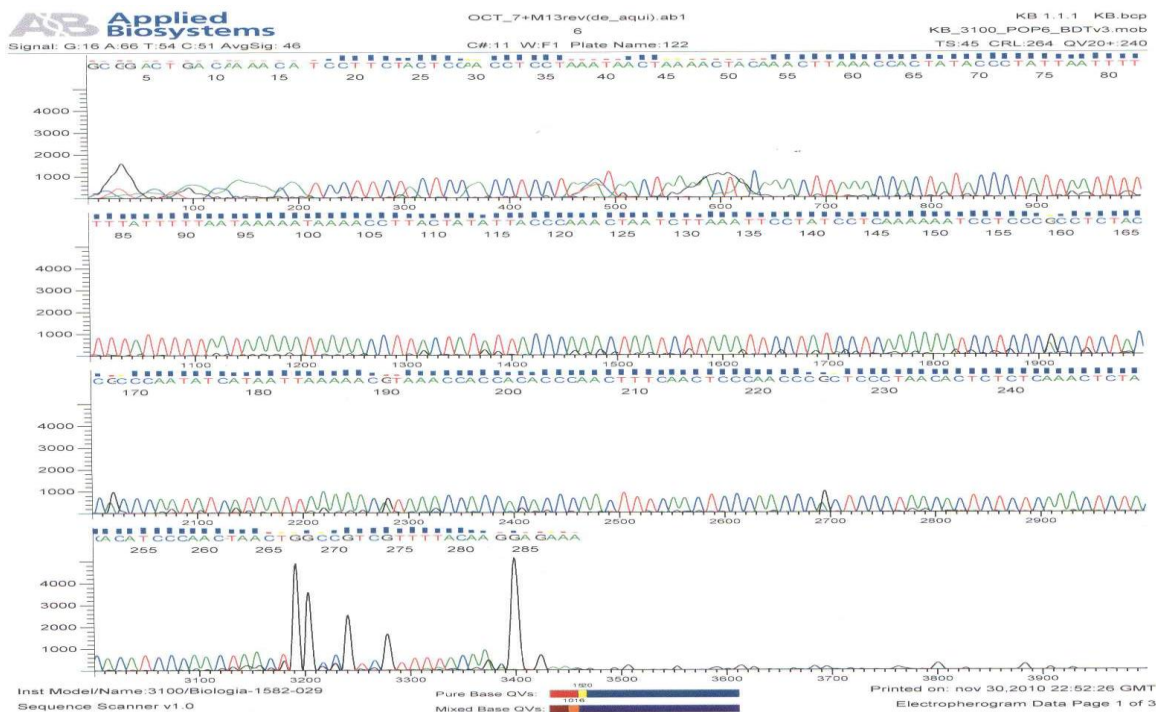


Figura 12: Regiones reguladoras de los genes Nanog, Oct4, Sox2 y sus residuos CpG evaluados en este trabajo experimental. Los números indican los pares de bases de los residuos CpG con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS)

Ejemplo de Análisis del Estado de Metilación del ADN



AGCCTCCTAAG TGGCTGGGA CTACAGGCTT GACCACTGTGCCT
 AACCTCCT AAA TAACTAAA CTACAACTT AACCCTA TACCCT
GTTAGTTTTTTTATTTTAGTAA GATGGGGCCTT GCTATGTTACCCAGGCT
 ATTAATTTTTTTATTTTAAATAA AATAAAACCTT ACTATATTACCCAACT

GCTCTTGAATTCT GTCCCTCA AGAAATCCTCCCTCT CTGCCTCCAGTGTCTGA
 AATCTT AAA TTCT ATCCTCA AAAAACTCTCCCTCT CTACCTCCCAATATGATAA
AAAGGCTGAGCCACCACCCCA ACTTTCAACTCCAA CCTCTCCCTGGCAC TC
 AAAAACT AAACCA CCACCCCA ACTTTCAACTCCAA CCTCTCCCTAACAC TC



Figura 13: Secuencia ilustrativa del estado de metilación de una región reguladora del gen Oct 4. Las letras subrayadas corresponden a las secuencias reportadas en Genbank en modo de secuencia complementaria y antisentido y las letras sin subrayar corresponden al resultado de la reacción de secuenciación. Los resultados de la secuenciación describen 4 residuos CpG metilados. La secuenciación se llevó a cabo con el primer M13 reverse.

Análisis del Estado de Metilación de Regiones Reguladoras de los Genes Oct4, Sox2 y Nanog

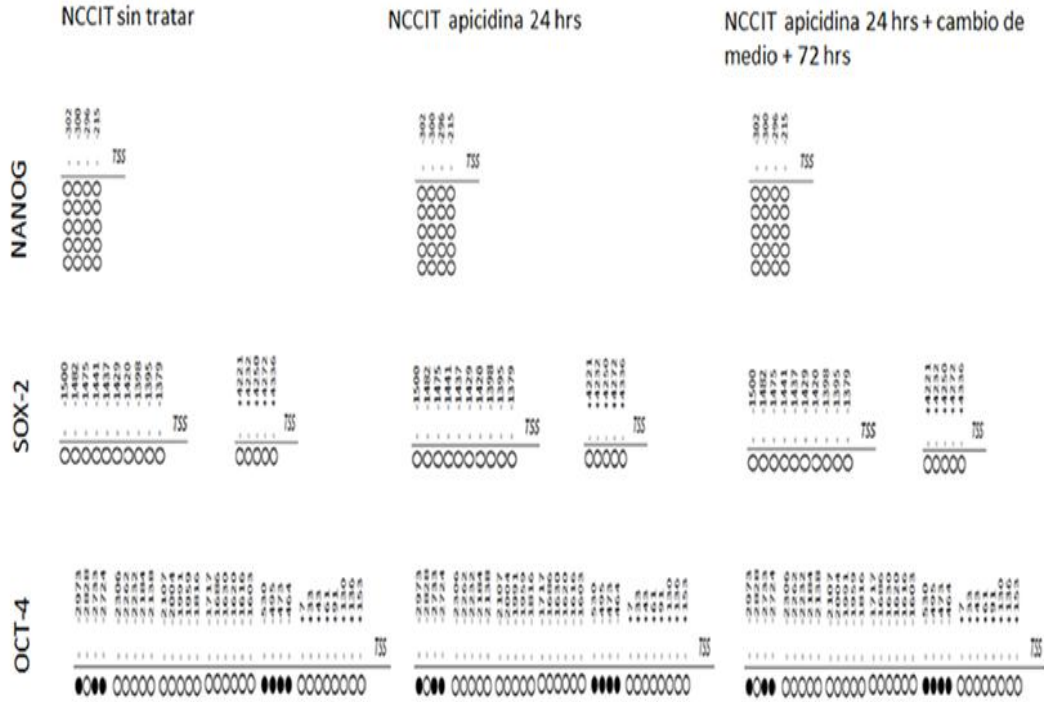


Figura 14: Estado de metilación de regiones reguladoras de los genes Oct4, Sox2 y Nanog en células NCCIT sin tratamiento, células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h y células NCCIT tratadas con apicidina 1 μ M por 24 h seguido de un cambio de medio y un lapso de espera de 72 h antes de la extracción del DNA. Como control de esta metodología se usó DNA tratado con bisulfito de células 293T, la región evaluada del control comprende los pares de bases -2073 a -2724 con respecto al sitio de inicio de transcripción (TSS) del gen Oct-4.

Evaluación del Potencial Tumorigénico.

La evaluación del potencial tumorigénico se realizó mediante xenotransplantes en ratones atímicos de la cepa FOXN1NU de 5 semanas de edad. Las condiciones experimentales de la evaluación del potencial tumorigénico comprenden: células NCCIT sin tratamiento, células NCCIT tratadas con apicidina, células NCCIT tratadas con apicidina e infectadas con el lentivirus OKSIM y células NCCIT que solo fueron infectadas con el lentivirus OKSIM. Como control de la infección con el lentivirus OKSIM en estos experimentos se usaron células NCCIT infectadas con el lentivirus eGFP producido de forma paralela con el lentivirus OKSIM. (Figura 15).

En los experimentos del potencial tumorigénico se observó como era de esperarse que el virus OKSIM aumentase el potencial tumorigénico de las células NCCIT (Figura 16B Y 16C). A pesar de que la expresión de los genes Oct4, Sox2 y Nanog/P8 señalados como responsables del fenotipo de células troncales de cáncer se recupera 72 hrs después de retirar el tratamiento con apicidina, las células NCCIT administradas con apicidina 1 μ M por 24 h no desarrollaron masa tumoral (Figura 15B). Las células NCCIT administradas con apicidina e infectadas con el lentivirus OKSIM presentan un mayor desarrollo tumoral con respecto a las células NCCIT control (Figura 15C).

Las células NCCIT infectadas con el virus OKSIM y las células NCCIT administradas con apicidina 1 μ M por 24 h e infectadas con el virus OKSIM presentan el mismo potencial tumor génico. Por ende se sugiere que el virus

OKSIM puede revertir de forma total los efectos negativos que la apicidina ejerce al potencial tumorigénico de las células NCCIT (Figura 16C Y 16D).

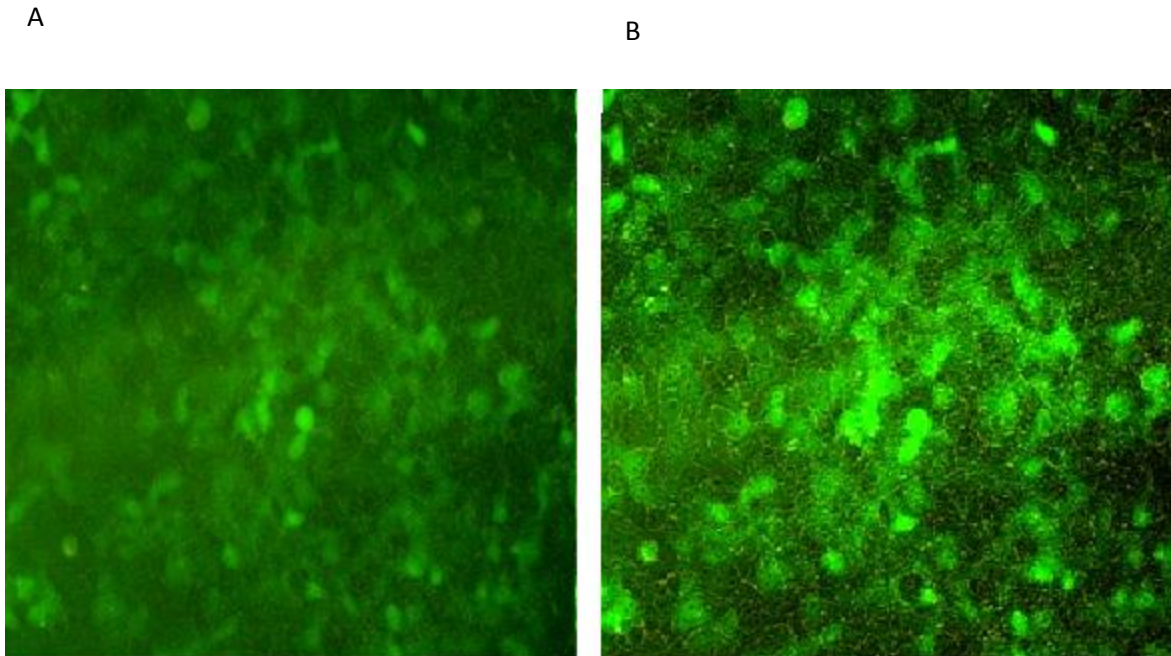


Figura 14: A) Lentivirus eGFP, control de infección OKSIM experimentos NCCIT apicidina 24 hrs + infección OKSIM B) Lentivirus eGFP, control de infección OKSIM experimentos NCCIT + OKSIM.

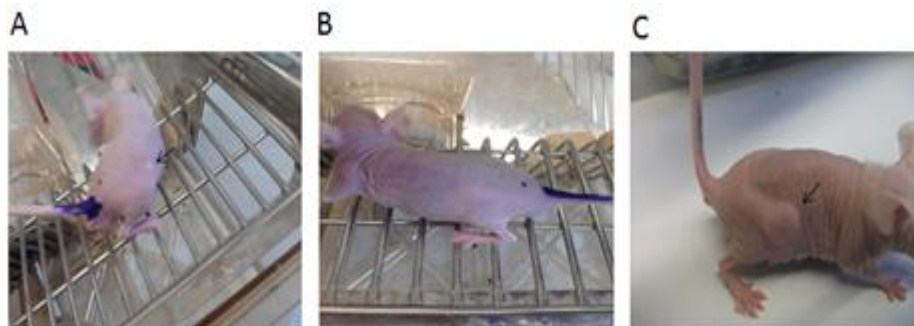


Figura 15: A) Ratones atímicos inyectados con 8 millones de células NCCIT sin tratamiento, 12 días después de ser inyectado. B) Ratones atímicos inyectados con 8 millones de células NCCIT tratadas con apicidina $1\mu\text{M}$ por 24 hrs, 12 días después de ser inyectados. C) Ratón inyectado con 8 millones de células NCCIT tratadas con apicidina $1\mu\text{M}$ por 24 hrs e infectados con el virus OKSIM, 12 días después de ser inyectado.

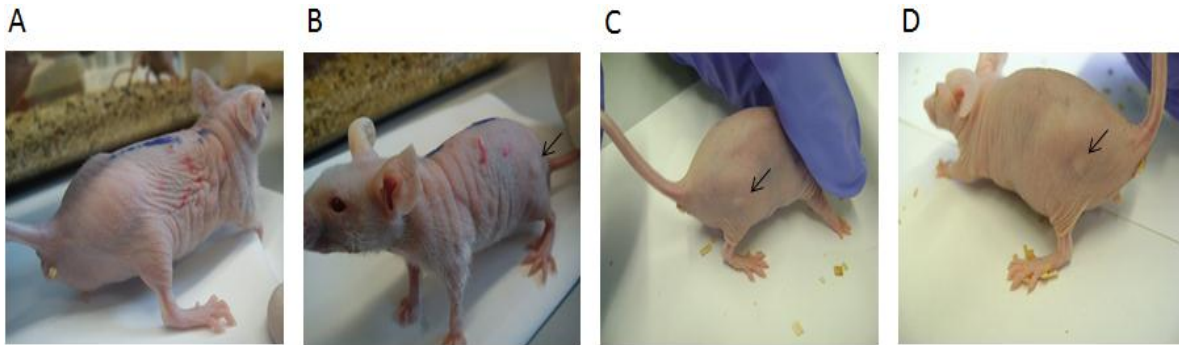


Figura 16: A) Ratones atímicos inyectados con 9 millones de células NCCIT sin tratamiento 13 días después de ser inyectados. B) Ratones atímicos inyectados con 9 millones de células NCCIT infectados con lentivirus OXSIM, 13 días después de ser inyectado. C) Ratones atímicos inyectados con 9 millones de células NCCIT infectadas con el lentivirus OXSIM. D) Ratones atímicos inyectados con 9 millones de células NCCIT administradas con apicidina e infectadas con el lentivirus OXSIM.

Análisis de Resultados

La disminución de la expresión de los genes de pluripotencia y el aumento en los genes de diferenciación posterior al tratamiento con apicidina no llevó a las células NCCIT a diferenciarse irreversiblemente como era de esperarse de acuerdo al modelo de las células HES. En este sentido el tratamiento de las células NCCIT con apicidina y el retiro del tratamiento de apicidina refleja un fenómeno de reversibilidad de la transición estado pluripotente- diferenciación.

La explicación de este fenómeno está adscrito a particularidades fisicoquímicas de la interacción de la apicidina con HDACs y la fisiología de las células NCCIT.

En el contexto de fisicoquímico la interacción entre el inhibidor de deacetilasas apicidina y las HDACs parece tener carácter reversible. Aunque el inhibidor de deacetilasas tricostatina desplaza al agua de la estructura tetracoordinada del Zn^{2+} y forma un enlace de coordinación bidentado entre su grupo carbonilo e hidroxilo para generar una estructura de Zn^{2+} pentacoordinado con geometría de bipirámide trigonal, se tiene reportado el carácter reversible de esta interacción [83, 84, 85].

La apicidina al igual que la tricostatina desplaza al agua de la estructura tetracoordinada de Zn^{2+} , sin embargo la apicidina solo forma un enlace de coordinación con el Zn^{2+} mediante el carbonilo de su grupo la etilcetona. Bajo este punto de vista se espera que la interacción entre la apicidina que solo forma un enlace de coordinación con el zinc también sea reversible.

De tal forma que una vez que se retiró el tratamiento con apicidina de las células NCCIT, las condiciones de equilibrio de la interacción entre apicidina y HDACs

debieron desplazarse al estado disociado de apicidina y HDACs. Cuando la condiciones catalíticas de las HDACs se recuperaron, se restablecieron las condiciones epigenéticas que permiten una alta expresión de los genes Oct4, Sox2 y Nanog/P8 y a su vez los genes de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog disminuyeron la expresión de los genes de diferenciación.

En el contexto fisiológico celular la recuperación del estado pluripotencial en NCCIT después de haber retirado el tratamiento con apicidina puede adjudicarse a la falta de expresión del gen P53. Está establecido que P53 ejerce una regulación negativa en la expresión de Nanog y que a su vez Nanog ejerce un efecto negativo en la expresión de P53 [13, 49].

Existen trabajos que demuestran un incremento en la eficiencia del proceso de reprogramación celular cuando la expresión del gen P53 es inhibida; por otro lado la sobreexpresión de P53 inhibe el proceso de reprogramación celular. De tal forma Nanog está involucrado en un fenotipo pluripotencial y de células troncales de cáncer, mientras que P53 está asociado con procesos de diferenciación y mantiene un perfil de gen supresor de tumores al inhibir el ciclo celular y disminuir la expresión de Nanog [13, 49]. Bajo esta perspectiva fisiológica las células NCCIT carecen de un mecanismo esencial para dirigir y completar el proceso de diferenciación.

Los mecanismos moleculares circunscritos en la disminución de la expresión de los genes de pluripotencia Oct 4, Nanog/P8 y Sox 2 son desconocidos. La acción de inhibir la actividad catalítica de HDACs corresponde a una activación

transcripcional. La disminución de la expresión de Oct4, Nanog/P8 y Sox2 debe ser resultado de un incremento en la expresión de factores de transcripción que regulan de forma negativa a estos genes.

En el caso particular de Oct-4 se pensó que los mecanismos moleculares por los cuales la apicidina disminuía la expresión de Oct-4 estaban asociados a la expresión de la histona metil transferasa G9a, que es la enzima responsable de silenciar a Oct-4 en el modelo embrionario, [81] sin embargo en el presente estudio, después de administrar el inhibidor de G9-a, *BIX-01294* [86] junto con apicidina no se observaron cambios con respecto a los experimentos en donde solo se administró la apicidina (datos no mostrados).

A las 24 hrs después de haber administrado las células NCCIT con apicidina se observó la expresión de caspasa 3 activa. El mecanismo de inducción de apoptosis por apicidina en diversas líneas de cáncer incluyendo la línea NCCIT está asociado principalmente al silenciamiento de DNMT1. El silenciamiento o activación de DNMT1 es regulado por el sistema pRB/E2F. En estudios con la línea de cáncer Hela se ha observado después de la administración de apicidina un aumento en la reclutación de pRB en el promotor de DNMT1, a su vez pRB recluta HDACI al promotor de DNMT1 lo que propicia el silenciamiento transcripcional de DNMT1. El incremento en la expresión de p21 es consecuencia de una disminución en los niveles de expresión de DNMT1 y el efecto directo del inhibidor de deacetilasas apicidina [58].

A las 72 hrs después de haber retirado el tratamiento con apicidina ya no se observó la expresión de caspasa 3 activa. Estos datos sugieren que a 72 hrs después de haber retirado el tratamiento de apicidina el promotor de DNMT1 ya no estaba interaccionando con pRB y que la expresión de DNMT1 estaba activa ya que no se observaron indicios de apoptosis. Esto también concuerda con la disminución de P21 72 hrs después de haber retirado el tratamiento de apicidina. Sin embargo, la expresión de P21 a las 72 hrs después de haber retirado el tratamiento de apicidina es el doble con respecto al control, lo cual indica que existen otros factores que participan en el incremento y mantenimiento de la expresión de P21.

La información obtenida de la metodología de bisulfito sodio en este estudio no describe cambios de metilación en los residuos CpG de las regiones reguladoras de los genes Oct4, Sox2 y Nanog. Esto sugiere que los cambios epigenéticos involucrados en el silenciamiento transcripcional de Oct4, Sox2 y Nanog no siguen el orden de cambios epigenéticos: metilaciones en el ADN seguido por un reclutamiento de proteínas MeCP2 y un reclutamiento de HDACs por las proteínas MeCP2 [58, 59, 60].

Los mecanismos epigenéticos del silenciamiento de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog desencadenados por el inhibidor de deacetilasas apicidina en este trabajo deben estar circunscritos a nivel de cromatina. De tal forma que los efectos de inhibición de la expresión de los genes de Oct4, Sox2 y Nanog desde el punto de vista epigenético son fácilmente reversibles.

Una pregunta interesante que no fue averiguada en este trabajo son los cambios en la expresión relativa de DNMT1, DNMT3A Y DNMT3B al administrar células NCCIT con apicidina. Es posible que la apicidina disminuyera la expresión de estos genes y que estos cambios de expresión sean un impedimento para la promoción de metilaciones en los residuos CpGs de regiones reguladoras de los genes Oct4, Sox2 y/o Nanog.

Los mecanismos por los cuales la apicidina disminuyó el potencial tumorigénico de las células NCCIT no están determinados por la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog/P8. El gen P21 puede estar relacionado en este efecto, pero también es posible que la apicidina perturbe la expresión de otros genes aún no identificados asociados a la determinación del fenotipo de células troncales de cáncer.

La infección con el virus OKSIM, logró eliminar totalmente los efectos negativos al potencial tumorigénicos ejercidos por la apicidina. Es posible que uno o combinaciones de los factores del vector policistrónico OKSIM perturbasen la expresión del factor por medio del cual la apicidina ejerció su efecto antitumorigénico.

Los posibles efectos de la apicidina a la expresión de Nanog/P8, Oct4 y Sox2 en otros sistemas de células troncales de cáncer son difíciles de descifrar. Es posible que la apicidina sea expulsada de la célula por el transportador ABCG2, comúnmente expresado en células troncales de cáncer. Sin embargo debido a la gran variedad en cuanto a las estructuras químicas de los iHDACs es muy probable que alguna de estas moléculas no sea reconocida por los

transportadores ABCG2. También resulta difícil de descifrar si los mecanismos moleculares por los cuales los factores de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog/P8 fueron reprimidos después de administrar apicidina a las células NCCIT podrán ser activados de igual manera en otros modelos de células troncales de cáncer.

Conclusiones:

La disminución de la expresión de los factores de transcripción Oct-4, Sox2 y Nanog/P8 en las células NCCIT tratadas con apicidina son de carácter reversible. La apicidina no genera cambios en el estado de metilación de las regiones reguladoras del ADN de los genes Oct4, Sox2 y Nanog, lo que sugiere que los mecanismos ligados a la disminución de la expresión de estos genes están asociados a cambios postraduccionales en las colas de histona de los nucleosomas que interactúan con los sitios de regulación de estos genes en el ADN.

Las células NCCIT que fueron tratadas con apicidina presentan un menor potencial tumorigénico al ser xenotransplantadas a ratones atímicos con respecto a las células NCCIT sin tratamiento. La disminución del potencial tumorigénico en las células NCCIT ejercido por el inhibidor de deacetilasas apicidina es revertido por la sobreexpresión de los genes Oct4, Sox2, KLF4 y cMyc.

Los mecanismos moleculares que comprende la disminución de la expresión de los genes Oct4, Sox2 y Nanog/P8 ejercidos por el inhibidor de deacetilasas apicidina, así como la reversión del efecto antitumorigénico de la apicidina por la sobreexpresión de los genes Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc se desconocen y deben ser estudiados. 74

Debido a que las células de NCCIT expresan los factores de transcripción Oct4, Sox2, Nanog/P8 y son las células troncales de pluripotentes de un teratocarcinoma, esta línea celular es un buen modelo de células troncales de

cáncer. De tal forma que este trabajo describe un posible panorama del efecto de los inhibidores de deacitalasas sobre otras líneas de células troncales de cáncer.

Perspectivas

- Evaluar el efecto de la apicidina y otros inhibidores de deacetilasas sobre la expresión de los genes Oct-4, Sox2 y Nanog/P8 en diversas líneas de células troncales de cáncer.
- Evaluar el potencial tumorigénico, clonigénico, proliferación y resistencia a fármacos en células troncales de cáncer cuando son administradas con apicidina y otros inhibidores de deacetilasas..
- Establecer patrones de administración de inhibidores de deacetilasas para debilitar el fenotipo de células troncales de cáncer.

Bibliografia:

1. Li, F., et al., *Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis*. Cell Res, 2007. 17(1): p. 3-14.
2. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. 414(6859): p. 105-11.
3. Lobo, N.A., et al., *The biology of cancer stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. 23: p. 675-99.
4. Visvader, J.E. and G.J. Lindeman, *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(10): p. 755-68.
5. Regenbrecht, C.R., H. Lehrach, and J. Adjaye, *Stemming cancer: functional genomics of cancer stem cells in solid tumors*. Stem Cell Rev, 2008. 4(4): p. 319-28.
6. Peng, S., N.J. Maihle, and Y. Huang, *Pluripotency factors Lin28 and Oct4 identify a sub-population of stem cell-like cells in ovarian cancer*. Oncogene. 29(14): p. 2153-9.
7. Chiou, S.H., et al., *Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. 14(13): p. 4085-95.
8. Linn, D.E., et al., *A Role for OCT4 in Tumor Initiation of Drug-Resistant Prostate Cancer Cells*. Genes Cancer. 1(9): p. 908-16.

9. Jia, X., et al., *SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell*. J Mol Cell Biol. 3(4): p. 230-8.
10. Jingyu Z., Xia W., Bing C J., et al. (2010) The human pluripotency gene NANOG/NANOGP8 is is a retrogene expressed in cancers. FEBS Journal 273 (8):1723-30.
11. Jeter, C.R., et al., *NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation*. Oncogene. 30(36): p. 3833-45.
12. Karoubi, G., et al., *OCT4 expression in human non-small cell lung cancer: implications for therapeutic intervention*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2009. 8(4): p. 393-7.
13. Marie Z., Arnaud D., Aiala L., et al.(2010) NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. EMBO Journal. 29, 2659 – 2674.
14. Chen, Y., et al., *The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer*. J Biol Chem, 2008. 283(26): p. 17969-78.
15. Leis, O., et al., *Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells*. Oncogene.
16. Jeter, C.R., et al., *NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation*. Oncogene. 30(36): p. 3833-45.

17. Chen, Y.C., et al., *Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells*. PLoS One, 2008. 3(7): p. e2637.
18. Jia, X., et al., *SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell*. J Mol Cell Biol. 3(4): p. 230-8.
19. Chen, Y., et al., *The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer*. J Biol Chem, 2008. 283(26): p. 17969-78.
20. Chiou, S.H., et al., *Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. 14(13): p. 4085-95.
21. Jingyu Zhang., Xia Wang., Bing Chen., Zhifeng Xiao (2010) The human pluripotency gene NANOG/NANOGP8 is expressed in gastric cancer and associated with tumor development. Oncology Letters 1: 457-463.
22. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. 126(4): p. 663-76.
23. Kashyap, V., et al., *Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs*. Stem Cells Dev, 2009. 18(7): p. 1093-108.
24. Young, R.A., *Control of the embryonic stem cell state*. Cell. 144(6): p. 940-54.

25. Iovino, N. and G. Cavalli, *Rolling ES cells down the Waddington landscape with Oct4 and Sox2*. Cell. 145(6): p. 815-7.
26. Yves Bourillot P., Savatier P., et al (2010) Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency *BMC Biology* , 8:125.
27. Rowland, B.D., R. Bernards, and D.S. Peeper, *The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene*. Nat Cell Biol, 2005. 7(11): p. 1074-82.
28. Varlakhanova, N.V., et al., *myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal*. Differentiation. 80(1): p. 9-19.
29. Pelengaris, S., M. Khan, and G. Evan, *c-MYC: more than just a matter of life and death*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(10): p. 764-76.
30. Klemm, J.D. and C.O. Pabo, *Oct-1 POU domain-DNA interactions: cooperative binding of isolated subdomains and effects of covalent linkage*. Genes Dev, 1996. 10(1): p. 27-36.
31. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. 389(6648): p. 251-60.
32. Chambers, I., et al., *Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development*. Nature, 2007. 450(7173): p. 1230-4.
33. Torres, J. and F.M. Watt, *Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFκB and cooperating with Stat3*. Nat Cell Biol, 2008. 10(2): p. 194-201.
34. Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith, *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells*. Nat Genet, 2000. 24(4): p. 372-6.

35. Darr, H., Y. Mayshar, and N. Benvenisty, *Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features*. *Development*, 2006. 133(6): p. 1193-201.
36. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2007. 448(7151): p. 313-7.
37. Bowles, J., G. Schepers, and P. Koopman, *Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators*. *Dev Biol*, 2000. 227(2): p. 239-55.
38. Boyer, L.A., et al., *Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells*. *Cell*, 2005. 122(6): p. 947-56.
39. Wu, Q., et al., *Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells*. *J Biol Chem*, 2006. 281(34): p. 24090-4.
40. Boyer, L.A., et al., *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. *Nature*, 2006. 441(7091): p. 349-53.
41. Loh, Y.H., et al., *The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells*. *Nat Genet*, 2006. 38(4): p. 431-40.
42. Bilodeau, S., et al., *SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state*. *Genes Dev*, 2009. 23(21): p. 2484-9.
43. Pasini, D., et al., *Regulation of stem cell differentiation by histone methyltransferases and demethylases*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008. 73: p. 253-63.

44. Kashyap, V., et al., *Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs*. *Stem Cells Dev*, 2009. 18(7): p. 1093-108.
45. Kagey, M.H., et al., *Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture*. *Nature*. 467(7314): p. 430-5.
46. Bilodeau, S., et al., *SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state*. *Genes Dev*, 2009. 23(21): p. 2484-9.
47. Yeap, L.S., K. Hayashi, and M.A. Surani, *ERG-associated protein with SET domain (ESET)-Oct4 interaction regulates pluripotency and represses the trophoctoderm lineage*. *Epigenetics Chromatin*, 2009. 2(1): p. 12.
48. Margueron, R., et al., *Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks*. *Nature*, 2009. 461(7265): p. 762-7.
49. Kawamura, T., et al., *Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming*. *Nature*, 2009. 460(7259): p. 1140-4.
50. Gartel A. (2005). A new model of transcriptional repression by c-myc: methylation. *Oncogene* 25, 1989–1990
51. Andrews P. (2002) From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *The royal Society* 357(1420): 405–417.
52. Donovan, P.J. and M.P. de Miguel, *Turning germ cells into stem cells*. *Curr Opin Genet Dev*, 2003. 13(5): p. 463-71.

53. Andrews, P.W., et al., *Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin*. *Biochem Soc Trans*, 2005. 33(Pt 6): p. 1526-30.
54. Sperger, J.M., et al., *Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(23): p. 13350-5.
55. Damjanov, I., B. Horvat, and Z. Gibas, *Retinoic acid-induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT*. *Lab Invest*, 1993. 68(2): p. 220-32.
56. Xu, F., et al., *Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs*. *Curr Med Chem*. 17(33): p. 4052-71.
57. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. *Nat Genet*, 1998. 19(3): p. 219-20.
58. You, J.S., et al., *Histone deacetylase inhibitor apicidin downregulates DNA methyltransferase 1 expression and induces repressive histone modifications via recruitment of corepressor complex to promoter region in human cervix cancer cells*. *Oncogene*, 2008. 27(10): p. 1376-86.
59. Lande-Diner, L., et al., *Role of DNA methylation in stable gene repression*. *J Biol Chem*, 2007. 282(16): p. 12194-200.
60. de Leon-Guerrero, S.D., G. Pedraza-Alva, and L. Perez-Martinez, *In sickness and in health: the role of methyl-CpG binding protein 2 in the central nervous system*. *Eur J Neurosci*. 33(9): p. 1563-74.

61. Baylin, S.B., et al., *Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia*. Adv Cancer Res, 1998. 72: p. 141-96.
62. Wu, J., et al., *Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(19): p. 8891-5.
63. Beaulieu, N., et al., *An essential role for DNA methyltransferase DNMT3B in cancer cell survival*. J Biol Chem, 2002. 277(31): p. 28176-81.
64. Robert, M.F., et al., *DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells*. Nat Genet, 2003. 33(1): p. 61-5.
65. Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, Esteller M. (2006). A profile of Methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. Cancer Res 66: 8342–8346.
66. Fournel, M., et al., *Down-regulation of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase induces cell cycle regulators p16(ink4A) and p21(WAF/Cip1) by distinct mechanisms*. J Biol Chem, 1999. 274(34): p. 24250-6.
67. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. 184(139): p. 868-71.
68. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. 389(6648): p. 251-60.
69. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. 293(5532): p. 1074-80.

70. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. *Biochem J*, 2003. 370(Pt 3): p. 737-49.
71. Finnin, M.S., et al., *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. *Nature*, 1999. 401(6749): p. 188-93.
72. Acharya, M.R., et al., *Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review*. *Mol Pharmacol*, 2005. 68(4): p. 917-32.
73. Dokmanovic, M., C. Clarke, and P.A. Marks, *Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives*. *Mol Cancer Res*, 2007. 5(10): p. 981-9.
74. Acharya, M.R., et al., *Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review*. *Mol Pharmacol*, 2005. 68(4): p. 917-32.
75. Montero, A., et al., *Design, synthesis, biological evaluation, and structural characterization of potent histone deacetylase inhibitors based on cyclic alpha/beta-tetrapeptide architectures*. *J Am Chem Soc*, 2009. 131(8): p. 3033-41.
76. Cheong, J.W., et al., *Induction of apoptosis by apicidin, a histone deacetylase inhibitor, via the activation of mitochondria-dependent caspase cascades in human Bcr-Abl-positive leukemia cells*. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(13): p. 5018-27.
77. Hayatsu, H., *The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research*. *Mutat Res*, 2008. 659(1-2): p. 77-82.
78. Luu-The, V., et al., *Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction*. *Biotechniques*, 2005. 38(2): p. 287-93.

79. (2006) Rotor – Gene 6000 Operator Manual Corbett Research.
80. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.
81. Feldman, N., et al., *G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis*. Nat Cell Biol, 2006. 8(2): p. 188-94.
82. You, J.S., et al., *OCT4 establishes and maintains nucleosome-depleted regions that provide additional layers of epigenetic regulation of its target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(35): p. 14497-502.
83. Furumai, R., et al., *Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(1): p. 87-92.
84. Kemp, M.G., et al., *The histone deacetylase inhibitor trichostatin A alters the pattern of DNA replication origin activity in human cells*. Nucleic Acids Res, 2005. 33(1): p. 325-36.
85. Yoshida, M., S. Horinouchi, and T. Beppu, *Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function*. Bioessays, 1995. 17(5): p. 423-30.
86. Chang, Y., et al., *Structural basis for G9a-like protein lysine methyltransferase inhibition by BIX-01294*. Nat Struct Mol Biol, 2009. 16(3): p. 312-7.