



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PAPEL DE CTCF EN LA TRANSCRIPCIÓN DE RNAS NO CODIFICANTES DEL  
CENTRÓMERO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Victor Manuel del Castillo Falconi

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis A. Herrera Montalvo

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

COMITÉ TUTOR

Dr. Félix Recillas Targa

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Emilio Rojas del Castillo

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MÉXICO

AGOSTO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

“Papel de CTCF en la transcripción de los ncRNA de Centrómero”

**“Papel de CTCF en la transcripción de RNAs no codificantes del  
centrómero”**

Por: Victor Manuel del Castillo Falconi

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
• Epigenética	2
• Modificaciones Post-traduccionales de histonas	3
○ El modelo del escritor y el lector	4
• Variantes de histonas	6
• CTCF	8
• RNAs-nc	10
• Centrómero	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
DISEÑO ESXPERIMENTAL	21
• Cultivos celulares	21
• Tratamientos con TSA	21
• Tratamientos con 3-ABA	21
• Inmunofluorescencia	22
• Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	22
• Análisis de expresión relativa de RNA	23
• Transfección de siRNA contra CTCF	24
• Análisis estadísticos	24
RESULTADOS	26
• Localización celular de CTCF en células Wi-38 y HCT116 durante interfase y mitosis	26
• Presencia de CTCF y su efecto en la transcripción de los RNAs-nc de satélite $\alpha$ y 2 en Wi-38 y HCT116.	28
• Determinación de las marcas de histonas en	

las regiones del centrómero y pericentromérica de HCT116 durante interfase y mitosis.	<b>30</b>
• Determinación de los niveles de CTCF y la marca de heterocromatina constitutiva H3K9me3 en las regiones del centrómero y pericentromérica así como los de RNAs-nc de los satélites $\alpha$ y 2 en WI-38 y HCT116 tratadas con TSA.	<b>34</b>
• Determinación de los niveles de RNAs-nc de los satélites $\alpha$ y en HCT116 tratadas con 3-ABA y transfectadas con el siRNA contra CTCF.	<b>36</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	
• Unión de CTCF al cromosoma durante mitosis	<b>37</b>
• La abundancia de CTCF en centrómero y la transcripción del RNA-nc del satélite $\alpha$ .	<b>38</b>
• Caracterización de las marcas de histona para el centrómero de HCT116	<b>39</b>
• Reclutamiento o incremento de CTCF en el centrómero y la transcripción de los satélites $\alpha$ y 2 inducida por el aumento en la acetilación de histonas.	<b>40</b>
• Disminución de la proteína CTCF, decrece la transcripción de los satélites $\alpha$ y 2.	<b>41</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>PROTOCOLOS EN EXTENSO</b>	<b>44</b>
• Separación de células en interfase y mitosis por la técnica de “Shake off”	<b>44</b>
• Inmunofluorescencias	<b>45</b>
• Transfección de células	<b>45</b>
• Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	<b>46</b>
• qRT-PCR	<b>51</b>
• Tratamiento con DNAsa I libre de RNAsa	<b>53</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>55</b>

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la Secretaría de Salud bajo la dirección del Dr. Luis A. Herrera Montalvo. Quién recibió apoyo de CONACyT (182997; 83959) y de PAPIIT (IN213311).

Los estudios del Biol. Víctor M. Del Castillo Falconi fueron apoyados por una beca de maestría de CONACyT (446841)

Agradezco al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química, UNAM por el apoyo proporcionado durante mi periodo de estudios dentro del programa.

A la M. en C. Clementina Castro Hernández brindó una excelente asesoría técnica durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Ernesto Soto-Reyes Solis por brindar un excelente apoyo en la asesoría de la tesis.

Al Biol. Rodrigo Gonzales-Barrios de la Parra por brindar un excelente apoyo en la asesoría de la tesis.

El comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Luis A. Herrera Montalvo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Emilio Rojas Del Castillo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El jurado del examen de maestría estuvo conformado por:

Presidente: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Vocal: Dra. Marcela Lizano Soberón

Vocal: Dr. Luis Felipe Jiménez García

Vocal: Dra. María Elena Ibarra Rubio

Secretario: Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara

## **AGRADECIMIENTOS.-**

Al Dr. Luis A. Herrera Montalvo, por todo el apoyo que me ha brindado, por haberme aceptado en su laboratorio y como tutor de este trabajo. Ya que sin él no se hubiera podido llevar a cabo este proyecto de investigación.

Al Dr. Felix Recillas Targa por la ayuda que brindó como asesor en este trabajo y las clases de epigenética que nos brinda en el posgrado.

Al Dr. Emilio Rojas Del Castillo por su paciencia y la ayuda que brindó como asesor en este trabajo.

Al Dr. Soto-Reyes Solis Ernesto por enseñarme el área de epigenética y las preguntas actuales con las que nos enfrentamos como por ser un gran amigo en todo momento.

Al Biol. Gonzáles-Barrios Rodrigo, que siempre me enseñó y me apoyó en el laboratorio en especial al realizar los ChIPs y en discutir cualquier tema del proyecto, así como ser un gran amigo en todo momento.

Gracias a todos estos mis tutores de Maestría.

## **DEDICATORIA.-**

A mi madre, C. Ofelia Falconi Pascacio, mi padre Victor M. Del Castillo Dávila y mis hermanas, Ofelia del Castillo Falconi y Ana Luisa del Castillo Falconi por apoyarme durante todos estos años de estudio.

A mi tío Luis Felipe del Castillo Dávila por su ejemplo en el ámbito académico, ya que sin él, no hubiera podido inspirarme para llegar hasta aquí.

En especial a mi hija Sarah Samantha del Castillo Barba y a su madre, Arisbel Barba García y por su apoyo con samy y mi total gratitud por su esfuerzo constante para apoyar a mi hija.

A mis hermanos y amigos Alan Gonzáles Alan Alegría, Elihu Catalan, Carlos Ochoa, Oscar Morales, Javier Dueñas, Carlos Requesnes, Alex Vargas, Jonatan Hinojosa, Miguel Romero, Arturo y Joe que siempre me inspiran a seguir adelante y muestran un apoyo incondicional en todo momento.

Al equipo del laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología que me han ayudado en esta última etapa de mi formación de estudios de Maestría y su paciencia; Rodrigo, Ernesto, Jone, Lissania, (meta)Fernandito, Fernanda VR Julia, Eunice, Fernanda, Yaír, Ángela, Gil, Nancy, Chuchín, Didier, Alex, Ilos, Diego, Rodriguín, Marco, Mike, Clemen, Lucy, José y en especial al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo que se encuentra al frente del equipo.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
3-ABA	3-aminobenzamida
Ago2	Argonauta 2
ATP	Adenosin trifosfato
CTCF	Factor nuclear CCCTC
dsRNA	RNA de doble cadena
DNMT	DNA Metil Transferasa
HAT	Acetil transferasa de histonas
HDAC	Desacetil transferasa de histonas
MLL/Ash1	Myeloid, Lymphoid or Leukemia/ Absent Small or Homeotic
miRNA	microRNA
nt	nucleótidos
nm	nanómetros
PARP-1	Poli (ADP-Ribose) Polimerasa 1
pb	pares de bases
piRNA	RNA asociado a la proteína PIWI
PRC2	Proteína del complejo de represión 2
RISC	Complejo de silenciamiento dirigido por RNA
RNAm	RNA mensajero
RNA-nc	RNA no codificante
RNA-ncl	RNA no codificante largo
sRNA	small RNA

siRNA	RNA pequeño interferente
Su(var) 3,9	Supresor de variegación 3-9
TSA A	Tricostatina A
UsnRNA	RNA pequeño nuclear uridilado
UTR	Región no traducible

## RESUMEN

El factor nuclear CCCTC (CTCF) es una proteína que tiene la capacidad de unirse a más de 55 mil sitios en el genoma humano de manera específica para cada tejido y tiene una función aisladora, delimitando regiones de eucromatina y heterocromatina; la localización de CTCF durante interfase se ha observado unido al DNA y en mitosis se ha observado específicamente en centrómeros de algunas líneas celulares cancerosas. El centrómero es una estructura de cromosomas eucariontes y se ha caracterizado por su alta compactación; sin embargo, se ha reportado la transcripción de RNAs no codificantes (RNA-nc) necesarios para la formación del complejo centrómero/cinetocoro y se han descrito con una función esencial para la segregación de los cromosomas. Debido a esto, nuestro interés se centró en conocer si CTCF favorece la transcripción de los RNAs-nc presentes en centrómero. El presente trabajo muestra evidencia de la participación de CTCF como factor de transcripción para las secuencias satélite  $\alpha$  y 2 de centrómeros en líneas celulares de cáncer colorrectal, HCT116 y se demuestra que la unión de CTCF al centrómero provoca una sobre-expresión de los RNAs-nc de los satélites  $\alpha$  y 2. Estos datos nos sugieren que la función del transcrito en el centrómero es de carácter estructural y su transcripción es favorecida por la presencia de CTCF.

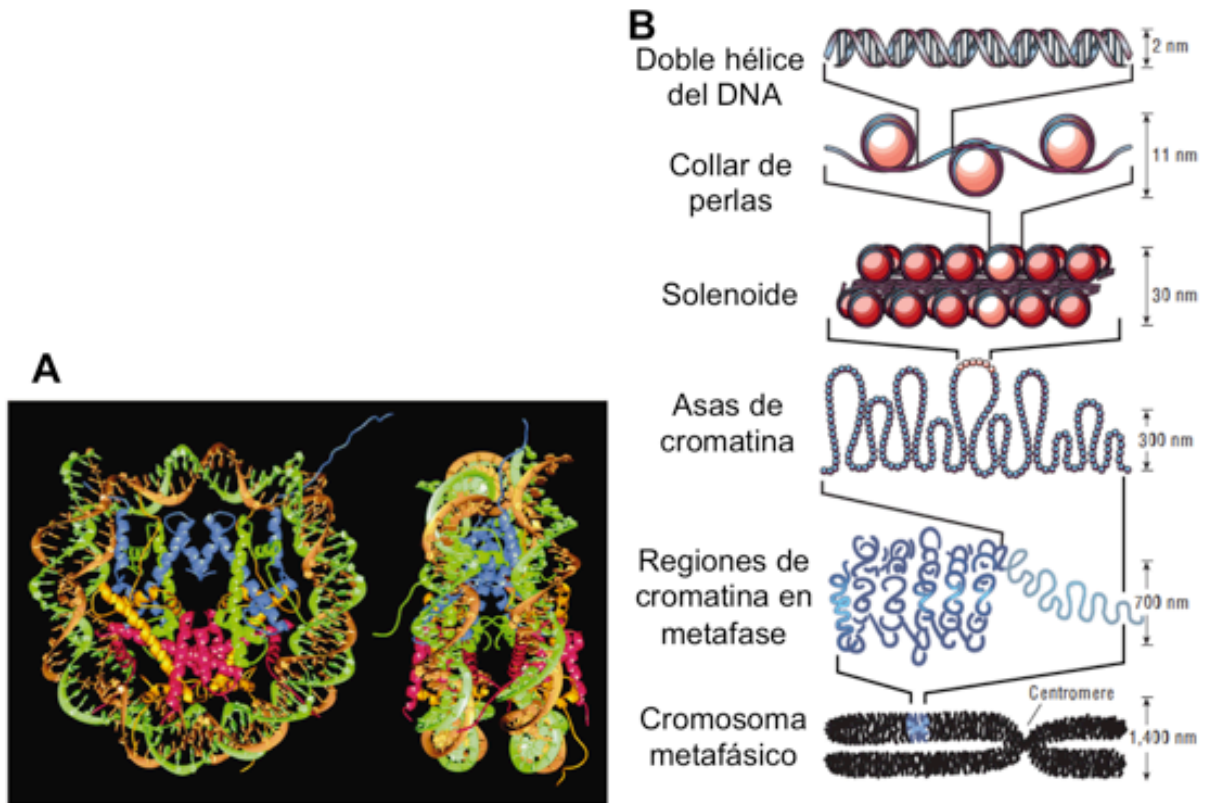
## INTRODUCCIÓN

### Epigenética

El término epigenética fue acuñado por C. H. Waddington en 1942 como la interacción casual entre genes y sus productos, los cuales proporcionan un fenotipo específico del ser. Actualmente, una de las definiciones más aceptadas es el estudio de cambios heredables en la regulación génica que se producen sin un cambio en la secuencia del DNA y que pueden heredarse de una generación celular a otra (Esteller, 2011).

El DNA en eucariontes, se encuentra compartimentalizado dentro del núcleo celular en un complejo formado por RNA y proteínas tanto histonas como no-histonas, llamado cromatina. La unidad de la cromatina es el nucleosoma, que se compone por el octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) alrededor del cual se encuentran aproximadamente 165 pares de bases (pb) del DNA (Figura 1A); (Felsenfeld y Groudine, 2003). Debido a que las moléculas del DNA son muy grandes, se han encontrado distintos grados de compactación de la cromatina; la fibra de 11nm, conocida como el collar de perlas es la eucromatina. El siguiente grado de compactación es la fibra de 30 nm, conocida como solenoide la cual es la heterocromatina; ésta es considerada una cromatina inactiva para la transcripción. Por último el nivel de mayor compactación es el cromosoma metafásico (Figura 1B); (Driel, *et al.*, 2003; Felsenfeld y Groudine, 2003; Luger y Hansen, 2005).

La regulación de los procesos epigenéticos está dado por los cambios en la estructura de la cromatina, los cuales tienen un efecto en los niveles de expresión de los genes. Dentro de los diferentes procesos encontramos la metilación del DNA, las modificaciones post-traduccionales de histonas, los complejos Polycomb y Tritorax, los complejos remodeladores dependientes de ATP, la organización nuclear y los RNAs no codificantes.



**Figura 1.-** La cromatina y sus diferentes grados de compactación 1A.- Modelo de la estructura del nucleosoma realizada por cristalografía de rayos X en donde se observan 1.7 vueltas del DNA enrollando al octámero de histonas 1B.- Niveles de compactación de la cromatina observado desde el menos compacto: DNA desnudo, collar de perlas, solenoide hasta el nivel más compacto: el cromosoma metafásico (Tomado y modificado de Felsenfeld and Groudine, 2003).

### Las modificaciones post-traduccionales de histonas

Uno de los principales procesos de regulación epigenética son las modificaciones post-traduccionales de histonas. Las histonas, así como otras proteínas, son blanco de modificaciones post-traduccionales en residuos de aminoácidos específicos como lisinas y argininas, los cuales son blanco de acetilación y metilación; o residuos de serinas y treoninas que son blanco de fosforilación; además, existen otras modificaciones como la ubiquitinación y sumoilación, entre otras (Tabla 1). En

conjunto, estas modificaciones pueden favorecer la compactación o relajación de la cromatina, permitiendo el reconocimiento de secuencias blanco para factores de transcripción (Kouzarides 2007). La acetilación de histonas, es un proceso llevado a cabo por las acetiltransferasas de histona (HAT) en lisinas, las cuales pueden neutralizar las cargas de la histona y provocar un relajamiento de la cromatina; por otro lado, existen enzimas que llevan a cabo la reacción reversible removiendo los grupos acetilo de los mismos residuos y son conocidas como desacetilasas de histona (HDACs) (Kouzarides, 2000; Peserico y Simone 2011).

**Tabla 1.-** Diferentes modificaciones de histonas (Tomado y modificado de Kouzarides, 2007).

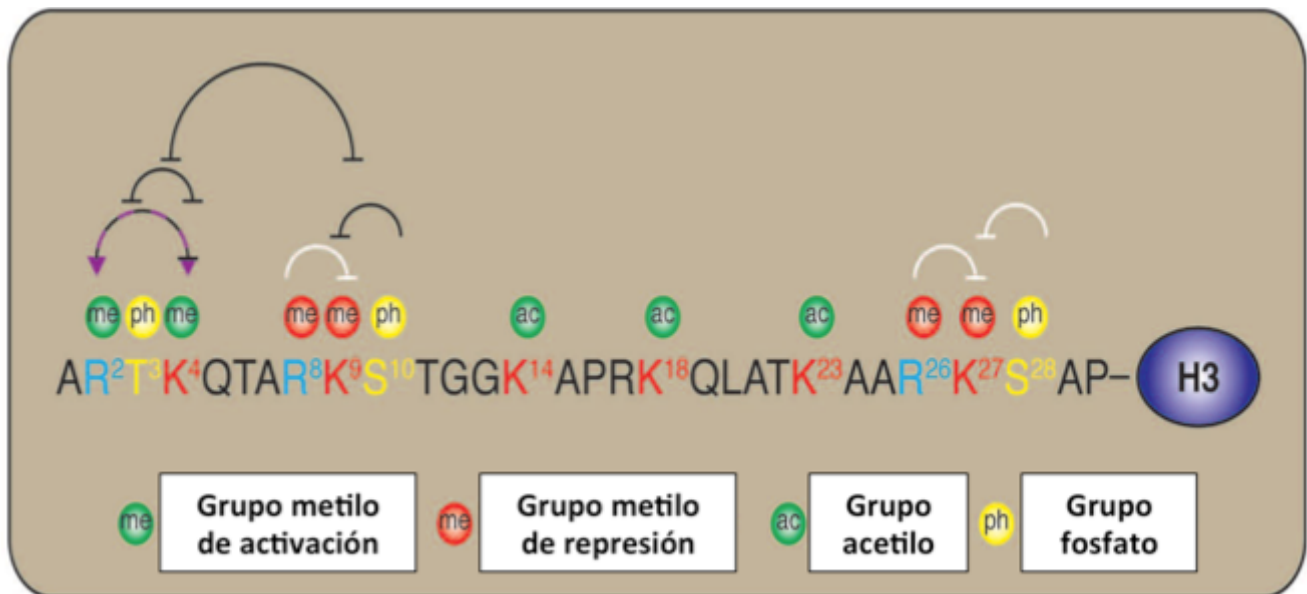
<b>Modificaciones de la cromatina</b>	<b>Residuo modificado</b>	<b>Función asociada</b>
Acetilación	K-ac	Transcripción, reparación, replicación y condensación
Metilación (lisinas)	K-me1 K-me2 K-me3	Transcripción, reparación
Metilación (argininas)	K-me1 K-me2a K-me2s	Transcripción
Fosforilación	S-fosf T-fosf	Transcripción, reparación y condensación
Ubiquitinación	K-ub	Transcripción, reparación
Sumoilación	K-su	Transcripción

### ***El Modelo del escritor y el lector***

Además de la acetilación de histonas, también existe otra manera de modificar un cambio en la tasa de transcripción de un gen: el modelo conocido como “writing and reading”, donde una enzima adiciona la marca que será interpretada por otra proteína, tales como factores de transcripción, remodeladores de la cromatina o represores de la expresión génica. Esto se observa en la metilación de lisinas la cual es llevada a cabo por proteínas que cuentan con el dominio metil-transferasa de lisina, denominado SET; como ejemplo se encuentran las metilasas Su(var)3-9, enhancer of zeste y MLL/Ash1 (Tritorax). Un ejemplo de proteínas que cuentan con dicho dominio son SETDB1 que tiene como sustrato a la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) y SET7 cuyo sustrato es la lisina 4 de la histona H3 (H3K4) (Binda, 2013). La marca de metilación en lisinas de las histonas puede ser reconocida por los dominios TUDOR, cromodominio y WD40 presentes en proteínas que son reclutadas de manera específica según el grado de metilación. Las lisinas presentan distinto grado de

metilación; es decir, pueden encontrarse mono, di o trimetiladas (Bannister, *et al.*, 2002) y de esta manera reclutar proteínas específicas, las cuales participan en la adición de marcas o en la inhibición de la adición de marcas epigenéticas en los demás residuos de aminoácidos de las histonas; esto es lo que se conoce como el “código de histonas” (Rea, *et al.*, 2000; Lachner, *et al.*, 2001).

Las diferentes modificaciones de histonas se conocen como diferentes combinatorias que afectan, ya sea positiva o negativamente, la compactación de la cromatina, y se han identificado ciertos residuos modificados que involucran regiones laxas como la acetilación de H3 y H4, o regiones compactas como la metilación de H3K9me3 (Figura 2). Además, existen algunas marcas como la metilación de H3K4me3 que facilita la actividad transcripcional y actúa como antagonista en la adición de la H3K9me3 (Hake *et al.*, 2004, Kouzarides 2007 ).



**Figura 2.-** Modificaciones covalentes de histona en el nucleosoma. Las diferentes modificaciones de histonas se conocen como diferentes combinatorias que afectan, ya sea positiva o negativamente, la compactación de la cromatina (tomado y modificado de Binda, 2013).

## Variantes de histonas

Además de las modificaciones post-traduccionales de histonas, otro de los procesos epigenéticos asociado a histonas es la incorporación de variantes de histonas las cuales sustituyen a las histonas canónicas. Los genes que codifican a las histonas son multicopia y muestran un pico de expresión durante fase S del ciclo celular (Hereford, *et al.*, 1981), sin embargo también existen variantes no alélicas que se originaron por duplicación en el genoma y se expresan de manera constante durante el ciclo celular (Malk y Henikoff, 2003). Las variantes de histonas, se localizan en distintos *loci* del genoma, participando en la regulación de procesos epigenéticos, en la diferenciación celular y en la herencia epigenética (Tabla 2) (Kamakaka y Biggins, 2005; Henikoff, *et al.*, 2004). Hasta ahora, se han descrito variantes para las histonas H2A, H2B y H3, pero no para la histona H4 (Smith, 2002).

**Tabla 2.-** Variantes de histonas (Tomado y modificado de Kamakaka y Biggins, 2005).

Histona canónica	Variante de histona	Efecto en la cromatina	Función
H2A	MacroH2A	Condensación de la cromatina	Inactivación del cromosoma X
	H2A.X	Condensación de la cromatina	Reparación del DNA/ Recombinación/ Represión de la transcripción
	H2A.Z	Condensación de la cromatina	Activación de la transcripción/ represión, segregación de los cromosomas.
H3	H3.3	Cromatina abierta	Transcripción
	CENP-A		Formación del cinetocoro

La variante de histona para H3, CENP-A (proteína de unión al centrómero A), es característica del centrómero y su función es servir como marca epigenética especificando la localización de unión del complejo de proteínas del cinetocoro (Crude, 2002; Yoda, *et al.*, 2000; Meluh, *et al.*, 1998). CENP-A es depositada por la chaperona HJURP durante G1 y actúa independiente de la replicación del material génico (Shelby, 2000; Stellfox, *et al.*, 2013). Otra variante de la histona H3 es H3.3, la cual es depositada por el complejo de HIRA que actúa a través de todo el ciclo celular en regiones que son transcripcionalmente activas y sirve como marcador de eucromatina (Kamakaka, 2005; Henikoff, *et al.*, 2004). Por su parte la variante de histona H2A.Z es



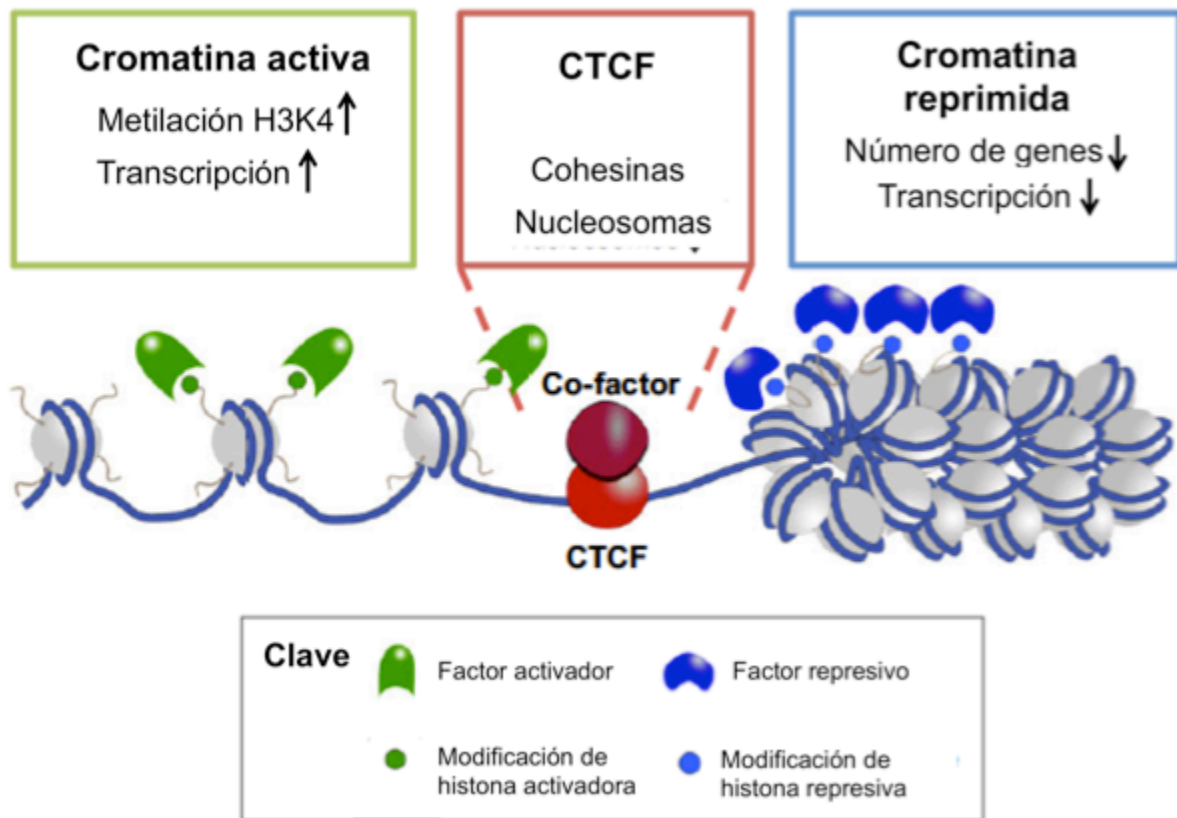
## “Papel de CTCF en la transcripción de RNAs-nc de Centrómero”

incorporada en regiones silenciadas del genoma, evitando la propagación de la heterocromatina, aunque también se ha comprobado que se encuentra como activador de la transcripción en algunos genes (Meneghini, 2003, Van Leeuwen y Gottschling, 2003). Por último otra de las variantes de histonas más estudiadas hasta ahora es MacroH2A, la cual se localiza principalmente en el cromosoma X inactivo de hembras en mamíferos (Chadwick y Willard, 2001).

## CTCF

El factor nuclear CTCF es una proteína de 82.8 KDa que cuenta con once dedos de zinc que le proporcionan la capacidad de unirse aproximadamente a más de 55 mil sitios en el genoma humano de manera tejida específica (Filippova *et al.*, 1996; Kim, *et al.*, 2006 Nakahashi, *et al.*, 2013). CTCF interacciona con múltiples proteínas, entre las que se encuentran: RNA polimerasa II, cohesina, Suz12, CHD8, YY1, nucleofosmina, Kaiso y Sin 3A (Chernukhin *et al.*, 2007; Defossez *et al.*, 2005; Donohoe *et al.*, 2007; Ishihara *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Parelho *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2008; Yusufzai *et al.*, 2004; Wendt *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2011).

Hasta ahora se han descrito distintas funciones para la proteína CTCF, algunas de las cuales son: factor de transcripción (Klenova, *et al.*, 1993), bloqueador de enhancers (potenciadores de la transcripción) (Bell, *et al.*, 1999), silenciador (Hou, *et al.*, 2008), activador de la transcripción (Gombert y Krumm, 2009), impronta génica (Fedoriw, *et al.*, 2004; Fitzpatrick, *et al.*, 2007), inactivador del cromosoma X (Chao, *et al.*, 2007), formador de asas de cromatina al interactuar con el complejo cohesina y como proteína aisladora, entre otras funciones (Weth, *et al.*, 2010). Cuando funge como aislador, determina los dominios cromosómicos delimitando regiones de eucromatina y heterocromatina (Figura 3). Durante la interfase, CTCF se ha localizado en nucleoplasma, con excepción del nucléolo y durante mitosis se ha ubicado en el centrosoma, en el anillo contráctil y unido al cromosoma metafásico en el centrómero (Zhang, *et al.*, 2004).



**Figura 3.-** Modelo de la función de proteína aisladora de CTCF. CTCF delimita regiones de eucromatina de las de heterocromatina, reclutando remodeladores de la cromatina a los promotores de genes que se encuentran activos para la transcripción en tejidos específicos, el marcador de los promotores en las histonas es la H3K4me3. Además CTCF puede interactuar con el complejo protéico de cohesina (tomado y modificado de Herold, 2012).

En 2009, Docquier y colaboradores reportaron que para que lleve a cabo su función de proteína aisladora, CTCF debe sufrir modificaciones post-traduccionales como la ADP-ribosilación llevada a cabo por la proteína PARP-1; CTCF ADP-ribosilada se identifica como una proteína de 180 Kilodaltones. Y el inhibidor de la PARP-1 es la 3-aminobenzamida (3-ABA).

## **RNAs-nc**

Otro de los procesos involucrados en la regulación epigenética de la cromatina son los RNAs no codificantes (RNAs-nc). Actualmente se sabe que solamente una porción baja del genoma (aproximadamente el 1.5%) transcribe RNAs que codifican proteínas. Los RNAs-nc tienen distintas funciones asociadas a procesos biológicos como son el desarrollo, la diferenciación celular y el metabolismo (Bartel, 2004; Mercer, *et al.*, 2009; Ponting, *et al.*, 2009; Wilusz, *et al.*, 2009)

Una de las clasificaciones de RNAs-nc se basa en su longitud, entre los que se encuentran aquéllos menores a 200 nt. son RNAs-nc pequeños (sRNA) y es donde encontramos a los RNA pequeños interferentes (siRNA), los microRNA (mirRNA) y los RNA asociados a la proteína PIWI (piRNA). Estos últimos llevan a cabo su función en el silenciamiento transcripcional y post-transcripcional a través del apareo complementario con bases específicas de sus blancos (Bernstein y Allis, 2005; Bracken y Helin, 2009; Faghihi y Wahlestedt, 2009; Mattick, 2001; Mercer, *et al.*, 2009; Whitehead, *et al.*, 2009; Wiluzs, *et al.*, 2009).

Los siRNA, miden alrededor de 22 nucleótidos y actúan silenciando a sus blancos ya sea de manera transcripcional o bien de manera post-transcripcional, y Sólo se han reportado unos cuantos que cumplen una función como marcadores de la región en donde se establece la heterocromatina constitutiva del telómero o regiones pericentroméricas (Urgakovic, 2009). Los siRNA son RNA de doble cadena (dsRNA), reconocidos y procesados por la enzima dicer, miembro de la familia de endonucleasas III y se caracterizan por ser de tamaño específico entre 19 y 23 nt. según la especie (Bernstein, *et al.*, 2001; Ketting, *et al.*, 2001). Una vez que se sintetiza el siRNA, una de las dos hebras del dúplex es cargada a la subunidad argonauta 2 (Ago2) del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y se unen al RNA mensajero (RNAm) blanco según la especificidad de su secuencia provocando un corte endonucleolítico del RNAm, conocido como “slicer” (Kawasaki, *et al.*, 2005; Martínez, *et al.*, 2002; Morris, 2005). Los siRNA que actúan silenciando de manera

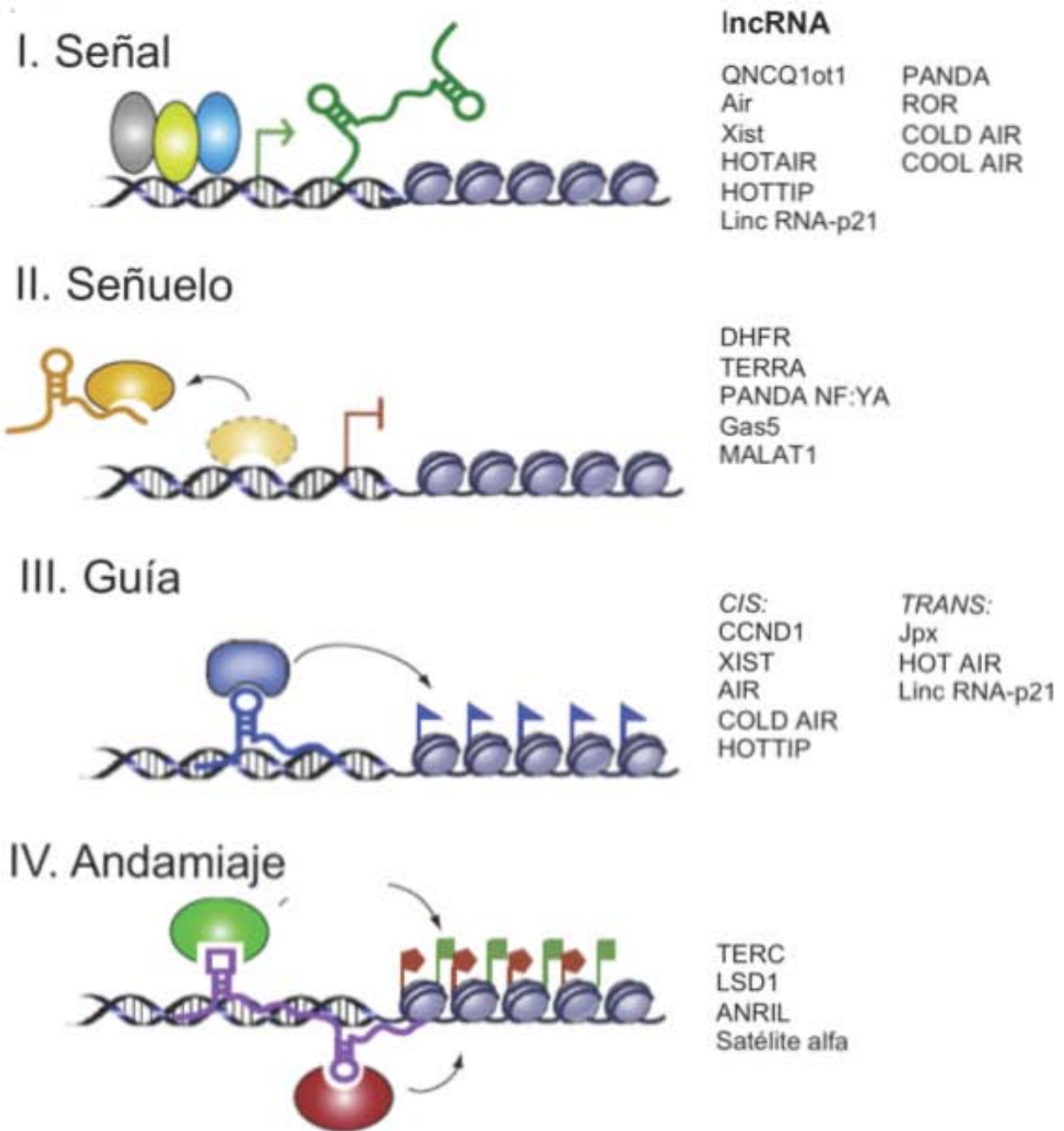
transcripcional, muestran la misma vía para el establecimiento y mantenimiento de la estructura de la heterocromatina constitutiva (Li, 2013; Jiang, 2012; Probst y Almouzni, 2011); éstos también son dsRNAs y pueden actuar de forma *cis* o *trans*, además se unen al complejo de silenciamiento de la transcripción, inducido por RNA (RITS) e induce un incremento de las marcas de H3K9me2 y H3K27me2 (Kim, 2006; Hawkins, *et al.*, 2009). Los factores necesarios para que se lleve a cabo el silenciamiento transcripcional por esta vía, son: Ago1, DNA metil-transferasa 3a (DNMT3a) y HDAC (Hannon, 2002; Long-Cheng, 2014; Hawkins, *et al.*, 2009).

Por su parte; los miRNAs, son RNA que miden alrededor de 22 nt de largo, son transcritos por la RNA polimerasa II y en algunos casos, al igual que los tRNA, el 5S ribosomal y el RNA uridinilado pequeño U6 (UsnRNA), son transcritos por la RNA polimerasa III. Al transcrito primario se le da el nombre de pri-pre-miRNA y miden aproximadamente 1 kb. de largo. Posteriormente el pri-pre-miRNA es procesado por Dicer a un RNA intermedio, pre-miRNA que cuenta con una estructura de trébol y mide entre 60 a 70 nt el cual es cortado por la RNA endonucleasa III, drosha, que genera un dúplex de miRNA que es exportado del núcleo al citoplasma por el receptor Ran-GTP, exportina-5. Finalmente, uno de los miRNAs es cargado a la subunidad Ago1 de RISC el cual se une al extremo 5`UTR del RNAm blanco y lleva a cabo la inhibición de la traducción (Bartel, 2005; Fabian y Sonengerg, 2012).

La tercera clase de sRNA son los piRNAs, que miden de 26-31 nt y no son procesados por Dicer (Chu y Rana, 2007). Su función es la de silenciar transposones y sirven para mantener las células pluripotentes en líneas germinales (O`Donnell y Boeke, 2007).

Los RNAs-nc que miden más de 200 nt son considerados RNAs no codificantes largos (RNAs-ncl), son transcritos por la RNA polimerasa II, tienen niveles de transcripción bajos y cuentan con modificaciones de 5` cap y Poliadenilación en 3`, (Guttman, *et al.*, 2009). Los RNA-ncls muestran niveles de transcripción específico para cada tejido y responden a diversos estímulos, los RNAs-ncl se clasifican según las funciones que se han descubierto hasta ahora; se encuentran los de señal para factores de

transcripción y remodeladores de la cromatina, señuelo de remodeladores de la cromatina, guía cis y trans y andamiaje para proteínas de unión a DNA (Wang y Chang, 2011) (Figura 4).



**Figura 4.-** Modelos de las funciones de RNAs-ncI: Señal, sirven como reguladores en la iniciación, elongación o terminación de la transcripción; Señuelo, se unen y titulan a sus proteínas blanco que son factores de transcripción; Guía, funciona de guía para proteínas como remodeladores de la cromatina y otros RNAs-nc y pueden actuar de forma *cis* o *trans*; y los de Andamiaje, sirven como plataforma en donde se ensamblan múltiples proteínas efectoras. Cada tipo en la clasificación de los RNAs-lnc tiene sus correspondientes ejemplos a la derecha (tomado y modificado de Wang y Chang, 2011).

**I. Señal.-** Estos RNAs-nc funcionan como señales moleculares, poseen funciones reguladoras, ya sea en iniciación, elongación o terminación de la transcripción. Otra función en el mecanismo molecular es la especificidad de alelo, conocida como “impronta génica”. En organismos diploides en donde se encuentran dos alelos de cada gen autosómico uno de los alelos muestra una restricción de la transcripción llevado a cabo por este mecanismo epigenético (Mohammad, *et al.*, 2009).

Uno de los ejemplos más estudiados que lleva a cabo esta función es *Kcnq1ot1*, es un RNA-lnc que mide 90 kb., se expresa en el alelo paterno y silencia el dominio improntado del gen *Kcnq1*. *Kcnq1ot1* interacciona con la metil-transferasa de histonas G9a y PRC2 formando una represión de la transcripción del dominio en *cis*, al reclutar al complejo policomb (Pandey, *et al.*, 2008). Otro ejemplo importante de RNA-lnc señal es *Air*; se transcribe en el segundo intrón del gen *Igf2r* en el alelo materno de ratón y reprime genes de manera tejido y alelo específico reclutando a G9a (Nagano, *et al.*, 2008). La inactivación del cromosoma X (*Xic*) ha sido un fenómeno biológico bastante estudiado, donde se encuentra involucrado el RNA-lnc “*Xist*” que se transcribe en el cromosoma X inactivo y recubre al cromosoma del cual fue transcrito, reprimiéndolo casi en su totalidad (Tian, *et al.*, 2010). Otros RNA-lnc que funcionan como guía, regulan la expresión de genes HOX, los cuales a su vez, regulan la expresión específica de las diferentes partes del cuerpo de forma antero-posterior. Estos genes, se transcriben con una moda temporal y son sitio específicos; el RNA-lnc HOTAIR, mide 2.2 kb y reprime a HOXD de manera *trans*, reclutando al complejo Policomb (Rinn, *et al.*, 2007). Además de estos ejemplos, también se encuentran otros RNA-lnc que llevan a cabo esta función, como HOTTIP, PANDA, COLDAIR y COOLAIR, entre otros.

**II. Señuelo.-** Estos RNAs-ncl, se unen y titulan a sus proteínas blanco que son factores de transcripción, modificadores de la cromatina y reguladores de la transcripción; evitando que se unan a su secuencia de DNA blanco. De esta manera, este tipo de RNAs-ncl actúa regulando a las proteínas efectoras de manera negativa para la transcripción.

Dentro de este tipo de lncRNAs, se encuentra DHFR, el cual disminuye la transcripción del gen que codifica para la proteína de hidrofolato humano (*DHFR*), inhibiendo la formación del complejo de inicio de la transcripción, atrapando al factor de transcripción IIB (TFIIB) (Martianov, *et al.*, 2007). Otro ejemplo es TERRA el cual interactúa e inhibe a la telomerasa, la cual es una enzima reverso-transcriptasa conservada en eucariontes, cuya función es mantener la estabilidad del genoma adhiriendo repetidos de DNA telomérico en la parte final los cromosomas (Rendon, *et al.*, 2010).

**III. Guía.-** Este tipo de RNAs-ncl funciona de guía para proteínas como remodeladores de la cromatina y otros RNAs-nc. Pueden ser transcritos y sirven como guía en el mismo locus o pueden transcribirse en un locus y servir como guía en otro.

*CIS.-* Estos son transcritos en el mismo locus en donde se lleva a cabo su función. Uno de los RNA-lnc mejor caracterizados es Xist.

*TRANS.-* Estos son transcritos en un locus distinto de donde llevan a cabo su función. La expresión del RNA-lnc HOX, HOTAIR es un ejemplo de guía que actúa de forma *trans* y otro ejemplo importante es Jpx que es importante para la acción del Xist en el cromosoma Xic. Esto se demostró al realizar deleciones y disminuciones de la transcripción para Jpx, donde posteriormente se suplió de forma *trans*, observándose un rescate en la activación de Xist (Tian, *et al.*, 2010).



**IV.- Andamiaje.-** Estos RNA-ncls sirven como plataforma en donde se ensamblan múltiples proteínas efectoras (Spitale, *et al.*, 2011).

HOTAIR es un RNA-ncl que mide 2.2 kb del cual se ha comprobado que los primeros 300 nt del extremo 5' se unen al complejo PRC2 el cual trimetila a la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) y las demás bases interaccionan con un segundo complejo que esta formado por LSD1, CoREST y REST que desmetilan a las histonas H3 y H4, inactivando la transcripción del gen (Tsai, *et al.*, 2010). El RNA-ncl transcrito del satélite  $\alpha$  es un RNA-nc necesario para el establecimiento de la heterocromatina pericentromérica asociándose a la modificación pequeña similar a ubiquitina (SUMO) y a la proteína de heterocromatina 1 (HP1), proveyendo especificidad al complejo HP1-SUMO (Maison, *et al.*, 2011). En el centrómero, los RNA-nc que se transcriben del satélite  $\alpha$ , son polimerizados en todas las distintas fases del ciclo celular, hasta en mitosis, contradiciendo el paradigma de la inactivación transcripcional global mitótica; son transcritos por la RNA polimerasa II y su transcripción puede ser inhibida por  $\alpha$ -amanitina en mitosis y como consecuencia se observan rezagos de los cromosomas anafásicos que producen una mala segregación cromosómica (Chan, *et al.*, 2012). En 2009, Gopalakrishnan y colaboradores mostraron que una baja en la expresión por siRNA de la DNA metil-transferasa 3B (DNMT3B) y CENP-C, las cuales son dos proteínas que interactúan y actúan en conjunto durante metafase en las regiones centroméricas y pericentroméricas de células HCT116, provocan un cambio en las marcas de histona características de ambas regiones así como una sobre-expresión en los niveles de RNA-ncs del centrómero y regiones pericentroméricas y observaron rezagos anafásicos; Los RNA-nc del satélite  $\alpha$  sirven como plataforma para proteínas del punto de monitoreo, para proteínas del cinetocoro y proteínas involucradas en el mantenimiento de la heterocromatina como HP1 y DNMTs, también se ha propuesto los RNA-nc del satélite  $\alpha$  son importantes para el establecimiento de la cromatina del centrómero reclutando a Mis18, el cual es la chaperona que deposita a CENP-A (Alonso, *et al.*, 2003; Chueh, *et al.*, 2009; Kim, *et al.*, 2012; Wong, *et al.*, 2007;).

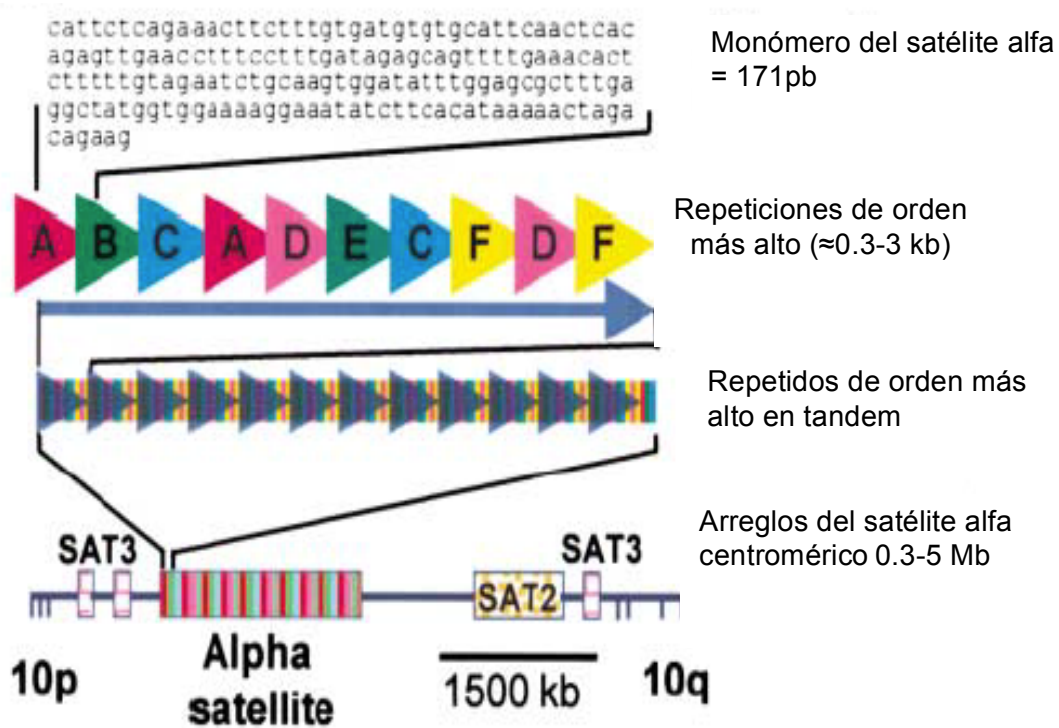
## Centrómero

El centrómero es una estructura característica del cromosoma eucarionte, se define como: “la interfase cromosómica que se encuentra entre los brazos de cada cromosoma y forma el complejo centrómero/cinetocoro”. Este es el sitio al que se unen los microtúbulos del huso mitótico y es esencial para que se lleve a cabo una correcta segregación de los mismos durante la mitosis (Cheeseman and Desai, 2008).

El centrómero está compuesto por monómeros repetidos en tándem de 171 pb. llamados satélite  $\alpha$  (Manuelidis, 1978), los cuales muestran una identidad del 60% al 80% entre cromosomas (Rudd y Willard, 2004; Waye y Willard 1987; Willard y Waye, 1987). Un conjunto de monómeros del satélite  $\alpha$  componen los repetidos de alto orden (HOR, por sus siglas en inglés, High Order Repeat) y cada HOR es considerado como una familia de satélite  $\alpha$ ; los HOR se repiten en tándem, formando arreglos de satélite  $\alpha$  que muestran aproximadamente un 90% de identidad (Figura 5). Distintos estudios, han demostrado que la secuencia del centrómero no se encuentra conservada entre las especies que han sido utilizadas como modelo de estudio (Cleveland, *et al.*, 2003) únicamente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra un centrómero de 25 pb capaz de reclutar a CENP-A y a las proteínas del cinetocoro (Cheeseman, 2002; Laloraya, *et al.*, 2000; Tanaka, *et al.*, 1999).

Actualmente se han realizado distintos trabajos en los que se utilizan diversos modelos matemáticos y probabilísticos con los que se realizan mapas de los distintos centrómeros (Roy, *et al.*, 1998; Benson, 1999; Chakravarthy, 2004; Krishnan y Tang, 2004; Nandy, *et al.*, 2006; Leclercq, *et al.*, 2006). Sin embargo, la dificultad que se presenta para llevar a cabo los estudios del centrómero todavía es alta ya que son pocos los estudios que se han realizado para unificar los tipos de algoritmos utilizados en los análisis de la secuenciación de las secuencias repetidas del satélite  $\alpha$  (Gluncic y Para, 2012; Hayden, 2012; Hayden, *et al.*, 2013).

“Papel de CTCF en la transcripción de RNAs-nc de Centrómero”

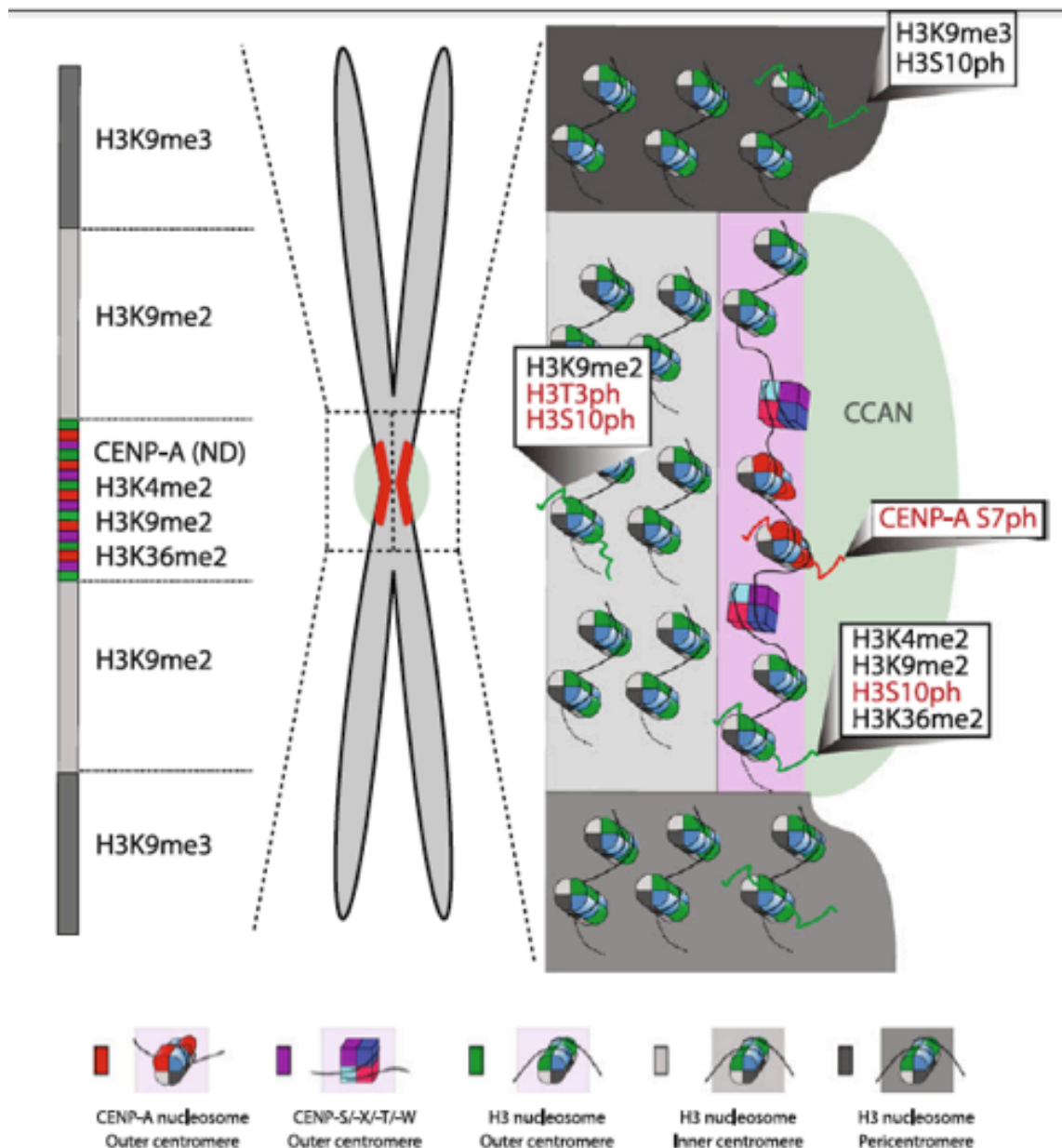


**Figura 5.-** Elementos constituyentes del centrómero en mamíferos. El satélite  $\alpha$  se encuentra en el centrómero y un conjunto de repetidos del satélite  $\alpha$  forman los HOR. En la región pericentromérica se encuentran repetidos de satélites 2 y 3.

La variante de histona, CENP-A, es necesaria y fundamental para el establecimiento del cinetocoro y tiene una función conservada desde levaduras hasta mamíferos (Barnhart, *et al.*, 2011; Mellone, y Allshire, 2003; Mendiburo *et al.*, 2011; Schueler and Sullivan, 2006). En el centrómero, CENP-A se encuentra en regiones alternadas con la histona H3, y dentro de los dominios de H3 se encuentran marcas de histona como la H3K9me2 y la H3K4me2 (Lam, *et al.*, 2006; Sullivan y Karpen, 2004). La región del centrómero se encuentra flanqueada por grandes bloques de heterocromatina constitutiva en las regiones pericentroméricas donde se encuentra un enriquecimiento de la marca de histona H3K9me3 (Figura 6) y ambas regiones son necesarias para que se lleve a cabo una buena segregación de los cromosomas (Partridge, 2000; Blower y Karpen, 2001; Urgakovic, 2009).

Se ha determinado que existe una alta densidad de metilación del DNA en las región del centrómero y pericentromérica de células normales, sin embargo en células cancerosas existe una hipometilación en ambas regiones (Robertson, 2005; Jones y

Baylin, 2002); también se ha encontrado la transcripción de RNAs no codificantes (RNA-nc), que son necesarios en el reclutamiento de proteínas esenciales para la formación del complejo centrómero/cinetocoro como CENP-A, CENP-C y proteínas del punto de monitoreo mitótico como INCENP, survivina y Aurora B (Chan, *et al.*, 2012; Cleveland, *et al.*, 2003; Rudd and Willard, 2004; Schueler and Sullivan, 2006; Karpen and Allshire 1997; Sullivan and Karpen, 2004).



**Figura 6.-** Marcas epigenéticas de histonas presentes en centrómero durante interfase y mitosis. En el centrómero se encuentran marcas de activación como inactivación transcripcional y en la región pericentromérica se encuentran marcas de heterocromatina constitutiva (Tomado y modificado de Madison *et al.*, 2012).

## “Papel de CTCF en la transcripción de RNAs-nc de Centrómero”

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Se encuentra CTCF favoreciendo la transcripción de RNA-ncs de centrómero?

## **HIPÓTESIS**

La presencia de CTCF en centrómero se asocia con un estado de transcripción activa de RNAs-nc.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la participación de CTCF en la transcripción de RNAs-nc de centrómero.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la unión de CTCF en centrómero durante interfase y mitosis.
2. Caracterizar las marcas de histonas en centrómeros de células HCT116.
3. Determinar la expresión relativa del satélite  $\alpha$  en células HCT116 comparadas con WI-38.
4. Determinar los niveles de expresión del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 en células HCT116, durante interfase y mitosis.
5. Evaluar los niveles de los RNA-ncs del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 y los niveles de la proteína CTCF en células Wi-38 y HCT116 tratadas con TSA.
6. Inhibir a CTCF y evaluar los niveles de RNA-ncs del satélite  $\alpha$  y el satélite 2.
7. Evaluar los niveles de los RNAs-nc del satélite  $\alpha$  y satélite 2 en HCT116 tratadas con 3-ABA.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **1. Cultivos celulares**

Para realizar los estudios del presente trabajo, fueron utilizadas líneas celulares de fibroblastos normales de pulmón, WI-38 y líneas celulares epiteliales derivadas de carcinoma colorrectal, HCT116. Ambas líneas celulares son de *Homo sapiens*. Los medios de cultivo utilizados en WI-38 y HCT116 fueron EMEM y McCoy's, respectivamente y las condiciones de cultivo fueron a 37°C, a una atmosfera de presión y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2. Tratamientos con TSA**

Las células fueron tratadas con 1 µM del inhibidor de HDACs (HDACIs) Tricostatina A (TSA) que promueve la relajación de la cromatina vía inhibición de desacetilasas de histona (Maison y Almouzni, 2004) durante 24 y 48 horas; el medio fue reemplazado con medio nuevo suplementado con TSA 1 µM cada 24 horas. Fueron utilizadas como control del tratamiento, células sin tratamiento.

### **3. Tratamientos con 3-ABA**

Las células fueron tratadas con 8 mM del inhibidor de la proteína PARP-1,3-aminobenzidina (3-ABA), para inhibir la acción de proteína aisladora de CTCF durante 48 horas; el medio fue reemplazado con medio nuevo suplementado con 3-ABA 8 mM cada 24 horas. Como control del tratamiento, fueron utilizadas células sin tratamiento.

#### **4. Inmunofluorescencias**

Para conocer la localización de CTCF en células HCT116 y WI-38, se cultivaron sobre cubreobjetos de 22x22 mm, donde fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 10 minutos. Las células fueron lavadas tres veces por 3 minutos con PBS 1X y se llevo a cabo la permeabilización con triton 100X al 0.5% durante 10 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS 1X para retirar el fijador y se bloqueo con albumina 1% durante una hora. Las células se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se realizaron tres lavados con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, aislado de la luz. Por último se montaron las células con Vecta Shield-DAPI en un portaobjetos para ser observados en el microscopio de fluorescencia utilizando un Zeiss Axio-Imager A2; las imágenes fueron analizadas utilizando el software Axiovision 4.8, y se observó la localización de las proteínas CTCF y la marca de histona H3K9me3 por fluorescencia.

#### **5. Ensayo de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

Con el fin de conocer si CTCF se une al centrómero y a la región pericentromérica, se empleo el ensayo de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Este ensayo se utilizó para determinar la presencia de CTCF y la abundancia de las marcas de actividad transcripcional: H3K4me2, H3K9ac y las marcas de inactividad transcripcional: H3K9me2, H3K9me3; así como la presencia de CENP-A en el centrómero. Este ensayo se llevo a cabo amplificando el satélite  $\alpha$  y satélite 2 de la línea celular HCT116 y WI-38 durante interfase y mitosis, sincronizadas con nocodazol 2 ng/mL y separadas mediante la técnica de “shake off”, obteniendo una subpoblación de células en mitosis y otra de células en interfase con el fin de determinar si existe una relación entre la presencia de CTCF, las marcas de histonas y los niveles del transcrito.



Los ensayos de ChIP, se realizaron utilizando una curva estándar del input al 10%, 1% y 0.1% para extrapolar el porcentaje de input con el que se puede inferir la abundancia de la proteína unida a la cromatina. Posteriormente se determinó la ocupancia relativa al normalizar con el ruido de fondo, IgG; y determinar las veces de enriquecimiento relativo. Los resultados obtenidos son representativos de experimentos independientes realizados por triplicado, los cuales fueron amplificados por triplicado en placas ópticas de 96 pozos para qPCR (fast optical 96well plate, Applied Biosystems). El qPCR fue realizado utilizando Thermo Maxima SYBR Green/ROX 1qPCR Master Mix (Thermo Scientific K0222) que fue amplificado con el sistema de tiempo real “Step One plus” (Applied Biosystems, 4376600).

## **6. Análisis de expresión relativa de RNA**

Para conocer los niveles de RNA, primero se obtuvo RNA total por el método de Trizol® (Invitrogen cat. 1559602) de cultivos de células WI-38 y HCT116 en células asincrónicas, células en interfase y mitosis tratadas con nocodazol 2 ng/mL y separadas por “shake off”. A su vez, se obtuvo RNA de células WI-38 y HCT116 tratadas con TSA 1  $\mu$ M, tratadas durante 24 y 48 horas. El RNA fue tratado durante 1 hora con Dnasa I (Fermentas cat. #ENO521) y se llevó a cabo la reacción de Retro-Transcripción (RT) en 1  $\mu$ g de RNA en ambas líneas celulares. Se obtuvo el cDNA con el kit de GenAmp® RNA PCR KIT de Applied Biosystems; utilizando 1  $\mu$ g de RNA y siguiendo las especificaciones del fabricante.

Posteriormente se realizó el ensayo de qRT-PCR por triplicado experimental en una placa de 96 pozos, utilizando SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix (Fermentas cat. K0222) para determinar la expresión relativa del satélite  $\alpha$  y del satélite 2 en células HCT116 calibrando con la expresión de WI-38 y normalizando con GAPDH. El análisis de expresión relativa se realizó al aplicar  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ .

## 7. Transfección de siRNA contra CTCF

Para evaluar la contribución funcional del factor nuclear CTCF, se transfectaron células HCT116 con RNA interferente (siRNA) contra CTCF utilizando Lipofectamina LTX and Plus Reagent de invitrogen; de esta manera, se determinó la aportación que realiza esta proteína en los niveles de expresión del satélite  $\alpha$  y del satélite 2.

## 8. Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas *t de student* para conocer si existen diferencias significativas del enriquecimiento de CTCF en los ensayos de ChIP después de llevar a cabo la técnica de “shake-off”; comparando interfase con mitosis en satélite  $\alpha$  y satélite 2 de la línea celular HCT116, en los tratamientos con TSA comparando control sin tratamiento con los tratamientos de 24 y 48 horas respectivamente en las líneas celulares WI-38 y HCT116. Se utilizó *t de student* para la H3K9me3 en satélite  $\alpha$  y satélite 2 de las líneas celulares WI-38 y HCT116, comparando control sin tratamiento con tratamiento de TSA 24 y 48 h respectivamente.

Se realizó también *t de student* para conocer si existen diferencias significativas de los niveles de RNA del satélite  $\alpha$  y satélite 2 después de llevar a cabo la técnica de shake-off; comparando mitosis con interfase de la línea celular HCT116 y en las líneas celulares WI-38 y HCT116 tratadas con TSA; comparando control sin tratamiento con células tratadas durante 24 y 48 horas respectivamente.

Los ensayos de transfección fueron comparados con la prueba *t de student* comparando plásmido con inserto de siRNA para CTCF (siRNA-CTCF) *versus* plásmido con GFP (eGFP) y células normales sin transfección *versus* eGFP. Todos los experimentos fueron realizados con triplicado biológico y triplicado experimental y fue utilizado un valor de significancia  $\alpha = 0.95$  y  $\alpha = 0.99$ .



## **RESULTADOS**

### **Localización celular de CTCF en células WI-38 y HCT116 en interfase y mitosis**

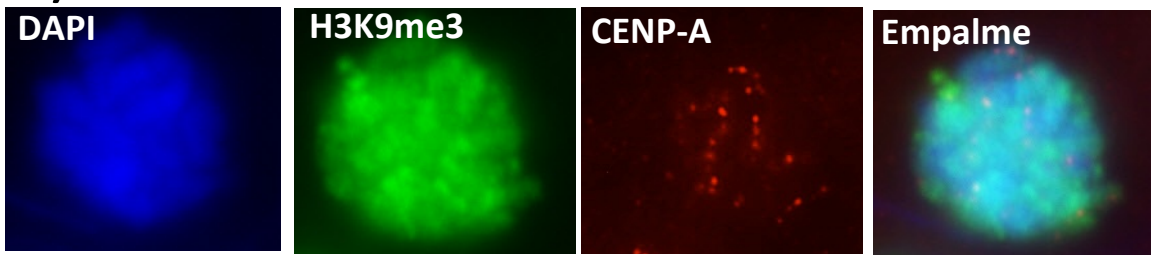
En los ensayos de doble inmunofluorescencia (IF) en WI-38, se observó la modificación post-traducciona de histona, H3K9me3 y se marcaron los centrómeros, utilizando el anticuerpo anti-CENP-A. La H3K9me3 se encontró en el cromosoma metafásico durante mitosis y se determinó una co-localización en el área del centrómero. (Figura 7A).

También se observó la localización de la proteína CTCF en núcleo celular y no se logró determinar una co-localización con CENP-A, en células WI-38 (Figura 7B).

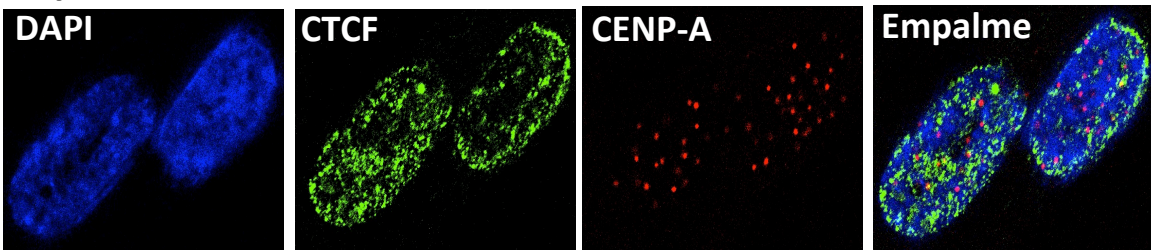
En HCT116, se observó una co-localización de H3K9me3 y CENP-A (Figura 7C). Por su parte, CTCF se localizó en la cromatina nuclear de células en interfase, mientras que en mitosis se encontró en los cromosomas (Figura 7D).

## WI-38

A)

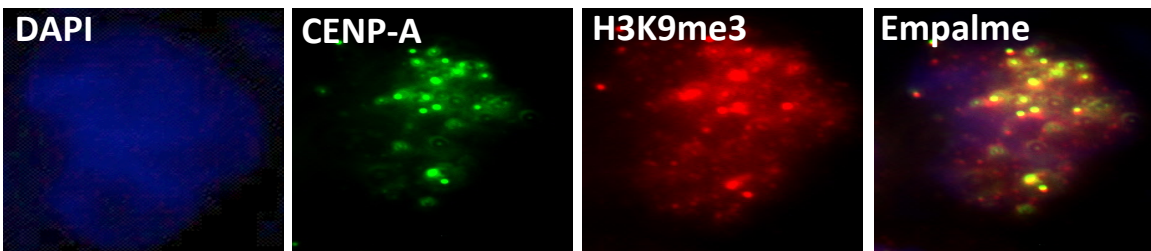


B)

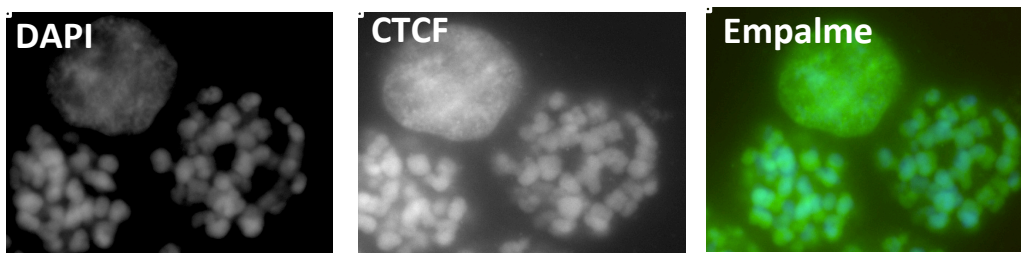


## HCT116

C)



D)



**Figura 7.- La marca de histona H3K9me3 se encuentra en centrómero en de ambas líneas celulares y CTCF se encuentra en nucleoplasma durante interfase y unida al cromosoma durante mitosis.** A) Doble inmunofluorescencia de la marca de heterocromatina, H3K9me3 (verde) y CENP-A (rojo). B) Doble inmunofluorescencia de CTCF (verde) y CENP-A (rojo) en WI-38.

En células HCT116, se observa a CTCF unido al cromosoma, durante mitosis. C) Doble inmunofluorescencia de H3K9me3 y CENP-A D) Inmunofluorescencia de CTCF en células HCT116 durante interfase y mitosis.

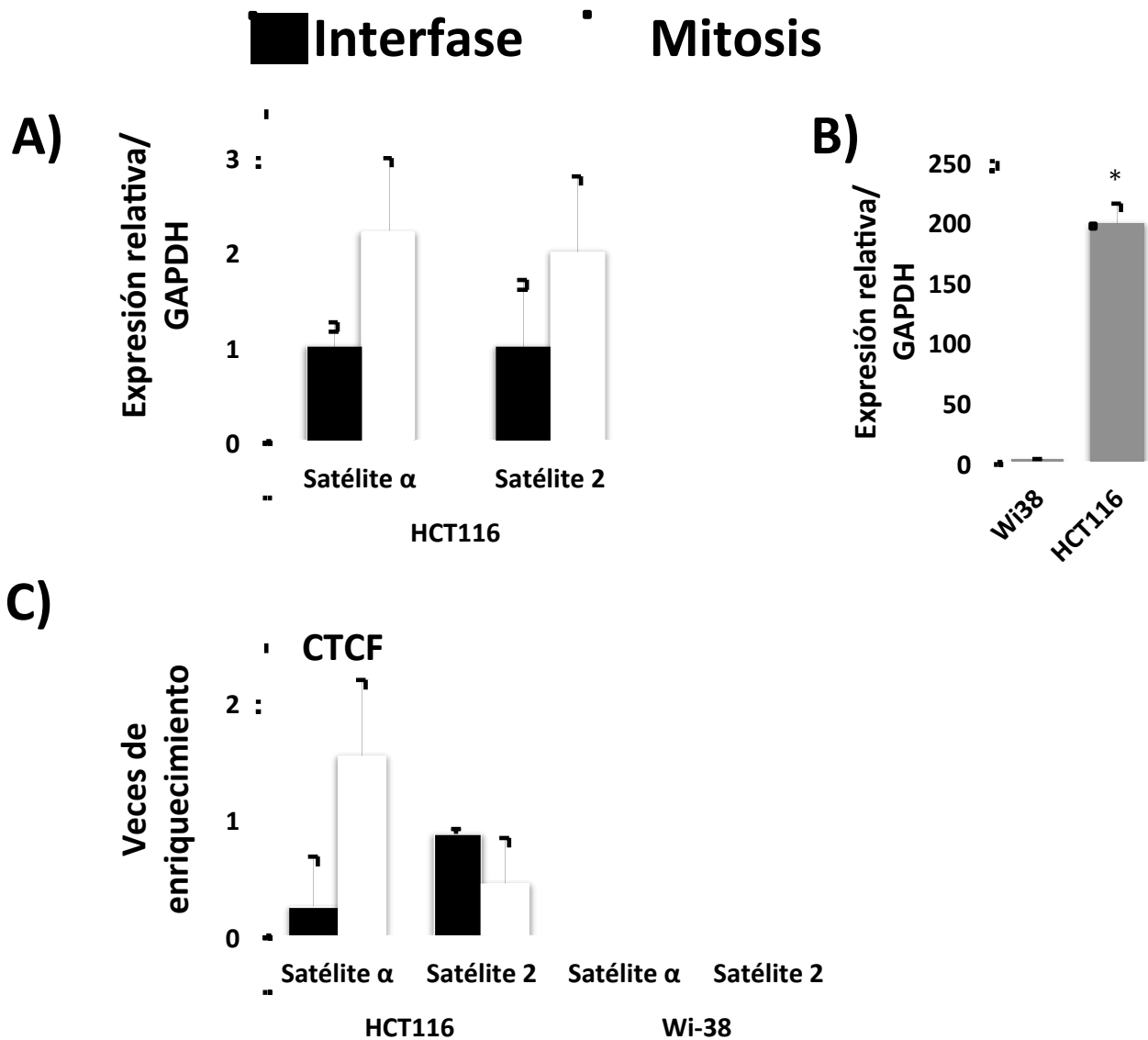
\*Todas las figuras fueron tomadas a 100X

**Presencia de CTCF y su efecto en la transcripción de los RNA-ncs de satélite  $\alpha$  y satélite 2 en células WI-38 y HCT116.**

Se realizaron ensayos de ChIP en células WI-38 y HCT116 inmunoprecipitando a la proteína CTCF para observar el enriquecimiento en el satélite  $\alpha$  (región centromérica) y en el satélite 2 (región pericentromérica). Se observó que la proteína CTCF se encuentra ausente en ambas regiones de la línea celular WI-38, pero se encontró presente en la línea celular HCT116, mostrando una tendencia de aumento en el satélite  $\alpha$  durante mitosis, sin embargo no existen diferencias significativas ( $p>0.05$ ). En el satélite 2 tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) (Figura 8A).

Se realizó un análisis de expresión relativa comparando la cantidad del transcrito de HCT116 con WI-38 y se observó una sobre-expresión del satélite  $\alpha$  en HCT116 (Figura 10B).

Además se realizó el análisis de expresión relativa para el transcrito no codificante del satélite  $\alpha$  en HCT116 se observó durante interfase y mitosis, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). La presencia del transcrito del satélite 2, también se encontró durante interfase y mitosis sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) (Figura 8C).



**Figura 8.- Abundancia de CTCF y su efecto en la transcripción del RNA no codificante del centrómero en células WI-38 y HCT116.** A) ChIP de CTCF en el satélite  $\alpha$  y satélite 2 en una población de células separadas en subpoblaciones de mitosis e interfase. B) Expresión relativa del satélite  $\alpha$  en células HCT116 calibrado con células WI-38 y normalizado con GAPDH. C) qRT-PCR de los RNA-nc del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 en una población de células separadas en subpoblaciones de mitosis e interfase de células HCT116.

\*Existen diferencias significativas al ser comparadas con la prueba *t de student* ( $p < 0.05$ ).

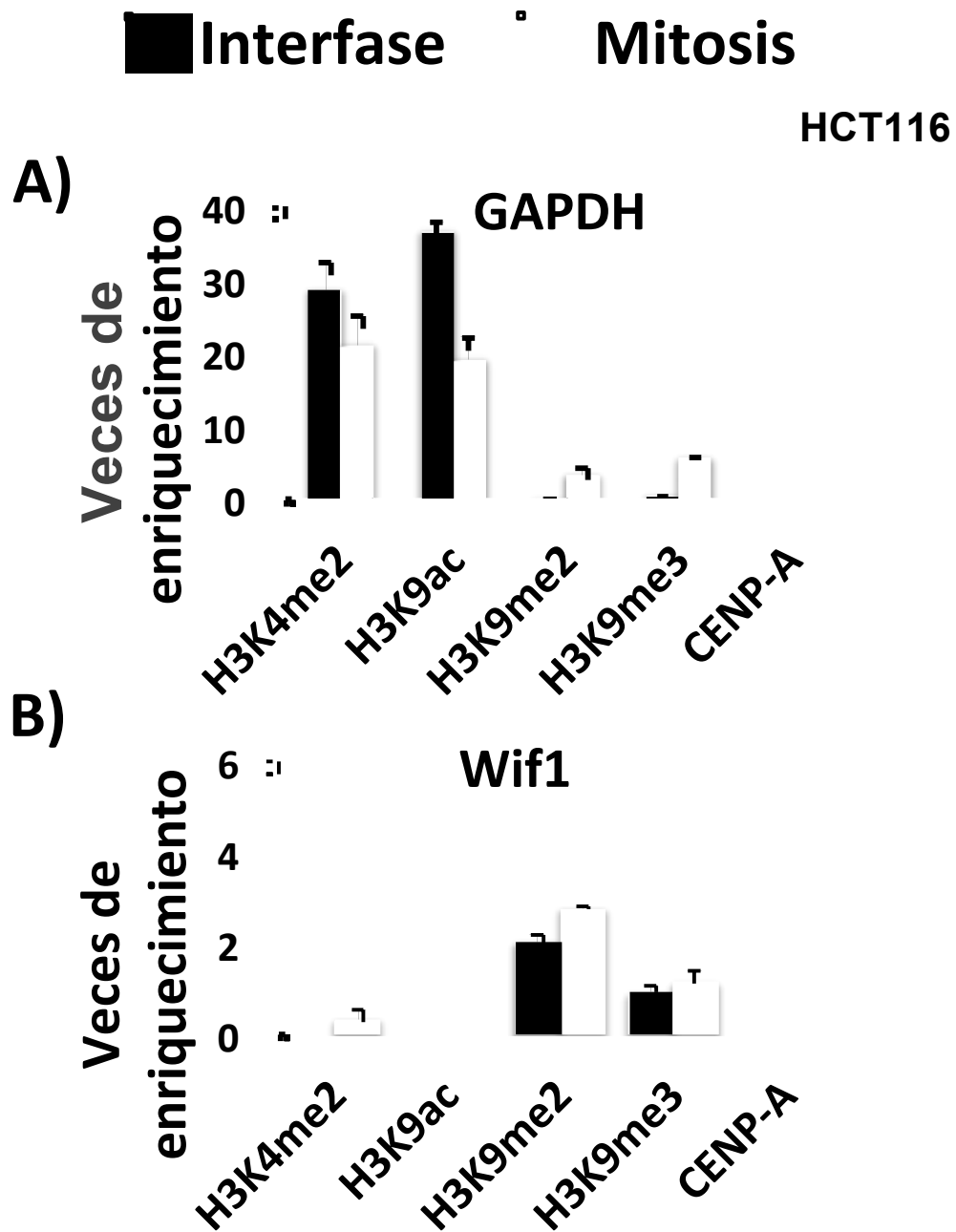
**Determinación de las marcas de histona en la región del centrómero y la región pericentromérica de células HCT116 durante interfase y mitosis.**

Se realizaron ensayos de ChIP para las diferentes marcas de histona: H3K4me2, H3K9ac, H3K9me2, H3K9me3, se utilizó como control centromérico a la variante de histona H3, CENP-A y se normalizaron los resultados utilizando un anticuerpo inespecífico anti-IgG.

Para demostrar que fueron bien realizados los ChIPs, se utilizó como control de eucromatina al promotor del gen GAPDH el cual es un gen constitutivo que se expresa de manera constante en los diferentes tejidos y tipos celulares y se conoce que esta enriquecido por marcas de actividad transcripcional. Se observó la presencia de las marcas H3K4me2 y H3K9ac, corroborando que se trata de una cromatina transcripcionalmente activa. También se observó que en mitosis, las marcas H3K9me2 y H3K9me3 se hacen presentes en el promotor de GAPDH (Figura 9A).

También se utilizó como control de heterocromatina al promotor del gen WIF1, el cual es un inhibidor de la vía Wnt, el cual ha sido reportado sin transcripción en células HCT116 (Gopalakrishnan, *et al.*, 2009). Observamos una abundancia de las marcas relacionadas con la estructuración de heterocromatina: H3K9me2 y H3K9me3. Además se encontró la presencia de la marcas H3K4me2 en mitosis (Figura 9B).





**Figura 9.-** Las marcas de activación transcripcional se encontraron en el promotor de GAPDH y las marcas de inactivación transcripcional se encontraron en el promotor de WIF1. Determinación de las marcas de histona en centrómero por Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIp) para las marcas de histona H3K4me2, H3K9ac, H3K9me2, H3K9me3, CTCF, CENP-A e IgG evaluado en A) el promotor del gen GAPDH y B) el promotor de WIF1 en células HCT116 durante interfase (negro) y mitosis (blanco).

En la región del centrómero evaluada en el satélites  $\alpha$ , se encontró la presencia de las modificaciones post-traduccionales de histona: H3K9ac y H3K9me2, además de la presencia de la variante de histona CENP-A en interfase. Las modificaciones post-traduccionales de histona: H3K9ac y H3K9me2 se mantienen constantes en interfase y mitosis; mientras que H3K9me2 y H3K9me3 se observan únicamente en el satélite  $\alpha$  en mitosis (Figura 10A).

En la región pericentromérica evaluada en el satélite 2, se encontró la presencia de las modificaciones post-traduccionales de histona: H3K9me2 y H3K9me3. Ambas marcas de represión transcripcional se mantienen constantes en interfase y mitosis; mientras que H3K9ac y H3K4me2 se muestran presentes únicamente en mitosis en el satélite  $\alpha$ ; el control de centrómero CENP-A, se mostró ausente en la región pericentromérica durante interfase y mitosis (Figura10B).

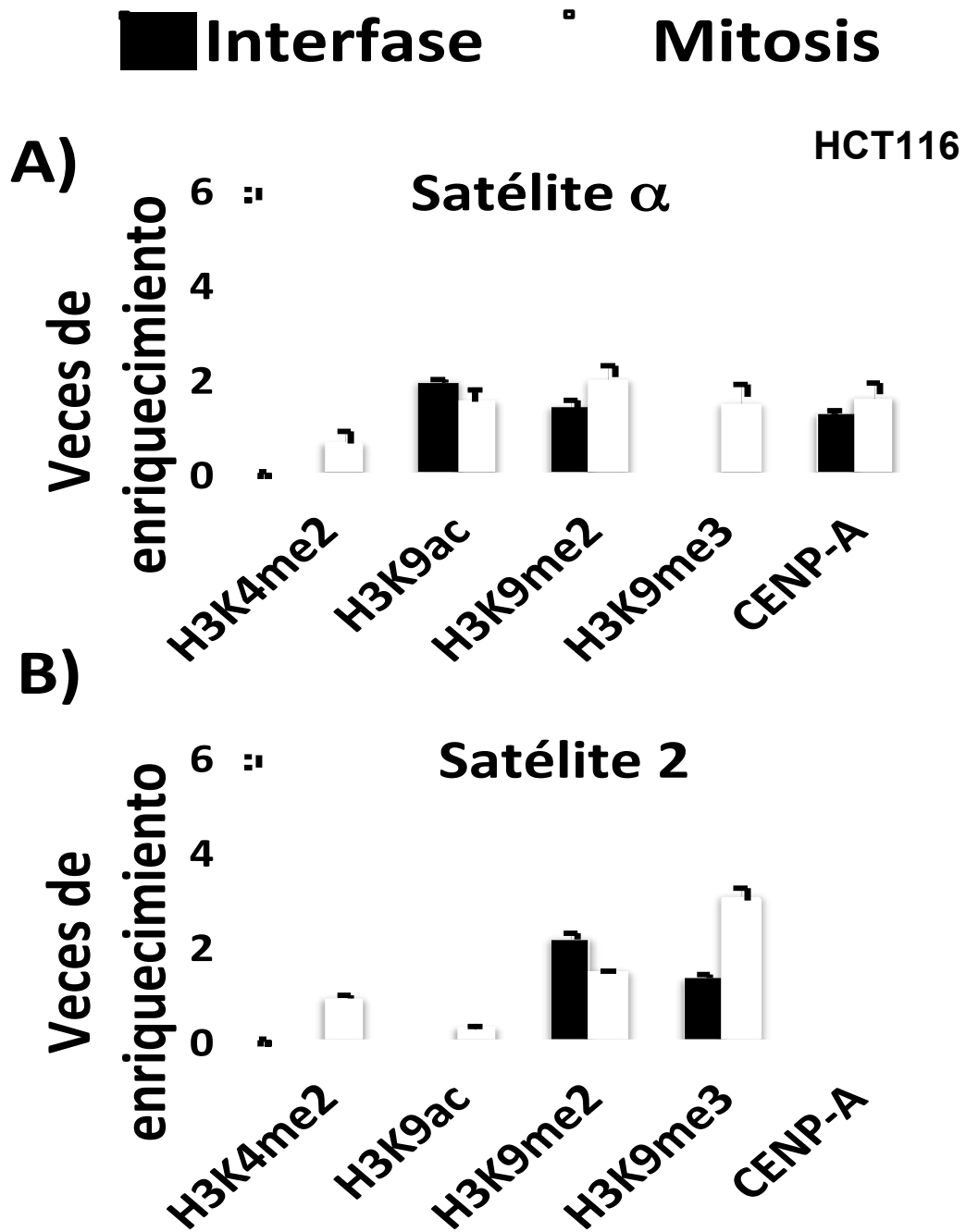


Figura 10.- El satélite  $\alpha$  muestra principalmente marcas de activación transcripcional en interfase y mitosis y el satélite 2 muestra principalmente marcas de represión transcripcional en interfase y mitosis. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para las marcas de histona H3K4me2, H3K9ac, H3K9me2, H3K9me3, CTCF, CENP-A e IgG evaluado en A) satélite  $\alpha$  y, B) Satélite 2; en células HCT116 durante interfase (negro) y mitosis (blanco).

**Determinación de los niveles de CTCF y la marca de heterocromatina constitutiva H3K9me3 en las regiones del centrómero y pericentromérica así como los de RNA-ncs de del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 en células WI-38 y HCT116 tratadas con TSA.**

Se realizaron ensayos de ChIP para células WI-38 y HCT116 tratadas por 24 y 48 horas con TSA 1 $\mu$ M para observar el efecto de una cromatina más laxa. Se observó que en WI-38, el enriquecimiento de CTCF aumenta en satélite  $\alpha$  y satélite 2 a partir de las 24 horas de tratamiento, mostrando una  $p < 0.05$  en todos los casos de WI-38. Mientras que en HCT116 se mantiene constante a las 24 horas del tratamiento seguido por un aumento en la presencia de CTCF en satélite  $\alpha$  a las 48 horas de tratamiento y en el satélite 2 se mantiene constante (Figura 11A).

Al determinar la marca de la histona H3K9me3 por medio del ensayo de ChIP en células WI-38 tratadas con TSA 1 $\mu$ M, se observó que en el satélite  $\alpha$  y el satélite 2, disminuye el nivel de enriquecimiento de esta marca a las 24 y 48 horas de tratamiento en las líneas celulares WI-38 y HCT116 obteniendo una  $p < 0.001$  (Figura 11B). Esto significa que los tratamientos con TSA provocan la disminución de la heterocromatina constitutiva en las regiones del centrómero y pericentromérica.

El análisis de expresión relativa, mostró que el transcrito no codificante del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 aumentaron su expresión con los tratamientos de TSA en ambas líneas celulares a las 24 y 48 horas de tratamiento obteniendo una  $p < 0.001$ , comparados con el control sin tratamiento (Figura 11C)

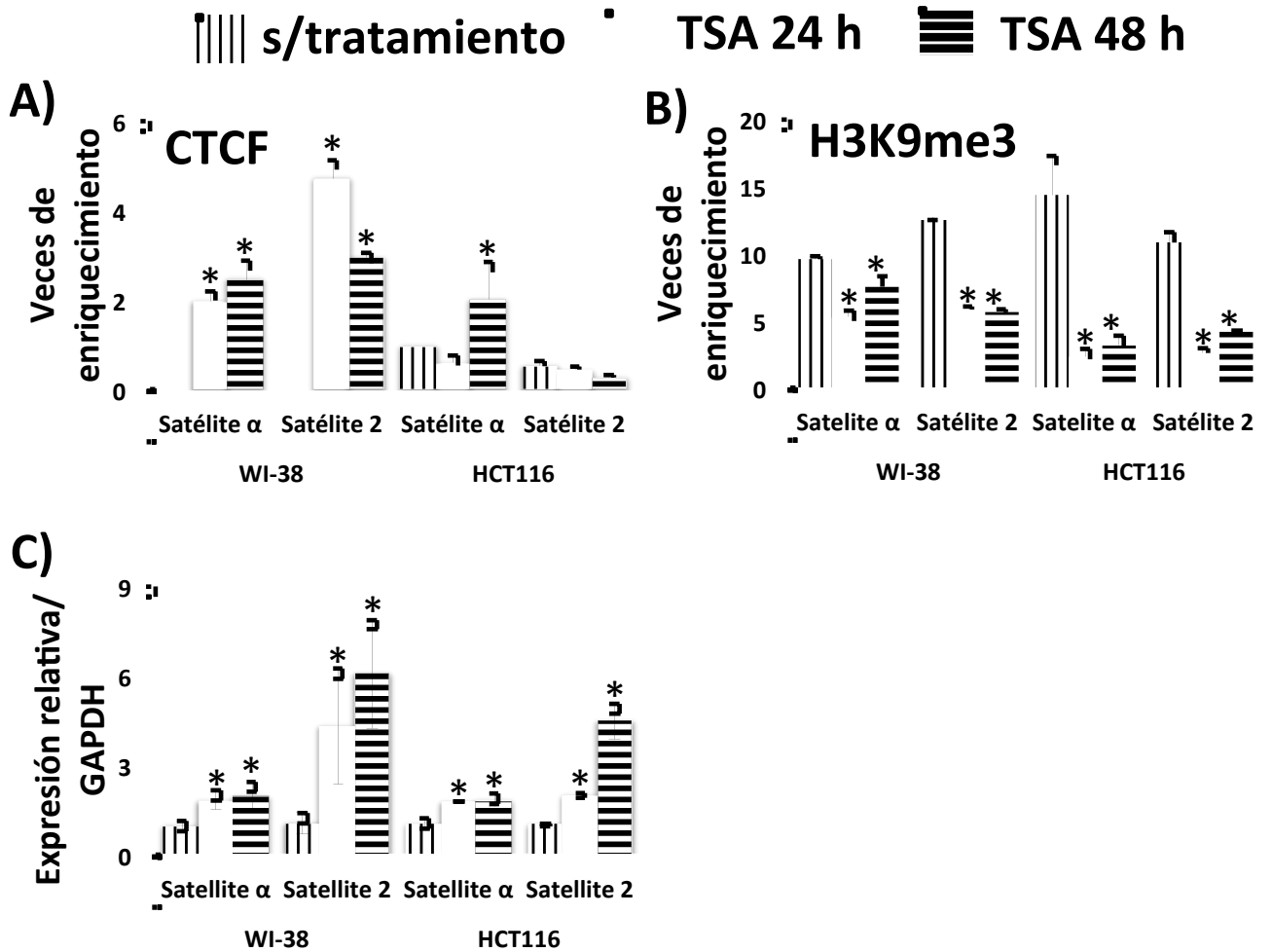


Figura 11.- Tratamientos con TSA provocan un reclutamiento de CTCF, disminución de la H3K9me3 y un aumento en los niveles del RNA-nc del satélite α. A) Chlp de CTCF B) Chlp para la H3K9me3. C) Análisis de expresión relativa por qRT-PCR de los RNA-ncs.

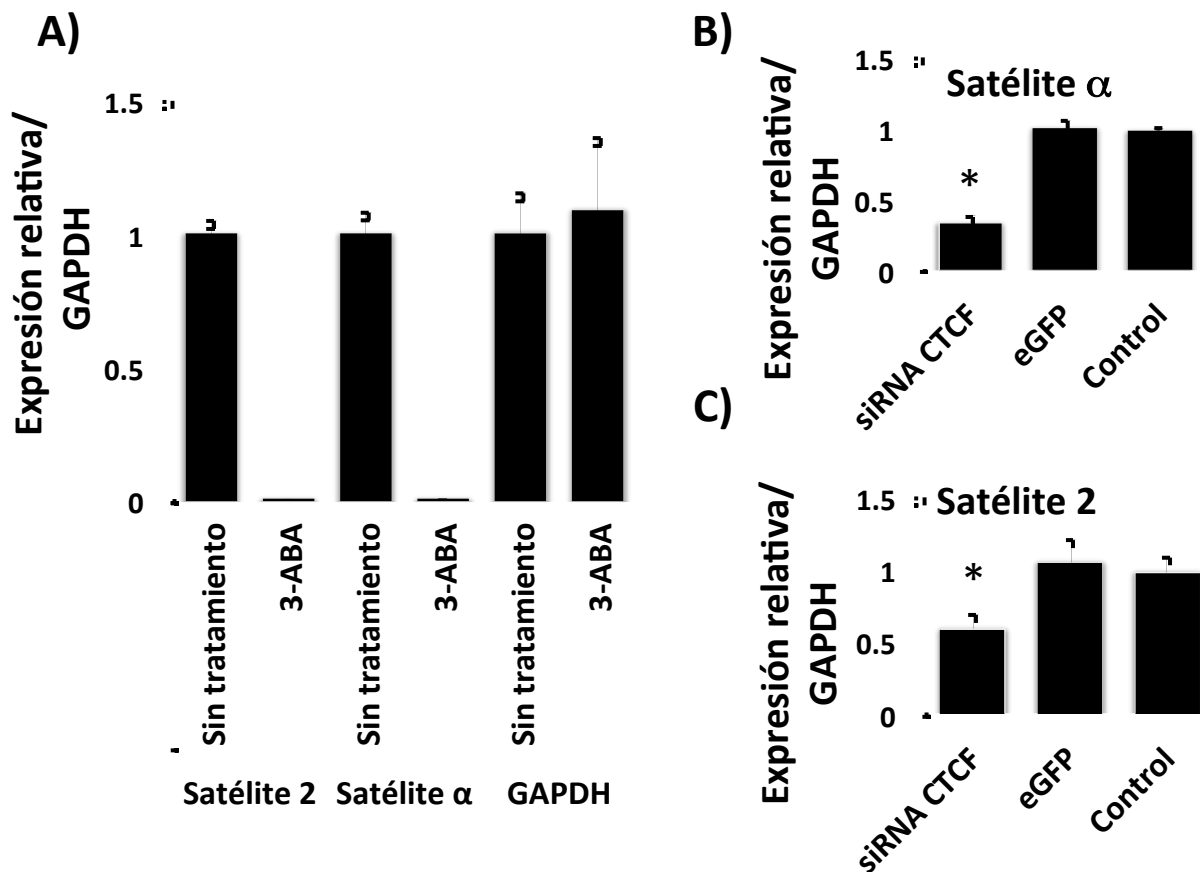
Todos los ensayos de esta figura fueron realizados en satélite α y satélite 2 de células tratadas con TSA 1μM durante 24 y 48 horas de tratamiento en las líneas celulares WI-38 y HCT116

\*Existen diferencias significativas al ser comparadas las células con tratamiento vs. células sin tratamiento con la prueba *t de student* ( $p < 0.001$ ).

**Determinación de los niveles de RNA-ncs del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 en células HCT116 tratadas con 3-ABA y transfectadas con el siRNA contra CTCF.**

Los tratamientos con 3-ABA mostraron una disminución de los RNA-ncs del satélite  $\alpha$  y satélite 2 en células HCT116, mientras que GAPDH permanece constante

Se observó en células HCT116, transfectadas con siRNA contra CTCF, una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en la transcripción del satélite  $\alpha$  y del satélite 2 comparado contra células transfectadas con eGFP. En las células control sin transfección, no existen diferencias significativas (Figura 12B y 12C).



**Figura 12.-** Inhibición de CTCF, evaluando los niveles de transcripción del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 en células HCT116.

\* Existen diferencias significativas al ser comparadas las células transfectadas eGFP vs. células transfectadas con siRNA CTCF y el control son transfección, utilizando la prueba *t de student* ( $p < 0.001$ ).

## DISCUSIÓN

### Unión de CTCF al cromosoma durante mitosis.

Las modificaciones post-transcripcionales de histonas asociadas a la activación y represión transcripcional se mantienen a lo largo de la mitosis para preservar el estatus en la actividad de cada gen; sugiriendo una memoria epigenética (Gazit, *et al.*, 1982; Michelotti, *et al.*, 1997). Aunque muchos de los factores de transcripción basal, la RNA polimerasa II, factores de unión a enhancer y las enzimas HAT y HDACs se encuentran ausentes en el cromosoma durante mitosis (Gottesfeld y Forbes, 1997; Kruhlak, *et al.*, 2001; Martínez-Balbas, *et al.*, 1995; Zaidi *et al.*, 2003); también ha sido comprobado que distintas proteínas se encuentran unidas al DNA durante mitosis, tales como: los factores de transcripción TFIID y TFIIB (Christova y Oelgeschlager, 2002), el complejo pasajero cromosómico (Adams, *et al.*, 2001) y otras proteínas como la DNA glicosilasa, proteínas de matriz nuclear (Dantzer, *et al.*, 2002) y poli-ADP ribosilasa (Kanai, *et al.*, 2000), entre otras. En nuestro trabajo, por medio del ensayo de inmunofluorescencia se observó a la proteína CTCF unida al cromosoma durante mitosis en células HCT116. Esto coincide con lo que ha sido reportado en la literatura para las líneas celulares HeLa y HBL-100 donde también se observa a CTCF por medio de inmunofluorescencias, esto también se ha observado en células con sobre-expresión de CTCF-GFP y en la fracción cromosómica valorada con Western-blot, durante mitosis (Burke, *et al.*, 2005; Rubio, *et al.*, 2008). Dado que CTCF tiene distintas funciones asociadas a la activación o represión de la transcripción, nos preguntamos: ¿Qué función realiza CTCF unido al cromosoma durante mitosis? Burke y colaboradores en 2006, sugirieron que CTCF funciona como marcador epigenético formando un asa en el locus del gen H19 durante mitosis.

Para la transcripción durante mitosis, se había descrito el dogma para la represión de la transcripción, sin embargo en 2012, Chan y colaboradores encontrarán co-localización en inmunofluorescencias para la RNA polimerasa II pSer5 y pSer2 que

marcan actividad transcripcional y el marcador de centrómero CREST, así como FITC-rUTP colocalizando con CREST, produciendo transcritos del satélite  $\alpha$  durante mitosis. Nosotros realizamos ensayos de ChIP para CTCF en la región del centrómero y la región pericentromérica de HCT116, donde encontramos la presencia de CTCF. Esto concuerda con lo antes sugerido en la literatura para otras líneas celulares por medio de inmunofluorescencias donde se encontró a la proteína CTCF asociada al *locus* del centrómero (Burke, et al., 2005; Rubio, *et al.*, 2008), sin embargo, en estos trabajos no se definieron las regiones de centrómero y pericentromérica. Nosotros, por medio de ChIP determinamos que en la línea celular WI-38 existe una ausencia de CTCF en la región del centrómero y región pericentromérica. Esto puede ser debido a que la línea celular WI-38 es una línea de fibroblastos normales y la presencia de CTCF en centrómero puede ser utilizado como un marcador de células cancerosas. Sin embargo, aún falta realizar más estudios en líneas normales y cultivos primarios para determinar que CTCF no se encuentra en centrómeros de líneas normales y es característico de células cancerosas.

### **La abundancia de CTCF en centrómero y la transcripción del RNA-nc del satélite $\alpha$ .**

Existen estudios donde se sugiere que la función de la transcripción del centrómero durante mitosis es promover la deposición de CENP-A, además; se ha asociado una posible interacción de CENP-A con el transcrito del satélite  $\alpha$  (Chueh, *et al.*, 2009; Choi, *et al.*, 2009) y con el remodelador de la cromatina FACT (Okada, et al., 2009). Por otro lado se ha sugerido que las marcas de histona son fundamentales en la deposición de CENP-A ya que la pérdida de la H3K4me2 produce una disminución en los niveles de transcripción del satélite  $\alpha$  y a su vez un decremento en la deposición de CENP-A (Bergman, *et al.*, 2011). Nosotros observamos que existe una asociación entre la abundancia de CTCF en centrómero de HCT116 y la transcripción del satélite  $\alpha$  ya que observamos un enriquecimiento de CTCF en la región del centrómero



durante mitosis y un aumento en la transcripción del centrómero durante mitosis de células HCT116, mientras que no encontramos la presencia de CTCF en centrómeros de WI-38 y la transcripción del satélite  $\alpha$  es baja. Otra observación importante es que la transcripción del centrómero en células HCT116 es mayor que en células WI-38 y además su transcripción aumenta durante mitosis, ambos experimentos sugieren que existe una asociación entre la presencia de CTCF y el aumento en la transcripción del centrómero de HCT116. Chan y col., en 2012, demostraron que el centrómero se transcribe durante mitosis en células HeLa y de acuerdo con este trabajo, se puede sugerir que la transcripción del centrómero, se lleva a cabo principalmente durante mitosis. En células WI-38, no se llevó a cabo el análisis de qRT-PCR, debido a la dificultad de crecer las células y alcanzar un alto número de células para el experimento, además de la dificultad en la estandarización de la técnica de “Shake-off” con esta línea celular.

### **Caracterización de las marcas de histona para el centrómero de HCT116.**

Diversos trabajos han caracterizado las variantes y modificaciones de histona en centrómeros de varias especies y líneas celulares. Se ha reportado que dentro del centrómero se encuentra CENP-A, alternada por la histona H3 que presenta modificaciones post-traduccionales de histona mostrando activación transcripcional: H3ac y H4ac, H3K4me2, pero no se encuentra la presencia significativa de H3K4me3 (Sullivan y Karpen, 2004). En el centrómero, nosotros encontramos a través de ChIP, las modificaciones post-traduccionales de histona: H3K9ac, H3K9me2 y CENP-A que se muestran constantes durante el ciclo celular y las modificaciones post-traduccionales de histona: H3K4me2 y H3K9me3 se muestra presentes únicamente durante mitosis; todas estas modificaciones de histona ya habían sido reportadas en la literatura en estudios realizados en células asincrónicas y durante mitosis (Gopalakrishnan, *et al.*, 2009; Sullivan y Karpen, 2004). Esto nos sugiere que las marcas post-traduccionales de histona: H3K4me2 y H3K9me3 cambian a través del ciclo celular, y se hacen presentes durante mitosis aumentando la transcripción del

satélite  $\alpha$ . En la región pericentromérica se encontraron las modificaciones postraduccionales de histona de represión transcripcional; H3K9me2 y H3K9me3 siendo constantes a través del ciclo celular y durante mitosis se muestran presentes las modificaciones de activación transcripcional H3K4me2 y H3K9ac. Estos resultados nos sugieren que en el centrómero como en la región pericentromérica se requieren de modificaciones que han sido reportadas en represión transcripcional y en la formación de heterocromatina, para que se lleve a cabo la transcripción de los RNAs-nc del centrómero; en especial en la región pericentromérica.

**Reclutamiento o incremento de CTCF en el centrómero y la transcripción del satélite  $\alpha$  inducida por el aumento en la acetilación de histonas.**

Distintos estudios han mostrado que la acción de la TSA A ocurre principalmente en heterocromatina constitutiva, la cual es una región donde se encuentra una hipoacetilación de histonas, una alta metilación del DNA y una alta concentración de la proteína de heterocromatina 1 (HP1) (Maison y Almouzni, 2004). En este trabajo, se observó que los tratamientos de 24 y 48 horas con TSA 1  $\mu$ M, llevan a un reclutamiento y mayor enriquecimiento de CTCF en las líneas celulares WI-38 y HCT116, respectivamente en las regiones centromérica y pericentromérica, además de la observación de que se aumenta la transcripción del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 con excepción del satélite 2 en HCT116. Esto nos sugiere que CTCF tiene la capacidad de unirse al centrómero y región pericentromérica cuando se induce un estado de eucromatina al permanecer acetilada cada región y su presencia facilita la transcripción del RNA-nc en ambas regiones actuando como proteína aisladora para el estado de la cromatina. En la región pericentromérica de HCT116, se observó una resistencia al tratamiento, esto puede ser debido a que no sea necesario un aumento en el enriquecimiento de CTCF sino un aumento en la activación postraduccional de CTCF por la poliADP-ribosilación realizada por la proteína PARP-1.

**Disminución de la proteína CTCF, decrece la transcripción del satélite  $\alpha$  y del satélite 2.**

La inhibición de CTCF en células HCT116, es una prueba de la importancia de esta proteína como un facilitador de la transcripción en centrómero. Los transcritos del satélite  $\alpha$  y del satélite 2 disminuyen después de los tratamientos con 3-ABA y la transfección del siRNA contra CTCF.

Con este trabajo, se propone que CTCF actúa como un elemento aislador en el centrómero de carcinomas y su importancia puede llegar a ser estructural (Rubio 2008; Zhang, et al., 2004). Sin embargo hace falta realizar más estudios de formación de aneuploidias al inhibir a CTCF, debido a su importancia estructural en el cromosoma, principalmente en el centrómero de carcinomas.

## **PERSPECTIVAS**

Los resultados de este trabajo nos sugieren que CTCF funciona como elemento aislador en las regiones del centrómero y región pericentromérica, aunque hace falta realizar estudios de ChIP para las modificaciones postraduccionales de histona en el centrómero de células con transfección estable del siRNA contra CTCF y de esta manera conocer si las modificaciones que marcan actividad transcripcional aumentan.

Además hace falta comprobar por Western-blot si CTCF disminuye con el tratamiento con 3-ABA y las transfecciones.

Por otra parte hace falta realizar inmunofluorescencias para saber qué ocurre con la localización de CTCF después de los tratamientos con TSA. Y de ser posible observar la abundancia de los RNA-ncs del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 por medio de RNA-FISH en células tratadas con TSA.

Una parte muy importante de este proyecto es saber si el aumento o disminución de los RNA-ncs del satélite  $\alpha$  y el satélite 2 conllevan a la generación de inestabilidad cromosómica para esto hace falta realizar estudios con los métodos reportados en esta tesis con los cuales se puede lograr una desregulación en la expresión de estos satélites y cuantificar los cromosomas presentes en las células hijas.

## CONCLUSIONES

- La proteína CTCF se encuentra unida a los cromosomas principalmente durante mitosis y la transcripción del satélite  $\alpha$ , muestra una tendencia a la alta en células HCT116.
- CTCF se encuentra unida a las regiones del satélite  $\alpha$  y del satélite 2 de células HCT116.
- Los tratamientos con TSA, aumentan la cantidad de CTCF en el centrómero y la transcripción de los RNA-ncs de los satélites  $\alpha$  y 2 en HCT116 y WI-38.
- Se encontró, que el RNA-nc del satélite  $\alpha$  en HCT116 se sobre-expresa comparado con WI-38.
- El centrómero está caracterizado por una mayor densidad de marcas de activación transcripcional, mientras que en la región pericentromérica existe una mayor densidad de marcas de inactivación transcripcional en HCT116.
- El tratamiento con 3-ABA, provoca una disminución en la transcripción de los satélites  $\alpha$  y 2.
- Células HCT116 transfectadas con siRNA contra CTCF, disminuyen la expresión de los transcritos de los satélites  $\alpha$  y 2.

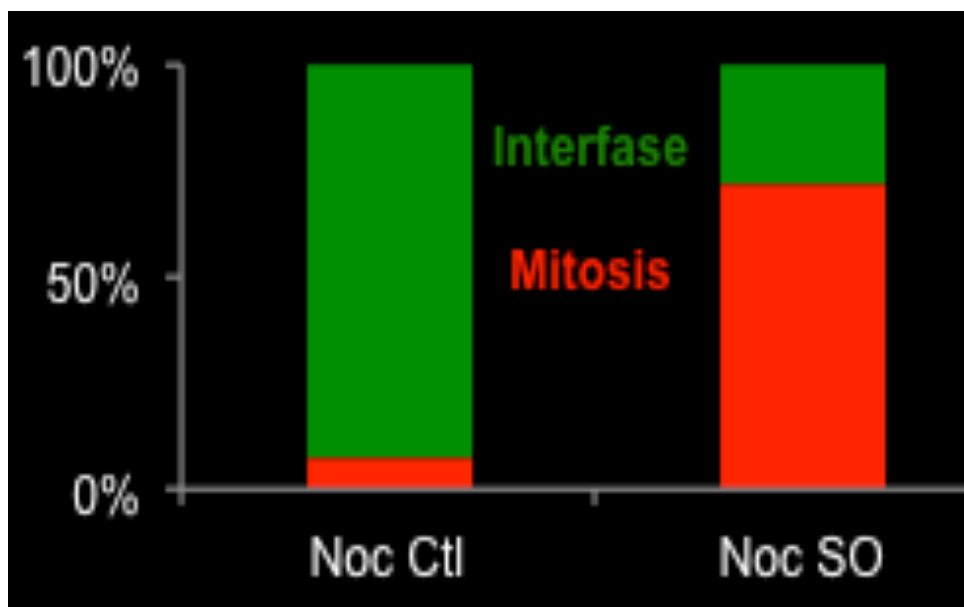
Todos estos resultados sugieren que CTCF actúa como un factor de transcripción de los RNA-ncs de las regiones centromérica y pericentromérica.

## PROTOCOLOS AMPLIADOS

### Separaci3n de c3lulas en interfase y mitosis por la t3cnica de “Shake off”

La t3cnica de “shake off” es utilizada para separar una poblaci3n de c3lulas asincr3nicas en dos subpoblaciones, una en interfase y otra en mitosis.

- 1.- Las c3lulas fueron tratadas durante 9 horas con nocodazol 2 ng/mL.
- 2.- Posteriormente, las c3lulas son golpeadas en la parte lateral de la caja de cultivo para que sean recuperadas las c3lulas de interfase.
- 3.- Las c3lulas que se quedan pegadas a la caja son c3lulas en mitosis y son tratadas con tripsina, para su posterior recuperaci3n.
- 4.- Cada una de las subpoblaciones fue validada al ser realizado el 3ndice mit3tico (Figura 7) contando las c3lulas mit3ticas en distintos planos seleccionados al azar hasta contar de 500-600 c3lulas.



**Figura 7.-** 3ndice mit3tico de las subpoblaciones de c3lulas separadas por shake off en Noc Ctl (interfase) y Noc SO (Mitosis).

### **Inmunofluorescencias (IF)**

1. Lavar muestras con PBS 1X a temperatura ambiente (agregar en la pared)
2. Fijar con Paraformaldehído 4% por 10 minutos.
3. Lavado rápido con PBS en agitación (5 min).
4. Permeabilizar con tritón 100X ó NP40 0.1 - 0.5% por 15 min.
5. 2 lavados rápidos con PBS 1X
6. Bloqueo con albumina 1% por 30 min a 1 hora.
7. 2 lavados rápidos.
8. Anticuerpo primario 2 hrs – ON (cámara húmeda 4°C sin que reciba luz)
9. 3 lavados de 5 min. Ó 5 lavados de 3 min.
10. Aplicar anticuerpo secundario, e incubar por una hora en cámara húmeda sin que reciba la luz.
11. Agregar Vectashield-DAPI en una proporción 5:1 y sellar laminilla.

### **Transfección de células**

1. Se cultivan la células y se llevan a una confluencia de 50%.
2. Se lava con PBS 1x “2 veces” en las cajas p30.
3. Agregar 800µl de medio sin suero.
4. Preparar las muestras con el plus y medio y se deja incubando 15 min.  
En el inter se prepara la mezcla con medio y lipofectamina.
5. Mezclar después de incubar la lipofectamina con la mezcla de plásmido con plus e incubar 15-30 minutos.
6. Agregar por goteo a lo largo de la caja la mezcla con lipofectamina y el plásmido quedando un volumen final de 1ml.
7. Se dejan 6 h a 37 °C atm CO<sub>2</sub> 5%.
8. Se remueve el medio y se cambia por uno con suero fetal bovino.

## **Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

### ***Obtención de la cromatina***

Una vez obtenidas las células necesarias (una caja p150 por cada anticuerpo que se vaya a utilizar), se afora el medio de cultivo de todas las cajas con PBS a un volumen de 18 mL para cada una de ellas.

### ***Crosslinking***

Se les adicionan 18 mL de medio mas 2 mL de buffer Crosslinking y se agitan por 10 minutos. Se detiene el Crosslinking con 1mL de glicina 2.5 M y se agita por 5 minutos. Se retira el medio y se lava 3 veces con PBS. Se le pone 1mL de buffer de lisis y se colocan a 4°C por 5 minutos y se recolectan las células con scrapper para sonicar.

### ***Evaluación de la cromatina***

Se obtienen viales de 50µl de cromatina, tomados cada dos pulsos de sonicación contando desde cero.

### ***Día 1***

Se lleva cada tubo a un volumen de 300µl adicionando agua y se les agrega 300µl de fenol, se vortexea y se centrifuga a 13000 rpm x 10 min. (19000 g). Se toma la parte acuosa (parte superior, con mucho cuidado) y por último se agrega 1mL de Etanol y 300µl de Acetato de amonio 5M por toda la noche.

### ***Día 2***

Se centrifuga a 14000 rpm x 30 min. y se retira el sobrenadante. Por último se adicionan 40µl de H<sub>2</sub>O y se deja a 65°C por 40 minutos (hasta que ebulle el etanol). Se corre en un gel de agarosa al 1%.



## ***Inmunoprecipitación***

### ***Precleaning***

Centrifugar cromatina a 200 rpm x 5 min. y tomar 400µl de la cromatina para el Input.

Preparar buffer 9 Dilutton: 1 lisis. 200µL por 20µL del cocktail de inhibidores.

Se colocan 1mL de cromatina por cada 3mL de Buffer y 50µL de perlas y girar de dos a cuatro horas a -4 °C.

### ***Anticuerpos***

4mL de cromatina+2mg de anticuerpo y se gira a -4 °C por toda la noche.

## ***Día 2***

### ***Perlas***

Se ponen a girar 50 µL de perlas por dos horas y posteriormente se centrifugan a 2,000 rpm por dos minutos y se retira el sobrenadante con mucho cuidado.

### ***Lavados***

Se coloca la solución en un tubo de 15 mL en 1mL de buffer de lavado y se le da vueltas por dos minutos, se centrifuga a 2,000 rpm por dos minutos. Estos lavados, se llevan acabo cuatro veces y el último lavado, se lleva acabo de igual manera, utilizando 1mL de final wash.

### ***Elución de DNA***

Se resuspende el DNA en 450mL de Elution buffer. Se trata con 2.5 µL de RNAsa A por 1 hora a 37 °C y con proteinasa K por toda la noche a 67 °C.

## ***Día 3***

### ***Limpieza del DNA***

Se llevan acabo 2 lavados de fenol/cloroformo y se precipitan utilizando 20 µg de glicógeno+165 µL de acetato de amonio 10M (330 µL, 5M + 1mL de Et° OH.

## Evaluación del ChIP por PCR en tiempo real y análisis de datos

Añadir por cada reacción de qPCR

Componente	Volumen
SYBR-GREEN	10 $\mu$ L
OLIGO FWD	1.5 $\mu$ L
OLIGO RVS	1.5 $\mu$ L
Inmunoprecipitación	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	2 $\mu$ L
Volumen final	20 $\mu$ L

### Validación de oligonucleótidos

Se realiza una curva estándar con diluciones del input 0.01%, 0.1% y 10% para contar con diluciones sucesivas se toman 100  $\mu$ L del tubo de input al 100%, diluyendo con 900  $\mu$ L de agua para PCR, de esta dilución (input 1%) se toman nuevamente 100  $\mu$ L y se diluyen con 900  $\mu$ L de agua para PCR. Para obtener las diluciones 0.1% y 0.01% se repiten los pasos dos veces más.

Posteriormente se grafica el  $\log(\text{Input } x\%)$ ; versus el CT. Se utiliza la pendiente del gráfico para realizar la ecuación de la eficiencia de amplificación (EA), la cual debe ser cercana a 2. (gráfico 5)

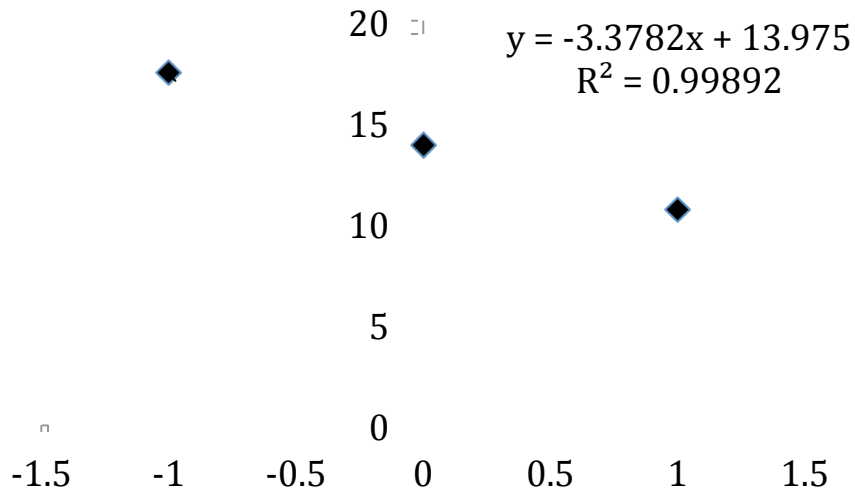
$$EA = 10^{(-1/m)} \text{ ec. 1}$$

Donde:

EA: eficiencia de amplificación.

m: pendiente de la recta calculada en la curva estándar de las diferentes concentraciones del Input.

“Papel de CTCF en la transcripción de RNAs-nc de Centr6mero”



**Gráfico 5.-** Curva estándar de INPUT, utilizando las concentraciones de 10%, 1% y 0.01%

**%Input**

El % input es indica la eficiencia de Inmunoprecipitación con respecto al material inicial y se calcula con la siguiente ecuación.

$$\%Input = \frac{EA^{(Ct\ input\ 10\% - Ct\ ChIP)} (FD) (100)}{\dots} \text{ec. 2}$$

Donde:

EA: eficiencia de amplificación.

FD: factor de dilución del input inicial con el cual se comparan las inmunoprecipitaciones (10).

**Veces de enriquecimiento**

Este parámetro compara el porcentaje del input de las inmunoprecipitaciones con el porcentaje del input del anticuerpo inespecífico IgG.

$$\text{Veces de enriquecimiento} = \frac{\%inout\ loci\ específico}{\%inout\ loci\ específico\ IgG} \text{ec. 3}$$

“Papel de CTCF en la transcripción de RNAs-nc de Centrómero”

**Tabla.-** Anticuerpos utilizados en los ensayos de ChIP e inmunofluorescencias (IF)

<b>Anticuerpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
<b>IgG anti-conejo</b>	Santa cruz	1.5µg (ChIP)
<b>CTCF</b>	Millipore	3µg (ChIP)/ 1:100 (IF)
<b>H3K4me2</b>	Diagenode	3µg (ChIP)/ 1:200 (IF)
<b>H3K9ac</b>	Abcam	5µg (ChIP)
<b>H3K9me2</b>	Millipore	3µg (ChIP)
<b>H3K9me3</b>	Abcam	3µg (ChIP) /1:200 (IF)
<b>H3 total</b>	Millipore	2µg (ChIP)
<b>CENP-A</b>	Abcam	5µg/ 1:200 (IF)

**Tabla.-** Oligos utilizados en el ensayo de qRT-PCR

<b>Primers</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Utilizado en:</b>
<b>Satélite α</b>	5'-CTCACAGAGTTGAACCTTCC-3' (Fd)	ChIP, qRT-PCR
	5'-GAAGTTTCTGAGAATGCTTCTG-3' (Rv)	
<b>Satélite 2</b>	5'-ATCGAATGGAAATGAAAGGAGTCA -3' (Fd)	ChIP, qRT-PCR
	5'-GACCATTGGATGATTGCAGTCA-3' (Rv)	
<b>GAPDH</b>	5' – TCGTTCCCAAAGTCCTCCTGTTTC -3' (Fd)	ChIP, qRT-PCR
	5'- TCCGCAGCCGCCTGGTTC- 3' (Rv)	
<b>WIF1</b>	5'-AGCCCTTCCCGCTCTTCTGTT –3' (Fd)	ChIP. qRT-PCR
	5'-CGGCAGAGACGTAAGACTGGCAAA-3' (Rv)	

## qRT-PCR

### Preparación de primers para RNA-ncs del centrómero

1. Se les aplica un pulso en la nanofuga para bajarlos.
2. Se le agrega el volumen de agua específico para cada primer siguiendo la siguiente fórmula:

$$V = m / (P.M. * M)$$

donde m= masa, P.M.= peso molecular y M= molaridad.

Nota: se realiza en un lugar estéril y agua limpia para no contaminar.

	<b>m (mg)</b>	<b>PM</b>	<b>M(mmol)</b>	<b>V (L)</b>	<b>V<sub>H2O</sub>(mL)</b>
<b>alpha_9 (Fd)</b>	130.22	7978.2	100	0.00016322	<b>163</b>
<b>alpha_9 (Rv)</b>	146.18	7956.2	100	0.000183731	<b>184</b>
<b>alpha_4 (Fd)</b>	135.43	8256.4	100	0.00016403	<b>164</b>
<b>alpha_4 (Rv)</b>	161.02	8286.4	100	0.000194318	<b>194</b>
<b>alpha_13/21 (Fd)</b>	184.68	7354.8	100	0.000251101	<b>251</b>
<b>alpha_13/21 (Rv)</b>	178.88	8094.4	100	0.000220992	<b>221</b>
<b>alpha_RT (Fd)</b>	137.38	6038	100	0.000227526	<b>228</b>
<b>alpha_RT (Rv)</b>	110.52	6781.4	100	0.000162975	<b>163</b>

3. Se le da un vortex corto y se vuelve a centrifugar a la misma velocidad y tiempo.
4. Se incuba a 37 °C por 1 hora.
5. Se diluyen 1:10
6. Se dejan a -20 °C

### **Extracción de RNA mediante TRIzol.**

Para células que crecen en monocapa

1.- Lisar las células directamente en la placa de cultivo virtiendo 1 ml de TRIZOL para cajas de 25 cm<sup>2</sup> y mezclar varias veces las células utilizando una pipeta (esto permitirá que las células se despeguen).

Nota: La cantidad de TRIZOL agregado está basado en el área del plato de cultivo (siendo así que se utiliza 1 ml por 10 cm<sup>2</sup>) y no por el número de células presentes. La utilización de una menor cantidad de TRIzol puede provocar que exista una contaminación del RNA con DNA.

2.- Pasar el TRIzol con las células a un tubo Falcon de 15 ml e incubarlas por 5 minutos a temperatura ambiente (15 a 30° C).

3.- Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado.

4.- Agitar vigorosamente los tubos por 15 segundos con la mano e incubar otros 2 ó 3 minutos a temp. Amb. (15 a 30 °C).

5.- Centrifugar a no más de 12,000 g por 15 minutos entre 2 a 8 ° C. Después de la centrifugación, la mezcla se separará en 3 fases

Superior = fase acuosa,

media = fase de fenol-cloroformo,

inferior = fase roja

Nota: El RNA se encontrará exclusivamente en la fase acuosa.

6.- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir 0.5 ml de alcohol isopropílico por cada ml utilizado de TRIzol (esto ayuda a precipitar al RNA).

Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a no más de 12,000 g por 10 minutos entre 2 a 8° C (aquí posiblemente ya se observe el pellet con el RNA).

7.- Remover el sobrenadante y lavar el pellet con 3 ml de etanol al 75% (que contiene agua DPEC), mezclar la muestra con vortex y centrifugar la muestra por 5 minutos a 7,500 g entre 2 a 8 °C.

8.- Dejar secar el pellet a temperatura ambiente.

9.- Resuspender el pellet en agua con DPEC e incubar 10 minutos a 60 °C.

10.- Guardar la muestra a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Tratamiento con DNAsa I libre de RNAsa

1.- Realizar la mezcla de:

- RNA 1  $\mu\text{g}$  4  $\mu\text{l}$
- Buffer de reacción 10X con  $\text{MgCl}_2$  1  $\mu\text{l}$
- DNasa I 1u por cada  $\mu\text{g}$  de RNA
- Agua DEPC hasta 10  $\mu\text{l}$

2.- Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1hr.

3.- poner 2  $\mu\text{l}$  50mM EDTA y se incuba a  $65^{\circ}\text{C}$  por 20 min.

### Obtención del cDNA.

1.- Preparar :

RNA	2 $\mu\text{g}$	<b>Mix:</b> Buffer 5X	4 $\mu\text{l}$
dNTPs	1 $\mu\text{l}$	DTT	2 $\mu\text{l}$
Oligo dt	1 $\mu\text{l}$	RNasa Out	1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	hasta 12 $\mu\text{l}$		

Incubar a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos

2.- Adicionar 7  $\mu\text{l}$  de mix a cada muestra en  $-20^{\circ}\text{C}$ .

3.- Incubar a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos en el termociclador.

4.- Agregar 1  $\mu\text{L}$  SSE II RT a cada muestra.

5.- Incubar la reacción a  $42^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos en el termociclador.

6.- Incubar la reacción a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

7.- Enfriar a  $37^{\circ}\text{C}$  en el termociclador.

8.- Adicionar 1  $\mu\text{l}$  (2U) de RNasa H e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.

9.- Guarde a  $-80^{\circ}\text{C}$  grados centígrados.

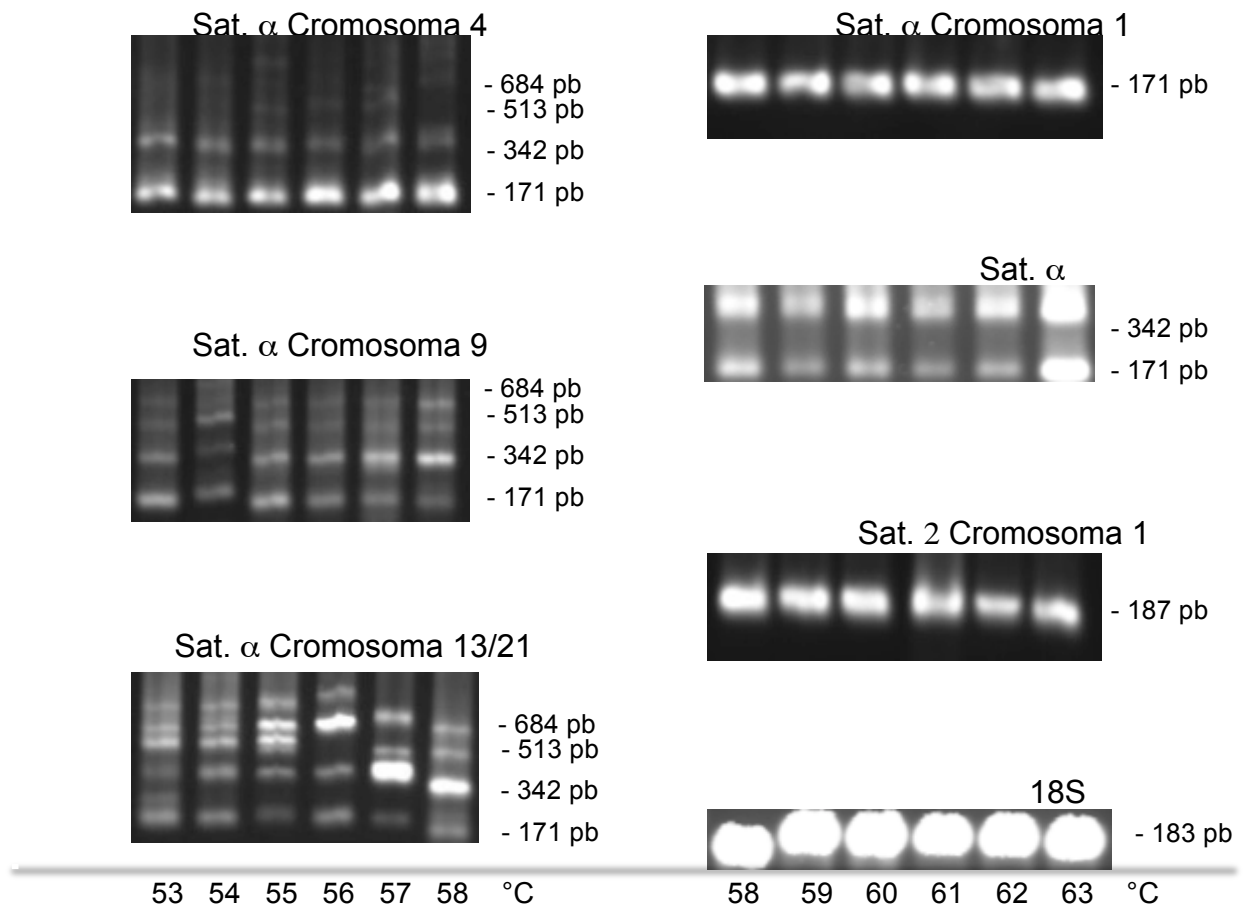
### Amplificación del cDNA.

Buffer	1.5 $\mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$	0.4 $\mu\text{l}$
dNTPs	0.2 $\mu\text{l}$
Taq	0.1 $\mu\text{l}$
Oligo F	0.75 $\mu\text{l}$
Oligo R	0.75 $\mu\text{l}$
cDNA	1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	5.3 $\mu\text{l}$
<b>V. F.</b>	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>

“Papel de CTCF en la transcripción de RNAs-nc de Centrómero”

Se amplifican por 40 de 30 segundos.

Por último se corre en un gel de agarosa al 2%.



**Figura 8.-** PCR del satélite  $\alpha$ , los satélites  $\alpha$  de los cromosomas: 1, 4, 9 y 13/21 y el satélite 2 del cromosoma 1 amplificados de DNA de células HCT116.



## REFERENCIAS

- Adams RR, Carmena M, Earnshaw W C (2001) Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 11: 49–54
- Alonso A., Mahmood,R., Li,S., Cheung,F., Yoda,K. and Warburton,P.E. (2003) Genomic microarray analysis reveals distinct locations for the CENP-A binding domains in three human chromosome 13q32 neocentromeres. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 2711–2721.
- Barnhart MC, Kuich PH, Stellfox ME, Ward JA, Bassett EA, Black BE, Foltz DR (2011) HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. *J Cell Biol* 194:229–243
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G. (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*. 98; 3: 387-96.
- Bergmann JH, et al. (2011) Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J* 30: 328–340.
- Bernstein, E., and Allis, C.D. (2005). RNA meets chromatin. *Genes Dev.* 19: 1635–1655.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. (2004) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363–366.
- Binda O. (2013) On your histone mark, set, methylate! *Epigenetics*. 8: 457-463.
- Blower, M.D. & Karpen, G.H. (2001) The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat. Cell Biol.* 3: 730–739.
- Bracken, A.P., and Helin, K. (2009). Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9: 773–784.
- Chadwick, B. P. y Willard, H. F. (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J. Cell Biol.* 152: 375-84.
- Chan L., Owen J. Marshall, Richard Saffery, Bo Won Kim, Elizabeth Earle, K. H. Andy Choo, and Lee H. Wong. (2012) Active transcription and essential role of RNA polymerase II at the centromere during mitosis. *PNAS.* 109; 6: 1979–1984.

Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Davidow LS, Lee JT. (2002) CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science*. 295; 5553: 345-7.

Cheeseman, I.M., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2002). Simple centromere, complex kinetochore: linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast. *J. Cell Biol.* 157: 199–203.

Cheeseman IM, Desai A (2008) Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 33–46

Chernukhin I, Shamsuddin S, Kang SY, Bergstrom R, Kwon YW, Yu W, Whitehead J, Mukhopadhyay R, Docquier F, Farrar D, Morrison I, Vigneron M, Wu SY, Chiang CM, Loukinov D, Lobanenko V, Ohlsson R, Klenova E. (2007) CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. *Mol Cell Biol.* 5: 1631-48.

Choi ES, Strålfors A, Castillo A G, Durand-Dubief M, Ekwall K, Allshire RC. (2011) Identification of non-coding transcripts from within CENP-A chromatin at fission yeast centromeres. *J Biol Chem* 286: 23600–7.

Choo, K.H.A. (1997) Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am. J. Hum. Genet.*, 61: 1225–1233.

Christova R, Oelgeschlager T (2002) Association of human TFIIID promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat Cell Biol* 4: 79–82.

Chueh AC, Northrop EL, Brettingham-Moore KH, Choo KH, Wong LH (2009) LINE retrotransposon RNA is an essential structural and functional epigenetic component of a core neocentromeric chromatin. *PLoS Genet* 5:e1000354.

Chu C. Y., Rana T M. (2007) Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol*; 213: 412-19.

Cleveland D. W., Mao Y. and Sullivan K. F. (2003) Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling cell, Vol. 112: 407–421.

Dantzer F, Luna L, Bjoras M, Seeberg E (2002) Human OGG1 undergoes serine phosphorylation and associates with the nuclear matrix and mitotic chromatin in vivo. *Nucleic Acids Res* 30: 2349–2357.

Defossez PA, Kelly KF, Filion GJ, Perez-Torrado R, Magdinier F, Menoni H, Nordgaard CL, Daniel JM, Gilson E. (2007) The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. *J Biol Chem.* 280 52: 43017-23.

Donohoe ME, Zhang LF, Xu N, Shi Y, Lee JT. (2007) Identification of a Ctfc cofactor, Yy1, for the X chromosome binary switch. *Mol Cell.* 25 1: 43-56.

- Esteller M. (2011) Epigenetic changes in cancer. *Biol. Rep.* 3:9: doi:10.3410/B3-9
- Fabian M. R., and Sonenberg N. (2012) The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* 5; 19, 6: 586-93.
- Faghihi, M.A., and Wahlestedt, C. (2009). Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 637–643.
- Fedoriw AM, Stein P, Svoboda P, Schultz RM, Bartolomei MS. (2004) Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science.* 303; 5655: 238-40.
- Felsenfeld G, Groudine M. (2003) Controlling the double hélix. *Nature.* 421: 448-453.
- Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, Neiman PE, Collins SJ, Lobanenkov V V., (1996) An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol.* 6: 2802-13.
- Fitzpatrick GV, Pugacheva EM, Shin JY, Abdullaev Z, Yang Y, Khatod K, Lobanenkov VV, Higgins MJ. (2007) Allele-specific binding of CTCF to the multipartite imprinting control region KvDMR1. *Mol Cell Biol.* 7: 2636-47.
- Gazit B, Cedar H, Lerer I, Voss R (1982) Active genes are sensitive to deoxyribonuclease I during metaphase. *Science* 217: 648–650.
- Gluncic´ M. and Para V. (2012) Direct mapping of symbolic DNA sequence into frequency domain in global repeat map algorithm. *Nucleic Acids Research*, 1–17.
- Goll, M.G. and Bestor, T.H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 481–514.
- Gombert WM, Krumm A. (2009) Targeted deletion of multiple CTCF-binding elements in the human C-MYC gene reveals a requirement for CTCF in C-MYC expression. *PLoS One.* 4; 7:e6109.
- Gottesfeld JM, Forbes DJ (1997) Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends Biochem Sci* 22: 197–202.
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B.W., Cassady, J.P., Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458: 223–227.

Hake SB, Xiao A, Allis CD. (2004) Linking the epigenetic “language of histone modifications to cáncer. *Br J Cancer*. 23; 4: 761-769.

Hannon G. J. (2002) RNA interference. *Nature*. 418: 244-251.

Hawkins PG, Santoso S, Adams C, Anest V, Morris KV. (2009) Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* 37:2984-95.

Hayden K. E. (2012) Human centromere genomics: now it's personal *Chromosome Res* 20: 621–633.

Hayden, K. E., Strome E. D., Merrett S. L., Lee Hye-Ran, Rudd M. K. and Willard H. F. (2013) Sequences associated with centromere competency in the human genome 33; 4: 763-772.

Henikoff, S; Furuyama, T; Ahmad, K. (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet*. 20: 320-6.

Hereford, L. M., Osley, M. A., Ludwig, T. R. y Mclaughlin, C. S. (1981) Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell* 24, 367-75.

Hou C, Dale R, Dean A. (2010) Cell type specificity of chromatin organization mediated by CTCF and cohesin. *Proc Natl Acad Sci* 107; 8: 3651-6.

Ishihara K, Oshimura M, Nakao M. (2006) CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol Cell*. 23; 5: 733-42.

Jiang G., Zheng L. and Tong Q (2012) Small RNAs targeting transcription start site induce heparanase silencing through interference with transcription initiation in human cáncer cells. *Plos one* 7; 2: e31379.

Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev. Genet*. 3: 415–428.

Kamakaka R. T. y Biggins, S. (2005) Histone variants: deviants? *Genes. Dev*. 19: 295-310.

Kanai M, Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Uchida K, Miwa M (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase localizes to the centrosomes and chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 385–389

Kawasaki H, Taira K, Morris KV. (2005) siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle*; 4: 442–8.

Ketting, R. F., Ficher S. E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G. J., Plasterk R. H., (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in

developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15: 2654–2659.

Kim G. H., Villanueva L. M., Morris K. V. and Rosi J. J. (2006) Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol.* 13; 9: 793-7.

Kim, I.S., Lee, M., Park, K.C., Jeon, Y., Park, J.H., Hwang, E.J., Jeon, T.I., Ko, S., Lee, H., Baek, S.H. et al. (2012) Roles of Mis18alpha in epigenetic regulation of centromeric chromatin and CENP-A loading. *Mol. Cell*, 46: 260–273.

Kim T. H, Ziedulla K. Abdullaev, Andrew D. Smith, Keith A. Ching, Dmitri I. Loukinov, Roland D. Green, Michael Q. Zhang, Victor V. Lobanekov, and Bing Ren. (2006) Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF binding sites in the human genome. *Cell.* 128; 6: 1231–1245

Klenova EM, Nicolas RH, Paterson HF, Carne AF, Heath CM, Goodwin GH, Neiman PE, Lobanekov VV. (1993) CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol Cell Biol.* 12: 7612-24.

Kouzarides T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19: 1176-1179.

Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128: 693-705.

Krude, T. (2002) Chromatin assembly: the kinetochore connection. *Curr. Biol.* 12: R256-8.

Kruhlak MJ, Hendzel MJ, Fischle W, Bertos NR, Hameed S, Yang XJ, Verdin E, Bazett-Jones DP (2001) Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J Biol Chem* 276: 38307–38319.

Lachner, D. O`Carroll, S. Rea, K. Mechtler and T. Jenuwein (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 410: 116-120.

Laloraya, S., Guacci, V., and Koshland, D. (2000). Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p. *J. Cell Biol.* 151: 1047– 1056.

Lam, A.L., Boivin, C.D., Bonney, C.F., Rudd, M.K. and Sullivan, B.A. (2006) Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103: 4186–4191.

Le May N, Fradin D, Iltis I, Bougneres P, Egly JM. (2012) XPG and XPF endonucleases trigger chromatin looping and DNA demethylation for accurate expression of activated genes. *Mol Cell.* 47; 4: 622-32.

- Li, E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Rev. Genet.* 3: 662–673.
- Li L. C. (2013) Chromatin remodeling by the small RNA machinery in mammalian cells. *Epigenetics* Oct 22; 9, 1 [Epub ahead of print].
- Li T, Hu JF, Qiu X, Ling J, Chen H, Wang S, Hou A, Vu TH, Hoffman AR. (2008) CTCF regulates allelic expression of *Igf2* by orchestrating a promoter-polycomb repressive complex 2 intrachromosomal loop. *Mol Cell Biol.* 20: 6473-82.
- Luger K., and Hansen J. C., (2005) Nucleosome and chromatin fiber dynamics, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 188-196.
- Maison C, Almouzni G (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 296–304.
- Maison, C., Bailly, D., Roche, D., Montes de Oca, R., Probst, A.V., Vassias, I., Dingli, F. Lombard, B., Loew, D., Quivy, J.P., and Almouzni, G. (2011). SUMOylation promotes de novo targeting of HP1a to pericentric heterochromatin. *Nat. Genet.* 43: 220–227.
- Manuelidis L. (1978) Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma* 66: 23–32.
- Malik, H. S. y Henikoff, S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* 10: 882-91.
- Martianov, I., Ramadass, A., Serra Barros, A., Chow, N., and Akoulitchev, A. (2007). Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a noncoding interfering transcript. *Nature.* 445: 666–670.
- Martinez-Balbas MA, Dey A, Rabindran SK, Ozato K, Wu C (1995) Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell.* 83: 29–38
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 110: 563–74.
- Mattick J. S. (2001) Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *21; 11:* 986-991.
- Mellone, B.G. & Allshire, R.C. (2003) Stretching it: putting the CEN(P-A) in centromere. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 191–198.
- Mendiburo MJ, Padeken J, Fulop S, Schepers A, Heun P (2011) *Drosophila* CENH3 is sufficient for centromere formation. *Science* 334: 686–690
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights

into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10: 155–159.

Meluh, P. B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D. y Smith, M M. (1998) Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* 94: 607-13.

Meneghini, M. D., Wu, M. y Madhani, H. D. (2003) Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell.* 112: 725-36.

Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10: 155–159.

Michelotti EF, Sanford S, Levens D (1997) Marking of active genes on mitotic chromosomes. *Nature.* 388: 895–899

Mohammad, F., Mondal, T., and Kanduri, C. (2009). Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs. *Epigenetics.* 4: 277–286.

Morris KV. (2005) siRNA-mediated transcriptional gene silencing: The potential mechanism and a possible role in the histone code. *Cell Mol Life Sci.* 62: 3057–66.

Nagano, T., Mitchell, J.A., Sanz, L.A., Pauler, F.M., Ferguson-Smith, A.C., Feil, R., and Fraser, P. (2008). The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science.* 322: 1717–1720.

O'Donnell KA, Boeke JD. (2007). Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell.* 129:37–44.

OkadaM, Okawa K, Isobe T, Fukagawa T (2009) CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-a in cooperation with FACT and CHD1. *Mol Biol Cell.* 20: 3986–95.

Pandey, R.R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., Nagano, T., Mancini-Dinardo, D., and Kanduri, C. (2008). *Kcnq1ot1* antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol. Cell.* 32: 232–246.

Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb BS, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher AG, Merkenschlager M. (2008) Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell.* 8: 3: 422-33.

Partridge, J.F., Borgstrøm, B. & Allshire, R.C. (2000) Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere. *Genes Dev.* 14: 783–791.

- Peserico A. And Simone C. (2011) Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biothechnol.* 371832. doi: 10.1155/2011/371832.
- Ponting, C.P., Oliver, P.L., and Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell.* 136: 629–641.
- Probst, A.V., and Almouzni, G. (2011). Heterochromatin establishment in the context of genome-wide epigenetic reprogramming. *Trends Genet.* 27; 5: 177–185.
- Rea F., Eisenhaber D., O`Carroll B. D., Strahl Z. W., Sun M., Schmid, S. Opravil K., Mechtler C. P., Ponting C. D., Allis T. Jenuwein (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* 406: 593-599.
- Redon, S., Reichenbach, P., and Lingner, J. (2010). The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* 38: 5797–5806.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Brugmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., and Chang, H.Y. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 129: 1311–1323.
- Robertson, K.D. (2005) DNA methylation and human disease. *Nature Rev. Genet.* 6: 597–610.
- Rubio ED, Reiss DJ, Welch PL, Distèche CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, Krumm A. (2008) CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105; 24: 8309-14.
- Rudd MK, Willard HF. (2004) Analysis of the centromeric regions of the human genome assembly. *Trends Genet.* 20: 529 –533.
- Schueler, M. G. and Sullivan, B.A. (2006) Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7: 301–313.
- Shelby, R. D., Monier, K. y Sullivan, K. F. (2000) Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J. Cell Biol.* 151: 1113-8.
- Smith, M M. (2002) Histone variants and nucleosome deposition pathways. *Mol. Cell.* 9: 1158-60.
- Spitale, R.C., Tsai, M.C., and Chang, H.Y. (2011). RNA templating the epigenome: long noncoding RNAs as molecular scaffolds. *Epigenetics* 6: 539–543.
- Stellfox, Baley AO and Foltz DR. (2013) Putting CENP-A in its place. *Cell Mol Life Sci.* 70; 3: 10481058.



- Sullivan, B. A. and Karpen, G.H. (2004) Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11: 1076–1083.
- Tanaka, T., Cosma, M.P., Wirth, K., and Nasmyth, K. (1999). Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. *Cell.* 98: 847–858.
- Tian, D., Sun, S., and Lee, J.T. (2010). The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell.* 143: 390–403.
- Tsai, M.C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 329: 689–693.
- Ugarkovic' DI. (2009). Centromere-competent DNA: structure and evolution. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 48: 53–76.
- Van Driel R, Fransz PF, Verschurre PJ (2003) The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci.* 116: 4067-4075.
- Van Leeuwen, F. y Gottschling, D. E. (2003) The histone minority report: the variant shall not be silenced. *Cell.* 112: 591-3.
- Waddington C. H. (1942) The epigenotype *Endeavour.* 1: 18-20.
- Wang K. C. and Chang H. Y. (2011) Molecular of long noncoding RNAs. *Molecular cell.* 16; 6: 904-914
- Waye JS, Willard HF. (1987) Nucleotide sequence heterogeneity of alpha satellite repetitive DNA: a survey of alphoid sequences from different human chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 15: 7549 –7569.
- Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, Peters JM. (2008) Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature.* 14; 451: 796-801.
- Weth O, Weth C, Bartkuhn M, Leers J, Uhle F, Renkawitz R. (2010) Modular insulators: genome wide search for composite CTCF/thyroid hormone receptor binding sites. *PLoS One.* 5; 4:e10119.
- Willard HF, Waye JS. (1987) Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. *J. Mol. Evol.* 25: 207–214.

Wilusz, J.E., Sunwoo, H., and Spector, D.L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 23: 1494–1504.

Wong, L.H., Brettingham-Moore, K.H., Chan, L., Quach, J.M., Anderson, M.A., Northrop, E.L., Hannan, R., Saffery, R., Shaw, M.L., Williams, E. *et al.*, (2007) Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res.* 17, 1146–1160.

Whitehead, J., Pandey, G.K., and Kanduri, C. (2009). Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790: 936–947.

Wilusz, J.E., Sunwoo, H., and Spector, D.L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 23: 1494–1504.

Wong L. H., Kate H. Brettingham-Moore, Lyn Chan, Julie M. Quach, Melissa A. Anderson, Emma L. Northrop, Ross Hannan, Richard Saffery, Margaret L. Shaw, Evan Williams and K.H. Andy Choo. (2007) Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res.* 17: 1146-1160

Xiao T, Wallace J, Felsenfeld G. (2011) Specific sites in the C terminus of CTCF interact with the SA2 subunit of the cohesin complex and are required for cohesin-dependent insulation activity. *Mol Cell Biol.* 11: 2174-83.

Yoda, K., Ando, S., Morishita, S., Houmura, K., Hashimoto, K., Takeyasu, K. y Okazaki, T. (2000) Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 7266-71.

Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G. (2004) CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell.* 13; 2 :291-8.

Zaidi SK, Young DW, Pockwinse SM, Javed A, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS (2003) Mitotic partitioning and selective reorganization of tissue-specific transcription factors in progeny cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 14852–14857

Zhang R, Burke LJ, Rasko JE, Lobanenkov V, Renkawitz R. (2004) Dynamic association of the mammalian insulator protein CTCF with centrosomes and the midbody. *Exp Cell Res.* 294; 1: 86-93.