



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Bioquímicas

Agotamiento de DNA mitocondrial y sus efectos sobre el patrón de metilación del DNA nuclear mediados por las concentraciones de S-adenosilmetionina y dinucleótido de nicotinamida y adenina.

TESIS

QUE PARA OBTENER ELGRADO DE:

Maestra en Ciencias

P R E S E N T A :

MARLENE REZA NOYOLA

Tutor Principal
Dr. Félix Recillas Targa

Miembros del Comité tutorial:
Dr. María Soledad Funes Argüello
Dr. Emilio Rojas Del Castillo

Ciudad Universitaria, CDMX, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

En los compartimentos mitocondriales se llevan a cabo diversas vías metabólicas, por lo que la mitocondria es productora de una gran gama de metabolitos. Existen evidencias que muestran que el agotamiento del DNA mitocondrial puede alterar los patrones de metilación del DNA, sin embargo, se desconocen los mecanismos detrás de este fenómeno. En este estudio se generó un modelo de agotamiento de DNA mitocondrial, mediante la exposición de células MCF7 a 200 ng/mL de bromuro de etidio. El agotamiento de mtDNA provoca una desregulación del metabolismo mitocondrial, incluyendo la disminución de la fosforilación oxidativa, en respuesta a la afectación del complejo I de la cadena de transporte de electrones y a la subsecuente disminución de las concentraciones del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺). En este trabajo se comprobó que el agotamiento de DNA mitocondrial en dichas células aumenta la viabilidad celular, las concentraciones de SAM y la metilación del DNA nuclear a nivel global. Estos cambios se relacionan directamente con los niveles de NAD⁺. Con base en datos públicos de Bisulfito-seq generados en otros modelos, los cambios de metilación del DNA nuclear se encuentran en elementos regulatorios del genoma, como *enhancers* y promotores. Mismos que derivan en cambios en la expresión de genes, asociados a vías regulatorias del ciclo celular, así como de remodeladores epigenéticos, en específico DNMT3a, DNMT3b y TET3. Finalmente se comprobó que el metabolismo mitocondrial, a través de las concentraciones de NAD⁺, puede modular los niveles de SAM y de la metilación del DNA nuclear.

Abstract

Various metabolic pathways are carried out in the mitochondrial compartments, which is why the mitochondria are the producer of a wide range of metabolites. There is evidence showing that the depletion of mitochondrial DNA can alter DNA methylation patterns, however, the mechanisms behind this phenomenon are

unknown. In this study, a mitochondrial DNA depletion model was generated by exposing MCF7 cells to 200 ng / mL of ethidium bromide. The depletion of mtDNA causes a dysregulation of mitochondrial metabolism, including a decrease in oxidative phosphorylation, in response to the involvement of complex I of the electron transport chain and the subsequent decrease in the concentrations of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). In this work it was found that the depletion of mitochondrial DNA in these cells increases cell viability, SAM concentrations and nuclear DNA methylation at a global level. These changes are directly related to NAD⁺ levels. Based on public Bisulfite-seq data generated in other models, nuclear DNA methylation changes are found in regulatory elements of the genome, such as enhancers and promoters. They lead to changes in gene expression, associated with cell cycle regulatory pathways, as well as epigenetic remodelers, specifically DNMT3a, DNMT3b and TET3. Finally, it was found that mitochondrial metabolism, through NAD⁺ concentrations, can modulate SAM levels and nuclear DNA methylation.

Índice

Resumen	2
Abstract.....	2
Abreviaturas	6
Introducción.....	7
La función de la mitocondria en la célula	7
Origen de las mitocondrias	8
El genoma mitocondrial	8
Enfermedades asociadas a mutaciones en el DNA mitocondrial	9
Regulación epigenética.....	12
Organización tridimensional de la cromatina.....	14
Elementos distales de regulación.....	17
Modificaciones pos-traduccionales de histonas	17
Metilación del DNA	19
ANTECEDENTES	25
Efectos metabólicos del agotamiento de DNA mitocondrial	25
Efectos epigenéticos del agotamiento del DNA mitocondrial.....	26
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO	28
General	28
Objetivos particulares.....	28
METODOLOGÍA.....	28
Generar un modelo de disfunción mitocondrial en células humanas.	28
Determinar los genes diferencialmente regulados tras el agotamiento de mtDNA.....	30
Determinar una posible relación entre los niveles de NAD ⁺ y los niveles de SAM.....	31
Determinación de una posible relación entre los niveles de NAD ⁺ y los niveles de SAM.	32
Evaluación de los niveles de metilación del DNA nuclear en el modelo de agotamiento de mtDNA	33
RESULTADOS	34
La exposición a BrEt en células MCF7 reduce el número de copias de mtDNA y aumenta la viabilidad celular.	34
El agotamiento del mtDNA en MCF7 disminuye los niveles de NAD ⁺ y aumenta los de SAM.	37
El efecto del agotamiento de mtDNA sobre los niveles de SAM podría estar relacionado con la concentración intracelular de NAD ⁺	39

La concentración intracelular de NAD ⁺ y SAM influyen los niveles de metilación del DNA nuclear.....	41
Existe un conjunto de genes diferencialmente regulados ante el aumento intracelular de SAM.	43
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS	57
SUPLEMENTARIAS.....	57
REFERENCIAS	61

Abreviaturas

DNA---- Ácido desoxirribonucleico
mtDNA-----Genoma mitocondrial
Rho 0----- Celulas carentes de genoma mitocondrial
SAM---- S-Adenosil metionina
NAD+----- Dinucleotido de Nicotinamida y adenina
CO₂---- Dióxido de carbono
FAD+----- Dinucleotido de flavina y adenina
NADH---- Nicotinamida adenina dinucleótida y de hidrogeno
FADH₂----- Dinucleotido de flavina y adenina reducido
ATP---- Adenosín trifosfato
RNA----Ácido ribonucleico
tRNA----- RNA de transferencia
rRNA---- RNA ribosomal
TK2---- Timidina quinasa 2
RRM2B----- Subunidad M2 B de la ribonucleósido-difosfato reductasa
DGUOK---- Deoxiguanosina quinasa
MPV17---- proteína de membrana interna mitocondrial sin función asignada
POLG---- DNA polymerase gamma
PEO1----- Helicasa del DNA mitocondrial
DNMT ----Metil transferasas del DNA
SAH----S-adenosil-1-homocisteína
dcSAM---- S-adenosilmetionina descarboxilada
TETs---- Diez-once translocación metilcitosina dioxigenasas
H3K27ac----Acetilación del residuo de lisina en la posición N-terminal 27 de la proteína histona H3.
H3K4me3----- Trimetilación del residuo de lisina en la posición N-terminal 4 de la proteína histona H3
H3K4me1----- Monometilación del residuo de lisina en la posición N-terminal 4 de la proteína histona H3
H3K36me3 ----- Trimetilación del residuo de lisina en la posición N-terminal 36 de la proteína histona H3
H3K27me3----- Trimetilación del residuo de lisina en la posición N-terminal 27 de la proteína histona H3
H3K9me3 ----- Trimetilación del residuo de lisina en la posición N-terminal 9 de la proteína histona H3
MAT1A---- metionina adenosiltransferasa 1 A
5mC ----5-metilcitosina
OXPHOS---- sistema de fosforilación oxidativa
BrEt----Bromuro de etidio
NAM ---- Nicotinamida
NDI1-----Exógenas deshidrogenasa 1
AOX I-----Oxidasa alternativa 1

Introducción

La función de la mitocondria en la célula

Las mitocondrias son generalmente orgánulos oblongos, que varían en tamaño entre 1 y 10 micrómetros de longitud, su número cambia dependiendo del requerimiento energético de la célula, sin embargo, estos orgánulos son bastante flexibles y los estudios en tiempo real de células vivas han demostrado que las mitocondrias cambian de forma rápidamente y se mueven en la célula casi constantemente, organizándose con base en las necesidades particulares de la célula (Friedman & Nunnari, 2014).

Las mitocondrias representan un papel primordial en la generación de energía celular en los organismos eucariontes, son los orgánulos responsables de generar la mayor parte de la energía útil derivada del catabolismo de carbohidratos y ácidos grasos (Scheffler, 2002). En la mitocondria la oxidación de acetil CoA a CO_2 se combina con la reducción de NAD^+ y FAD a NADH y FADH_2 , respectivamente y después los electrones resultantes de la oxidación de NADH y FADH_2 se transfieren a través de una serie de portadores en la membrana mitocondrial hasta el oxígeno molecular para generar ATP y CO_2 . De esta manera, la fosforilación oxidativa genera la mayor parte de la energía derivada del metabolismo oxidativo (Cooper G.M., 2000)

Sin embargo, las mitocondrias no son solo organelos productores de ATP , poseen el inicio del ciclo de la urea, , también desempeñan un papel fundamental en la apoptosis, así como la vía de síntesis de los centros hierro-azufre (Fe-S) que son esenciales para varios procesos extra mitocondriales, evidenciando que la función mitocondrial es clave para la fisiología celular normal, dados los muchos procesos bioquímicos diferentes que ocurren en ésta (Suomalainen & Battersby, 2017).

Origen de las mitocondrias

Las mitocondrias surgieron alrededor de dos mil millones de años atrás, a partir de la endosimbiosis entre una α -proteobacteria y un arqueón (Vesteg y Krajcovic, 2008).. Aunque las mitocondrias han mantenido el carácter de doble membrana de sus antepasados y la producción de ATP, su forma y composición general se han alterado drásticamente y han adquirido innumerables funciones adicionales dentro de la célula eucarionte. Como parte del proceso de adquisición de nuevas funciones durante la evolución, la mayor parte del material genómico de la α -proteobacteria original se perdió o se transfirió al genoma nuclear de la célula receptora. Por eso en las mitocondrias actuales solamente existe un pequeño genoma circular, que, en el caso del humano, consta de aproximadamente 16 Kilobases y está presente en las células en un vasto exceso de copias en relación con los cromosomas nucleares.

El genoma mitocondrial

Las mitocondrias contienen su propio genoma, una molécula circular de 16.6 Kb que en general, solo es transmitido por herencia materna. El genoma mitocondrial humano contiene información para codificar solo 13 proteínas, 22 tRNAs y 2 rRNAs ribosomales que son componentes esenciales de su propio aparato de traducción; cada proteína codificada se restringe a subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Incluyen siete subunidades del complejo I, una subunidad del complejo III, tres subunidades del complejo IV y dos subunidades del complejo V (Smiraglia, et. al., 2008). También posee una región llamada "asa" (D-loop) o región de control, en el cual se inicia la replicación.

El proteoma mitocondrial actual es una mezcla de proteínas bacterianas 'viejas' y de proteínas 'nuevas' provenientes del hospedero. Por ejemplo, las máquinas de replicación y transcripción del DNA mitocondrial (mtDNA) tienen un origen

evolutivo en el bacteriófago, mientras que la maquinaria traduccional mitocondrial tiene una clara relación evolutiva con las bacterias (Shutt y Gray, 2006). Así mismo. Los productos proteicos codificados en el mtDNA representan una pequeña parte del proteoma mitocondrial, mientras que todas las demás proteínas mitocondriales (~1500), incluidas aquellas involucradas en la replicación, transcripción y traducción del mtDNA, están codificados por genes nucleares. Debido a que la mitocondria surgió de un evento de endosimbiosis que fue seguido de la transferencia de genes desde el endosimbionte hacia el huésped (Martin y Mentel, 2010), no es de extrañarse que el proteoma mitocondrial tenga en su mayoría proteínas codificadas en el núcleo. Debido a esto, la célula ha creado mecanismos de regulación que le permitan tener una fina coordinación entre el genoma nuclear y la mitocondria. Esta regulación se hizo evidente desde hace décadas, por ejemplo, en 1972 Zoltan y Hans observaron que las proteínas del aparato genético mitocondrial de *Neurospora crassa* están codificadas por genes nucleares, que son sintetizadas en ribosomas citoplasmáticos y que son controladas por un producto génico mitocondrial similar a un represor, planteando así un modelo que explica la coordinación de los ciclos de división nuclear y mitocondrial mediante un control represor. Sin embargo, aunque resulta intuitivo que debe existir una regulación desde el núcleo para modular las funciones mitocondriales, llevó muchos años describir las bases de vías de señalización que pudieran explicar estos procesos.

Enfermedades asociadas a mutaciones en el DNA mitocondrial

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos causados por mitocondrias disfuncionales. Los trastornos mitocondriales pueden ser causados por mutaciones (adquiridas o heredadas), en el DNA mitocondrial (mt DNA) o en genes nucleares que codifican componentes mitocondriales (El-Hattab y Scaglia, 2013).. También pueden ser el resultado de una disfunción mitocondrial adquirida debido a los efectos adversos de drogas, infecciones u otras causas ambientales.

A diferencia de otras enfermedades, las enfermedades mitocondriales pueden volverse clínicamente evidentes una vez que el número de mitocondrias afectadas alcanza cierto nivel o "expresión umbral" (Chinnery, 2000)

En mamíferos el genoma mitocondrial tiene una tasa de mutación más alta (aproximadamente 100 veces mayor) que el genoma nuclear (Cabrera, 2021). Las mutaciones del DNA mitocondrial ocurren con frecuencia, debido a la falta de la capacidad de reparación de errores que tiene el DNA mitocondrial. Además los defectos en las enzimas que controlan la replicación del DNA mitocondrial (todos los cuales están codificados por genes en el DNA nuclear) también pueden resultar en mutaciones en el DNA mitocondrial (Chinnery, 2000)

La clasificación clínica de los trastornos mitocondriales es un desafío debido al espectro superpuesto de fenotipos. El mismo defecto genético puede causar una variedad de síndromes clínicos diferentes. Por el contrario, un síndrome clínico casi idéntico puede ser causado por una variedad de defectos moleculares diferentes del ADN nuclear o del mtDNA (Chinnery, 2015).

En otros casos las enfermedades mitocondriales son causadas por la reducción del número de copias de mtDNA, llamado "agotamiento de DNA mitocondrial". Los síndromes de agotamiento del DNA mitocondrial (SMD por sus siglas en inglés) son un grupo clínicamente heterogéneo de trastornos con un patrón de transmisión autosómico recesivo que se inicia en la infancia o en la primera infancia y que se caracterizan por un número reducido de copias de mtDNA en los tejidos y órganos afectados (Chinnery, 2015). Los trastornos por depleción del ADN mitocondrial se dividen en dos categorías amplias: una forma miopática pura y un síndrome hepatocerebral que implica una encefalopatía progresiva con insuficiencia hepática. La causa miopática está formada por mutaciones en TK2 y RRM2B (Saada et. al., 2001) y los síndromes hepatocerebrales son causados por mutaciones en DGUOK, MPV17, POLG, PEO1, SULCA2 o SULG1.1 (Sarzi, et. al. 2007). El síndrome de Alpers-Huttenlocher es un ejemplo de un trastorno con depleción del mDNA causado por mutaciones en POLG que codifica la subunidad catalítica de la polimerasa encargada de replicar el ADNmt, que generalmente se

presenta en la primera infancia con encefalopatía asociada con convulsiones, mioclonías, ataxia y retraso en el desarrollo, seguido de insuficiencia hepática a menudo irreversible (Naviaux y Nguyen, 2004).

Además se ha demostrado que las mutaciones autosómicas recesivas homocigotas y heterocigotas compuestas de POLG causan encefalomiopatías infantiles a veces con afectación hepática (síndrome de Alpers-Huttenlocher, ver arriba) o un síndrome de ataxia recesiva de inicio tardío (síndrome de ataxia recesiva mitocondrial; MIRAS) que es muy prevalente en Escandinavia (Hakonen, et. al., 2005).

Los trastornos de la síntesis de proteínas intramitocondriales han surgido como una de las principales causas de la enfermedad mitocondrial codificada en el núcleo. Un tercio de los pacientes con enfermedad mitocondrial tiene un defecto bioquímico que involucra múltiples complejos enzimáticos de la cadena respiratoria, lo que sugiere un defecto en la síntesis de proteínas intramitocondriales (Chinnery, 2015). Una minoría de estos pacientes tiene una mutación del mtDNA como causa principal, pero la mayoría tiene trastornos autosómicos recesivos. El mecanismo molecular involucra potencialmente una amplia gama de diferentes genes que afectan la replicación del mtDNA y la expresión del mtDNA, incluyendo proteínas estructurales ribosomales, proteínas de ensamblaje ribosómico, aminoacil-tRNA sintetasas, enzimas modificadoras de tRNA, enzimas de metilación de tRNA y varias factores de iniciación, alargamiento y terminación de la traducción mitocondrial (Chinnery, 2015). Aunque existe una superposición clínica considerable, la mayoría de los pacientes no tienen características claramente definidas y presentan una encefalomielopatía superpuesta que puede afectar al corazón y al hígado. En muchos pacientes, el trastorno es fatal en los primeros años de vida, y la diversidad de genes implicados respalda el uso de la secuenciación temprana del exoma en el diagnóstico de este trastorno una vez que se ha establecido la base bioquímica (Van Goethem, et. al., 2003).

Actualmente se cree que varios síndromes clínicos están asociados con las enfermedades mitocondriales. Los posibles ejemplos incluyen síndrome de

Pearson, síndrome de Leigh, oftalmoplejía externa progresiva, dolor muscular inducido por el ejercicio, fatiga y rabdomiólisis (Cohen, 2016). También se han hecho correlaciones muy robustas entre el agotamiento de DNA mitocondrial y el envejecimiento. Se ha visto que la disfunción mitocondrial tiene un papel fundamental en el surgimiento y progresión del cáncer, considerándose una marca distintiva de una célula cancerosa (Hsu, et. al. 2016).

Regulación epigenética

La epigenética consiste en mecanismos mediante los cuales la cromatina se altera químicamente (a través de modificaciones de DNA e histonas) o estructuralmente (a través de la remodelación de la cromatina y la interacción inter/intra cromosómica de DNA) (Figura 1).

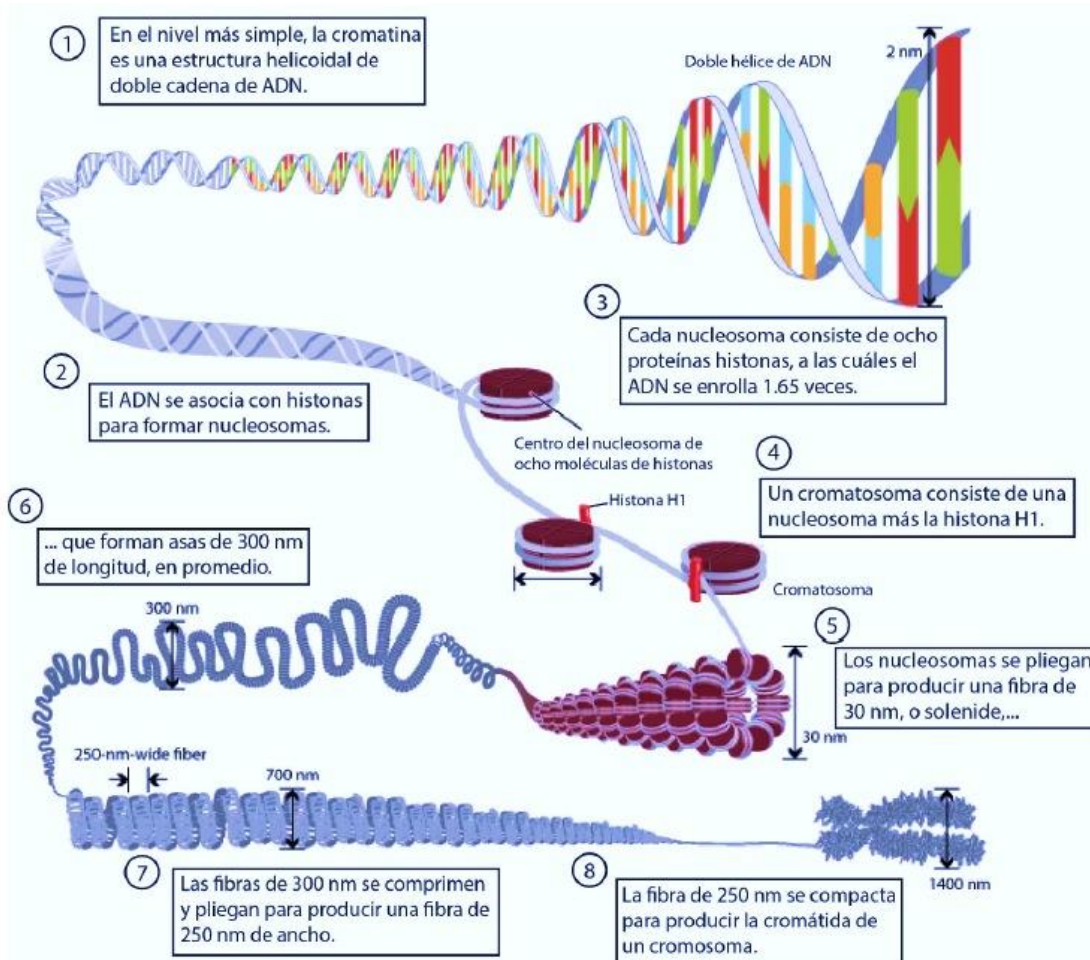


Figura 1. Niveles de organización de la cromatina (Modificado de Annuziatio, A, 2008). Desde la doble hélice de DNA, pasando por los nucleosomas, solenoides hasta llegar a los cromosomas, se observa como el DNA tiene una organización tridimensional que le permite mantenerse en un espacio tan diminuto como el núcleo.

En el genoma humano, estas modificaciones epigenéticas pueden ocurrir en cualquier lugar y ninguna de ellas altera la secuencias de nucleótidos del DNA, pero pueden tener efectos profundos en la transcripción de genes y, por lo tanto, en el linaje, la función y el destino de las células. Además, en respuesta a estímulos ambientales o durante el desarrollo, la cooperación entre varias regulaciones epigenéticas confiere "memoria epigenética" que le permite a las células transmitir su información genética y el fenotipo asociado (Chen, et. al., 2017).

Los procesos epigenéticos son esenciales para el desarrollo y la diferenciación, pero también pueden surgir en adultos, ya sea por cambios aleatorios o bajo la influencia del medio ambiente (Jaenisch y Bird, 2003). Los mecanismos epigenéticos también protegen contra los genomas virales que de otro modo secuestrarían las funciones celulares para sus propios fines. La comprensión sobre los procesos epigenéticos es cada vez mayor, llegando a describir formas en que las modificaciones parecen ser interpretadas por proteínas que reconocen una modificación particular y facilitan los efectos biológicos posteriores apropiados (Chen, et. al., 2017)

Organización tridimensional de la cromatina

La cromatina se organiza dentro del núcleo tan eficientemente que permite la expresión y replicación adecuadas del material genético al mismo tiempo que mantiene la cromatina en un espacio reducido. Los estudios de la organización tridimensional de la cromatina como el Hi-C (una extensión de 3C que es capaz de identificar interacciones de largo alcance de manera imparcial y en de todo el genoma) sugieren que los cromosomas están organizados en grandes compartimientos o “territorios cromosómicos”, a su vez la cromatina se agrupa en compartimientos “A o B” , dominios más pequeños llamados dominios topológicamente asociados (TAD por sus siglas en inglés) y asas de cromatina (Rowley y Corces, 2018).

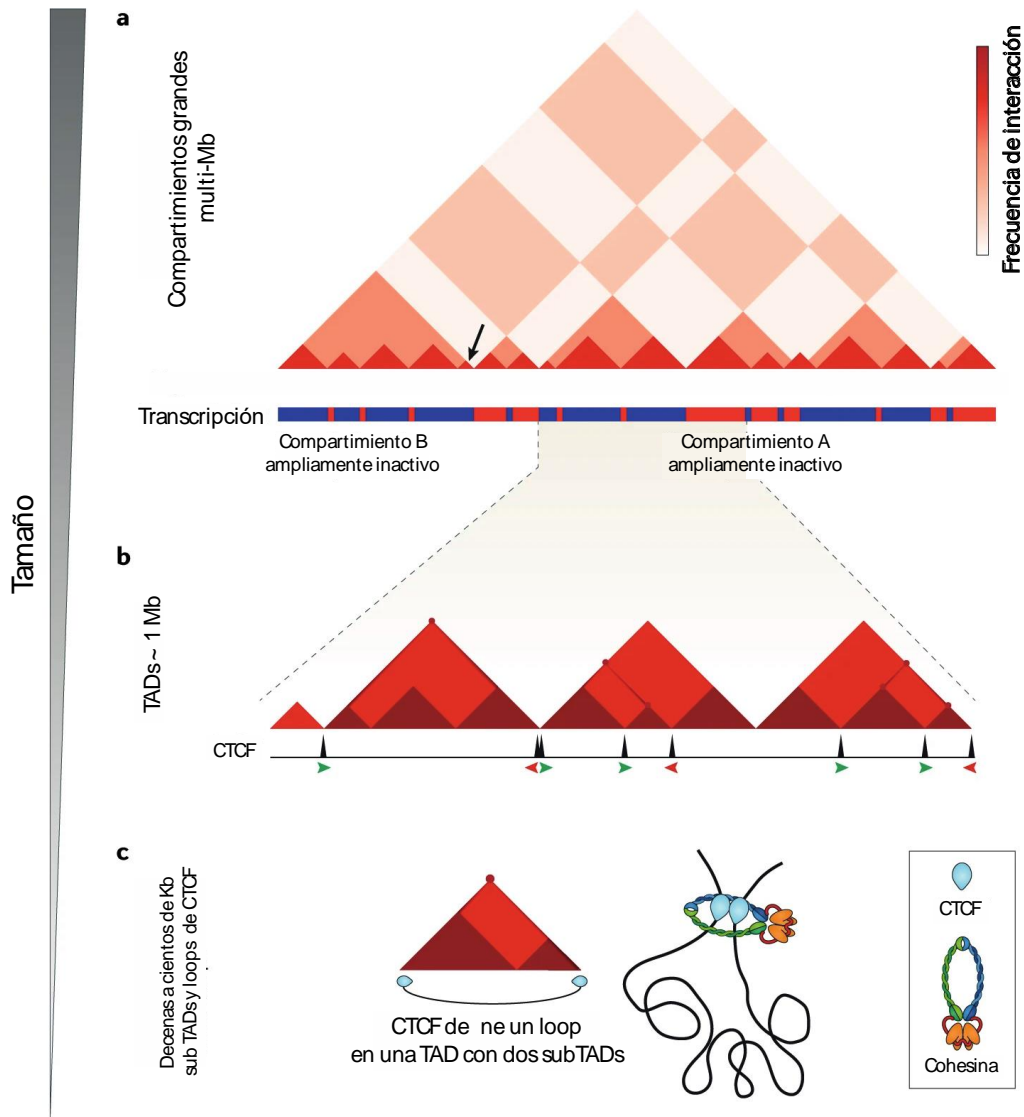


Figura 2. Modelo jerárquico de la organización de la cromatina (Modificado Rowley y Corces, 2018). a) Caricatura de las señales de interacción en intensidades variables de rojo, obtenidas de los datos de Hi-C de baja resolución que permiten identificar los compartimentos A (rojo) y B (azul) con base en regiones transcripcionalmente activas e inactivas del genoma, respectivamente. b) Las TADs son regiones más pequeñas del genoma identificadas con datos Hi-C de mayor resolución, caracterizadas por frecuencias de interacción más altas (tono más oscuro de rojo) y bucles de CTCF. La dirección de los sitios de CTCF está indicada por las orientaciones y los colores rojo y verde de las puntas de flecha. c) TAD detectada a una resolución de ~ 40 kb, que contiene dos subTADs y se encuentra flanqueada por sitios de CTCF-cohesina que forman un bucle. Lo anterior sugiere que las características de diferentes tamaños contribuyen a la formación de otros.

Las regiones en los compartimentos “A” generalmente contienen genes transcritos y modificaciones de histonas activas, aunque algunas regiones en los compartimentos A no se transcriben. Análogamente, el compartimento B contiene genes inactivos con modificaciones de histonas asociadas con un estado transcripcionalmente reprimido, pero también a algunos genes transcritos (Fig. 2a) (Rowley y Corces, 2018). Por otro lado los TADs son regiones más pequeñas del genoma identificadas con datos de Hi-C de mayor resolución. Los TADs están separados por límites que están enriquecidos en sitios de unión a CTCF (Factor de unión a CCCTC) y genes altamente transcritos. Es importante tener en cuenta que no todos los TADs definidos computacionalmente está flanqueados por la unión de CTCF (Fig. 2b) (Rowley y Corces, 2018).

Las características de los diferentes estados de organización 3D de la cromatina han llevado a plantear un modelo jerárquico, en el que los compartimentos están compuestos por varios TADs (Fig. 2). Mientras que los compartimentos A y B corresponden a dominios que interactúan preferentemente con secuencias en otras regiones del compartimento A o B, respectivamente, los TADs corresponden a secuencias que interactúan preferentemente con ellos mismos en lugar de con otras regiones del genoma (Rowley y Corces, 2018).

Esta organización altamente regulada permite la accesibilidad selectiva de la maquinaria de transcripción, por ejemplo, factores de transcripción (TF) y cofactores a elementos genómicos específicos, incluidos potenciadores (para facilitar la transcripción), promotores (para iniciar la transcripción), el cuerpo genético / marcos de lectura abiertos (para transcribir y traducir a proteínas), silenciadores (para suprimir la transcripción) y aislantes (para bloquear las interacciones promotor-potenciador) (Rowley y Corces, 2018).

Elementos distales de regulación

El genoma contiene secuencias que influyen en la expresión de un gen o en grupos de genes y a diferencia de los promotores, estas secuencias se pueden encontrar junto al gen blanco o hasta a 1 Mega base de distancia. Debido a que se localizan lejos de sus genes blanco, la identificación de dichos elementos suele ser complicada. Este tipo de elementos se divide en tres: *enhancer*, silenciadores e *insulators*.

Los *enhancers* son regiones del genoma que tienen la capacidad de aumentar la transcripción de un gen independientemente de su posición y orientación respecto al promotor del gen que regula. No existen secuencias consenso que permitan identificarlos, pero suelen tener secuencias altamente conservadas entre distintas especies del mismo grupo filogenético, por lo que la conservación es una de las características de identificación de nuevos enhancers (Pennacchio et. al., 2006). En la actualidad se ha visto que una característica más confiable para identificar a los posibles enhancers es la presencia de la acetilasa de histonas p300, regiones de cromatina abierta y las marcas de histonas H3K27ac y H3K4me1.

Los silenciadores son secuencias reconocidas por factores transcripcionales con funciones represoras o co-represoras y así como sucede con los *enhancers*, su función sobre el promotor del gen blanco es independiente de su orientación y distancia (Maston et. al., 2006). Finalmente los insulators tienen la habilidad de proteger a un gen de la influencia de elementos regulatorios no deseados presentes en su micro ambiente cromosómico (Barkess y West, 2012).

Modificaciones pos-traduccionales de histonas

Las histonas están cargadas positivamente en el extremo N de su secuencia con abundantes residuos de lisina y arginina, los cuales le confieren la capacidad de

unirse fuertemente al DNA para limitar su accesibilidad. Cada nucleosoma contiene un octámero de histonas, formado por dos monómeros de cada tipo de histona (H2A, H2B, H3 y H4). Aproximadamente el 80% del DNA genómico está empaquetado en nucleosomas, y el 20% restante está contenido en la región de enlace que conecta nucleosomas vecinos.

Las histonas están sujetas a más de 130 modificaciones postraduccionales (PTM por sus siglas en inglés), que incluyen acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación. Entre las modificaciones de histonas más comunes esta H3K27ac, H3K4me3, H3K4me1 y H3K36me3 que se encuentran asociadas con regiones de transcripción activa. En contraste, H3K27me3 y H3K9me3 se distribuyen principalmente en zonas de heterocromatina.

Las modificaciones de histonas pueden afectar las actividades transcripcionales a través de dos mecanismos principales. Primero, las histonas PTM pueden alterar la estructura y conformación de la cromatina. Por ejemplo, la acetilación de H3K27 puede reducir la carga positiva de histonas, disminuyendo así su unión al DNA y aumentando su accesibilidad (Workman y Kingston, 1998). En segundo lugar, las PTM de histona pueden proporcionar señales para que los "readers" (proteínas que leen estas marcas) recluten más activadores o supresores de la transcripción. Por ejemplo, la trimetilación H3K27 es reconocida por el complejo represivo polycomb 1 (PRC1), que cataliza la ubiquitinación de la histona H2A, un proceso requerido para la represión transcripcional (Pasini, et. al., 2008). Las PTM tienen funciones diferentes dependiendo del residuo o posición en el que se localizan, formando así el código de histonas, que puede controlar la accesibilidad del DNA, reclutar factores de transcripción y activadores o supresores para dar como resultado una transcripción activa o silenciada (Rivera y Ren, 2013).

Metilación del DNA

La metilación del DNA, es de los primeros mecanismos epigenéticos descritos, así como de los más estudiados, en el cual un grupo metilo (CH₃) se agrega enzimáticamente al carbono 5 de la citosina con precisión temporal (por ejemplo, etapas de desarrollo o diferenciación) y espacial (es decir, regiones específicas de DNA en un cromosoma dado) (Moore y Fan, 2003). La mayor parte de la metilación del ADN ocurre en citosinas que preceden a un nucleótido de guanina o sitios CpG. Los sitios CpG metilados pueden ser potencialmente mutagénicos, ya que la 5mC puede desaminar a timina (Coulondre et al, 1978). También existe evidencia de metilación sin CpG en células madre embrionarias de ratón y humanas; sin embargo, esta metilación se pierde en tejidos maduros (Lister et al, 2009). Un análisis más exhaustivo de la corteza frontal murina ha revelado recientemente que, aunque la mayor parte de la metilación ocurre dentro de los sitios CpG, existe un porcentaje significativo de sitios metilados no CpG (Xie et al, 2012). Debido a su reciente descubrimiento, el papel de la metilación sin CpG aún no está claro.

La metilación del ADN es catalizada por una familia de metiltransferasas de DNA (Dnmts). Dnmt3a y Dnmt3b pueden establecer un nuevo patrón de metilación en el ADN no modificado y, por lo tanto, se conocen como Dnmt de novo. Por otro lado, Dnmt1 funciona durante la replicación del DNA para copiar el patrón de metilación de la hebra de DNA parental en la hebra recién sintetizada. Las Dnmts están ampliamente involucradas en el desarrollo embrionario. Cuando las células alcanzan la diferenciación terminal, la expresión de Dnmt se reduce mucho.

Aproximadamente el 45% del genoma de los mamíferos consiste en elementos transponibles y virales que son silenciados por metilación en masa (Schulz et al, 2006). La gran mayoría de estos elementos se inactivan por metilación del DNA o por mutaciones adquiridas con el tiempo como resultado de la desaminación de 5mC (Walsh et al, 1998). Si se expresan, estos elementos son potencialmente

dañinos ya que su replicación e inserción pueden conducir a la alteración de genes y la mutación del DNA (Ukai et al, 2003).

La capacidad de la metilación para regular la expresión génica a través de islas CpG es particularmente importante para establecer la impronta (Choi et al, 2005). Los genes improntados se expresan de solo uno de los dos cromosomas parentales heredados. Más allá de los genes improntados, la metilación del ADN de las islas CpG regula la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación (Shen et al, 2007; Weber et al, 2007; Fouse et al, 2008; Mohn et al, 2008; Meissner et al, 2008).

La metilación de islas CpG da como resultado un silenciamiento estable de la expresión génica (Mohn et al, 2008). La mayoría de los promotores de genes, aproximadamente el 70%, residen en islas CpG (Saxonov et al, 2006). Las islas CpG son tramos de ADN de aproximadamente 1000 pares de bases de largo que tienen una densidad de CpG más alta que el resto del genoma (Bird et al, 1985). Las islas CpG, especialmente aquellas asociadas con promotores, están altamente conservadas entre ratones y humanos (Illingworth et al, 2010). La ubicación y preservación de las islas CpG a lo largo de la evolución implica que estas regiones poseen una importancia funcional.

Parece que las islas CpG se han conservado evolutivamente para promover la expresión génica mediante la regulación de la estructura de la cromatina y la unión de factores de transcripción. Como muchos sitios de unión a factores de transcripción son ricos en GC, es probable que las islas CpG mejoren la unión a los sitios de inicio de la transcripción. A pesar de su falta de elementos promotores comunes, las islas CpG mejoran la accesibilidad del ADN y promueven la unión del factor de transcripción.

La metilación de islas CpG puede alterar la unión del factor de transcripción, reclutar proteínas de unión a metilo represivas y silenciar de manera estable la expresión génica. Sin embargo, las islas CpG, especialmente las asociadas con promotores de genes, rara vez están metiladas. Se necesitan más estudios para

determinar hasta qué punto la metilación del ADN de las islas CpG regula la expresión génica.

Por otro lado, la metilación del primer exón, como la metilación del promotor, conduce al silenciamiento del gen (Brenet et al, 2011). La evidencia sugiere que la metilación del DNA en el cuerpo del gen está asociada con un mayor nivel de expresión genética en las células en división (Hellman y Chess, 2007; Ball et al, 2009; Aran et al, 2011). Sin embargo, en células que se dividen y no se dividen lentamente, como el cerebro, la metilación del cuerpo genético no se asocia con un aumento de la expresión génica (Aran et al, 2011; Guo et al, 2011a, 2011b; Xie et al, 2012). Además, en la corteza frontal murina, la metilación de sitios no CpG dentro de los cuerpos génicos se correlaciona negativamente con la expresión génica (Xie et al, 2012). Por lo que aún no está claro cómo la metilación del ADN del cuerpo del gen contribuye a la regulación de los genes.

Mecanismos regulatorios de la metilación del DNA

La metilación del DNA está a cargo de las proteínas DNA (citosina-5)-metiltransferasa (DNMT por sus siglas en inglés) de novo (DNMT3A y DNMT3b) y de mantenimiento (DNMT1), las cuales se ven fuertemente reguladas a distintos niveles. Por ejemplo, se ha visto que la unión de las DNMT3A a las colas de las Histonas 3 activa directamente a DNMT3A por un mecanismo alostérico (Li et. al, 2011), en estudios *in vitro* se observó que estimula la metilación del DNA unido a la cromatina (Zhang et. al, 2010). Estos resultados indican que el dominio ADD de DNMT3A (Responsable de la unión a H3) guía la metilación del DNA en respuesta a modificaciones específicas de histonas y proporciona una fuerte evidencia de que las metiltransferasas de DNA podrían dirigirse a la cromatina con marcas específicas (Fig 3). De hecho, existe una fuerte correlación entre la metilación del DNA y la ausencia de H3K4me3 (Meissner et. al., 2008, Weber et. al., 2007); para probar esto se introdujo artificialmente a DNMT3B en levaduras y se observó que

no metilaba regiones genómicas con alto contenido de H3K4me3 (Morselli et. al, 2015).

Se sabe que la unión de DNMTs podría tener otra función, por ejemplo, se ha descubierto que DNMT3A y DNMT3B están anclados de manera estable a nucleosomas que contienen niveles más altos de DNA metilado en células somáticas y que esta unión es esencial para regular los niveles celulares de DNMT3A y DNMT3B (Jeong et al, 2009).

Por otro lado, se ha visto que el dominio PWWP de DNMT3A interactúa específicamente con H3K36me3 y aumenta la actividad de metilación de DNMT3A en el DNA nucleosómico nativo, explicando por qué los niveles de metilación del DNA son altos en el cuerpo de los genes transcritos activamente (Dhayalan et al, 2010)

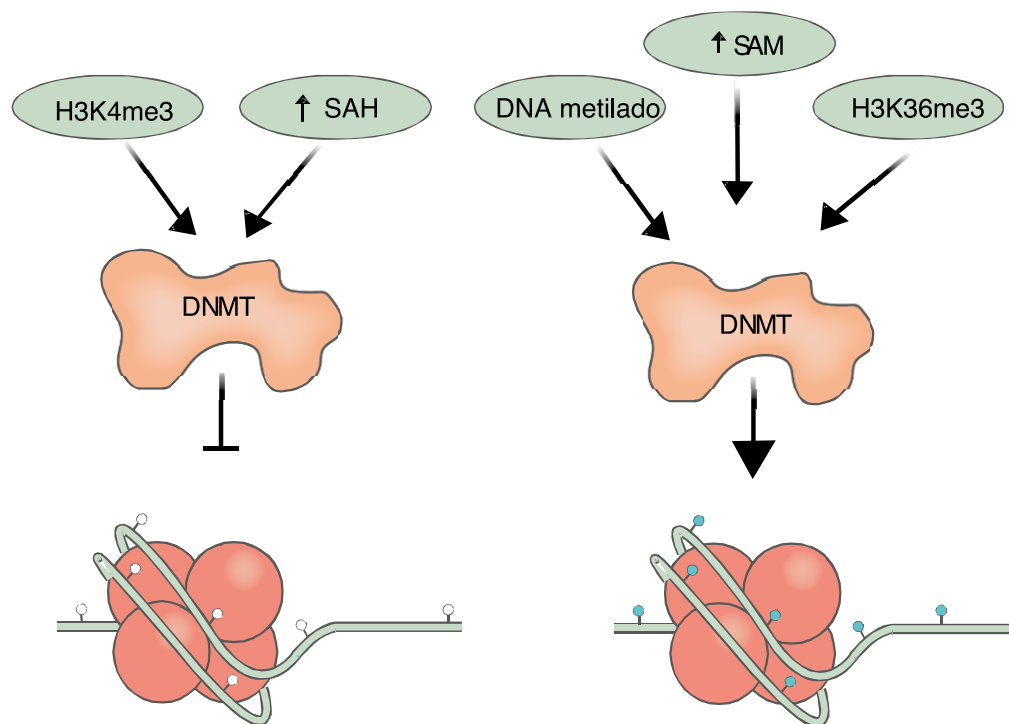


Figura 3. Factores que afectan la actividad de las DNMTs. Las altas concentraciones de SAH y acumulación de la marca de histona H3K4me3 se asocian para inhibir la actividad de la DNMT, evitando la metilación de las citosinas (a la izquierda). Este efecto contrasta con el efecto activador de las altas concentraciones de SAM, DNA metilado y la marca H3K36me3, que promueve la metilación del DNA.

Pero la interacción con histonas no es la única forma de regular la metilación del DNA, se ha visto que la metilación de DNA *de novo* en transposones de mamíferos es promovida por los piRNAs (RNAs de 24 a 32 pb asociados a proteínas piwi de la familia argonauta), ya que los complejos Piwi-piRNA reclutan enzimas modificadoras de la cromatina para establecer marcas de represión epigenéticamente estables que eventualmente promuevan la metilación del DNA *de novo* a través de la actividad del complejo DNMT3A-DNMT3L (Aravin et al, 2008).

Efectos del metabolismo mitocondrial en la metilación del DNA

Los haplotipos y haplogrupos mitocondriales afectan una variedad de vías de señalización. Algunos estudios implican un efecto de estas variantes sobre la metilación del DNA nuclear y sugieren que esto podría deberse a que las mitocondrias influyen en vías como OXPHOS y el ciclo de la metionina (Bellizi, et. al. 2012). De hecho, hallazgos recientes sugieren que la disfunción mitocondrial y las variaciones del mtDNA pueden causar alteraciones en los niveles de metabolitos, interfiriendo consecuentemente con la metilación del DNA nuclear. Existe una estrecha red de vías metabólicas que afectan a la metilación del DNA que involucra a las mitocondrias. Estos incluyen, pero no se limitan a: biosíntesis de serina, ciclo de folato, ciclo de metionina, vía de transulfuración y ciclo de Krebs.

El ciclo del folato, también conocido como ciclo de un carbono (1C), que tiene lugar principalmente en las mitocondrias, implica la transferencia de un carbono de la serina o la glicina para la formación de componentes básicos de ADN y ARN, o la generación de metionina (Maddocks, et. al., 2016). Posteriormente, esta vía se vincula al ciclo de la metionina, que se encuentra en el citoplasma, que participa en la producción de SAM, un donante de metilo que se utiliza para numerosas reacciones, incluido el DNAm (Maddocks, et. al., 2016). SAM es producida por la metionina adenosiltransferasa que reacciona con metionina y ATP. Una vez que

ha perdido su grupo metilo, SAM se convierte en SAH (S-adenosil-homocisteína), que se convierte en homocisteína, y luego se puede convertir de nuevo en metionina, reiniciando el ciclo o alimentarse en la vía de transulfuración donde se transforma de manera irreversible. Este último conduce a la producción de cisteína y α -cetobutirato, ambos necesarios para la gluconeogénesis, un proceso metabólico que produce glucosa a partir de fuentes de carbono que no son carbohidratos. Se ha descubierto que los niveles de SAM dependen del haplogrupo mitocondrial. Un ejemplo de ello se ve en líneas de células híbridas humanas de células del haplogrupo J que tienen un mayor nivel de expresión de metionina adenosiltransferasa 1A (MAT1A), por lo tanto niveles elevados de metilación global, en comparación con los mismos tipos de células con el haplogrupo H (Zhang, 2018).

El ciclo de Krebs que tiene lugar en la mitocondria producen intermedios como α -cetoglutarato, succinato y fumarato. Todos estos metabolitos influyen en la actividad de las enzimas TET, que de hecho pertenecen a la familia de las desoxigenasas dependientes de α -cetoglutarato (Iyer et. al., 2009). El succinato y el fumarato, por otro lado, como se observa en múltiples líneas celulares cancerosas humanas, son inhibidores de las enzimas TET y, en el caso del fumarato, es capaz de modular la TET también mediante la reducción de la expresión de ARNm de TET1 y TET2, aunque aumenta la expresión del ARNm de las enzimas TET3 (Laukka, et. al., 2016).

También se ha visto que la actividad de las DNMTs se ve influenciada por la concentración de su sustrato (S-adenosil metionina) y su producto (S- adenosil homocisteína (Fig. 3), por ejemplo, en presencia altas concentraciones de SAM, que sirve como donador del grupo metilo, se aumenta la actividad de DNMT, mientras que sus metabolitos, S-adenosil-1-homocisteína (SAH) y S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM), actúan como un inhibidor de la actividad de DNMT (Soda, 2018). Además el aumento de los niveles de SAH puede inhibir todas las reacciones de metiltransferasa dependientes de SAM (Ueland, 1982), incluida la N-metiltransferasa de glicina (GNMT) que funciona para

regular los niveles de SAM y la relación de SAM/SAH (Rowling y Schalinske, 2001) teniendo así un doble efecto sobre la actividad de DNMT.

ANTECEDENTES

Efectos metabólicos del agotamiento de DNA mitocondrial

La cantidad total de DNA mitocondrial celular (mtDNA) varía ampliamente y parece estar relacionada con la naturaleza y el estado metabólico de los tejidos y las células. Sin embargo, hay ocasiones en que la cantidad total de mtDNA se ve fuertemente disminuida (agotamiento de mtDNA) dañando la homeostasis celular. El agotamiento del mtDNA ocurre con frecuencia en muchas enfermedades, incluido el cáncer. En diversos estudios se ha visto que la actividad de la fosforilación oxidativa está bajo un estricto control por la cantidad de mtDNA en la célula, y que el número de copias de mtDNA es necesario para mantener un nivel normal de producción de energía (Rocher et. a., 2008). Aunado a la disminución de energía, dado que el complejo I de la cadena de transporte de electrones baja su actividad, se produce la acumulación de NADH en la célula.

En diversos estudios se ha observado que el agotamiento de mtDNA conduce a un aumento en los niveles de SAM, siendo uno de los efectos menos directos y difíciles de explicar (Lozoya et. al., 2018). Sin embargo, esto plantea la posibilidad de que el agotamiento tenga efectos fuera del ambiente mitocondrial, principalmente en aquellas reacciones que dependan de SAM como la metilación del DNA, un importante nivel de regulación epigenética.

Efectos epigenéticos del agotamiento del DNA mitocondrial

En la actualidad se sabe que el aumento en los niveles de SAM, va acompañado de un aumento en la actividad de las DNMT, de tal forma que el agotamiento de mtDNA puede influir en los patrones de metilación de DNA nuclear. Con el objetivo de esclarecer si el mtDNA afecta el paisaje epigenético en el genoma nuclear, Smiraglia, et.al, en el 2008 analizaron los cambios de metilación en una línea celular expuesta a bajas concentraciones de bromuro de etidio, como medio para producir agotamiento de mtDNA, observando que el deterioro mitocondrial puede modificar la metilación del DNA en el genoma nuclear, y que algunos, pero no todos los cambios inducidos por el agotamiento del genoma mitocondrial pueden revertirse mediante la reconstitución del contenido de mtDNA. Los datos anteriores sugieren una relación entre la regulación epigenética y la mitocondria, exponiendo que no solo el núcleo regula a la mitocondria, también la mitocondria tiene un poder regulatorio sobre el panorama epigenético nuclear.

El fenómeno observado por Smiraglia, fué confirmado en el 2018 por Lozoya et. al., destacando que los cambios de metilación van acompañados de cambios en el programa transcripcional cuando a las células humanas se les induce agotamiento de mtDNA. Muchos de los genes que se expresan diferencialmente en respuesta al agotamiento del mtDNA también se metilan diferencialmente. Además, estos cambios en la metilación y la expresión génica se pueden prevenir mediante la expresión de dos proteínas exógenas deshidrogenasa 1 (NDI1) y la oxidase alternativa (AOX), ya que permiten que el NADH se continúe oxidando.

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Se sabe que las disfunciones mitocondriales causadas por mutaciones del mtDNA están implicadas en enfermedades graves e intratables. Ya que los genes codificados en el mtDNA son esenciales para el correcto funcionamiento de la

fosforilación oxidativa y la producción de ATP en la célula, lo que podría plantear un papel emergente de la regulación inversa de la expresión génica nuclear en respuesta a las señales que se originan en las mitocondrias, en un proceso denominado señalización retrógrada (Ryan y Hoogenraad, 2007).

Considerando que la mitocondria interviene en la producción de metabolitos usados como sustratos o cofactores de modificadores epigenéticos y que alteraciones en la función mitocondrial afectan la disponibilidad de estos metabolitos, resulta interesante estudiar la contribución que tiene la mitocondria en la regulación transcripcional de los genes nucleares, a través de modular la actividad de los modificadores epigenéticos.

La naturaleza única y progresiva del agotamiento del mtDNA y la consecuente disfunción mitocondrial ofrece una oportunidad excepcional para llenar algunos de los vacíos de conocimiento en el campo, como los efectos sobre NAD⁺ y SAM, dos metabolitos usados por reguladores epigenéticos, sobre la regulación epigenética nuclear.

HIPÓTESIS

La disfunción mitocondrial ocasionada por el agotamiento de mtDNA afecta la actividad de los modificadores epigenéticos asociados a la regulación transcripcional en núcleo, a través de modular directa o indirectamente los niveles de sus sustratos.

OBJETIVO

General

- Determinar la contribución de la mitocondria en la regulación transcripcional de los genes nucleares.

Objetivos particulares

1. Generar un modelo de disfunción mitocondrial en células humanas.
2. Determinar los genes diferencialmente regulados tras el agotamiento de mtDNA
3. Evaluar el efecto del agotamiento del DNA mitocondrial sobre los niveles de NAD⁺ y SAM.
4. Determinar una posible relación entre los niveles de NAD⁺ y los niveles de SAM.
5. Evaluar los niveles de metilación del DNA nuclear en el modelo de agotamiento de mtDNA.

METODOLOGÍA

Generar un modelo de disfunción mitocondrial en células humanas.

Se utilizó la línea celular MCF7, derivada de tejido glandular mamario metastásico. Para inducir el agotamiento de mtDNA en células MCF7 se adiciono 200 ng/mL de bromuro de etidio (BrEt) al medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) más suero fetal bovino al 10% (Sigma Aldrich). El tratamiento se mantuvo por 8 semanas, tomando muestras de DNA, RNA y células cada 2 semanas, con el fin de observar

la progresión del fenómeno de agotamiento de mtDNA. Para validar el establecimiento del modelo de agotamiento de mtDNA, se realizaron qPCR contra el gen 12s rRNA codificado en el DNA mitocondrial, utilizando los oligonucleótidos 5´ CGAAAGGACAAGAGAAATAAGG 3´ para el *forward* y 5´CTGTAAAGTTTTAAGTTTTATGCG 3´ para el *reverse*, que generaban un fragmento de 152 pb (Fig. Suplementaria 1). Estos oligonucleótidos fueron estandarizados por PCR punto final (Fig. Suplementaria 2), para comprobar su especificidad, demostrando que solamente generan una banda de 152 pb (Fig. Suplementaria 3), por lo que son totalmente confiables para realizar qPCR.

Durante el establecimiento del modelo, cada 2 semanas, las células se cosecharon, se lavaron con PBS y se resuspendieron en TRIzol. La extracción del RNA se hizo el mismo día en que se realizaba el qPCR tanto para las células Rho 0 como para las WT, para evitar un sesgo por la degradación del RNA. Los resultados del qPCR se normalizaron comparando contra el gen constitutivo HPRT, el cual previamente se comprobó mediante PCR tiempo real que su expresión no tenía cambios ante el agotamiento de mtDNA.

Además se midió la viabilidad celular en tres tiempos (inicio, mitad y final del tratamiento) de las MCF7 wt y MCF7 rho0, para esto se inocularon 100 mil células en cada pozo de cajas Petri de 6 pozos y se agregó medio RPMI + BrEth 200 ng/mL. Cada día, durante 5 días, se cosechó un pozo diferente después de digerir con Tripsina y se tiñó con Azul de Tripano. Esta tinción permite diferenciar entre las células vivas y muertas, debido a q las células vivas son impermeables al tinte, mientras que las muertas no, por lo que estas últimas lucen opacas en microscopio óptico. Las células teñidas se contaron con un hemocitómetro, y solo se consideró para el conteo aquellas células que brillaban (células vivas). Cada ensayo de viabilidad fue realizado con dos replicas biológicas y cada replica biológica fue contada por duplicado.

Determinar los genes diferencialmente regulados tras el agotamiento de mtDNA.

Se descargaron los datos crudos del RNA-seq en células HepG2 publicado por Wang et. al, 20017, en el cual solamente aumentaron las concentraciones de SAM.

El análisis fue realizado utilizando la plataforma Galaxy. Después de realizar el corte de adaptadores, control de calidad, alineamiento y mapeo de las secuencias, se procedió a filtrar los genes por FDR (> 0.05) después los genes que fueron significativos se filtraron por los regulados a la baja ($\logFC > -1.5$) y los regulados a la alta ($\logFC < 1.5$).

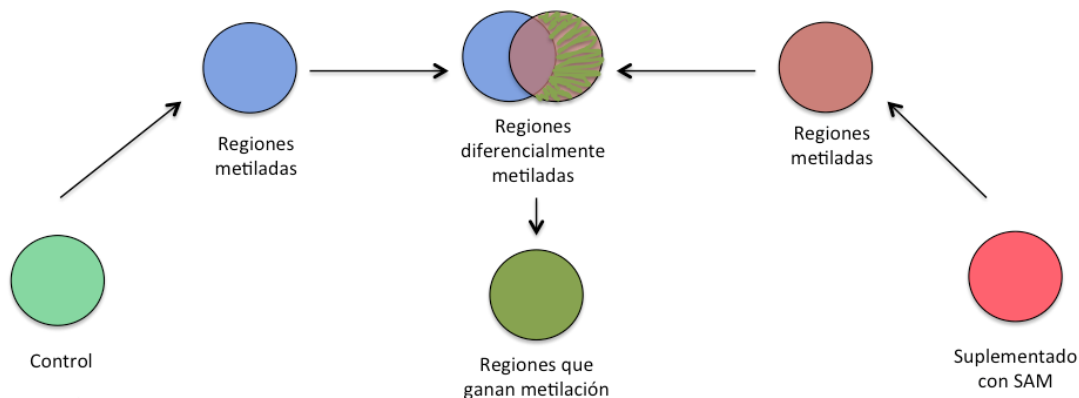


Figura 4. Flujo de trabajo para obtener las regiones que ganan metilación en presencia de un aumento en las concentraciones intracelulares de SAM. Para este trabajo, solo se tomaron en cuenta las regiones que en comparación con el control (verde militar), se metilaron más al aumentar las concentraciones de SAM.

Para hacer una elección robusta de los genes candidatos, se procedió a descargar los datos crudos de un Bisulfito-seq en el cual, se suplementaron a las células HepG2 con SAM (Wang, et. al., 2017). El análisis del Bis-seq se realizó en la plataforma Galaxy. Comparando las Regiones Diferencialmente Metiladas (DRM) con una lista de regiones promotoras, se ubicaron genes cuyos promotores variaron en su grado de metilación en presencia de altas concentraciones de SAM. Después las regiones diferencialmente metiladas fueron comparadas con los genes diferencialmente expresados. En las regiones comunes resultantes de

esta comparación podemos deducir que cuando se aumentan las concentraciones de SAM, dando lugar a un aumento de metilación que a su vez genera cambios en la expresión de genes nucleares.

Determinar una posible relación entre los niveles de NAD⁺ y los niveles de SAM.

Las células MCF7 al ser adherentes, se despegaron con tripsina, se centrifugaron y lavaron dos veces con PBS. Después 2×10^6 células se lisaron con 0.5 ml de KOH 2M, centrifugaron y se recolectó el sobrenadante. Se hizo una curva con 10, 30 y 50 μ l de muestra aforando a 50 μ l con Tris (50mM). Se incubaron 5 minutos a 4°C, se agregaron 90 ml de ácido fórmico y se incubó 10 min a 110°C, después se midió la absorbancia a 378 nm en un espectrofotómetro. Junto con cada medición de las muestras de MCF7 Rho 0, se leyó una curva estandar de diferentes concentraciones de NAD⁺, para poder realizar la correlación entre los valores de absorbancia y concentración de NAD⁺ (Fig. Suplementaria 4). Así se calculó la concentración de NAD⁺ en 2 millones de células a los 0, 3, 6, 9, 12 y 15 días así como 4, 6 y 8 semanas con el fin de observar la progresión de los niveles de NAD⁺ durante el establecimiento del modelo de agotamiento de mtDNA. Además se agregó un control positivo a la disminución de los niveles de NAD⁺, el cual consistió en exponer a células MCF7 WT a, un agente quelante de NAD⁺ llamado izonizada (70 mM).

Otro metabolito de interés en este trabajo fue SAM, debido a su papel como donador de grupos metilo en la metilación del DNA. Para realizar la extracción de SAM primero se lavaron las células con PBS dos veces, asegurándose que no quedara medio, pues este interfiere con la extracción de SAM. Posteriormente se agregó nitrógeno líquido y se guardaron las células a -70 °C toda la noche. Al día siguiente se rasparon las células adicionando metanol al 90% con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% para lisar las células. Después se sonicaron las células con dos pulsos de 1 min por 1 min de descanso con 35% de amplitud en

un *Ultrasonic Processor Cole Parmer* Tras centrifugar, el sobrenadante se deshidrato por evaporación en un Speedvac a 45 °C por 2 horas. Se reconstituyo con 100 µl de H₂O miliQ y se cuantifico la proteína por el método de Bradford (Stoscheck 1990). Con el fin de normalizar la medición de SAM entre replicas se procedió a medir proteína de cada extracción y diluir muestras para que en cada experimento las muestras tuvieran la misma concentración de proteína.

La medición de SAM se realizó mediante el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography* (HPLC) en inglés. Se utilizó una fase móvil a base de ácido 1-heptano sulfónico 8 mM, fosfato de amonio 40 mM y acetonitrilo 6% con un pH de 5.0. Antes de inyectar las muestras, fue necesario agregar acido perclórico a cada una de las muestras a una concentración final de 0.4 mM, esperar 5 min a que se precipitaran las proteínas y filtrar. Después se inyectaron las muestras en el HPLC, a un flujo de 1 mL/min. También se inyectaron estándares de SAM y SAH, para facilitar la identificación de los picos de SAM y SAH. Debido a la variabilidad que se puede presentar en las mediciones de SAM por HPLC, fue necesario analizar 4 muestras de tres réplicas biológicas, llegando así a tener un total de 12 muestras analizadas por cada tiempo.

Determinación de una posible relación entre los niveles de NAD⁺ y los niveles de SAM.

Se procedió a reconstituir las concentraciones de NAD⁺ en las células MCF7 rho0 para explorar si las pozas de NAD⁺ podrían modular los niveles de SAM. Al ser NAD⁺ una molécula que no puede atravesar membranas, se utilizó nicotinamida (NAM), un precursor de NAD⁺ que se sabe permea membranas teniendo una tasa de conversión a NAD⁺ de ~90% (Jang, et. al., 2012), y así garantizar que el NAD⁺ intracelular aumentara.

Dado que no se existen precedentes de que el NAD⁺ module los niveles de SAM, se procedió a utilizar 2 concentraciones de NAM con las cuales se habían

observado efectos benéficos en la actividad mitocondrial (Stein e Imai, 2012). Además, con esto se podría ver si hay un efecto umbral y si el efecto sobre las concentraciones de SAM es proporcional a la concentración de NAM utilizada.

A cultivos con 2 y 8 semanas de exposición a BrEth se agregó 1.5 mM o 3 mM de NAM al medio. Para asegurar que el efecto observado no fuera por la reconstitución de mtDNA se realizaron q-PCRs para corroborar que éste se mantuviera disminuido al ~99% en cada grupo de células usadas. Al cabo de 3 días (exposición aguda) y 12 días (exposición prolongada) post inducción de NAD⁺, se lavaron 2 veces con PBS, y guardaron a -70 °C toda la noche. Al día siguiente se continuó con la extracción y medición de SAM por HPLC. Este experimento se realizó con 2 réplicas biológicas y cada experimento independiente se realizó por triplicado.

Evaluación de los niveles de metilación del DNA nuclear en el modelo de agotamiento de mtDNA

Se extrajo DNA por el método de fenol-cloroformo de células MCF7 Rho0 con 2 y 8 semanas de exposición a BrEth, así como de células MCF7 Rho0 que fueron expuestas a 12 días con NAM. Las muestras de DNA se llevaron a un volumen de 400 µL con H₂O inyectable y se sonicaron con 2 pulsos de 15 seg (0.5 seg on, 0.5 seg off) con 35% de amplitud, siempre manteniendo las muestras de DNA en hielo. La sonicación tiene como propósito fragmentar el DNA para hacer más eficiente la unión del anticuerpo contra 5mC.

Después las muestras se concentraron por evaporación utilizando un Speedvac a 45 °C, después se cuantificó la concentración de proteína y se cargo en un gel de agarosa al 1.5% para confirmar la fragmentación del DNA. Después todas las muestras se llevaron a la misma concentración (150 ng/µL) y se cargaron 400 ng de DNA genómico sonicado proveniente de MCF WT, MCF7 Rho0 y MCF7 Rho0+ NAD⁺ en una membrana para transferencia de ácidos nucleicos HybondN⁺ (GE

Healthcare). Las membranas se dejaron secar, y posteriormente, el DNA se fijó a la membrana mediante su exposición a la luz UV en el equipo Stratalinker 1800 (Stratagene). La membrana se bloqueó con leche (Svelty) al 5% en PBS-Tween al 0.1% a temperatura ambiente durante 2 h, en seguida se incubó durante toda la noche a 4 °C con anti-5hmC (Active Motif 39769) a una dilución de 1:10000 con leche al 5% en PBS-Tween 0.1%. Transcurrida la incubación la membrana se lavó cinco veces con PBS-Tween 0.1% y se incubó con anti-ratón-HRP 1:20,000 (Santa Cruz Biotechnology) en PBS-Tween 0.1% durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación se lavó la membrana con PBS-Tween 0.1% y se reveló utilizando el sustrato SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) seguido de su exposición a películas fotosensibles. Finalmente la membrana se dejó toda la noche incubando en azul de metileno en agitación lenta y temperatura ambiente para marcar el DNA que se transfirió a la membrana. Este experimento se realizó con 2 réplicas biológicas y cada experimento independiente se realizó por triplicado.

RESULTADOS

La exposición a BrEt en células MCF7 reduce el número de copias de mtDNA y aumenta la viabilidad celular.

Las células MCF7 son células adherentes, con un tamaño de 20-25 micras, con un ritmo de crecimiento poblacional lento, y con un tiempo de duplicación típicamente de 30 a 40 horas. Aunque MCF7 es una línea celular cancerígena, no presenta agotamiento de mtDNA por lo que es un buen modelo de inducción de agotamiento de mtDNA. Además este modelo presenta ventajas sobre líneas celulares no cancerígenas, como la facilidad de mantenimiento de cultivos y la obtención de un gran número de células en tiempos cortos.

Para generar un modelo de células que carecen de mtDNA (Rho 0) en células MCF7 se adiciono 200 ng/mL de bromuro de etidio (BrEt) al medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) más suero fetal bovino al 10% (Sigma Aldrich). Este método aprovecha que a bajas concentraciones el BrEt (200 ng/ml) da lugar a una parcial o completa inhibición de la replicación y transcripción del mtDNA sin afectar la replicación del DNA nuclear. Se ha observado que el mtDNA se va diluyendo progresivamente conforme las células se van dividiendo (King y Attardi, 1996). De manera que dejando pasar el tiempo suficiente, las células presentan menor número de copias de DNA mitocondrial.

Se realizó una cuantificación relativa del número de copias de mtDNA cada dos semanas durante las 8 semanas de exposición a 200 ng/mL de BrEt (Fig. 5). Desde la segunda semana de exposición a BrEt se observa una disminución significativa del número de copias de mtDNA con respecto al control, sin embargo en las siguientes semanas continua la reducción progresiva del número de copias de mtDNA hasta el termino del tratamiento, dónde se observó una reducción significativa al comparar con la segunda semana de exposición.

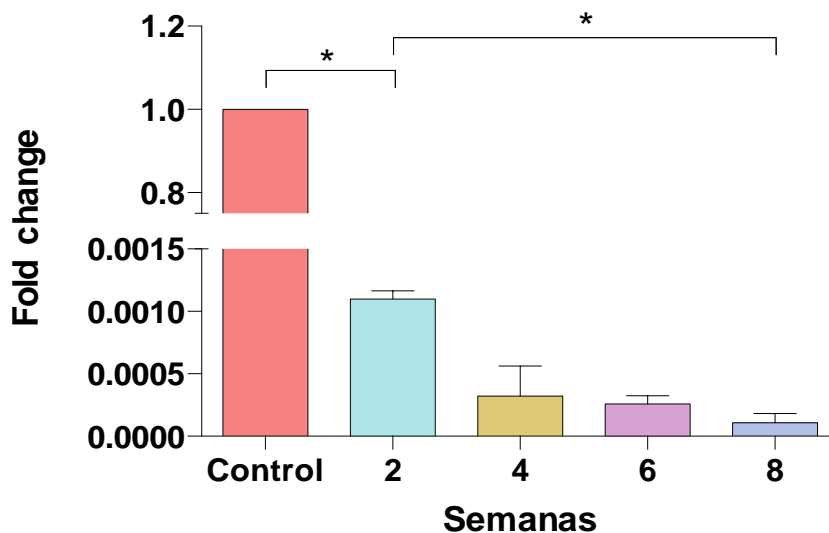


Figura 5. Expresión relativa del gen mitocondrial 12sRNA. qPCR de 5 millones de células MCF7 WT (control) o Rho0 de 2, 4, 6 y 8 semanas de tratamiento con bromuro de etidio. **p value < 0.0001

Aunado a esto, con el fin de explorar si el agotamiento de mtDNA tiene algún efecto en la viabilidad celular también se realizaron ensayos de viabilidad al inicio,

a la mitad y al término del tratamiento, mediante el protocolo estándar de conteo celular.

Se observó que la exposición al BrEth produce cambios en la proliferación celular de MCF7, sin embargo, estos cambios varían dependiendo del momento del tratamiento en el que son evaluados. Por ejemplo, al inicio del tratamiento con BrEt, la proliferación celular de MCF7 Rho0 disminuye con respecto al control (Fig. 6a). A las 4 semanas de exposición al BrEt, cuando se comprobó que ya hay una disminución del 99% en el contenido de mtDNA, la proliferación celular de MCF7 Rho0 es semejante al control (Fig. 6b). Al final del tratamiento, cuando el mtDNA se encuentra 99.9% disminuido, se observó que la proliferación celular de las MCF7 Rho0 es aún mayor que la del control (Fig. 6c).

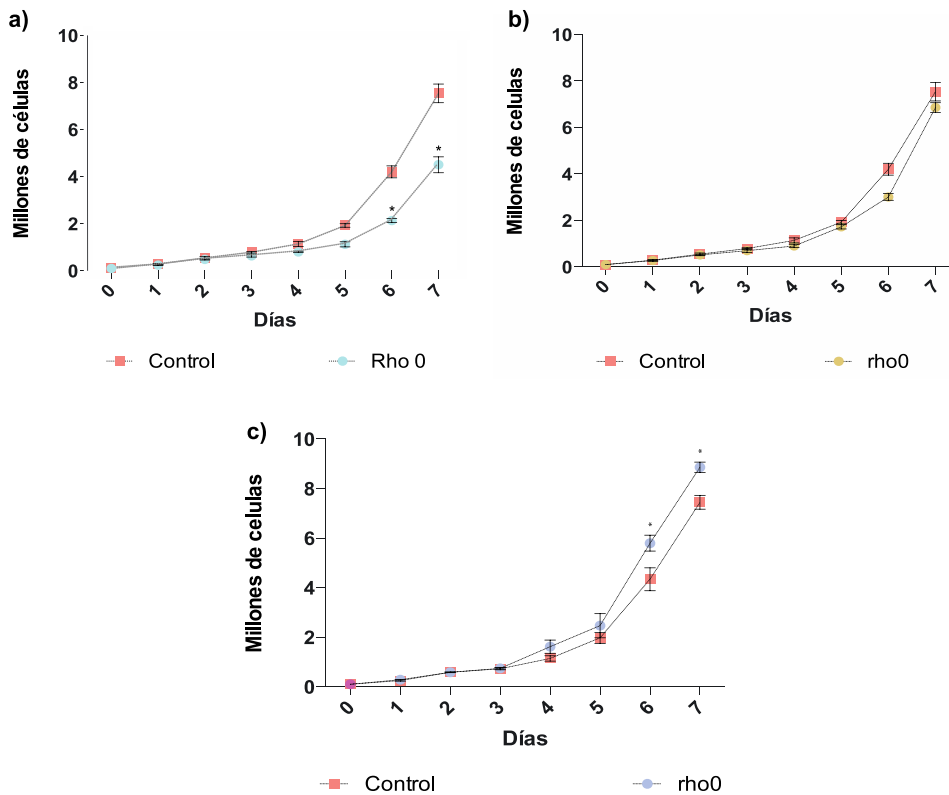


Figura 6. Viabilidad celular durante el establecimiento del modelo de agotamiento de mtDNA en MCF7. Se cuantifico la viabilidad celular tiñendo las células con azul de tripán y contándolas en una cámara de Neubauer bajo microscopio óptico. a) la viabilidad celular de células control (MCF7) es mayor a las células MCF7 rho0 (con agotamiento de

mtDNA) durante los primeros 7 días de exposición a BrEt. b) la viabilidad celular de MCF7 control y MCF7 rho0 durante la 4 semana de exposición a BrEt se mantiene sin diferencias significativas entre ambas. c) la viabilidad celular de MCF7 control es significativamente menor a la de MCF7 rho0 al termino del tratamiento con BrEt. * p value ≤ 0.0001 .

Estos resultados demuestran el establecimiento del modelo de agotamiento de mtDNA en células MCF7 mediante la exposición a 200 ng de BrEt durante 8 semanas, en el cual se observaron cambios en la viabilidad celular durante el tratamiento, la más notable es, que al final del tratamiento las células con agotamiento de mtDNA (Rho 0) tiene mayor viabilidad celular que el grupo control.

El agotamiento del mtDNA en MCF7 disminuye los niveles de NAD⁺ y aumenta los de SAM.

Como se mencionó en los antecedentes (Chen et. al., 2016), se observó que en la línea celular de osteosarcoma 143B el agotamiento de mtDNA provoca una acumulación de los niveles de NADH y disminución en las pozas de NAD⁺, debido a la reducción de la actividad del complejo I de la cadena respiratoria. Sin embargo, se consideró pertinente comprobar que este efecto no era exclusivo del tipo celular, por ello se realizó la medición de las pozas de NAD⁺ en nuestro modelo de agotamiento de mtDNA en MCF7.

Con muestras de células MCF7 y MCF7 Rho0 de 0, 3, 9 y 12 días, así como de 4, 6 y 8 semanas de exposición al BrEth, se realizó la medición de NAD⁺ por métodos espectrofotométricos. También se usó Isoniazida, un quelante de NAD⁺, como control positivo para acentuar los efectos de la disminución en los niveles de NAD⁺. Por ello, la concentración de NAD⁺ observada en el tratamiento con isoniazida (Fig. 7 b) se consideró como la mínima concentración de NAD⁺ intracelular a la que se podía llegar en este modelo.

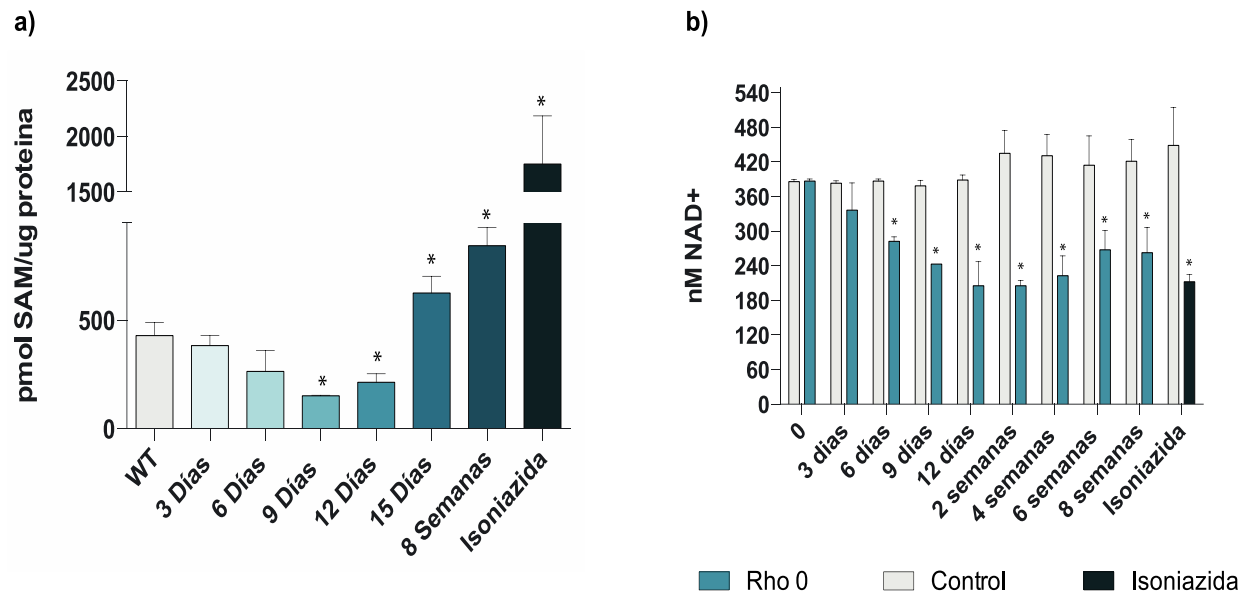


Figura 7. Concentraciones de NAD⁺ y SAM en MCF7 Rho0. a) Durante los primeros nueve días de exposición a BrEt la concentración intracelular de SAM disminuye paulatinamente, sin embargo desde el día 12 hasta finalizar las 8 semanas de exposición a BrEt se observó un aumento progresivo en los niveles de SAM. Además, la exposición de células MCF7 WT al quelante de NAD⁺ (Isoniazida) aumento los niveles de SAM significativamente con respecto al control. b) La concentración intracelular de NAD⁺ disminuyó significativamente desde el sexto día de exposición a BrEt y se mantuvo hasta finalizar las 8 semanas del tratamiento.

Con respecto a las MCF7 Rho0 se encontró, que conforme aumenta el tiempo de exposición al BrEth los niveles de NAD⁺ se van reduciendo progresivamente (Fig. 7b). Al comparar los niveles experimentales de NAD⁺ con los que se alcanzan con la exposición de MCF7 a Isoniazida, se puede decir que el agotamiento de mtDNA lleva a los niveles mínimos la concentración intracelular de NAD⁺.

En el caso de las concentraciones de SAM, se observó que entre los días 3 al 12, hay una disminución de SAM, aunque dicha disminución solo es estadísticamente significativa para los días 9 y 12 (Fig. 7a). Esta disminución puede deberse a un proceso de aclimatación y reajuste metabólico. Sin embargo, a las 2 semanas, cuando ya existe un agotamiento franco de mtDNA, hay un aumento significativo en las concentraciones de SAM, que es aún mayor a las 8 semanas de exposición a BrEth (Fig. 7a). Lo más notable fué el efecto de la isoniazida en SAM, ya que,

en presencia de este compuesto, cuando las concentraciones de NAD⁺ llegan a sus niveles mínimos, la concentración intracelular de SAM aumenta cuatro veces más. Por lo tanto, parece existir una relación inversa e inclusive podría existir una correulación entre las posas de NAD⁺ y SAM (ver discusión).

El efecto del agotamiento de mtDNA sobre los niveles de SAM podría estar relacionado con la concentración intracelular de NAD⁺

Para corroborar que el efecto del agotamiento de mtDNA sobre los niveles de SAM podría estar correlacionado con la concentración intracelular de NAD⁺, al medio de crecimiento de células MCF7 Rho0 se agregó NAM, un precursor de NAD⁺, para aumentar la concentración de NAD⁺. Aunque solamente se utilizaron dos concentraciones de NAM, se encontró en términos generales, que la exposición a NAM disminuye las concentraciones de SAM de las células MCF7 Rho 0 (Fig. 8).

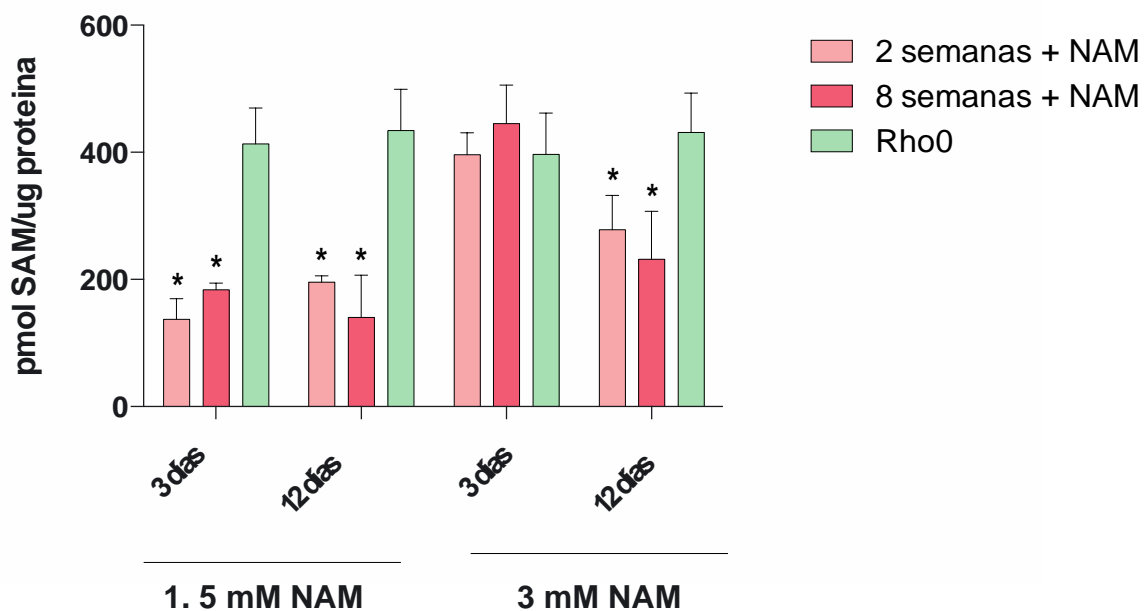


Figura 8. Efecto de la reconstitución de NAD⁺ intracelular en la concentración de SAM. En rosa claro se muestran los resultados obtenidos con células expuestas a BrEt durante 2 semanas y que fueron suplementadas con NAM, en rosa oscuro, las que tenían

8 semanas de exposición a BrEt y también fueron suplementadas con NAM y en verde es el grupo que solo fue expuesto a BrEt durante 8 semanas. La suplementación con NAM se llevó a cabo con 2 concentraciones diferentes y la concentración de SAM se midió en 2 tiempos de exposición; 3 y 12 días.

Es claro que la suplementación con 1.5 mM de NAM es mucho más efectiva en disminuir las concentraciones de SAM que NAM 3 mM. El análisis también contempló dos tiempos de muestreo, para distinguir si el fenómeno necesitaba de más tiempo para establecerse. Se encontró que en el caso de las células tratadas con NAM 1.5 mM, el tiempo no es un factor que afecte la disminución de SAM, pues desde los tres días de exposición, la concentración de SAM que se alcanza no tiene cambios significativos (p de 0.6427). En contraste, en las células suplementadas con NAM 3 mM, a los 3 días no hay un cambio en los niveles de SAM, que si se observa a los 12 días (Fig. 8) presentando una diferencia significativa (p 0.004).

Además, dado que al realizar las mediciones de SAM en el modelo de agotamiento de mtDNA, se observó que dependiendo del tiempo de exposición al BrEt era la concentración de SAM, se partió de dos grupos de células, la primera consistía en células con solo 2 semanas de exposición a BrEt, y el segundo grupo era de células con 8 semanas de exposición (Fig. 8). Esto tuvo como propósito ver si los efectos de NAD⁺ son independientes de la etapa del agotamiento de mtDNA en el que fuera adicionado, lo cual fue claramente probado, ya que se observó que sin importar cuantas semanas de exposición al BrEt tuviera el cultivo, no se encontraron diferencias significativas entre las respuestas observadas.

En conclusión, tras el agotamiento de mtDNA los niveles de NAD⁺ disminuyen y los de SAM aumentan, el aumento de SAM parece ser una consecuencia de la concentración intracelular de NAD⁺, lo cual se confirma al suplementar células con agotamiento de mtDNA con NAM y observar que los niveles de SAM disminuyen.

La concentración intracelular de NAD⁺ y SAM influyen los niveles de metilación del DNA nuclear

Tras observar que en las células MCF7 Rho 0 los niveles de SAM estaban aumentando, y dado que SAM es un donador de grupos metilo usado por diversas enzimas, incluidas las metil transferasas del DNA (DNMTs), se analizaron los niveles de metilación de células MCF7 con y sin agotamiento de mtDNA, para evaluar si los cambios en la concentración de SAM, podrian afectar los niveles de metilación del DNA nuclear. Con este fin, se realizó un Dot blot contra la marca 5metil citosina en células MCF7 WT y MCF7 Rho0, y se observó, que desde las dos semanas de exposición al bromuro de etidio, hay un aumento de 5 veces en la señal del anticuerpo contra la 5mC con respecto al control (Fig. 9), sugiriendo que basta con solo 2 semanas de exposición para tener efectos en el metiloma nuclear. Sin embargo, cuando se compara la señal del anticuerpo contra la 5mC de la semana dos y la semana ocho, se encuentran diferencias significativas ($p < 0.001$) entre ambas señales, lo que puede indicar que la hipermetilación del DNA que provoca el agotamiento de mtDNA es un proceso que se desarrolla paulatinamente.

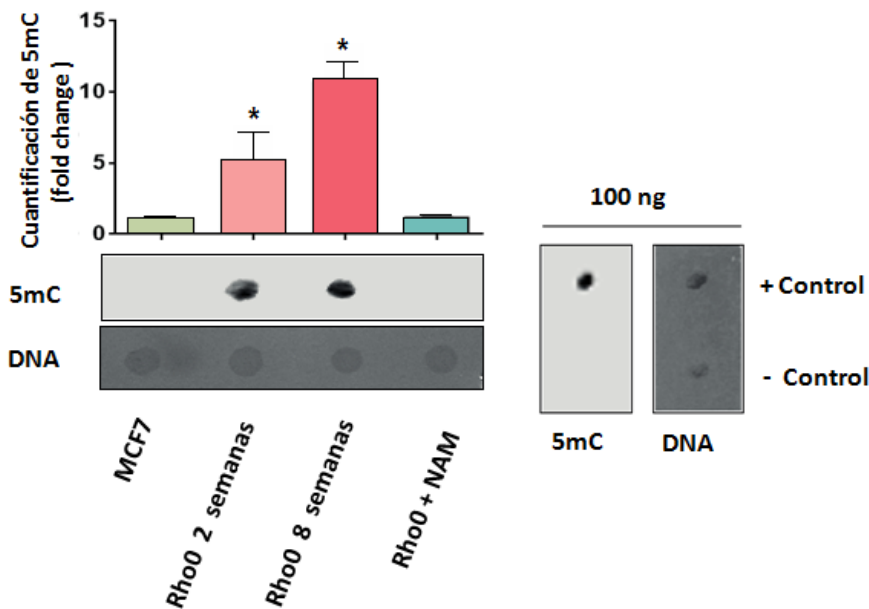


Figura 9. Dot blot contra 5mC en DNA genómico de células MCF7 con agotamiento de mtDNA y suplementadas con NAM+. Desde las dos semanas se observa un aumento significativo ($p < 0.001$) de la metilación del DNA nuclear. Por su parte el tratamiento con NAM 1.5 mM contrarresta los efectos de hipermetilación ocasionadas por el agotamiento de mtDNA.

Además se comprobó que el efecto del agotamiento en el metiloma nuclear no depende del linaje celular, lo que nos permite especular que los mecanismos que inducen la hipermetilación en respuesta al agotamiento de mtDNA pueden estar conservados.

También se comprobó que la suplementación con NAM 1.5 mM, no solo disminuye las concentraciones de SAM, sino que disminuye significativamente la metilación del DNA nuclear ($p < 0.001$), a juzgar por la disminución de la señal en el Dot blot que da el anticuerpo contra 5mC, ya que cuando se compara la señal del control con la señal de las MCF7 Rho 0 suplementadas con NAM no se encuentran diferencias significativas. La ausencia de señal tanto del control como del tratamiento suplementado con NAM no es consecuencia de la cantidad de DNA que se adicionó en el ensayo, ya que después de leer las señales del anticuerpo, esas mismas membranas se incubaron con Azul de metileno para marcar el DNA, demostrando que si hay DNA (Fig. 9), y que la ausencia de señal no es un artificio de la manipulación experimental.

En conclusión tras el establecimiento del agotamiento de mtDNA hay un aumento significativo en la señal de 5mC, de manera interesante, al suplementar con NAM los niveles de metilación del DNA se reestablecen de manera similar a los observados en el grupo control, lo cual podría estar relacionado con el restablecimiento de los niveles intracelulares de SAM.

Existe un conjunto de genes diferencialmente regulados ante el aumento intracelular de SAM.

El agotamiento de mtDNA es una condición de estrés ante la que una célula responde remodelando su programa transcripcional. Este reajuste es dirigido por mecanismos epigenéticos modulando la expresión de genes, que se activan o inhiben en respuesta a estrés. Se sabe que el agotamiento de mtDNA provoca un desajuste en las concentraciones de NAD⁺ y SAM, y que esto se relaciona con alteraciones en el metiloma nuclear. Si estos cambios de metilación no son al azar, sino que ocurren en respuesta al estrés generado por el agotamiento de mtDNA, la identificación de las regiones blanco y su impacto transcripcional, explicaría el aumento de viabilidad celular y otros fenotipos relacionados al agotamiento del mtDNA.

Sin embargo, no se cuenta con antecedentes transcriptómicos en la línea celular MCF7 ante el agotamiento de mtDNA. Por lo tanto, se realizó un análisis *in silico*, considerando los datos públicos del transcriptoma de células HepG2 control y en respuesta al aumento de las concentraciones de SAM (Wang, et. al., 2017 ; GEO accesión GSE87242). Este análisis permite hacer una inferencia de los cambios transcriptómicos que pudieran presentarse en el modelo MCF7 Rho0, dado que comparten el fenotipo de aumento de las concentraciones intracelulares de SAM, así como la hipermetilación del DNA nuclear. En dicho trabajo, Wang y colaboradores demostraron que SAM inhibe selectivamente el crecimiento, transformación e invasividad de líneas celulares de carcinoma hepatocelular, sin presentar efectos en células hepáticas primarias. Analizando el metiloma y transcriptoma de la línea celular HepG2 tratado y no tratado con SAM concluyeron que, al aumentar las concentraciones intracelulares de SAM, hay una hipermetilación de las regiones regulatorias (promotores y enhancers), así como una disminución en la transcripción de genes asociados a las vías de crecimiento y metástasis que se regulan positivamente en las células de cáncer de hígado.

Se descargaron los datos crudos del RNA-seq (Wang, et. al., 2017 ; GEO accesión GSE87242). Tras realizar el análisis en la plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.eu>), bajo criterios laxos de FDR ($FDR < 0.001$) se encontraron 6 736 genes que mostraron una expresión diferencial (DEGs).

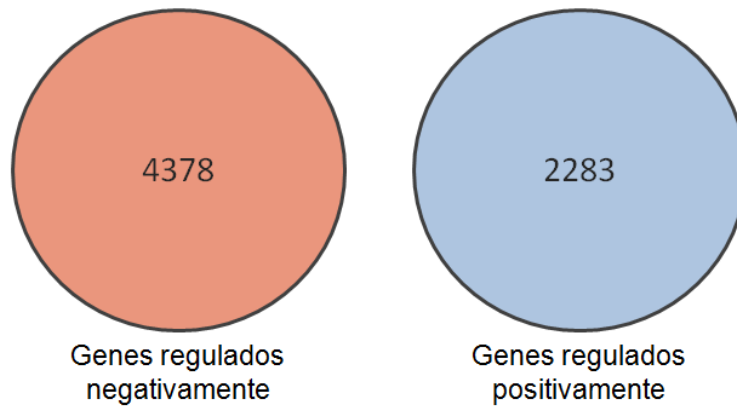


Figura 10. a) DEGs en los que se disminuye (rosa) o aumenta (azul) la transcripción, en respuesta al aumento intracelular de SAM. El número de DEGs que son regulados negativamente es considerablemente mayor que el que se regula positivamente.

Se separaron los DEGs en aquellos en los que se disminuye o se aumenta la transcripción. Considerando los DEGs con $FDR < 0.001$, 4378 muestran una menor expresión y 2283 una mayor expresión, en respuesta al aumento en las concentraciones intracelulares de SAM (Fig. 10). El número de DEGs que muestra una menor expresión es considerablemente mayor en comparación con el de DEGs que aumentan (Fig. 10), lo que coincide con el fenómeno de hipermetilación del DNA nuclear y el efecto transcripcional negativo de esta modificación epigenética.

Se realizó una ontología de genes, considerando por separado aquellos genes con menores niveles de expresión y aquellos con mayores. La ontología génica de los genes regulados negativamente mostró un enriquecimiento en categorías como: biogénesis del complejo ribonucleoproteico, proceso biosintético de péptidos, regulación del ciclo celular, organización de la mitocondria, generación de metabolitos precursores y energía entre otros (Fig. 11). Mientras que la ontología de genes regulados positivamente indica cambios en vías de señalización como:

regulación de la localización de proteínas celulares, organización del citoesqueleto de actina, regulación del proceso catabólico de proteínas y localización de orgánulos, entre otros (Fig. 11).

Algunos ejemplos específicos de genes que fueron regulados negativamente en respuesta al aumento de SAM intracelular se mencionan a continuación. CABLES1, codifica para una proteína involucrada en la regulación del ciclo celular a través de interacciones con varias quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Se ha observado que la sobreexpresión de CABLES1 induce apoptosis, mientras que su represión anula este proceso (Hideo, et. al., 2008). CDK6 y CDK1 codifican para proteínas quinasas de división celular y forman parte del complejo proteico que regula la transición de la fase G1 a S. CDC25A, codifica para una proteína fosfatasa de especificidad dual, es uno de los reguladores del ciclo celular más importantes, pues elimina la fosforilación inhibitoria de las CDKs, como CDK2, CDK4 y CDK6, y regula positivamente las actividades de las CDKs que conducen a la progresión del ciclo celular. Además, CDC25A también actúa como regulador de la apoptosis. La sobreexpresión de CDC25A promueve la tumorigénesis y se observa con frecuencia en varios tipos de cáncer (Shen y Huang, 2012). Estos constituyen solo algunos ejemplos de genes que fueron negativamente regulados en respuesta al aumento intracelular de SAM, proponiendo que al aumentar las concentraciones de SAM se presenta un efecto contrario al crecimiento poblacional, como se ha demostrado en diversos trabajos (Shoayashi, et. a., 2007; Zhao, et. al., 2010; Wang, et. al., 2017).

De manera interesante, los datos también sugieren que podría presentarse menor apoptosis dada la disminución en la expresión de CABLES1 y CDC25A, lo que podría explicar el aumento en la viabilidad celular de las MCF7 Rho0.

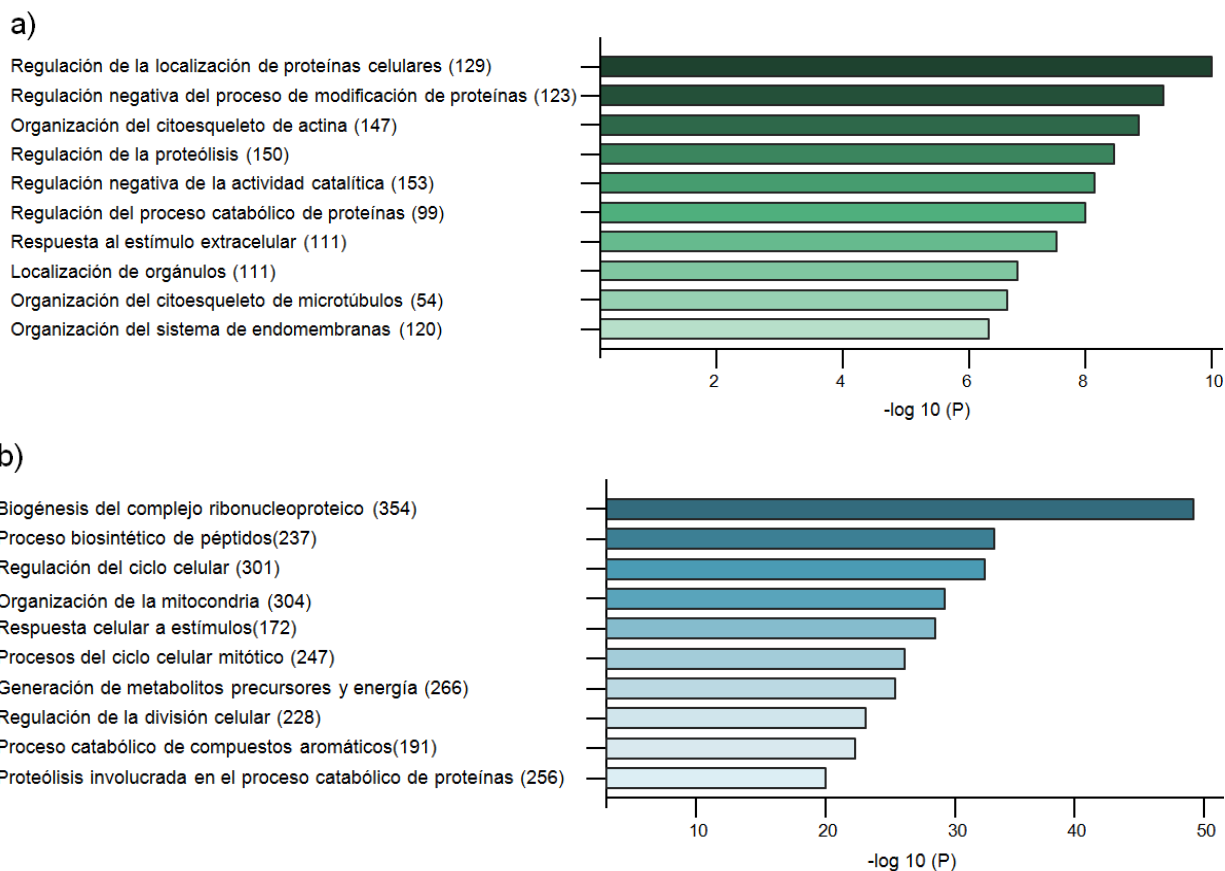


Figura 11. Ontología de los genes diferencialmente expresados en respuesta al aumento intracelular de las concentraciones de SAM. a) Ontología de genes regulados positivamente en respuesta a altas concentraciones de SAM, b) Ontología de genes regulados negativamente en respuesta a altas concentraciones de SAM.

Además, se descargaron los datos crudos del Bisulfito-seq en el mismo modelo (Wang, et. al., 2017; GEO accesión GSE87242), para identificar las regiones con ganancia de metilación en respuesta al aumento de las concentraciones de SAM. Se mapearon para ver el contexto genómico que representan dichas regiones, observando que se trata especialmente de regiones promotoras e intergénicas, seguidas por intrones, exones y regiones 3'UTR, en orden decreciente (Fig. 12). De manera interesante, aproximadamente el 90% de las regiones que ganan metilación corresponden a regiones ricas en elementos regulatorios.

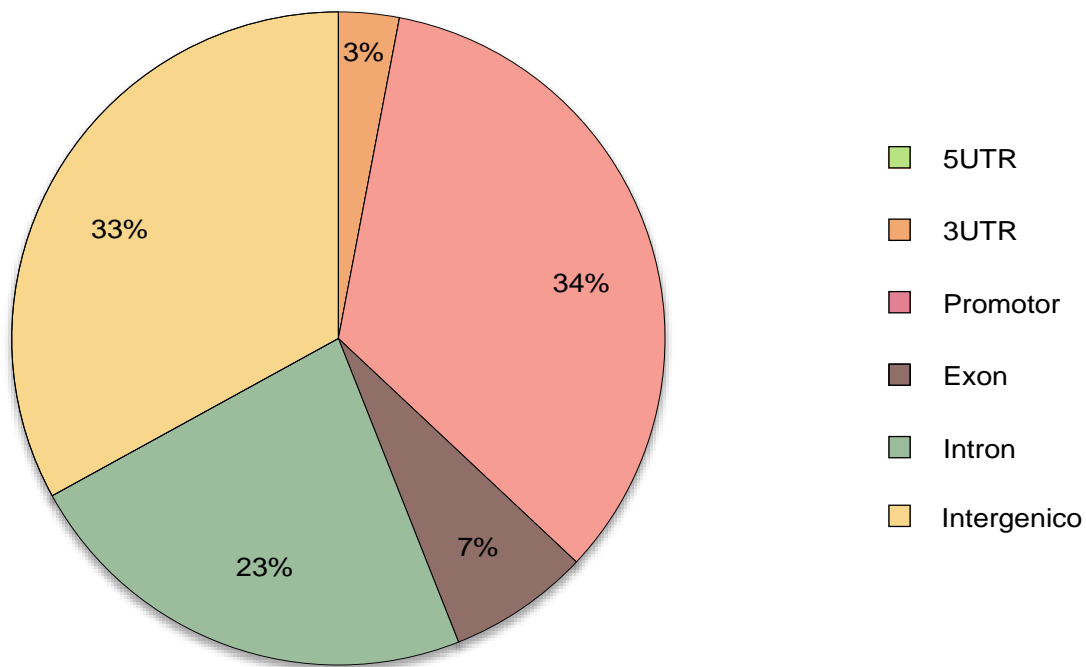


Figura 12. Distribución de las regiones que ganan metilación del DNA en respuesta a altas concentraciones de SAM. Las regiones que presentan una mayor metilación al aumentar las concentraciones intracelulares de SAM están mayoritariamente distribuidas en regiones no codificantes como regiones intergénicas e intrones.

En conclusión, los datos analizados del RNA-seq y bisulfito-seq, muestran que la hipermetilación global en respuesta a las altas concentraciones de SAM no ocurre de manera aleatoria, sino que los cambios se presentan específicamente en regiones regulatorias, que tienen un impacto en categorías de genes particulares como las asociadas a la regulación del ciclo celular (CDK6, CDK1, CDC25A), entre otras. Además, estos cambios de expresión de genes conducen a fenotipos que, en el caso de las células HepG2, conllevan a la reducción en la proliferación celular (Wang, et. al., 2017). Resulta interesante confirmar si en el modelo de estudio del presente trabajo estos genes, principalmente los involucrados en la regulación de la apoptosis, también se encuentran regulados negativamente. Esto pudiera explicar los cambios observados en la viabilidad celular en respuesta al agotamiento de mtDNA.

DISCUSIÓN

Las mitocondrias por décadas han sido reconocidas por su papel primordial en la generación de la energía celular para los organismos eucariontes, son el orgánulo responsable de generar la mayor parte de la energía útil derivada de la descomposición de carbohidratos y ácidos grasos (Scheffler, 2002), además de otras funciones importantes para la célula como la síntesis de los centros Fe-S.

El origen de las mitocondrias fue propuesto en 1970 por Lynn Margulis, como parte de su teoría de endosimbiosis. Se ha planteado que, en algún momento del proceso de adquisición de nuevas funciones durante la evolución, la mayor parte del material genómico de la α -proteobacteria original se perdió o transfirió rápidamente al genoma nuclear de la célula receptora. Por lo que, en las mitocondrias actuales, solo contienen un pequeño genoma circular, que en el caso del humano, consta de aproximadamente 16 Kb, pero a diferencia del genoma nuclear que solo consta de dos copias, el genoma mitocondrial está presente en las células en un gran número de copias.

Aunque el genoma mitocondrial solo codifica para 13 proteínas, 22 tRNAs y 2 rRNAs, se ha descrito que las mutaciones heredadas en el ADN mitocondrial pueden causar problemas con el crecimiento, el desarrollo y la función en órganos y tejidos que requieren de mucha energía (como el corazón, el cerebro y los músculos) (Lawless, et. al., 2020). Se ha reportado que el ADN mitocondrial tiene una capacidad limitada para reparar mutaciones y estas variantes tienden a acumularse con el tiempo(Olfors, et. al., 1995). La acumulación de variantes somáticas en el ADN mitocondrial se ha asociado con algunas formas de cáncer y un mayor riesgo de ciertos trastornos relacionados con la edad, como enfermedades cardíacas, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Nido, et. al., 2018). Además, la investigación sugiere que la acumulación progresiva de estas variantes a lo largo de la vida de una persona puede

desempeñar un papel en el proceso normal de envejecimiento (Elson, et. al., 2001). También se ha descrito que la reducción del número de copias de DNA mitocondrial (agotamiento de mtDNA) tiene consecuencias adversas para la homeostasis celular. El agotamiento de mtDNA se asocia frecuentemente con el envejecimiento (Clay-Montier et. al., 2009). Además se ha visto que la disfunción mitocondrial tiene un papel fundamental en el surgimiento y progresión del cáncer, considerándose una marca distintiva de una célula cancerosa (Hsu, et. al. 2016). La disminución del número de copias de mtADN en el cerebro se ha asociado de manera más consistente con diversas afecciones neurológicas, incluida la enfermedad de Parkinson (Pyle et. al., 2016), la enfermedad de Alzheimer (Coskun et. al., 2012) y algunos trastornos psiquiátricos como el desorden bipolar y esquizofrenia (Kakiuchi et. a., 2005). Sin embargo, los mecanismos por los cuales, la reducción del número de copias de mtDNA puede llegar a provocar todas estas afecciones aún no se conocen.

En la actualidad se han descrito que la reducción del número de copias de DNA mitocondrial (agotamiento de mtDNA) tiene consecuencias adversas para la homeostasis celular. El agotamiento de mtDNA se asocia frecuentemente con el envejecimiento (Clay-Montier et. al., 2009). Además se ha visto que la disfunción mitocondrial tiene un papel fundamental en el surgimiento y progresión del cáncer, considerándose una marca distintiva de una célula cancerosa (Hsu, et. al. 2016). La disminución del número de copias de mtDNA en el cerebro se ha asociado de manera más consistente con diversas afecciones neurológicas, incluida la enfermedad de Parkinson (Pyle et. al., 2016), la enfermedad de Alzheimer (Coskun et. al., 2012) y algunos trastornos psiquiátricos como el desorden bipolar y esquizofrenia (Kakiuchi et. a., 2005). Sin embargo, los mecanismos por los cuales, la reducción del número de copias de mtDNA puede llegar a provocar todas estas afecciones aún no se conocen.

En los últimos años, hay cada vez más evidencias que apoyan la idea que las funciones de los orgánulos celulares tiene más impacto que, por ejemplo, en la mitocondria, solo generar energía para subsistir. Y que es por medio de estas interconexiones que la disfunción mitocondrial puede tener impactos tan diversos.

Así, este trabajo empezó retomando la idea de que, si bien los impactos metabólicos que podría ocasionar el agotamiento de mtDNA es un fenómeno con consecuencias interesantes, lo que verdaderamente se quiere dilucidar, es cómo los cambios metabólicos que produce el agotamiento de mtDNA podría afectar los mecanismos epigenéticos, y esto, qué consecuencias tendría para la célula.

Durante años, múltiples trabajos han mostrado que el metabolismo mitocondrial puede afectar la disponibilidad de muchos productos del metabolismo intermedio que son sustratos o cofactores de remodeladores epigenéticos. Por ejemplo, en condiciones normales, la mitocondria interviene indirectamente en la síntesis de SAM mediante el ciclo del folato, también conocido como ciclo de un carbono (1C), que tiene lugar principalmente en las mitocondrias, implica la transferencia de un carbono de la serina o la glicina para la formación de componentes básicos de ADN y ARN, o la generación de metionina. SAM es producida por la metionina adenosiltransferasa que reacciona con metionina y ATP. Una vez que ha perdido su grupo metilo, SAM se convierte en SAH (S-adenosil-homocisteína), que se convierte en homocisteína, y luego se puede convertir de nuevo en metionina, reiniciando el ciclo o alimentarse en la vía de transulfuración donde se transforma de manera irreversible (Zhang, 2018). Curiosamente, se ha descubierto que los niveles de SAM dependen del DNA mitocondrial. Por ejemplo, se ve en líneas celulares híbridas humanas de células con mutaciones en el mtDNA (haplogrupo J) que tienen un mayor nivel de expresión de metionina adenosiltransferasa 1A (MAT1A), por lo tanto, niveles elevados de metilación global, en comparación con el control. Además, para llevar a cabo la síntesis de SAM, se necesita de ATP. Se ha afirmado que los niveles de ATP regulados por el mtDNA se correlacionan con una disminución del mtDNA global (Bellizzi, et. al., 2012). Los estudios indican que los niveles reducidos de ATP observados en células con agotamiento de mtDNA podrían estar asociados con problemas en el complejo respiratorio mitocondrial, ya que la pérdida de el mtDNA lleva a la disfunción de la cadena de transporte de electrones. Finalmente, algunos estudios muestran que la disfunción del complejo I inducida por rotenona resultó en cambios globales en los niveles de metilación del DNA en ratas, células híbridas humanas e incluso cuando se indujo en ratones madre y se midió en la descendencia (Fetterman y Ballinger, 2019; Scola, et. al.,

2014; Chinnery y Gomez-Duran, 2018). Juntos, estos estudios refuerzan la noción de que las diferencias en el mtDNA tienen efecto sobre la regulación de la metilación del DNA nuclear. Sin embargo, queda por dilucidar si estas asociaciones son correlativas o causales.

Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo dilucidar los efectos que la disfunción mitocondrial, generada por el agotamiento de mtDNA podría tener sobre la regulación de la metilación del DNA nuclear, para ello primero se procedió a generar un modelo de agotamiento de mtDNA. Se utilizó la línea celular MCF7, de origen cancerígeno, que no posee una disminución del número de copias de DNA mitocondrial. El agotamiento fue generado mediante la exposición de las células a BrEt 200 ng/ml. Aunque se sabe que el BrEt es un agente intercalante con gran poder mutagénico, las concentraciones a las que se utilizó en este trabajo disminuyen los riesgos mutagénicos sobre el DNA nuclear, haciendo así que este método sea ampliamente utilizado para generar modelos de agotamiento de mtDNA en diversas líneas celulares humanas y varias especies como humano, ratón y pollo (Warren et. al., 2017; Yu et. al., 2007; Armand et. al., 2004; Zylber et. al., 1969; Desjardins et. al., 1985). Se ha reportado que se debe de mantener la exposición al BrEt por 6-8 semanas para poder inducir un modelo de agotamiento de mtDNA (Smiraglia, et.al, 2008), sin embargo, basándose en los datos obtenidos en este trabajo se puede ver, que desde las dos semanas de exposición ya hay una disminución del 99% en la concentración del DNA mitocondrial comparado con las células MCF7 que no fueron expuestas a BrEt (Fig. 5). A las ocho semanas se observa que la concentración de mtDNA llega a reducirse 0.9% más en comparación a lo cuantificado a las dos semanas. Por lo que se puede decir, que la disminución más abrupta de DNA mitocondrial por BrEt solo tarda 2 semanas en llevarse a cabo. Y que la razón de mantener la exposición al BrEt hasta 8 semanas, sea porque los efectos de la reducción del contenido de mtDNA pueden ser los que tardan más en manifestarse.

Se ha descrito que el agotamiento de mtDNA provoca disfunción mitocondrial, específicamente, una disminución de la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones, que se traduce en una disminución de la oxidación de

NADH. Reducir dicha oxidación provoca que las concentraciones de NADH intracelulares aumenten, mientras las concentraciones de NAD⁺ se ven drásticamente reducidas, ya que el agotamiento de mtDNA también afecta la síntesis de NAD⁺ (Rocher et. a., 2008). De primera instancia esto provoca una disminución en la producción de energía por fosforilación oxidativa, la disminución en la producción de energía puede verse reflejada en la tasa de crecimiento celular, lo que posiblemente puede explicar la disminución en la proliferación observada al inicio del tratamiento con BrEt (Fig. 6a). Sin embargo, esta disminución también podría deberse a un re arreglo del programa transcripcional en esta etapa de aclimatación a la falta de mtDNA (Lozoya, et. al., 2019).

Se ha documentado ampliamente que la disminución en la síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa obliga a la célula a hacer cambios metabólicos, como acentuar el metabolismo láctico o glucólisis aeróbica (Regueira et. al., 2009). El aumento de los metabolitos generados por el metabolismo láctico se asocia con una acidosis de tejidos en pacientes, este fenómeno fue observado en el modelo de MCF7 Rho 0, donde ocurría una acidificación del medio con respecto al control (Datos no mostrados). Aunque por unidad de glucosa, la glucólisis aeróbica es un medio ineficiente para generar ATP si se compara con la cantidad obtenida por la respiración mitocondrial (Vander-Heiden et. al., 2009), la tasa de producción de ATP por la glucólisis aeróbica es mayor, permitiendo que la cantidad de ATP sintetizada durante un período de tiempo comparable con la obtenida por la fosforilación oxidativa (Shestov et. al., 2014).

Este cambio en el metabolismo es una de las características más evidentes del efecto Warburg el cual se cree que aumenta la producción rápida de ATP, por medio de la glucólisis aeróbica y así poder ajustarse rápidamente para respaldar la demanda de síntesis de ATP. También se ha propuesto que el efecto Warburg sea un mecanismo de adaptación para apoyar los requisitos biosintéticos de la proliferación, permitiendo explicar, porque a las 4 y 8 semanas de exposición al BrEt las células MCF7 tienen un ligero aumento en su proliferación con respecto al control (Graf. 2 b y c), el cambio metabólico podría permitir que el mayor consumo de glucosa sea utilizado como fuente de carbono para los procesos anabólicos

necesarios para apoyar la proliferación celular (Slavov et. al., 2014). Esto aunado a los datos obtenidos *in silico*, donde se observa que algunos genes que se encuentran regulados negativamente en presencia de altas concentraciones de SAM están asociados a la regulación del ciclo celular, en específico al paso de G1 a la fase S (CDK1, CDK6 y CDC25A), permitiendo plantear que el agotamiento de mtDNA no solo provoca cambios metabólicos, también podría generar cambios transcripcionales que le permite tener ventajas proliferativas con respecto a las MCF WT, de manera que en una célula cancerígena, este cambio en las concentraciones de mtDNA puede volverla más agresiva.

Como se mencionó anteriormente se observó que en líneas celulares inmortalizadas el agotamiento de mtDNA tenía efectos adversos sobre las concentraciones intracelulares de NAD⁺. Así mismo, se comprobó que el agotamiento de mtDNA disminuye las concentraciones de NAD⁺, de manera progresiva en células MCF7 Rho 0, viéndose una disminución significativa desde los 6 días (Fig. 7 b), la concentración es variable, pero sin tener diferencias significativas entre ellas. Cuando se comparó contra el control positivo de Isoniazida (quelante de NAD⁺), que funcionaría como referente de 0, se planteó que, la concentración obtenida al suplementar con isoniazida y las obtenidas durante la exposición a BrEt son similares, sugiriendo que el agotamiento de mtDNA lleva al límite las reservas de NAD⁺ intracelular (Fig. 7 b). Esto se predice basándose en toda la bibliografía consultada, que es por la disminución de la fosforilación oxidativa, en específico por la actividad reducida del complejo I, sin embargo, hacen falta las pruebas pertinentes para comprobar que en este modelo esa es la causa de la disminución en la concentración de NAD + intracelular.

Como parte de la disfunción mitocondrial que genera el agotamiento de mtDNA, se encuentra reducir las concentraciones de ATP, este fenómeno se ha asociado a la disminución de los niveles intracelulares de SAM, ya que para la síntesis de SAM los niveles de ATP pueden ser un punto limitante (Lozoya, et. al, 2019). En este trabajo se observó al medir SAM por HPLC, que a tiempos cortos de exposición al BrEt (3-12 días) la concentración de SAM disminuye significativamente con respecto al control (Fig. 7a) concordando con lo antes reportado (Lozoya, et. al.,

2019), sin embargo, a las 2 semanas, cuando las concentraciones de DNA mitocondrial se encuentran disminuidas 99%, hay un aumento de SAM, mismo que es significativamente mayor a las 8 semanas de exposición a BrEt. Este aumento en los niveles de SAM, nunca se habían visto en conjunto con niveles bajos de NAD⁺ en el mismo modelo celular, ya que usualmente, la disminución en los niveles de NAD⁺ iban acompañados de bajas concentraciones intracelulares de SAM. Aún no se tiene una explicación completa de por qué en un modelo que tiene un bajo nivel de ATP, la concentración intracelular de SAM es alta, nosotros hipotetizamos, que los cambios en la metilación del DNA nuclear, podrían estar afectando positivamente la regulación transcripcional de las metionina adenosiltransferasas, y esto podría aumentar la síntesis de SAM. Además, el aumento en los niveles de SAM que se observó de la semana 2 a la semana 8 podría indicar que los mecanismos que están regulando positivamente la concentración intracelular de SAM en MCF7 Rho 0 necesitan de tiempo para generar este fenotipo. Por otro lado, la medición de SAM en el grupo de células expuestas a Isoniazida, mostro que la concentración de SAM aumenta casi cuatro veces cuando las concentraciones de NAD⁺ son muy bajas (Fig. 7a). Mostrando por primera vez que la concentración de NAD⁺ puede tener efectos moduladores sobre las pozas de SAM que son independientes del agotamiento de mtDNA. Por esto se plantea la posibilidad de que el agotamiento de mtDNA afecta directamente la función de la cadena de transporte de electrones modulando los niveles de NAD⁺, mismos que podrían estar afectando los niveles de SAM. Para corroborar que el efecto del agotamiento de mtDNA sobre los niveles de SAM podría estar correlacionado con la concentración intracelular de NAD⁺, se suplementaron células MCRF Rho 0 con NAM y se observó que aunque el agotamiento de mtDNA se mantiene, el aumentar los niveles de NAD⁺ intracelulares baja la concentración de SAM. En conclusión, tras el agotamiento de mtDNA los niveles de NAD⁺ disminuyen y los de SAM aumentan, el aumento de SAM parece ser una consecuencia de la concentración intracelular de NAD⁺, lo cual se confirma al suplementar células con agotamiento de mtDNA con NAM y observar que los niveles de SAM disminuyen. Sin embargo, los mecanismos por los que las pozas de NAD⁺ podrían estar regulando los niveles de SAM son borrosos.

Lo que sí se conoce, son algunos antecedentes que muestran los efectos de modular los niveles de SAM sobre los niveles de metilación nuclear. En estudios previos se ha demostrado que al disminuir los niveles intracelulares de SAM se produce un fenotipo de hipometilación global del DNA nuclear, e inversamente, el aumento de los niveles de SAM va acompañado de la hipermetilación global del DNA nuclear (Waterland, et. al., 2006; Luka, et. al., 2010). Esto concuerda con lo que se observó en este trabajo, donde el efecto de hipermetilación provocado por el agotamiento de mtDNA ya es evidente a las 2 semanas de exposición, sin embargo, hay un aumento considerable a las ocho semanas. En conjunto con los datos de cuantificación de SAM, se concluye que, aunque las características más relevantes del modelo de agotamiento de mtDNA, como el aumento de SAM e hipermetilación del DNA nuclear, están presentes desde las dos semanas de exposición a BrEt, están más representadas a las 8 semanas.

La hipermetilación del DNA nuclear podría ser explicada con la información obtenida del análisis *in silico* que utilizó datos previamente publicados (Wang, et. al., 2017). Se observó que, en presencia de altas concentraciones de SAM, los genes de las DNMTs *de novo*, DNMT3a y DNMT3b, se encuentran regulados positivamente, mientras que el gen TET3 está regulado negativamente, sugiriendo que en el escenario de altas concentraciones intracelulares de SAM se favorece la metilación *de novo* con la sobreexpresión de las DNMT3a y DNMT3b. Además, se podría reducir la desmetilación, logrando una mayor acumulación de 5mC como se observó en el modelo de agotamiento de mtDNA.

Considerando que la actividad de las metil transferasas como las DNMTs depende de la concentración de su sustrato (SAM), cuya concentración intracelular es similar a la Km de las DNMTs, SAM puede jugar un papel importante en la regulación de la actividad de las DNMTs. Es posible que el aumento de las concentraciones intracelulares de SAM, tras el agotamiento de mtDNA, conduzca a un aumento en la actividad de las DNMTs y, por lo tanto, a un fenómeno de hipermetilación. De manera semejante, al reducir las concentraciones de SAM

mediante el aumento artificial de NAD⁺, la actividad de las DNMTs podría estar disminuida lo que reduce los niveles globales de metilación del DNA nuclear.

Es importante discernir si el aumento en la metilación global del DNA nuclear se debe a la sobreexpresión de componentes epigenéticos que regulan los niveles de metilación del DNA nuclear, o si se explica por el aumento en la actividad, o ambos. Por lo tanto, se sugiere un enfoque global al momento de estudiar los efectos del agotamiento de mtDNA en la metilación del DNA nuclear, así como el efecto de hipometilación que se observó al suplementar con NAM 1.5 mM. Centrarse solo en regiones codificantes restringe el universo de estudio, ya que en las regiones intergénicas se encuentran secuencias regulatorias como promotores, enhancers, insulators, sitios de unión a CTCF etc., de los cuales se sabe que la metilación puede influir en sus funciones. Con respecto a los enhancers, en general, su actividad potenciadora está definida por la unión de factores de transcripción, pero también existe una relación entre la ausencia de 5mC y la activación del enhancer. Además se sabe que la unión de proteínas arquitectónicas como CTCF es metilo-sensible, por lo que, los cambios en el patrón de metilación nuclear ocasionados por el agotamiento de mtDNA puede tener impacto en más mecanismos de regulación epigenética, dándole más complejidad al estudio de los efectos epigenéticos que podría ocasionar la disfunción mitocondrial generada a partir del agotamiento de mtDNA.

CONCLUSIONES

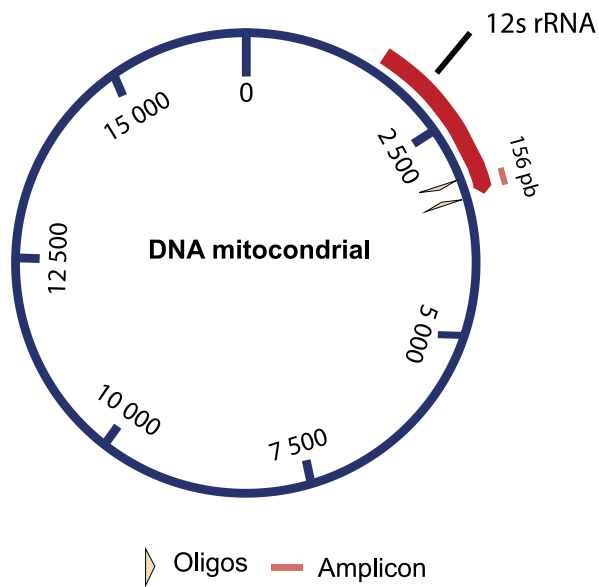
- Se cuenta con un modelo de disfunción mitocondrial ocasionada por el agotamiento de mtDNA en MCF7, tras la exposición a bromuro de etidio 200 ng/mL durante 8 semanas.
- El agotamiento de mtDNA disminuye los niveles intracelulares de NAD⁺ y aumenta los de SAM.
- Existe una relación inversa entre los niveles intracelulares de NAD⁺ y SAM.

- Es posible que el efecto que tiene el agotamiento de mtDNA sobre los niveles de SAM sea consecuencia de la concentración de NAD⁺, puesto que al aumentarla, disminuye SAM, aunque prevalezca el agotamiento de mtDNA.
- El agotamiento de mtDNA aumenta los niveles de metilación del DNA nuclear, indirectamente, ya que la hipermetilación se puede revertir aumentando los niveles intracelulares de NAD⁺.

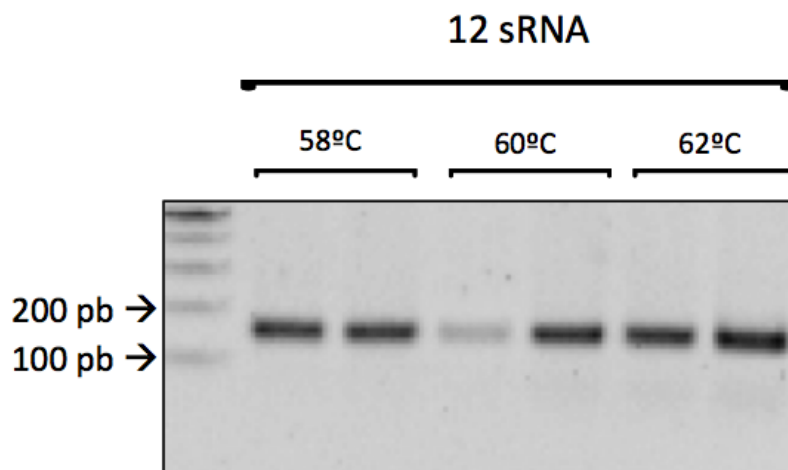
PERSPECTIVAS

- Discernir el mecanismo mediante el cual el agotamiento de DNA mitocondrial afecta los niveles de metilación del DNA nuclear.
- Determinar los posibles cambios en la expresión de genes derivados de la hipermetilación del DNA nuclear, en respuesta al agotamiento de mtDNA.
- Identificar las regiones del genoma en las que ocurren los cambios en los niveles de metilación del DNA nuclear en respuesta al agotamiento de mtDNA.
- Relacionar los cambios en los niveles de metilación del DNA nuclear con los cambios en la expresión de genes.

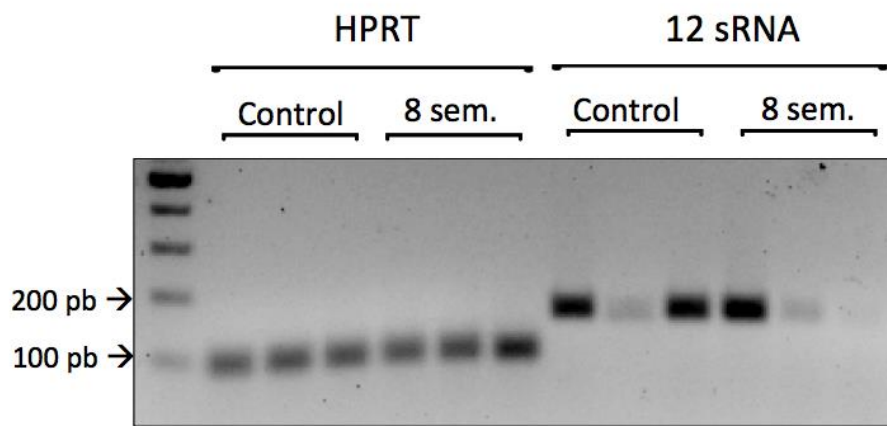
SUPLEMENTARIAS



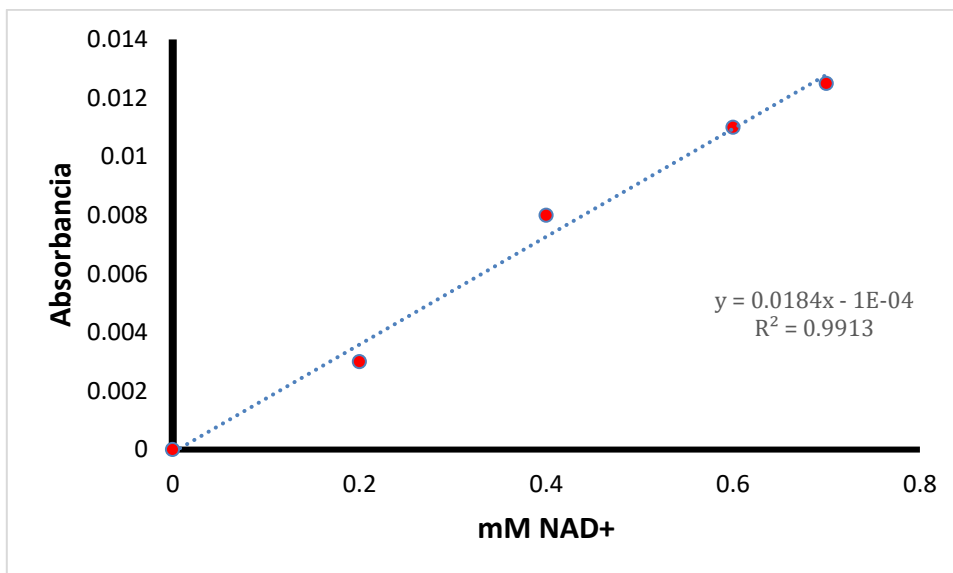
Suplementaria 1. Mapa del diseño de oligonucleótidos para cuantificación de mtDNA. Se diseñaron sobre la parte final del gen 12s rRNA con un fragmento de amplificación esperado de 156 pb.



Suplementaria 2. Estandarización oligonucleótidos 12 sRNA. Se probaron diferentes temperaturas para encontrar las condiciones optimas de amplificación de los oligonucleótidos para el gen mitocondrial 12 sRNA.



Suplementaria 3. Los oligonucleótidos contra el gen 12s rRNA mitocondrial son específicos en el qPCR. Gel de agarosa qPCR de HPRT y 12 sRNA. Tras realizar el qPCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1.5% para comprobar la amplificación de una sola banda



Suplementaria 4. Curva estándar de concentración de NAD+ en células MCF7 lisadas con KOH. Se midió la absorbancia a 378 nm de muestras de NAD+-Tris en concentraciones crecientes que van de 0 mM a 0.7 mM de NAD+ puro grado HPLC.

Genes comunes		
Expresados a la alta	AC005837.1	AL136040.1
	AC104561.4	AC027796.5
	DOK3	
Expresados a la baja	PTPRR	AC016245.1
	GDF15	GADD45A
	TRIB3	MOV10L1
	HIST1H4E	AC010327.7
	AL139423.1	STK31
	ARL14EPL	INHBE
	HIST1H1E	LAMC2
	TMEM225B	AC063965.2
	ADAM20P1	FGF21
	AKNA	HIST1H1D
	AC016925.3	HIST1H2BO
	CLDN9	MAFF
	AC245100.3	HIST2H2BE
	IRF7	APOA1-AS
	PPP1R32	ATF3
	INHBE	DSC1
	LAMC2	DMGDH
	AC063965.2	CSRNP1
	FGF21	DUSP10
	HIST1H1D	ADGRG1
	HIST1H2BO	HMOX1
	MAFF	PPP1R15A
	HIST2H2BE	TAS2R5
	APOA1-AS	ABCA10
	ATF3	AC016245.1
	AC087623.1	GADD45A
	AC005481.1	MOV10L1
	APOL6	AC010327.7
	CHST1	STK31
	LINC02019	BEST1
	UBA7	STK32A
	HIST1H3B	CCL20
	CRYAB	DUSP1
	INSC	AC008147.2
	LINC02154	PAPPA2
	KLHDC7B	KRTAP5-AS1
	IL31RA	CHAC1
	CYP4F3	MVP
	RPSAP44	AC005332.2

Tabla suplementaria 1. Genes Diferencialmente Expresados comunes para el agotamiento de mtDNA y el aumento intracelular de SAM. Hay un mayor número de genes diferencialmente expresados a la baja comunes para el agotamiento de mtDNA y aumento de SAM (86 genes) comparando con los genes diferencialmente expresados a la alta (5 genes).

REFERENCIAS

- Annunziato, A. (2008). DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education* 1(1):26
- Aran D, Sabato S, Hellman A. (2013). DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome Biol.* 14:R21
- Aravin A, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ. (2008) A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell.* 31(6):785-99.
- Armand R, Channon JY, Kintner J, White AK, Miselis KA, Perez R, Lewis LD. (2004) The effects of ethidium bromide induced loss of mitochondrial DNA on mitochondrial phenotype and ultrastructure in a human leukemia T-cell line (MOLT-4 cells). *Toxicology and Applied Pharmacology.* 196 (1), 68-79
- Barkess G, West AG. (2012) Chromatin insulator elements: establishing barriers to set heterochromatin boundaries. *Epigenomics* 4: 67-80.
- Bellizzi D, D'Aquila P, Giordano M, Montesanto A, Passarino G. (2012) Global DNA methylation levels are modulated by mitochondrial DNA variants. *Epigenomics.* 4(1):17-27.
- Bellizzi D, D'Aquila P, Giordano M, Montesanto A, Passarino G. (2012) Global DNA methylation levels are modulated by mitochondrial DNA variants. *Epigenomics*;4(1):17-27.
- Cabrera, V.M. Human molecular evolutionary rate, time dependency and transient polymorphism effects viewed through ancient and modern mitochondrial DNA genomes. *Sci Rep* 11, 5036 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84583-1>
- Cantó, C., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2015). NAD⁺ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metabolism*, 22(1), 31-53.
- Chen EI (2012) Mitochondrial dysfunction and cancer metastasis. *J Bioenerg Biomembr.* 44: 619-622

- Chen Z., Shuai L., Shankar S., Shyy j. and Shu C. (2017). Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annual Review of Biomedical Engineering*. Vol. 19:195-219.
- Chen, H., Wang, J., Liu, Z., Yang, H., Zhu, Y., Zhao, M., ... Yan, M. (2016). Mitochondrial DNA depletion causes decreased ROS production and resistance to apoptosis. *International journal of molecular medicine*. 38(4), 1039–1046.
- Chinnery PF, Gomez-Duran A. (2018) Oldies but Goldies mtDNA population variants and neurodegenerative diseases. *Front Neurosci*. 2018. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00682/full>.
- Chinnery PF. Mitochondrial Disorders Overview. 2000 Jun 8 [Updated 2014 Aug 14]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1224/>
- Chinnery, Patrick F., (2015) Chapter 24 - Mitochondrial Disorders Due to Mutations in the Nuclear Genome, Editor(s): Roger N. Rosenberg, Juan M. Pascual, Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition), Academic Press, Pages 283-290, ISBN 9780124105294, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410529-4.00024-3>.
- Clay-Montier LL, Deng J, Bai Y. (2009) Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics*. 36(3):125–31
- Cohen Bruce H. (2016) Pearson Syndrome. En *Mitochondrial Case Studies Underlying Mechanisms and Diagnosis (37-42)*. *Academic Press*
- Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Mitochondria. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/>
- Coskun P, Wyrembak J, Schriener SE, Chen H-W, Marciniack C, LaFerla F. (2012) A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *BBA-Gen Subjects*. 1820(5):553–64.
- Cuddapah, S., Schones, D. E., Cui, K., Roh, T. Y., Barski, A., Wei, G., ... Zhao, K. (2011). Genomic profiling of HMG1 reveals an association with

chromatin at regulatory regions. *Molecular and cellular biology*, 31(4), 700–709. doi:10.1128/MCB.00740-10

- Desjardins P, Frost E, Morais R. (1985) Ethidium bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1985;5(5):1163–9.
- Dhayalan A., Rajavelu A., Rathert P., Tamas R., Jurkowska R.Z., Ragozin S., Jeltsch A. (2010) The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation. *J. Biol. Chem.* 285:26114–26120.
- Ding, W.-X., & Yin, X.-M. (2012). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological Chemistry*, 393(7), 547–564.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, et al. 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 10:2709–21
- El-Hattab, A. W., & Scaglia, F. (2013). Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 10(2), 186–198. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0177-6>
- Ernst, J., & Kellis, M. (2012). ChromHMM: automating chromatin-state discovery and characterization. *Nature methods*, 9(3), 215–216.
- Etchegaray, J.-P., & Mostoslavsky, R. (2016). Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. *Molecular Cell*, 62(5), 695–711.
- Fetterman JL, Ballinger SW. (2019) Mitochondrial genetics regulate nuclear gene expression through metabolites. *Proc Natl Acad Sc*;116(32):15763–
- Friedman, J.R. and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*; 505(7483): 335–343
- Goto K, Numata M, Komura JI, Ono T, Bestor TH, Kondo H (1994). Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation* 56: 39–44.

- Grossman LI, Shoubridge EA. (1996), Mitochondrial genetics and human disease. *Bioessays*18:983–91.
- Hakonen A.H., Heiskanen S., Juvonen V, (2005), Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin, *Am J Hum Genet*, 77, pp. 430-441
- Hance,N., Ekstrand,M.I. and Trifunovic,A. (2005) Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1775–1783.
- Higashida, K., Kim, S. H., Jung, S. R., Asaka, M., Holloszy, J. O., & Han, D.-H. (2013). Effects of Resveratrol and SIRT1 on PGC-1 α Activity and Mitochondrial Biogenesis: A Reevaluation. *PLoS Biology*, 11(7).
- Houtkooper RH, Cantó C, Wanders RJ, Auwerx J. (2010), The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev.* 31:194–223.
- Hsu, CC., Tseng, LM., & Lee, HC. (2016). Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Experimental biology and medicine.* 241(12), 1281–1295.
- Hwang, ES., & Song, SB. (2017). Nicotinamide is an inhibitor of SIRT1 in vitro, but can be a stimulator in cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(18), 3347–3362.
- Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L. (2009) Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle.* 8(11):1698–710.
- Jaenisch R., Bird A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 33 :245-254.
- Jang, S., Kang, H. T., & Hwang, E. S. (2012). Nicotinamide-induced Mitophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19304–19314.
- Jing, R., Corbett, J. L., Cai, J., Beeson, G. C., Beeson, C. C., Chan, S. S. Duncan, S. A. (2018). A Screen Using iPSC-Derived Hepatocytes Reveals NAD⁺ as a Potential Treatment for mtDNA Depletion Syndrome. *Cell Reports*, 25(6), 1469–1484.

- Kakiuchi C, Ishiwata M, Kametani M, Nelson C, Iwamoto K, Kato T. (2005) Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletions in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 8(4):515–22.
- Kelly, R. D. W., Mahmud, A., McKenzie, M., Trounce, I. A., & St John, J. C. (2012). Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10124–10138.
- King, M. P., & Attardi, G. (1996). Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods in Enzymology*, 264, 304–13.
- Laukka T, Mariani CJ, Ihantola T, Cao JZ, Hokkanen J, Kaelin WG, et al. (2016) Fumarate and succinate regulate expression of hypoxia-inducible genes via TET enzymes. *J Biol Chem.* 291(8):4256–65.
- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest.* 106:847–56.
- Li B.Z., Huang Z., Cui Q.Y., Song X.H., Du L., Jeltsch A., Chen P., Li G., Li E., Xu G.L. (2011) Histone tails regulate DNA methylation by allosterically activating de novo methyltransferase. *Cell Res.* 21:1172–1181
- Lin JC, Jeong S, Liang G, Takai D, Fatemi M, et al. 2007. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell.* 12:432–44
- Lu, S.-P., & Lin, S.-J. (2010). Regulation of yeast sirtuins by NAD(+) metabolism and calorie restriction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(8), 1567–75.
- Maddocks ODK, Labuschagne CF, Adams PD, Vousden KH. (2016) Serine metabolism supports the methionine cycle and DNA/RNA methylation through De Novo ATP synthesis in cancer cells. *Mol Cell.* 61(2):210–21.
- Martin, W. & Mentel, M. (2010) The Origin of Mitochondria. *Nature Education* 3(9):58

- Martin, W. F., Garg, S., & Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1678), 20140330.
- Maston GA, Evans SK, Green MR. (2006) Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 29-59.
- Meissner A., Mikkelsen T.S., Gu H., Wernig M., Hanna J., Sivachenko A., Zhang X., Bernstein B.E., Nusbaum C., Jaffe D.B (2008) Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*. 454:766–770.
- Mimaki M. , Wang X. , McKenzie M. , Thorburn D.R. , Ryan M.T. . (2012), Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim. Biophys Acta*. 1817 pp. 851-862
- Modica-Napolitano JS, Kulawiec M, Singh KK. (2007), Mitochondria and human cancer. *Curr Mol Med*. 7:121–31.
- Moore, L., Le, T. y Fan, G. (2003). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* 38, 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Morselli M., Pastor W.A., Montanini B., Nee K., Ferrari R., Fu K., Bonora G., Rubbi L., Clark A.T., Ottonello S. (2015) In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. *Elife*. 4:e06205.
- Naito, A., Carcel-Trullols, J., Xie, C., Evans, T. T., Mizumachi, T., & Higuchi, M. (2008). Induction of acquired resistance to antiestrogen by reversible mitochondrial DNA depletion in breast cancer cell line. *International Journal of Cancer*, 122(7), 1506–11.
- Naviaux R.K., Nguyen K.V. (2004). POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol*, 55, pp. 706-712
- Naviaux, R. K. (2008). Mitochondrial control of epigenetics. *Cancer Biology & Therapy*, 7(8), 1191–3.
- Nikiforov, A., Dölle, C., Niere, M., & Ziegler, M. (2011). Pathways and Subcellular Compartmentation of NAD Biosynthesis in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21767–21778.

- Pasini D, Hansen KH, Christensen J, Agger K, Cloos PA, Helin K. (2008). Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and polycomb-repressive complex 2. *Genes Dev.* 22:1345–55
- Pennacchio L., Ahituv N, Moses A., Prabhakar S, Nobrega MA, Shoukry M, Minovitsky S, Dubchak I, Holt A, Lewis KD, Plajzer-Frick I, Akiyama J, De Val S, Afzal V, Black BL, Couronne O, Eisen MB, Visel A, Rubin EM. (2006) In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature.* 444(7118):499-502.
- Pyle A, Anugraha H, Kurzawa-Akanbi M, Yarnall A, Burn D, Hudson G. (2016) Reduced mitochondrial DNA copy number is a biomarker of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 38:2167–21610
- Regueira T. , Andresen M. y Djafarzadeh S. (2009) Disfunción mitocondrial en sepsis, impacto y posible papel regulador del factor inducible por hipoxia (HIF-1^α). *Med Intensiva.* 33(8):385–392
- Reinecke, F., Smeitink, J. A. M., & van der Westhuizen, F. H. (2009). OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease,* 1792(12), 1113–1121.
- Rivera CM, Ren B. (2013). Mapping human epigenomes. *Cell.* 155:39–55
- Rocher C., Taanman JW., Pierron D., Faustin B., Benard G., Rossignol R., Malgat M., Pedespan L., Letellier T. (2008) Influence of mitochondrial DNA level on cellular energy metabolism: implications for mitochondrial diseases. *J Bioenerg Biomembr* 40:59–67
- Rowley, M.J., Corces, V.G. (2018) Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat Rev Genet* 19, 789–800.
- Rowling M., Schalinske K. (2001) Retinoid compounds activate and induce hepatic glycine n-methyltransferase in rats. *J Nutr.* 131:1914–1917
- Ryan M.T. , Hoogenraad N.J. (2007), Mitochondrial-nuclear communications. *Annu. Rev. Biochem.* 76 . 701-722
- Saada A., Shaag A., Mandel H., Nevo Y., Eriksson S., Elpeleg O., (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet,* 29, pp. 342-344

- Sarzi E., Bourdon A., Chretien D., (2007) Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr*, 150, pp. 531-534 4 e1–4 e6
- Scheffler, I. E.. (2002). *Metabolic Pathways Inside Mitochondria*. In *Mitochondria* (pp. 246–272). New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Scola G, Kim HK, Young LT, Salvador M, Andreatza AC. Lithium reduces the effects of rotenone-induced complex I dysfunction on DNA methylation and hydroxymethylation in rat cortical primary neurons. *Psychopharmacology*. 2014;231(21):4189–98.
- Shestov AA, et al. (2014) Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife*. 3: 03342
- Shutt, T. y Gray, M. (2006) Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *TRENDS in Genetics*. 22, 90-95
- Simmons,D. (2008) Epigenetic influence and disease. *Nature Education* 1(1):6
- Singh, KK. (1998), *Mitochondrial DNA mutations in aging, disease and cancer*. New York, USA: Springer;
- Slavov N, et al. (2014) Constant growth rate can be supported by decreasing energy flux and increasing aerobic glycolysis. *Cell reports*.7(3):705–714.
- Smiraglia, D. J., Kulawiec, M., Bistulfi, G. L., Gupta, S. G., & Singh, K. K. (2008). A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus. *Cancer biology & therapy*, 7(8), 1182-90.
- Soda K. (2018). Polyamine Metabolism and Gene Methylation in Conjunction with One-Carbon Metabolism. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3106.
- Stein, L. R., & Imai, S. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23(9), 420–428.
- Stępień, P. P., Maciej Szewczyk, (2016) *Dialogues between cell nuclei and mitochondria*. *Postępy Biochemii* 62 (2)

- Stepper, P., Kungulovski, G., Jurkowska, R. Z., Chandra, T., Krueger, F., Reinhardt, R., Jurkowski, T. P. (2017). Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 45(4), 1703–1713.
- Stoscheck CM. Quantitation of Protein. 1990. *Methods in Enzymology* 182, 50-69.
- Stumpf, J.D. and Copeland, W.C. (2011) Mitochondrial DNA replication and disease: insights from DNA polymerase gamma mutations. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68, 219–233.
- Suomalainen A, Battersby BJ. 2017. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19:77–92
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson N-G (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429: 417-423
- Ueland PM (1982). Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Rev* 34: 223–253
- Van Goethem G., Martin J.J., Dermaut B, (2003), Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord*, 13, pp. 133-142
- Vander-Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324(5930):1029–1033.
- Vesteg, M., & Krajcovic, J. (2008). Origin of eukaryotic cells as a symbiosis of parasitic alpha-proteobacteria in the periplasm of two-membrane-bounded sexual pre-karyotes. *Communicative & integrative biology*, 1(1), 104–113. <https://doi.org/10.4161/cib.1.1.6349>
- Wang, Y., Sun, Z., & Szyf, M. (2017). S-adenosyl-methionine (SAM) alters the transcriptome and methylome and specifically blocks growth and

invasiveness of liver cancer cells. *Oncotarget*, 8(67), 111866–111881.
doi:10.18632/oncotarget.22942

- Warren EB, Aicher AE, Fessel JP, Konradi C (2017) Mitochondrial DNA depletion by ethidium bromide decreases neuronal mitochondrial creatine kinase: Implications for striatal energy metabolism. *PLoS ONE* 12(12): e0190456.
- Weber M., Hellmann I., Stadler M.B., Ramos L., Paabo S., Rebhan M., Schubeler D. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* 39:457–466.
- Wolf SF, Jolly DJ, Lunnen KD, Friedmann T, Migeon BR. (1984). Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *PNAS* 81:2806–10
- Workman JL, Kingston RE. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67:545–79
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. (1999), Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 98:115–24.
- Yu M, Yurong S., Xiyin W, Yi Y, Yunli Z, Xishan H, Ning Z, Ruifang N. (2007) Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells. *Toxicology Letters* 170 (1) 83-93
- Zhang N. (2018) Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Anim Nutr.* 4(1):11–6.
- Zhang N. (2018) Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Anim Nutr.* 4(1):11–6.
- Zhang Y., Jurkowska R., Soeroes S., Rajavelu A., Dhayalan A., Bock I., Rathert P., Brandt O., Reinhardt R., Fischle W. (2010) Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Res.* 38:4246–4253

- Zhang, X., Hu, M., Lyu, X., Li, C., Thannickal, V. J., & Sanders, Y. Y. (2017). DNA methylation regulated gene expression in organ fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(9), 2389–2397.
- Zoltan B. y Hans K. (1972) Cooperation of Mitochondrial and Nuclear Genes Specifying the Mitochondrial Genetic Apparatus in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 69(6): 1371–1374.
- Zylber E, Vesco C, Penman S. (1969) Selective inhibition of the synthesis of mitochondria-associated RNA by ethidium bromide. *J Mol Biol.* 44(1):195–204.
- Hideo Sakamoto, Anne M. Friel, Antony W. Wood, Lankai Guo, Ana Ilic, Michael V. Seiden, Daniel C. Chung, Maureen P. Lynch, Takehiro Serikawa, Elizabeth Munro, Esther Oliva, Sandra Orsulic, Sandra D. Kirley, Rosemary Foster, Lawrence R. Zukerberg & Bo R. Rueda (2008) Mechanisms of Cables 1 gene inactivation in human ovarian cancer development, *Cancer Biology & Therapy*, 7:2, 180-188, DOI: 10.4161/cbt.7.2.5253
- Shen, T., & Huang, S. (2012). The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 12(6), 631–639. <https://doi.org/10.2174/187152012800617678>
- Shobayashi M, Fujii T, Iefuji H. Effects of accumulated S-adenosylmethionine on growth of yeast cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007 Jun;71(6):1595-7. doi: 10.1271/bbb.70100. PMID: 17587699.
- Zhao Y, Li JS, Guo MZ, Feng BS, Zhang JP. Inhibitory effect of S-adenosylmethionine on the growth of human gastric cancer cells in vivo and in vitro. *Chin J Cancer.* 2010 Aug;29(8):752-60. doi: 10.5732/cjc.010.10046. PMID: 20663323.
-