

ANEXOS

Anexo 1-

Estudio de la metilación del ADN en promotores de microRNAs en distintos contextos celulares y sus implicaciones sobre sus genes blancos.

Estancia de investigación en el laboratorio de epigenética del cáncer dirigido por el Dr. Manel Esteller en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) Madrid, España (Enero a Junio de 2007).

Los microRNAs (miRNAs) pertenecen a una amplia familia de pequeños RNA no-codificantes, los cuales tienen múltiples funciones, como por ejemplo durante el desarrollo de plantas y animales, entre muchos otros procesos (Medina y Slack, 2008). Los miRNAs son RNAs pequeños de 21 a 25 nucleótidos (nt), los cuales tienen una vía principal de procesamiento (Figura 35). Esta se da cuando los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II lo cual deriva en la formación de un RNA denominado Pri-miRNA; a este transcrito primario se le adiciona una caperuza en el extremo 5', y que en su región 3' es poliadenilada, un procesamiento similar al que se observa para los RNAm codificantes. Posteriormente este Pri-miRNA es procesado co-transcripcionalmente por una RNAsa tipo III conocida como Drosha (Figura 35), formando así un precursor con un tamaño de 70 a 90 nt que presenta una estructura secundaria tipo tallo-asa conocido como pre-miRNA. Este es transportado al citoplasma por la exportina 5, donde es procesado por una endonucleasa RNAsa tipo III conocida como Dicer (Weber et al., 2007). Esto permite la formación de un RNA de doble cadena (dsRNA) de 21 a 25 pb



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.

(Figura 35A y B). Posteriormente una de las hebras es incorporada a un complejo proteico conocido como Complejo de silenciamiento inducido por RNA o RISC, mientras que la otra hebra es degradada. Consecutivamente el miRNA maduro acoplado a RISC presenta una secuencia complementaria a un RNA mensajero específico (o blanco), la cual cuando es perfecta conlleva al corte del mensajero, permitiendo así su degradación, o se aparea a la región 3'-UTR interfiriendo con la traducción del mensajero del gen blanco (Dalmay, 2008). Este fenómeno es importante en la regulación de los niveles de transcripción génica y por ende de la abundancia proteica. Siendo así que los miRNA representan un nuevo componente asociado en la regulación de la expresión génica.

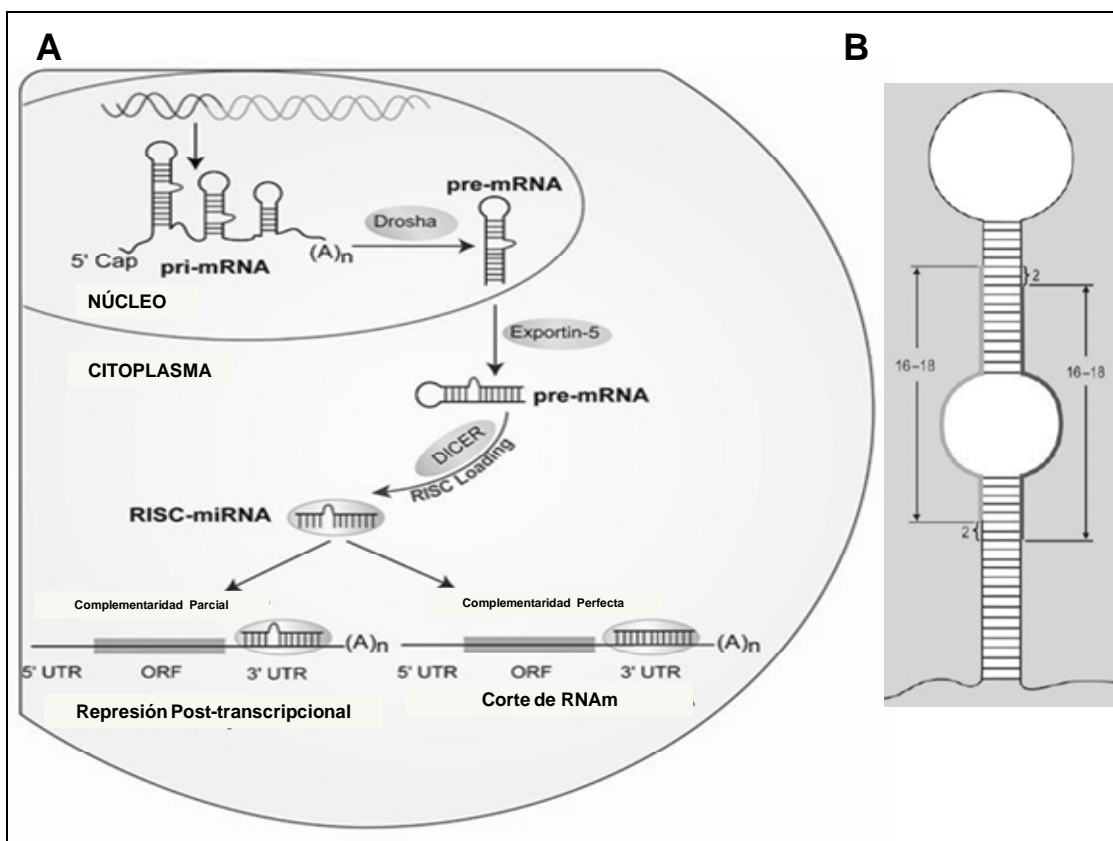


Figura 33. Biogénesis de los microRNAs (miRNA). **A-** Los genes de miRNA son transcritos por la RNA pol II generándose un transcrito primario (pri-miRNA), a este se le adiciona una caperuza en el 5', y es poliadenilado en su extremo 3'. Este contiene estructuras tallo-asa, las cuales son reconocidas por un complejo proteico Drosha-DGCR8, el cual lo corta para formar una estructura conocida como precursor de miRNA o pre-miRNA. Posteriormente es transportado por la Exportina 5 hacia citoplasma, donde Dicer lo procesa a un RNA de doble

cadena (dsRNA) de 21 a 25 nt. Una de las hebras de RNA es incorporada a un complejo de silenciamiento inducido por RNA llamado RISC. La hebra sencilla de RNA es complementaria a un RNAm blanco. Cuando el reconocimiento de la hebra es parcial conlleva al arresto traduccional, si esta es perfecta deriva en el corte y degradación del RNA mensajero. **B-** Estructura tallo-asa de un pri-miRNA. En rojo se representa el miRNA maduro de 21nt. Este es procesado por diferentes RNAsas tipo III como Drosha y Dicer.

Por esto, los microRNAs se han vuelto un campo de estudio de gran interés, esto debido a que son importantes reguladores de múltiples genes en muchos organismos, además de verse involucrados en diversos tipos de enfermedades, incluyendo el cáncer (Lujambio y Esteller, 2007; Maziere y Enright, 2007; Garzon et al., 2009). Dentro de las actividades celulares que se han observado para algunos microRNAs se ha descrito una función oncogénica donde los miRNAs: *hsa-miR-17-92*, *hsa-miR-155* y *hsa-miR-372-373* se asocian con proliferación celular (Croce, 2009). De igual forma, otros microRNAs tienen actividad de genes supresores de tumores como *hsa-miR-15a* y el *hsa-miR-16* entre otros (Ma y Weinberg, 2008; Medina y Slack, 2008; Croce, 2009; Garzon et al., 2009).

Al igual que múltiples genes, los microRNAs pueden ser desregulados a nivel transcripcional tanto por eventos genéticos y/o epigenéticos (Medina y Slack, 2008). En la actualidad poco se conoce a cerca de los elementos regulatorios como promotores o enhancers que modulan la expresión de los microRNAs, en especial se desconocen los procesos que pudieran influir en su des-regulación transcripcional. Por esto, durante la estancia de investigación nos concentramos en determinar el estado de metilación de potenciales promotores de microRNAs cuyas regiones promotoras incluyen a una isla CpG. Como un primer abordaje del proyecto, nos enfocamos en determinar *in silico* las secuencias de microRNAs que pudieran ser blancos de genes involucrados en cáncer de mama como: *ERBB2* y *EGFR* y por otra parte, aquellos que estén

asociados con el desarrollo de tumores cerebrales como: el gen O-6-metilguanina-DNA metiltransferasa (*MGMT*) (Paz et al., 2004; Watanabe et al., 2007). Los proto-oncogenes *ERBB2* y *EGRF* también conocido como *HER-2/neu* y *HER-1*, respectivamente, codifican para un receptor de tirosina cinasa *trans*-membranal, la cual se ha visto sobre-expresada en varios tipos de cánceres como ovario, vejiga y mama, además de asociarse con un mal pronóstico (Scott et al., 2007; Tolmachev, 2008). Por otro lado, el gen *MGMT* está involucrado en reparación del ADN, en especial, se encarga de remover los aductos formados por los nucleótidos de guanina (Patel y Shervington, 2009). Este gen se ha visto inactivado en múltiples cánceres de cerebro, como los glioblastomas, donde la metilación el ADN es uno de los mecanismos comúnmente involucrado en su silenciamiento (Kondo et al., 2003).

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de la metilación del ADN sobre promotores de microRNAs y su acción sobre sus potenciales genes blancos.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Definir *in silico* potenciales microRNAs que tengan como blanco a los genes *ERBB2*, *EGFR* y *MGMT*.
2. Caracterizar *in silico* a las regiones promotoras de microRNAs con base a la presencia de islas CpGs. Especialmente nos enfocaremos en aquellas que tengan como blanco a los genes antes mencionados.
3. Mediante el ensayo de bisulfito de sodio, secuenciación y/o PCR sensible a metilación determinar el estado de metilación del ADN de las islas CpGs pertenecientes a los microRNAs.

4. Evaluar el efecto biológico de la reactivación de los microRNAs por medio del inhibidor de la metilación 5-aza-2'-deoxicitidina.

RESULTADOS.

En primera instancia determinamos *in silico* a un conjunto de microRNAs que pudieran tener como blanco a los genes *ERBB2*, *EGFR* y *MGMT* utilizando distintas bases de datos (Figura 36). Posteriormente, definimos *in silico* cuáles de los microRNAs contienen islas CpGs mediante el programa Methyl Primer Express® Software v1.0. Una vez realizado el tamizaje de los microRNAs candidatos a ser evaluados, y llevamos a cabo el estudio del estado de metilación del ADN de dichas islas CpGs mediante la técnica de bisulfito de sodio y secuenciación, como también mediante el ensayo de PCRs sensibles a metilación (MS-PCRs).

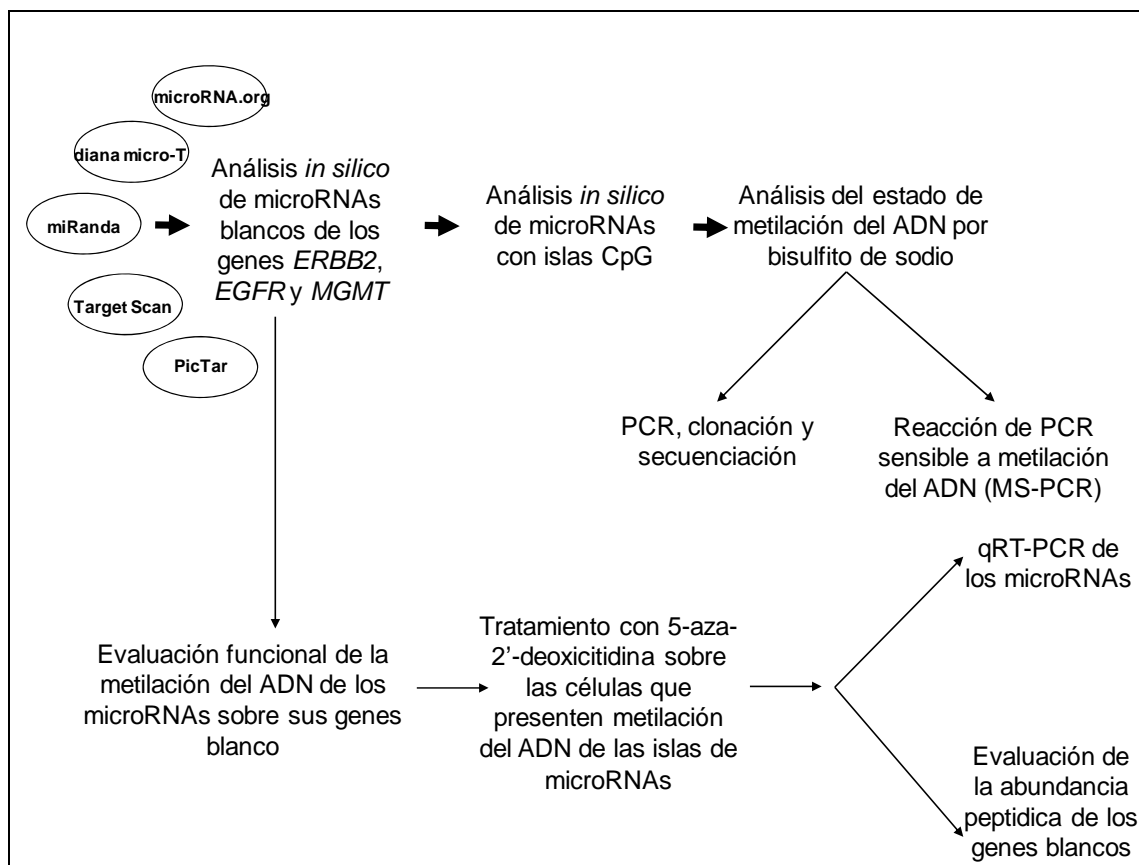


Figura 36. Diagrama de flujo diseñado y aplicado para el estudio de metilación del ADN de islas CpG asociadas a microRNAs que tienen por blanco a los genes *ERBB2*, *EGFR* y *MGMT*. Mediante múltiples bases de datos se buscan *in silico* a microRNAs que puedan ser blancos de los genes antes mencionados. Posteriormente se realiza un análisis *in silico* de islas CpG cercanas a los microRNAs que puedan ser inactivadas por metilación del ADN. Finalmente mediante ensayos de bisulfito de sodio secuenciación y/o reacción de PCRs sensible a metilación se evaluará el estado de metilación de cada uno de los microRNAs. Posteriormente se analizará el efecto biológico de la metilación del ADN mediante reactivaciones con 5-aza-2'deoxicitidina, para ello se determinará el patrón de la expresión y abundancia peptídica mediante qRT-PCRs y Western blot.

Determinación del estado de metilación de islas CpGs asociadas a microRNAs que tengan como blanco al gen *ERBB2*.

Debido a que este gen se ha visto afectado mayoritariamente desregulado en cáncer de mama, decidimos evaluar el estado de metilación de los miRNAs que tuvieran islas CpG y que su blanco fuera *ERBB2*. Al hacer el análisis *in silico*, encontramos once posibles microRNAs candidatos con esas características (Figura 36 y 37). Posteriormente por medio del ensayo de bisulfito y secuenciación evaluamos el estado de metilación de los once microRNAs presentes en ADN extraído de nueve líneas celulares tumorales de cáncer mamario, como control utilizamos ADN proveniente de tejido mamario normal y de linfocitos de sangre periférica de un individuo sano.

LINEAS CEL.	ESTIRPE											
		miR-375	miR-485	miR-125a	Let7-3a	miR-125b1	miR-296	miR-410	miR-432	miR-594	miR-611	miR-663
MDA-231	Ca. Mama	UN	HEM	MET	MET	MET	HEM	HEM	HEM	UN	UN	MET
MDA-436	Ca. Mama	HEM	MET	MET	MET	MET	HEM	MET	HEM	UN	UN	HEM
MDA-468	Ca. Mama	UN	UN	MET	MET	HEM	MET	HEM	HEM	UN	UN	MET
MCF-7	Ca. Mama	UN	MET	MET	MET	MET	MET	MET	MET	UN	UN	MET
BT549	Ca. Mama	HEM	MET	MET	MET	MET	MET	MET	MET	UN	UN	MET
MDA 2774	Ca. Mama					MET						
BT 474	Ca. Mama					HEM						
UACC 3199	Ca. Mama					MET						
MDA 157	Ca. Mama					UN						
Mama normal	Mama	UN	MET	MET	MET	UN	MET	MET	MET	UN	UN	HEM
Mama normal	Mama					UN						MET
LSP normales	LSP					UN						MET

UN	NO-METILADO
MET	METILADO
HEM	HEMIMETILADO

Figura 37. Análisis del estado de metilación de miRNAs que tienen como posible blanco al gen *ERBB2* en líneas celulares de estirpe mamario. Como control de la técnica se evaluó el estado de metilación en tejido mamario normal y en linfocitos de sangre periférica (LSP) de un individuo sano. Se secuenciaron al menos 8 clonas independientes de cada una de las secuencias genómicas modificadas por bisulfito de sodio provenientes de los microRNAs). UN, representa al análisis de 8 clonas independientes donde no se observa metilación del ADN; MET, representa al análisis de 8 clonas independientes donde se observa un 70% de metilación del ADN en su isla CpG, y HEM representa el análisis de 8 clonas independientes donde el estado de metilación del ADN oscila entre un 40 a un 60% en el total de las clonas estudiadas.

Con este estudio demostramos que solo las islas CpG presentes en los microRNAs *hsa-miR-125b1*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-594* y *hsa-miR-611* se encuentran en un estado no metilado tanto en ADN proveniente de tejido mamario normal, como de linfocitos de sangre periférica de un individuo sano. De manera interesante, el ADN correspondiente a la isla CpG asociada al *hsa-miR-125b1* se encontró hipermetilado en la mayoría de las líneas celulares provenientes de cáncer mamario con excepción de la línea celular MDA-MB-

157, datos que fueron corroborados por reacciones de PCR sensibles a metilación (MS-PCR) (Figura 38A y B), como control se utilizó ADN obtenido de dos tejidos mamarios normales independientes y de linfocitos de sangre periférica (Figura 38C). Por ello, nos concentramos en el *hsa-miR-125b1*, donde se evaluó su expresión mediante qRT-PCR en las líneas celulares de cáncer mamario MCF7, MDA-MB-231 y MDA-157. Los datos mostraron una disminución en la expresión de este microRNA en comparación con tejido mamario normal. Con el fin de corroborar si dicha metilación pudiera tener un efecto sobre la expresión de este microRNA, decidimos realizar un tratamiento con la 5-aza-2'-deoxicitidina. En las líneas celulares donde se había observado una hipermetilación del ADN en el promotor del microRNA *hsa-mir-125b1* demostramos una clara reactivación en su expresión (Figura 39). Obtuvimos este mismo resultado en la línea celular de cáncer mamario SKBR3, la cual sobre-expresa al gen *ERBB2* (Figura 40).

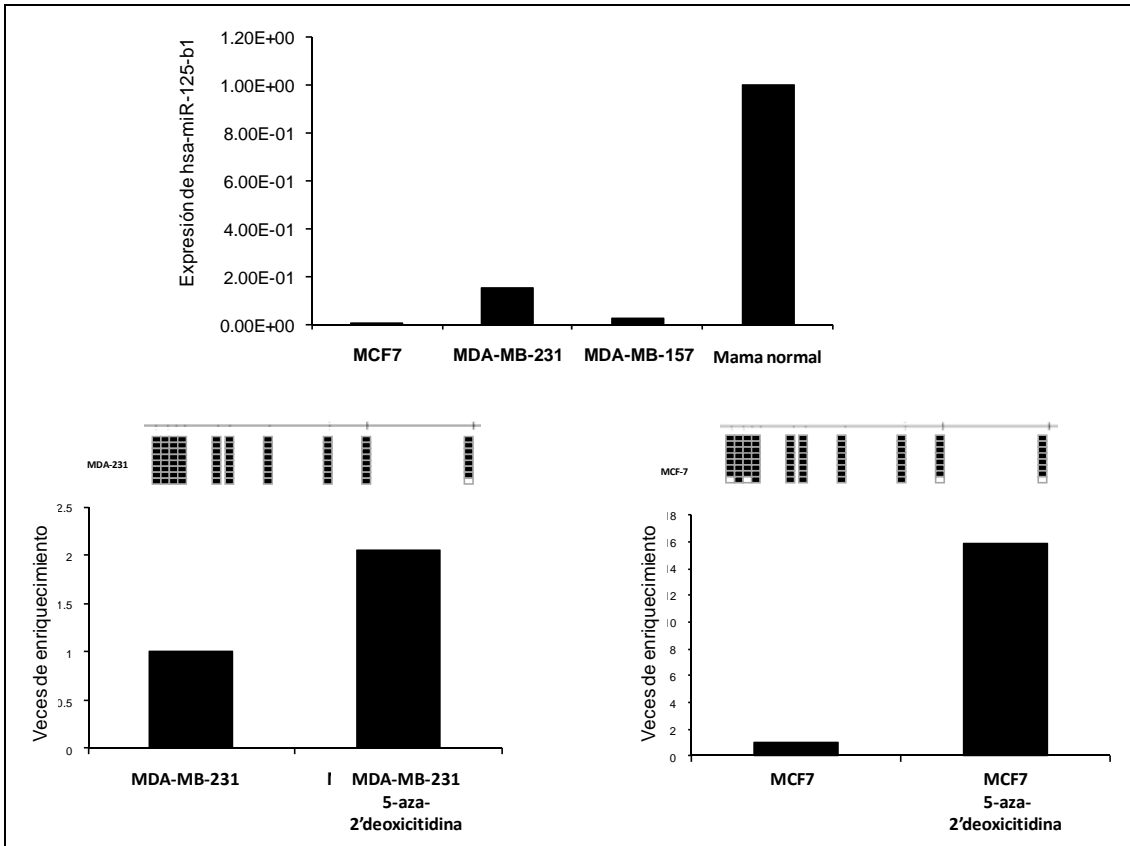


Figura 39. Evaluación de la expresión del microRNA *hsa-miR-125b1* mediante RT-PCR en tiempo real (q-RT-PCR) en tres líneas celulares de estirpe mamario comparado con tejido mamario normal. Reactivación de la expresión del microRNA *hsa-miR-125-b1* con un tratamiento de 5-aza-2'-deoxicitidina en las líneas celulares mamarias MDA-MB-231 y MCF7. Estos datos se realizaron por duplicado por lo cual las gráficas carecen de barras de error.

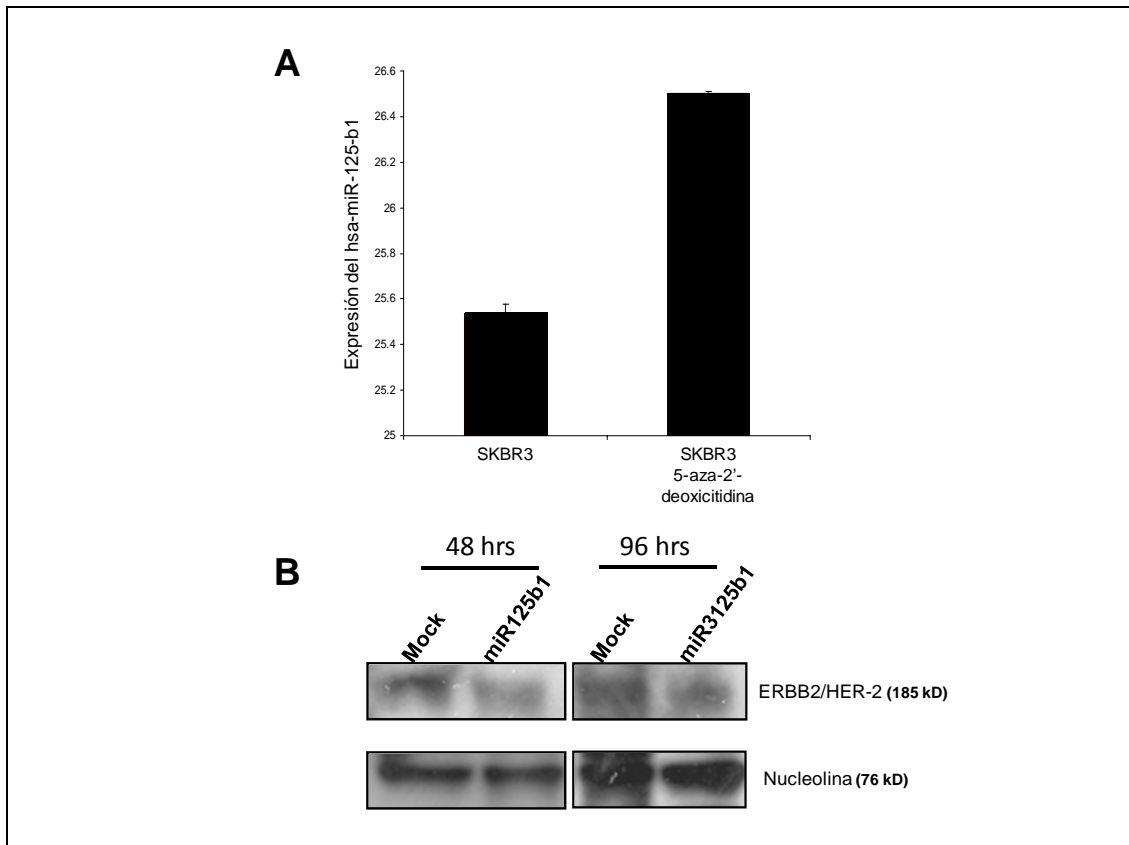


Figura 40. Evaluación de la transcripción del microRNA *hsa-miR-125-b1* y abundancia de ERBB2/HER-2 en la línea celular de cáncer mamario SKBR3. **A-** Niveles de la transcripción del microRNA *hsa-miR-125b1* determinados por una reacción de PCR en tiempo real (qRT-PCR) en la línea celular SKBR3 de mama. **B-** Determinación de la abundancia de ERBB2 por medio del ensayo de Western blot en SKBR3 post-transfección del precursor de *hsa-miR-125b1*.

Estos resultados sugieren que la expresión del microRNA *hsa-mir-125b1* está disminuida a causa de la metilación del ADN en su isla CpG asociada a su región promotora, y la reactivación de su expresión se correlaciona con el decremento de la expresión del gen *ERBB2*. Estas observaciones concuerdan con datos publicados, donde el microRNA *hsa-mir-125a* y *hsa-mir-125b* tienen un efecto represor sobre la traducción de ERBB2 y ERBB3, respectivamente (He et al., 2007).

Determinación del estado de metilación de islas CpGs asociadas a microRNAs que tengan como blanco al gen *EGFR*.

Utilizando el mismo abordaje se analizaron *in silico* a todos los microRNAs que pudieran tener como blanco al producto de la expresión del gen *EGFR*. Se evaluó el estado de metilación de las islas CpGs que conforman parte de los elementos de regulación de estos microRNAs demostrando que el microRNA *hsa-mir-34c* no se encuentra metilado en tejido normal de colon y pulmón, mientras que en todas las líneas celulares de colon las islas CpGs están hipermetiladas (Figura 41). Por su parte, para las líneas celulares pertenecientes a estirpe pulmonar encontramos diferencias en su estado de metilación (6 no metiladas de 10 líneas celulares analizadas).

LÍNEA CEL.	ESTIRPE	miR128-1	miR128-2	miR34c
SW480	colon	HEM	HEM	MET
SW460	colon	MET	MET	MET
HCT116	colon	MET	MET	MET
HCT15	colon	HEM		MET
H522	Pulmón	HEM	MET	UN
A549	Pulmón	HEM	MET	UN
A673	Pulmón			UN
H427	Pulmón			MET
H23	Pulmón			UN
H441	Pulmón			MET
H1299	Pulmón			MET
H2126	Pulmón			UN
Calu2	Pulmón			UN
LoVo	colon			MET
CaCo2	colon			MET
RKO	colon			MET
HT2919	colon			MET
L5147	colon			MET
D2D1	colon			MET
Colon Normal	colon	MET	MET	UN
Pulmón Normal	Pulmón	MET	MET	UN
Colon Normal	colon			UN
Pulmón Normal	Pulmón			UN

EGFR (Cáncer de pulmón y colon)

UN

NO- METILADO

MET

METILADO

HEM

HEMIMETILADO

Figura 41. Análisis del estado de metilación del ADN presente en las islas CpGs cercanas a los miRNAs que tienen como blanco al gen *EGFR* evaluado en líneas celulares de cáncer de colon y pulmón. UN, corresponden a secuencias no metiladas. UN, representa al análisis de 8 clonas independientes donde no se observa metilación del ADN; MET, representa al análisis de 8 clonas independientes donde se observa un 70% de metilación del ADN en su isla CpG, y HEM

representa el análisis de 8 clonas independientes donde el estado de metilación del ADN oscila entre un 40 a un 60% en el total de las clonas estudiadas.

Con base a estos resultados, decidimos concentrar nuestros esfuerzos en estudiar el estado de metilación del ADN del microRNA *hsa-mir-34c* para cada una de las líneas celulares de estirpe pulmonar, el cual fue evaluado, por ensayos de bisulfito de sodio y secuenciación (Figura 42A). Encontramos que únicamente las líneas celulares de cáncer pulmonar H-427, H-441 Y H-1299 presentaban un patrón de hipermetilación y como control se utilizó ADN obtenido de dos tejidos pulmonares normales (Figura 42B). Éste resultado fue corroborado por ensayos de PCR sensible a metilación (MS-PCR; Figura 42C).

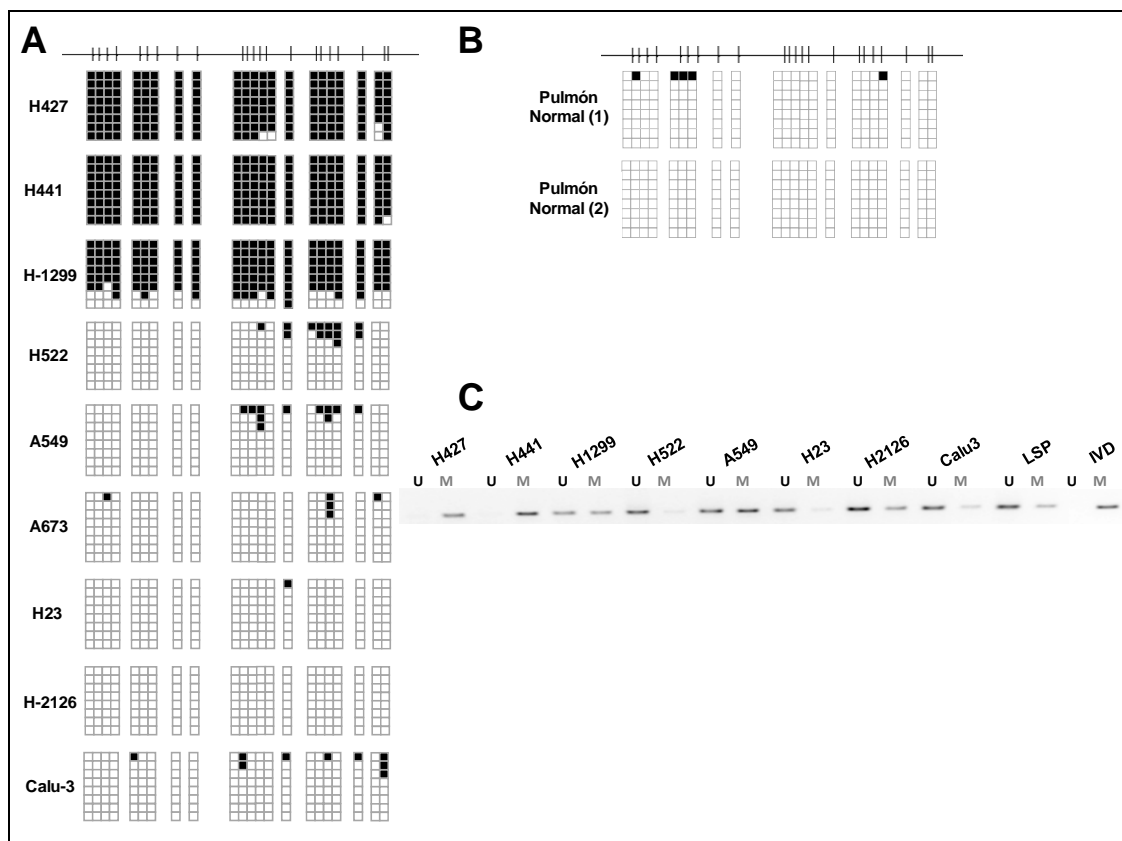


Figura 42. Análisis del estado de metilación del ADN de la isla CpG cercana al *hsa-mir-34c*. **A-** Evaluación del estado de metilación del ADN por bisulfito de sodio y secuenciación de la isla CpG cercana al microRNA *hsa-mir-34c*. **B-** Como control se utilizó ADN convertido por bisulfito de sodio obtenido de dos tejidos pulmonares normales independientes. **C-** Evaluación del estado de metilación del ADN de la isla CpG de este microRNA, mediante reacciones de PCR sensible a metilación (MSP) en distintas líneas celulares tumorales de cáncer mamario, como

control positivo de la metilación se utilizó ADN metilado *in vitro* por medio de la metilasa SssI (IVD). U representa a al producto de amplificación del templado no metilado y M representa a la amplificación del producto del templado metilado.

Esta familia de microRNAs es ampliamente estudiada debido a que se les ha asociado con una función de gen supresor de tumores, en particular, se han visto involucrados en el arresto del ciclo celular, senescencia y apoptosis (Welch y Wang, 1995). En mamíferos la familia de *miR-34* está compuesta principalmente por tres microRNAs, donde *hsa-miR34b* y *hsa-miR-34c* quienes comparten un transcrito primario en común. La expresión de estos microRNAs varía dependiendo de los tejidos. En ratón el miR-34a se expresa mayoritariamente en cerebro, mientras que los *mirR-34b/c* se expresan en pulmón sugiriendo una actividad tejido específica (Bommer et al., 2007). Es por ello que nos avocamos en tratar de determinar una función biológica para dicho microRNA, restituimos la expresión del microRNA mediante la transfección del microRNA maduro *hsa-miR-34c* en la línea celular H-1299 proveniente de cáncer de pulmón, donde sabemos que el promotor de este microRNA se encuentra hipermetilado.

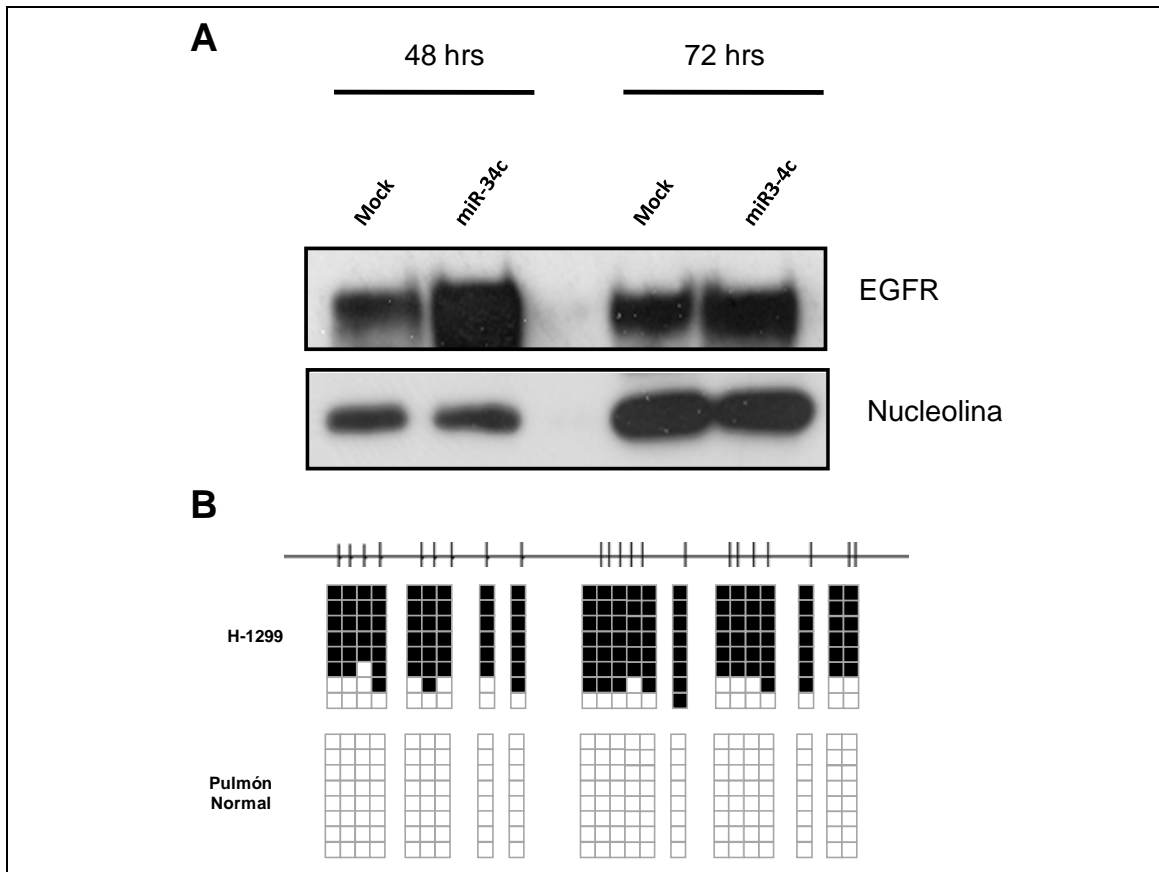


Figura 43. Efecto funcional del microRNA *hsa-miR-34c* sobre la expresión del gen *EGFR*. **A-** Western blot en la línea celular pulmonar H-1299 post-transfección del precursor de *hsa-miR-34c*. En dicho ensayo se transfectó cada 24 horas el siRNA, donde los datos se evaluaron a 48 horas y 72 horas, respectivamente. Como control negativo se transfectó a *hsa-miR-1*. **B-** Evaluación por bisulfito de sodio y secuenciación de la metilación del ADN del promotor del *hsa-miR-34c* en la línea celular H-1299 transformada de pulmón y en tejido normal de pulmón. Los recuadros negros indican metilación del ADN de un CpG y los blancos ausencia de metilación del ADN.

CONCLUSIÓN.

El cáncer es fundamentalmente una patología tanto genética, como epigenética que requiere la acumulación de estos dos tipos de alteraciones genómicas y que conllevan a la inactivación de genes supresores de tumores (*Rb*, *p53*) y/o la activación de proto-oncogenes como *Myc* y *Ras*, entre otros (Kent y Mendell 2006). En la actualidad aparte de los ya clásicos TSG y oncogenes se ha observado que ciertos microRNAs presentan funciones similares, en particular por los blancos que regulan. Por ello, se han visto implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación celular y en apoptosis. En cáncer un gran número de los microRNAs se han visto desregulados, observándose tanto sobre-expresados como silenciados, lo cual contribuye a la transformación celular. Estudios recientes han demostrado que los microRNAs de la familia *hsa-miR-34* son componentes importantes de la vía de regulación de *p53*, por lo tanto han sido catalogados como genes supresores de tumores (Wendt y Peters, 2009; Bommer et al., 2007; Chang, et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007). A su vez se ha reportado que los microRNA *hsa-mir-125a* y *hsa-mir-125b* tienen la capacidad de unirse al extremo 3'-UTR de los genes *ERBB2* y *ERBB3*, respectivamente, apoyando su actividad de TSG (He et al., 2007). Aunque muchos de ellos se han visto desregulados en cáncer. En el presente estudio demostramos que los promotores predichos para los microRNAs *hsa-mir-34c*, y *hsa-mir-125-b1* están metilados, derivando en la disminución de la expresión de los mismos. Esto sugiere que la hipermetilación del ADN en islas CpGs de los elementos de control de los microRNAs *hsa-miR125-b1* y *hsa-mir-34c* representa un

mecanismo de silenciamiento epigenético con consecuencias directas sobre sus genes blancos. Más importante aún, el tratamiento con un inhibidor de metilación como la 5-aza-2'-deoxicitidina logra recuperar la expresión de los microRNAs por medio del borrado de la metilación del ADN.

PERSPECTIVAS.

Con base a los resultados obtenidos relacionados con la de metilación del ADN en la secuencias de los promotores de los microRNAs, valdría la pena buscar nuevos blancos génicos de regulación de los microRNAs *hsa-miR-34c* y *hsa-miR-125b1*.

Anexo 2-

Efecto de la metilación *in vitro* sobre los promotores de genes supresores de tumores *Rb* y *p53*.

Aproximadamente el 70% de los promotores de genes humanos se encuentran asociados a islas CpGs. De estos se ha reportado que de 15,609 promotores humanos se pueden catalogar principalmente en tres tipos con relación a la densidad de CpGs que presentan: las islas CpG de alta densidad (HCP), las de baja densidad (LCP) y las de una densidad intermedia (ICP) (Weber et al., 2007). Aparentemente ésta clasificación de islas CpGs tiene una repercusión directa en los mecanismos epigenéticos involucrados en el silenciamiento de los promotores génicos embebidos en ellas (ver introducción general). De manera interesante, en el laboratorio se han desarrollado estudios de silenciamiento epigenético de dos genes supresores de tumores cuyos promotores corresponden a islas CpGs con características distintas. El promotor del gen de Retinoblastoma puede ser catalogado como una isla CpG de alta densidad (HCP) dado que contiene 27 CpGs distribuidos en los 400 pb del promotor mínimo de este gen; mientras que el promotor del gen *p53* humano presenta una isla CpG intermedia (ICP), la cual contiene 16 CpG en el promotor mínimo del gen dentro de una región de 350 pb (ver Figura 44A). En lo particular, estamos interesados en conocer las diferencias de la metilación incorporada *in vitro* en dos promotores asociados a islas CpG con características distintas.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la metilación *in vitro* sobre los promotores de genes supresores de tumores *Rb* y *p53* que presentan islas CpGs con características distintas.

Para el desarrollo de esta parte del proyecto se construyeron dos plásmidos: uno de ellos contiene al promotor mínimo de *Rb* (pGL*Rb*) (De-la-Rosa-Velázquez, datos no publicados) y otro al promotor de *p53* (pGL3*p53*) (Figura 44A). Estos plásmidos contienen al gen de la Luciferasa (*Luc*) como gen reportero. Con el fin de conocer el efecto de la metilación del ADN sobre dos estos promotores asociados a distintos tipos de islas CpGs procedimos a metilar *in vitro* a los plásmidos pGL*Rb* y pGL3*p53* a diferentes tiempos (0, 2, 3 y 4 horas de metilación *in vitro* del ADN; Figura 44). Para ello, se utilizó a la metilasa Sssl. Esta enzima tiene la capacidad de agregar un grupo metilo en el dinucleótido 5'-C^mpG-3'. Con el fin de corroborar la metilación de los plásmidos, el ADN plasmídico fue digerido con la enzima metilo-sensible HpaII, en donde, a mayor densidad de metilación del ADN menor cantidad de corte por parte de la enzima (Figura 44B). Los datos demostraron que a mayor tiempo de incubación con la enzima Sssl se presenta un mayor número de dinucleótidos CpGs metilados (Figura 44B). Una vez corroborada la metilación de los plásmidos estos fueron transfectados de manera transitoria en células HeLa y 48 horas post-transfección se evaluó la actividad de Luciferasa. Los resultados mostraron que para el promotor de *Rb* existe un comportamiento inversamente proporcional entre la actividad de Luciferasa y el grado de metilación del plásmido, es decir, que a mayores tiempos de incubación con la metilasa Sssl menor actividad del gen reportero. De manera interesante, para el caso del

promotor de *p53*, la actividad de *Luc* se abate en su totalidad al usar un plásmido que fue metilado *in vitro* durante dos horas (Figura 44C). Estos datos sugieren diferencias en la sensibilidad de los promotores con relación a la metilación del ADN, siendo el *p53* el promotor mucho más sensible, *in vitro*, a su silenciamiento por metilación del ADN a pesar de tener una menor densidad de dinucleótidos CpGs (Figura 44C). Por medio de la técnica de bisulfito de sodio y secuenciación se evaluó el estado de metilación del ADN en los distintos tiempos de incubación con la metilasa *SssI* sobre el promotor de *Rb* (Figura 44D). La secuenciación de las muestras transformadas del promotor de *Rb* sugiere que tiene mayor capacidad de contender en contra de la metilación del ADN debido a que incluso después de tres 3 horas de incubación con la metilasa y presentar más de un 90% de metilación éste mantiene cierta actividad del gen reportero (Figura 44D).

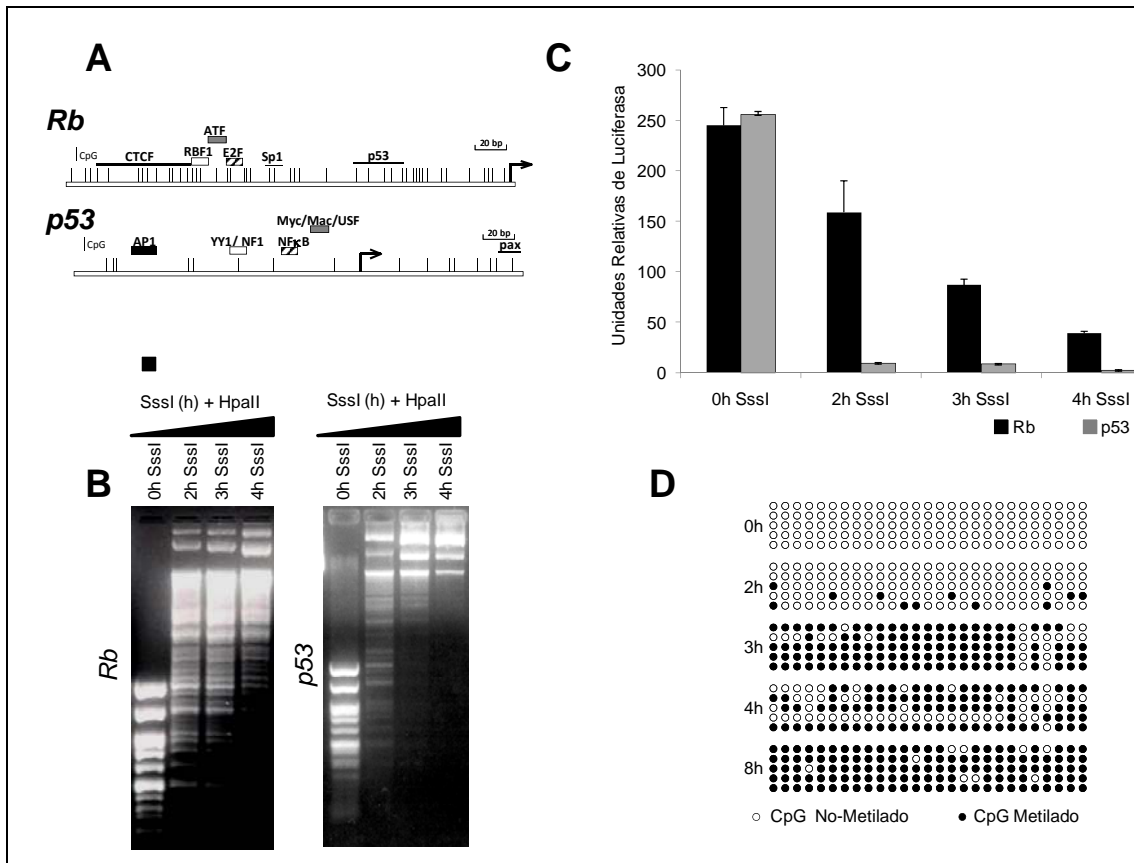


Figura 44. Efecto de la metilación del ADN *in vitro* sobre los promotores de los genes *Rb* y *p53*. **A-** Esquemas de los promotores de los genes *Rb* y *p53* donde cada una de las rayas verticales representan a cada uno de los dinucleótidos CpG presentes en cada uno de ellos. **B-** Evaluación del efecto de la metilasa SssI sobre los plásmidos pGL*Rb* y pGL3*p53* mediante la digestión con la enzima metilo-sensible HpaII. **C-** Efecto de la metilación del ADN sobre la actividad de los promotores *Rb* y *p53* evaluado por medio de la cuantificación del gen reportero Luciferasa (*Luc*). Los plásmidos fueron transfectados transitoriamente en células HeLa. **D-** Evaluación por bisulfito de sodio y secuenciación del estado de la metilación del ADN sobre el promotor *Rb* del ensayo de transfección transitoria. Los círculos negros indican metilación del ADN de un CpG y los blancos ausencia de metilación del ADN.

El hecho de que todo el plásmido estuviera siendo metilado en el ensayo anterior nos planteo la incertidumbre de que las diferencias observadas entre los promotores de *Rb* y *p53* se debía a que la metilación en el resto del plásmido pudiera alterar la actividad de los promotores sobre el gen reportero Luciferasa ó incluso al propio gen reportero.

Con el fin de abordar esta pregunta decidimos metilar diferencialmente tanto la región promotora y de manera independiente al vector. Una vez realizada la metilación *in vitro*, se llevó a cabo una ligación de manera

direccional de ambos vectores (pGLRb y pGL3p53), respectivamente, para finalmente ser transfectados transitoriamente en células HeLa (Figura 45).

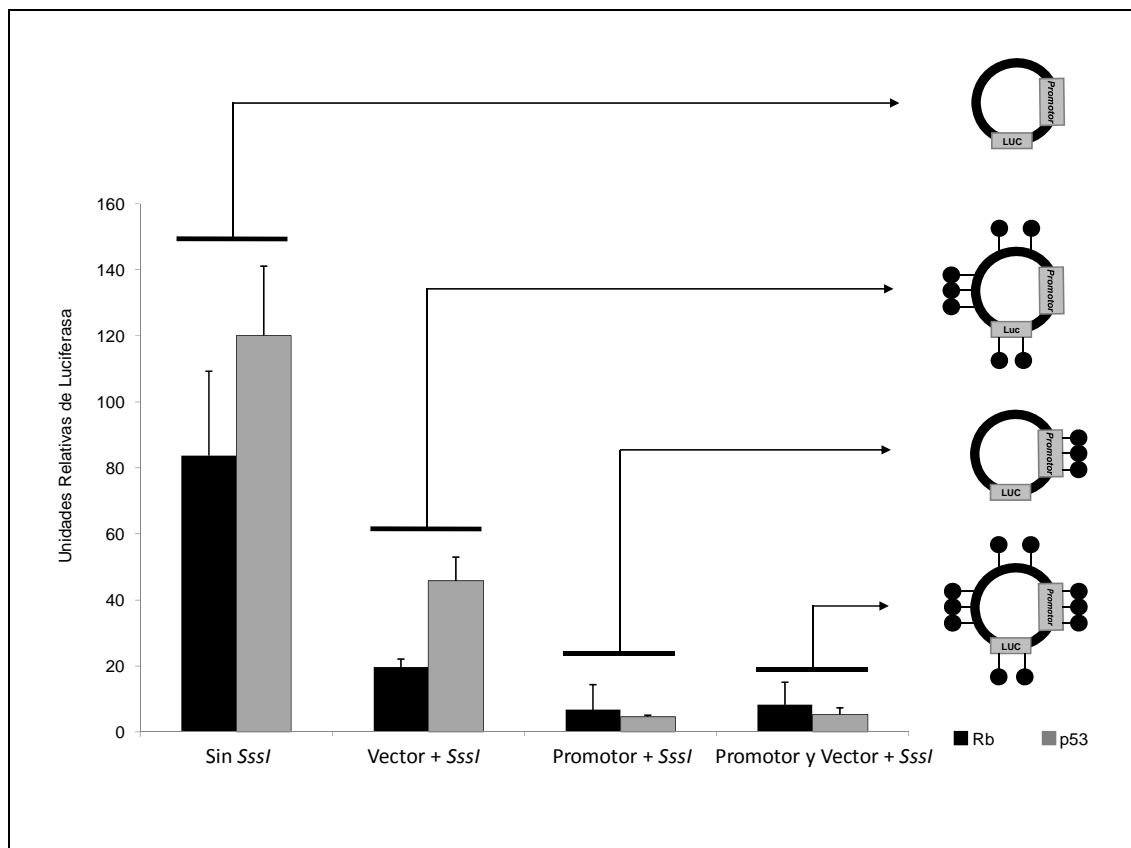


Figura 45. Efecto de la metilación del ADN *in vitro* de manera diferencial del plásmido. Para ello se metiló los promotores y el vector durante ocho horas utilizando a la metilasa SssI, posteriormente estos fueron ligados y directamente transfectados transitoriamente en células HeLa.

Los resultados obtenidos demuestran que la metilación del promotor es capaz de silenciar epigenéticamente de manera específica a ambos promotores. A su vez, la metilación del vector causa una disminución de la actividad del gen reportero sin ser tan notoria como la determinada para el caso en el cual el promotor fue metilado *in vitro* exclusivamente. De igual forma, los datos de metilación *in vitro* del ADN a tiempos largos postulan que las diferencias de silenciamiento entre ambos promotores (*Rb* y *p53*) pudieran deberse en las características inherentes de sus promotores. En particular, la drástica disminución de la expresión del gen reportero en *p53* a las dos horas

de incubación con la metilasa podría deberse a la metilación particular de alguno de los CpG contenidos en la secuencia de su promotor. Por ello, decidimos evaluar la sensibilidad del promotor de *p53* en contra de la metilación del ADN, a tiempos cortos de incubación. Se decidió metilar únicamente al promotor de *p53* a 15, 30, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente (Figura 46). Posteriormente los plásmidos fueron transfectados transitoriamente en células HeLa (Figura 46A). Los resultados muestran que desde los 15 minutos de incubación con la metilasa Sssl se observa una disminución dramática en la actividad del gen reportero. Con el fin de corroborar que efectivamente la metilasa tiene actividad a estos tiempos de metilación, una parte de la reacción fue digerida con la enzima metilo-sensible *HpaII* y posteriormente se procedió a realizar una reacción de PCR utilizando a los oligonucleótidos sintéticos de la región promotora del *p53* (Figura 46B). La amplificación de un templado en la reacción de PCR sugiere que el promotor del gen se encuentra metilado en cada uno de los tiempos experimentales. Como control de la reacción se utilizó al isoesquizómero de *HpaII* (*MspI*) la cual no es metilo-sensible (Figura 46B). Con todos estos datos nos concentramos en determinar el estado de metilación del ADN en cada uno de los 17 CpGs presentes en el promotor del gen a 15 minutos de incubación con la metilasa (Figura 46C).

En resumen estos datos generados *in vitro* sugieren fuertemente que la composición de cada tipo de isla CpG puede ser crítica para su silenciamiento por metilación del ADN.

PERSPECTIVAS.

Con el fin de concretar parte del proyecto es necesario analizar el efecto de metilación a tiempos cortos sobre el promotor del gen de retinoblastoma, de igual forma realizar el análisis de bisulfito de sodio y secuenciación, con el fin de determinar cuáles pudieran ser los principales CpG metilados a tiempos cortos.

Anexo 3-

Presencia de la proteína HP1 en el promotor del gen *p53* humano en linfocitos de sangre periférica.

En la actualidad se carece de un estudio que describa las modificaciones epigenéticas presentes en el promotor endógeno del gen *p53* humano en células no transformadas. Por ello nos enfocamos en estudiar el tipo de marcas epigenéticas presentes en dicho promotor. Utilizamos como sistema experimental compuesto por linfocitos de sangre periférica provenientes de dos individuos sanos, donde se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). En él, observamos un enriquecimiento de la histona H3 dimetilada en la lisina 9 (H3K9me2) y sorprendentemente a la proteína de heterocromatina 1 (HP1) (Figura 47). Este resultado sugiere, una vía por la cual H3K9me2 y la unión de la proteína de HP1 son en parte responsables, de modular epigenéticamente y de manera negativa la expresión del gen *p53* en un contexto celular normal. Esto abre un campo de estudio inédito, debido a que nuestros resultados plantean por primera vez, que ciertas marcas represivas de las histonas, pudieran estar modulando negativamente la conformación cromatínica asociada al promotor *p53* y por ende su expresión, y que de forma regulada deben ser revertidas. Por otra parte, esta observación es consistente con los datos obtenidos en las líneas celulares tumorales de origen epitelial y fibroblastos normales (ver Figura 13). En la actualidad han descrito desmetilasas de histonas, denominadas “Jumonji” las cuales tienen la capacidad de revertir el estado de metilación de múltiples marcas en las histonas, incluida a la H3K9me2

(Takeuchi et al., 2006). Uno de tantos modelos posibles, contempla que la expresión del gen, dirigida por su promotor en condiciones normales es prácticamente nula, por lo cual las desmetilasas de histonas pudieran estar involucradas en la regulación positiva del gen vinculada a una respuesta rápida a distintos tipos de estímulos. Por lo tanto, el estudio de las Jumonji sobre la regulación del promotor del gen *p53* humano en células normales sería de gran relevancia en un futuro próximo.

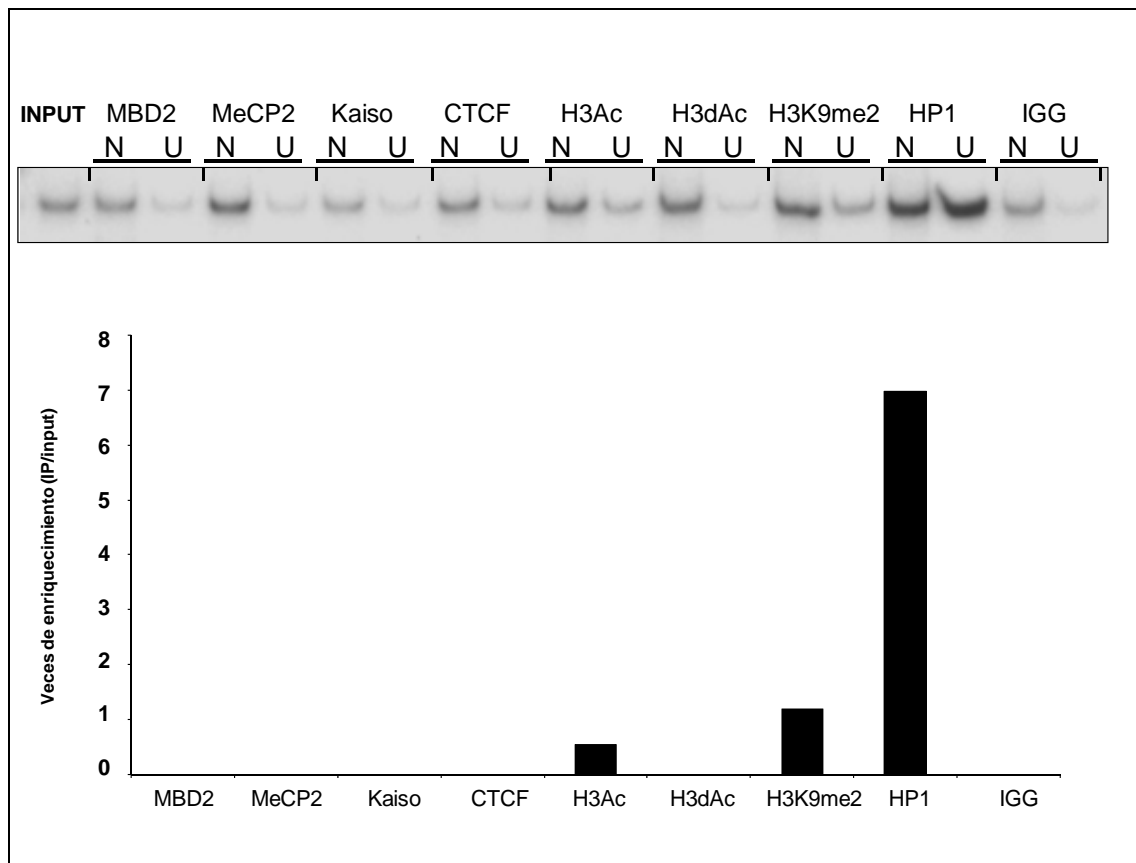


Figura 47. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) sobre el promotor *p53* en linfocitos de sangre periférica humana. Para este estudio se emplearon anticuerpos que reconocen a proteínas de unión al ADN metilado como MBD2, MeCP2 y Kaiso, como también de modificaciones en las histonas. En este resultado se observa la presencia de la histona H3 lisina 9 dimetilada (H3K9me2) y la proteína HP1.

PERSPECTIVAS.

Las recientes publicaciones relacionadas con la función de enzimas desmetilantes de histonas “Jumonji” sugieren que podrían ser blanco de las vías de *Rb* y *p53* (Pfau et al., 2008). Debido a que nuestros datos sugieren la presencia de HP1 en células quiescentes, sería de gran relevancia concentrarse en células inducidas evaluando así presencia de estas marcas represivas como también de las desmetilasas de histonas determinando así su efecto sobre la expresión del gen. Este tipo de experimentos también podrían llevarse a cabo en condiciones de estrés celular.

Anexo 4-

Defectos estructurales del nucléolo causados por la ausencia del factor nuclear CTCF.

El nucléolo es una estructura visible en el núcleo, la cual tiene como función principal la biogénesis ribosomal. También se ha visto involucrado con otras funciones como la retención de moléculas relacionadas al ciclo celular y la apoptosis, entre otras (Hernandez-Verdun, 2006). En el nucléolo se lleva a cabo la transcripción de los genes ribosomales (rDNA), procesamiento del RNA ribosomal (rRNA) 47S y el inicio del ensamblaje de las proteínas ribosomales como el RNA 5S, formando así a la subunidades pequeñas y grandes del pre-ribosoma. El nucléolo puede variar en tamaño y número dependiendo de la actividad, estado de proliferación o diferenciación celular (Hernandez-Verdun, 2006).

Organización nucleolar.

Existen tres componentes nucleolares visibles por microscopía electrónica (Figura 48). Los centros fibrilares (FC) quienes están parcial o completamente rodeados por una zona electrón densa conocida como componente fibrilar denso (DFC). Tanto los FC como los DFC están embebidos en un componente granular (GC), mayoritariamente compuesto por gránulos de 15-20 nm de diámetro (Junéra et al., 1995). Los FC pueden variar en tamaño y número y son inversamente proporcionales entre el tamaño y número. El transcrito naciente proveniente de los genes ribosomales se localiza en la unión entre la región del FC y del DFC acumulándose el transcrito en esta última (Junéra et al., 1995).

El nucléolo a su vez está compuesto de múltiples proteínas como la fibrilarina y la nucleolina que participan en las etapas tempranas del procesamiento del RNA ribosomal (RNAr). Dichas proteínas se localizan a lo largo del DFC con el RNA pequeño no-codificante (snoRNA) U3, mientras que las proteínas B23 y Nop52 se localizan en GC; estas participan en las etapas intermedias y tardías de la biogénesis ribosomal (Puvion-Dutilleul et al., 1991).

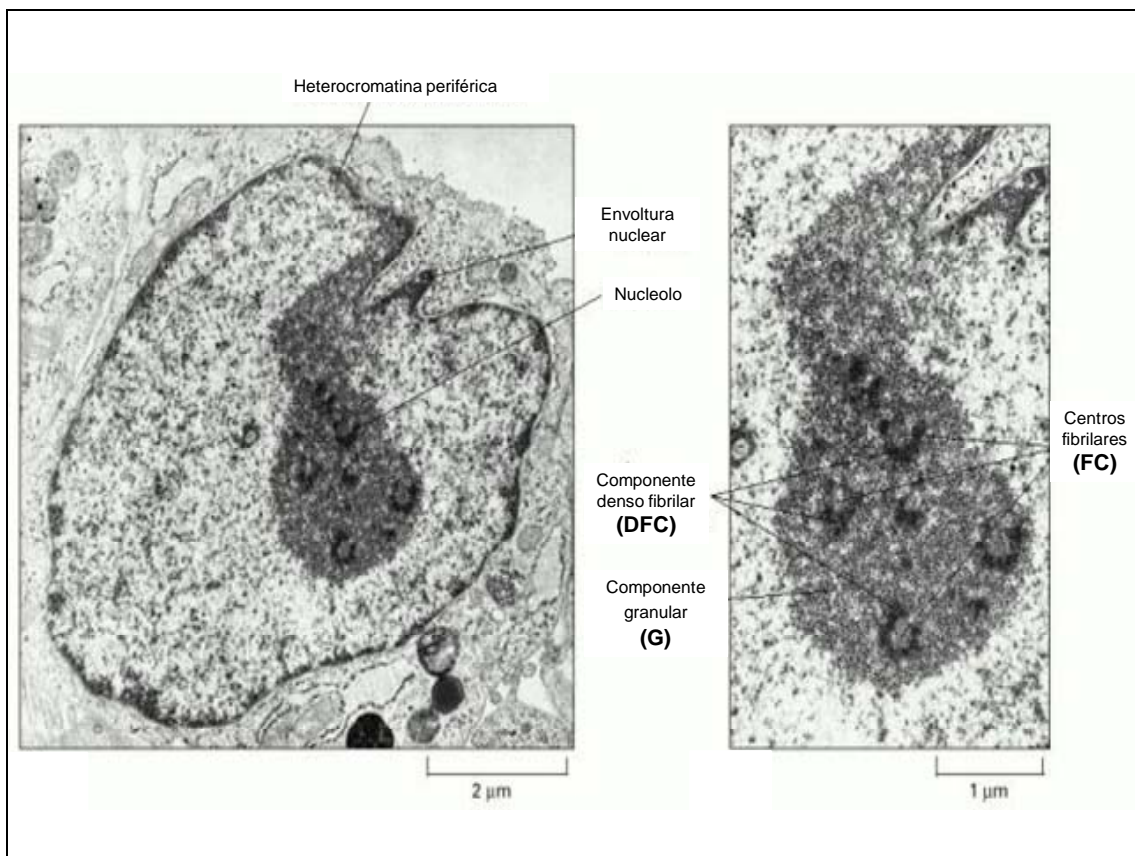


Figura 48. Estructura del nucléolo. Micrografía electrónica donde se muestran los tres componentes principales del nucléolo como los centros fibrilares (**FC**), los componentes fibrilares densos (**DFC**), y los componentes granulares (**G**).

A su vez, por medio de la microscopía electrónica se ha logrado observar una cromatina condensada en el nucléolo, la cual no llega a ser tan densa como en el núcleo, lo cual mediante tinciones específicas del DNA (como DAPI) no se logra evidenciar (Hernandez-Verdun, 2006).

Ensamblaje nucleolar al final de la mitosis.

En eucariontes, el nucléolo se ensambla durante la transición de mitosis/interfase. Este ensamblaje requiere a su vez la reactivación de la maquinaria de transcripción del ADNr (Sirri et al., 2008). Las proteínas nucleolares encargadas en la transcripción del RNAr son la polimerasa I y sus factores transcripcionales asociados, mientras que las proteínas B23, Nop52, nucleolina y Rpp29 tienen que ver con el procesamiento (Hernandez-Verdun, 2006). Las proteínas involucradas en el procesamiento del pre-rRNA abandonan el nucléolo durante la profase y se localizan mayoritariamente en la periferia de los cromosomas durante la mitosis. Se ha demostrado que muchas de las proteínas nucleolares son altamente dinámicas, asociándose y disociándose en un continuo intercambio con el nucleoplasma (Sirri et al., 2008). Durante la anafase, las proteínas involucradas en el procesamiento temprano y tardío (fibrilarina, Bop1, B23, y Nop52) se distribuyen homogéneamente alrededor de los cromosomas. Mientras que en la telofase y la fase G1 temprana ocurre una translocación desde la periferia cromosómica hacia los sitios de transcripción, para posteriormente concentrarse en *foci* específicos conocidos como cuerpos prenucleolares (PNB). Los PNB son estructuras discretas fibrogranulares visibles por microscopía electrónica. La formación de PNB es un fenómeno que ocurre durante el ciclo celular y el desarrollo. Se ha observado que la fibrilarina es una de las proteínas que primero abandona a los PNB y es reclutada a los sitios de transcripción, mientras que la mayoría de las proteínas se mantienen en los PNBs (Hernandez-Verdun, 2006).

El nucléolo y el cáncer.

La morfología y el número de nucléolos dependen de la actividad celular. Especialmente en cáncer, la hipertrofia del nucléolo es uno de los mayores cambios citológicos observables en células cancerosas. En cáncer el nucléolo puede variar en tamaño, forma y número, ocurriendo frecuentemente la hipertrofia nucleolar y la irregularidad en su forma en células cancerosas (Derenzini et al., 2002). Mediante la técnica de impregnación argéntica o AgNOR es posible evidenciar la distribución de proteínas nucleolares en tejidos malignos reconociendo así defectos en las regiones organizadoras nucleolares (NOR) (Treré et al., 2004). Esta técnica tiene la capacidad de resaltar a dos de los componentes principales del nucléolo: la nucleolina y las proteínas B23 (Derenzini et al., 2002). La cantidad de impregnación del AgNOR también ha sido utilizada para conocer el estado de proliferación celular de células cancerosas (Derenzini et al., 2002). Donde incluso se ha utilizado como un indicador del pronóstico de distintas neoplasias, evidenciando una relación entre la función del núcleo y la proliferación del cáncer (Mojgan et al., 2008).

El factor CTCF y su relación con el nucléolo.

Hoy en día es bien sabido que el factor CTCF está estrechamente ligado en la organización nuclear; se han observado interacciones dinámicas entre CTCF y las fibras de cromatina en el contexto de la arquitectura nuclear, lo cual repercute en múltiples funciones genómicas (Ohlsson et al., 2010).

Una de las interrogantes actuales es el conocer si el factor CTCF también tiene implicaciones en la estructura nucleolar, lo cual podría tener un impacto importante en la biogénesis de éste componente celular.

Ensayos *in vivo* han demostrado que el factor CTCF co-purifica y co-localiza con proteínas nucleolares como la nucleofosmina (Yusufzai et al., 2004). Interesantemente, CTCF presenta una distribución dependiente del ciclo celular (Zhang et al, 2004). En células en interfase la localización de CTCF es nuclear, donde mayoritariamente se excluye del nucléolo. Durante la mitosis CTCF se ha visto asociado a centrómeros, especialmente durante la metafase y anafase. En la telofase CTCF se disocia de los centrómeros y se re-localiza principalmente en el núcleo (Zhang et al., 2004). A la par existen reportes en donde se ha observado a CTCF en el nucléolo en diferentes modelos experimentales. Como ejemplo de ello se ha descrito la translocación de CTCF del núcleo hacia el nucléolo durante la diferenciación de la línea celular mieloide K562 y en el proceso de apoptosis en la línea celular mamaria MCF7 (Torrano et al., 2006; Kantidze et al., 2007; Liu et al., 2008). La localización nucleolar ha sido asociada con el arresto del ciclo celular. Interesantemente el CTCF presente en el nucléolo se encuentra post-traduccionalmente modificado por (ADP-ribosil)ación, modificación post-traducciona que tiene la capacidad de inhibir la transcripción nucleolar (Torrano et al., 2006). Aparentemente un dominio central de los dedos de zinc es el responsable de translocar a CTCF hacia el nucléolo (Torrano et al., 2006). Todos estos antecedentes nos hacen suponer que la presencia de CTCF en el nucléolo es importante para distintos procesos celulares como el arresto del ciclo celular. De manera paralela existen evidencias que sugieren una función estructural para el factor CTCF a nivel del núcleo (Guelen et al., 2008; Cuddapah et al., 2009), pero hasta ahora se desconoce su papel en la estructura y función del nucléolo.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el papel de CTCF en la formación y organización del nucleolar.

OBJETIVO PARTICULAR.

Evaluar las repercusiones estructurales del nucléolo en células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF).

RESULTADOS.

Con el fin de evaluar la posible contribución de CTCF sobre los organizadores nucleolares se utilizó la técnica de impregnación argéntica o AgNOR. Esta técnica permite estudiar a los componentes proteicos asociados a la región organizadora del nucléolo (NOR), como también el número, tamaño y armonía (forma normal) del nucléolo. Dicho ensayo se realizó en dos contextos celulares distintos, para ello se emplearon las líneas celulares previamente descritas HeLa y HeLa-kd-CTCF (Figura 21). En primera instancia se corroboró que las células a evaluar fueran deficientes a CTCF mediante el ensayo de Western blot (Figura 49A). Posteriormente mediante microscopio óptico se evaluó el estado de las proteínas pertenecientes a los organizadores nucleolares impregnadas en con la técnica de AgNOR, cien células fueron evaluadas para cada condición (HeLa y HeLa-kd-CTCF) (Figura 49B y C). Las células que presentaron una estructura normal de NOR se les denominó armónicas, mientras que aquella que presentaran una desorganización de los organizadores nucleolares se les denominó disarmónicas (como foto representativa ver la Figura 49C, panel inferior).

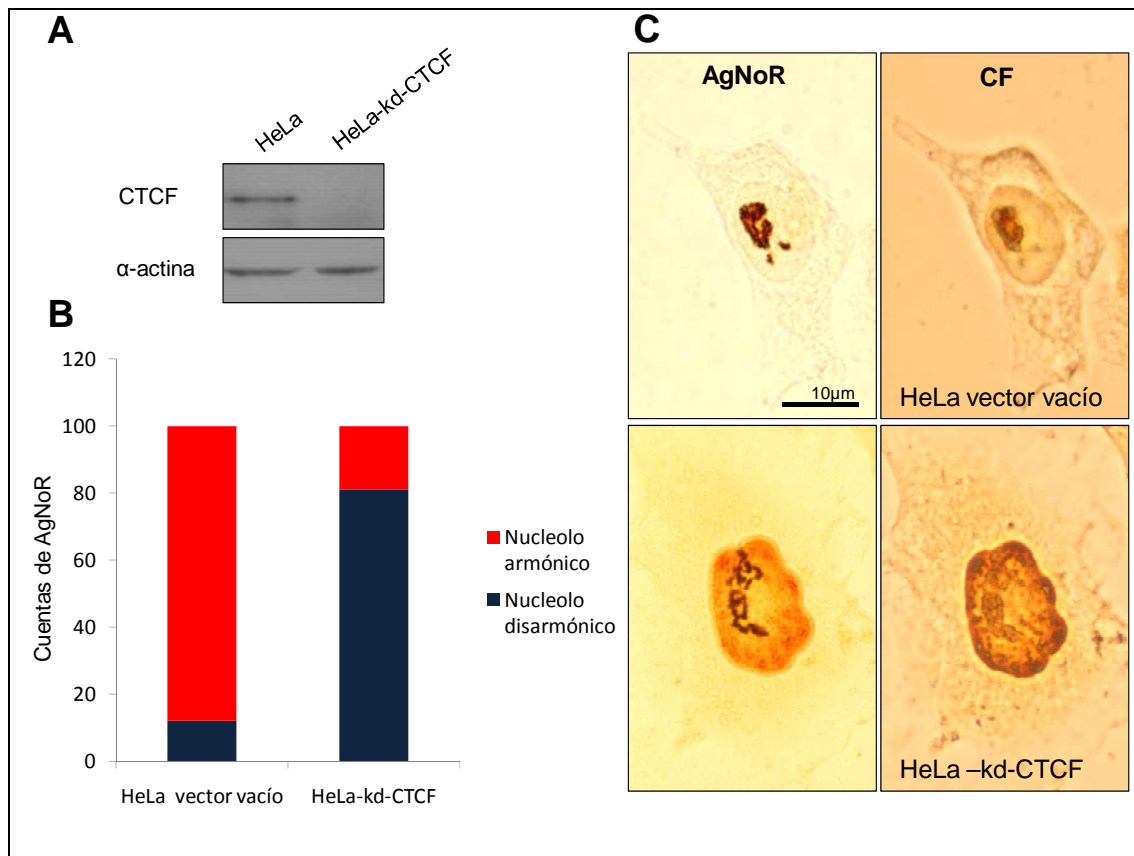


Figura 49. Evaluación del estado estructural de la región organizadora del nucléolo (NOR) mediante la impregnación argéntica AgNOR. **A-** Caracterización de la abundancia del factor nuclear CTCF en las células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF) comparadas con HeLa mediante Western blot. **B-** Grafica de la evaluación del estado estructural de los NOR, para ello se contaron 100 nucléolos celulares de cada una de las condiciones (HeLa y HeLa-kd-CTCF), a los NOR con estructuras normales se les denominó armónicos, mientras aquellos que presentaban un des-arreglo estructural se les denominó disarmónicos. **C-** Ejemplificación de las células impregnadas por la técnica de AgNOR donde se puede apreciar que las células HeLa vector vacío presentan la región organizadora del nucléolo normal, mientras que en las HeLa-kd-CTCF (panel inferior) se puede apreciar la desorganización estructural del NOR. Estos datos fueron evaluados con campo claro y contraste de fases (CF). La línea representa un tamaño de 10 μ M.

Estos datos sugieren que la ausencia de CTCF causa una desorganización de las proteínas pertenecientes a los componentes nucleolares. Con el fin de conocer el grado y estructuras afectadas en el nucléolo se procedió a realizar micrografías electrónicas de ambos contextos celulares (Figura 50). En las células HeLa se pone en evidencia la presencia de dos de los tres principales componentes del nucléolo (Componente granular y componente fibrilar denso), mientras que en las células HeLa-kd-CTCF se

aprecian distintos grados de desorganización de los componentes nucleolares que van desde la deslocalización de los centros fibrilares (Figura 50B, B-D) hasta la desorganización generalizada de todos sus componentes (Figura 50E y F). Con base a estos datos decidimos determinar cuáles de los componentes de NOR se encontraban desorganizados; para ello realizamos la técnica de AgNOR a nivel ultra estructural.

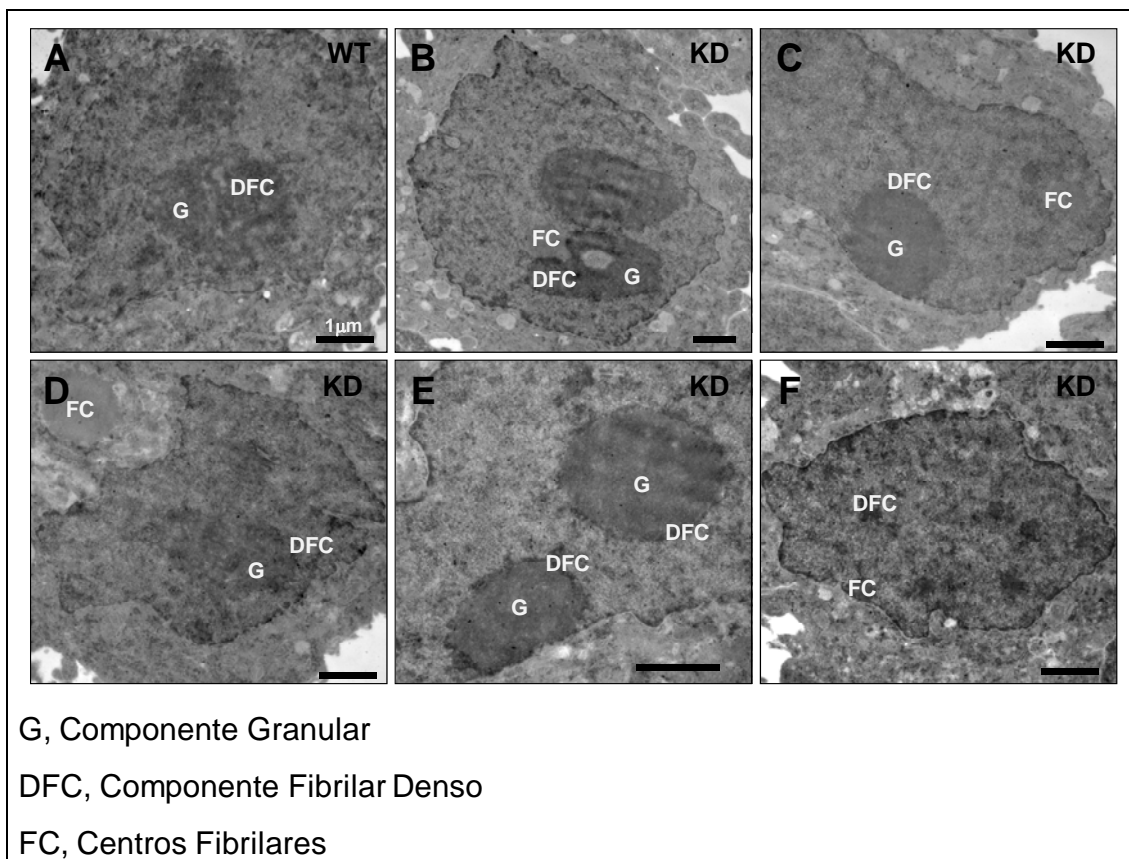


Figura 50. Análisis ultra estructural del nucléolo en células HeLa y células deficientes a CTCF HeLa-kd-CTCF. Estos datos fueron estudiados en cortes semi-finos evaluados con la técnica general de tetróxido de osmio. **A-** Micrografía del nucléolo de HeLa donde se aprecian dos de los tres componentes principales del nucléolo. **B, C, D, E y F-** Micrografía del nucléolo de HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se distinguen diferentes grados de desorganización de los componentes nucleolares. La G: Componente Granular, DFC: Componente Fibrilar Denso, y la FC: Centros Fibrilares. La barra representa un tamaño de 1 μm en todas las imágenes.

Para nuestra sorpresa las células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF) presentaban “hoyos” en las zonas perteneciente al componente granular y al fibrilar denso. Estos datos sugieren que la ausencia de CTCF induce la pérdida

o desorganización de las proteínas asociadas a alguno de estos componentes y por ende su estructura.

Por la literatura sabemos que al interior de los centros fibrilares se distribuye la fibrilarina, mientras que en los componentes granulares se distribuye mayoritariamente a la nucleofosmina y la proteína B23. Por medio de Western blot e inmunofluorescencias evaluamos la abundancia de fibrilarina en ambos contextos celulares (HeLa y HeLa-kd-CTCF ver Figura 52A y 53).

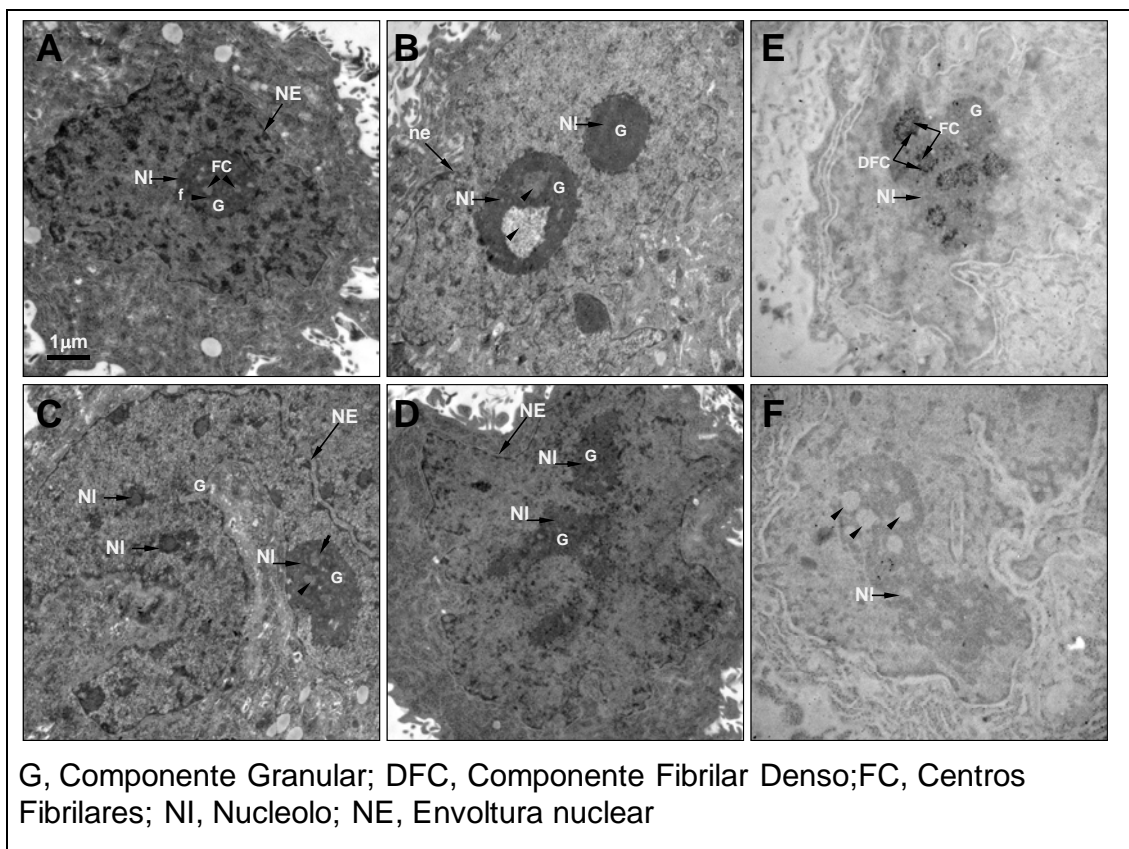


Figura 51. Ultra estructura del nucléolo en células HeLa y células deficientes a CTCF HeLa-kd-CTCF evaluado por la técnica de impregnación argéntica AgNOR. **A-** Micrografía del nucléolo de HeLa donde se aprecian los tres componentes principales del nucléolo señalado con flechas. **B-** Micrografía del nucléolo de células HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se puede apreciar la presencia de “hoyos” (marcados con flechas) en el componente granular. **C-** Micrografía del nucléolo de HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se puede apreciar la presencia de “hoyos” (marcados con flechas) en el componente granular también se puede observar pequeños fragmentos del nucléolo en el nucleoplasma. **D-** Micrografía del nucléolo de células HeLa deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se aprecia una total disgregación de los componentes nucleolares (núcleolo disarmónico). **E-** Micrografía del nucléolo en células HeLa donde se observa el componente granular parcialmente contrastado, el componente fibrilar denso altamente contrastado y los centros fibrilares parcialmente contrastados. **F-** Micrografía del nucléolo de HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se puede apreciar la presencia de “hoyos” (marcados con flechas) el componente granular está

parcialmente contrastado. La G: Componente Granular, DFC: Componente Fibrilar Denso, la FC: Centros Fibrilares, NI: nucléolo y NE: envoltura nuclear. La barra representa un tamaño de 1 μ M en todas las imágenes.

De manera importante logramos apreciar que en células deficientes a CTCF carecen de fibrilarina (Figura 52A). Estos datos sugieren que el factor CTCF puede estar involucrado en la transcripción o traducción de la fibrilarina y/o otros componentes del NOR.

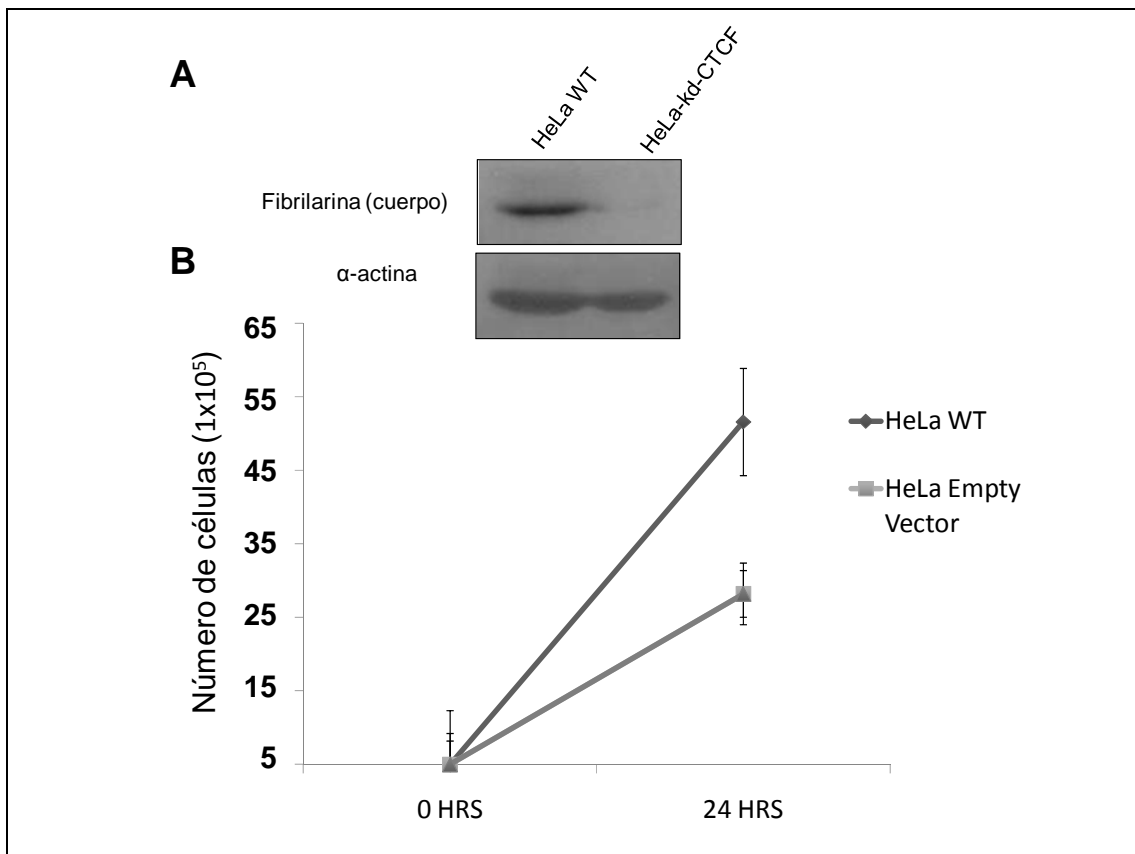


Figura 52. Evaluación funcional de la ausencia de CTCF sobre los organizadores nucleolares y sobre el ciclo celular. **A-** Determinación de la abundancia de fibrilarina en células HeLa y células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF) por medio de Westen blot. Como control de carga se evaluó a la α -actina. **B-** Evaluación del ciclo celular mediante “Doubling time” en células HeLa wt, HeLa transfectada establemente con el vector vacío y células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF).

Especialmente la fibrilarina participa en el procesamiento temprano del RNAr, por lo cual su ausencia podría afectar la sobrevivida celular. Por esto, nos concentramos en determinar la tasa de división celular mediante un ensayo de

“doubling time” (Figura 52B). Para la realización de este ensayo se parte de un número determinado de células y se contabilizan a lo largo del tiempo. Los datos sugieren que las células cultivadas con el antibiótico de selección (Puromicina) que presentan tanto al shRNA dirigida contra CTCF, como el vector vacío tienen básicamente la misma tasa de división celular (Figura 52B). Como control del ensayo se evaluaron células HeLa que no contienen ningún tipo de vector y cultivadas en ausencia de selección. Estos datos apuntan a que la aparente ausencia de fibrilarina no afecta la división celular. Una de las posibilidades por las cuales las células puedan seguir dividiéndose es debido a que ésta son células transformadas, lo cual favorece *per se* su división celular.

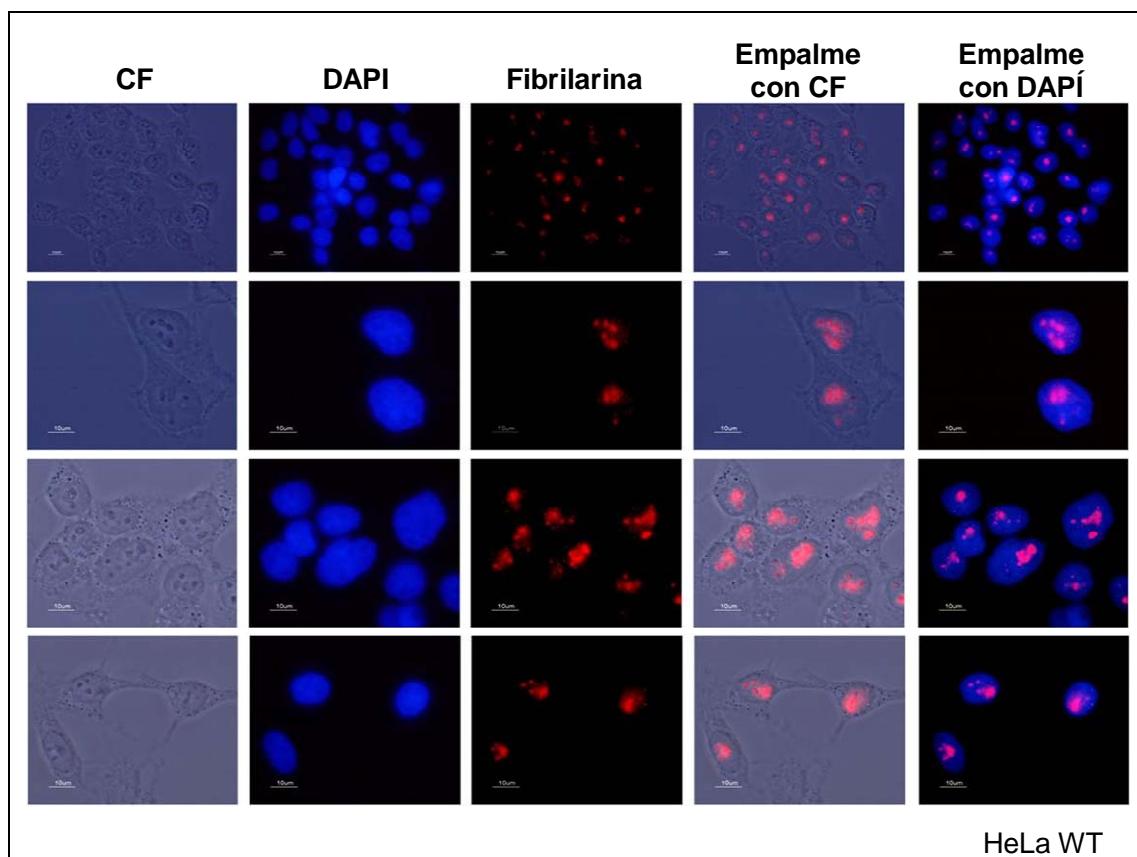


Figura 53. Determinación de la abundancia y localización de Fibrilarina en células HeLa evaluado por inmunofluorescencias. En la imagen CF representa el contraste de fase, DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol) representa la tinción de ADN y la fibrilarina está evaluada por medio del fluoróforo Texas Red.

Con el fin de conocer el efecto biológico de la ausencia de CTCF sobre la expresión de genes asociados a la biogénesis ribosomal, se realizó una qRT-PCR. Evaluamos la expresión de fibrilarina y los rRNA 28s tanto en células HeLa, como en HeLa-kd-CTCF (Figura 54). En dicho ensayo constatamos que la ausencia de CTCF no afecta la expresión de fibrilarina, mientras que para el gen ribosomal 28s se aprecia un incremento en su expresión (Figura 54). Como control del ensayo se muestran las gráficas de amplificación de cada uno de los templados, como también las curvas de disociación de los oligonucleótidos. En dicha curva se observa el enriquecimiento de un solo templado, lo cual refleja la formación de un solo amplicón.

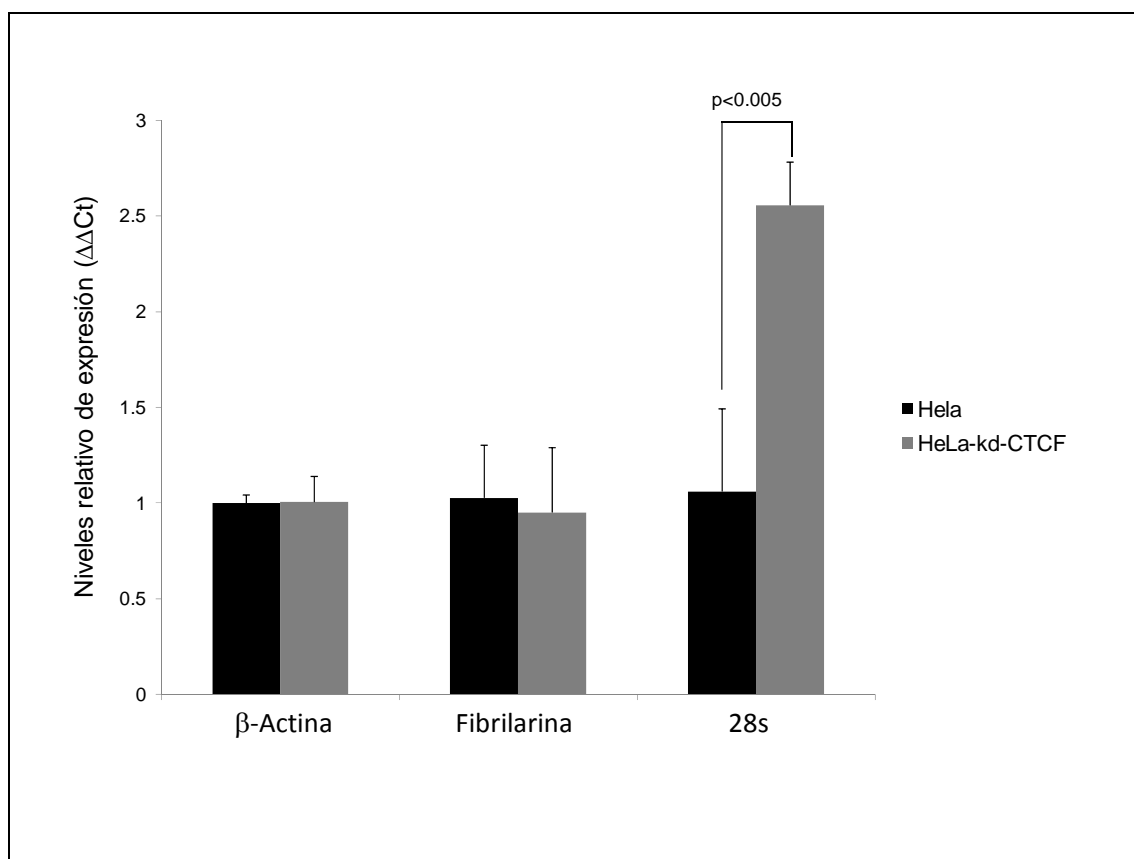


Figura 54. Evaluación de la expresión de genes asociados a la biogénesis ribosomal en un contexto deficiente a CTCF. qRT-PCR de β actina, fibrilarina y 28s en células HeLa y HeLa-kd-

CTCF. Los datos se realizaron por triplicado (dato evaluado por dos ensayos independientes) y fueron analizados por medio de la $\Delta\Delta Ct$.

Estos datos sugieren por un lado, que CTCF podría estar involucrado en la regulación negativa de la expresión de los rRNAs 28s (ver discusión).

DISCUSIÓN.

El nucléolo es el resultado de la fusión de múltiples regiones organizadoras nucleolares (NORs), las cuales se localizan en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos 12, 14, 15, 21 y 22. La formación del nucléolo representa a su vez, un prototipo de organización al interior del núcleo definiendo claramente territorios cromosómicos.

En los eucariontes, son cientos el número de copias correspondientes a los genes que codifican para los genes rRNAs tanto en un estado activo como constitutivamente silenciado, donde recientemente se ha sugerido que CTCF puede ser en parte responsable de su regulación a nivel transcripcional (Santoro, 2005). La transcripción de los genes ribosomales (rDNA) se establece durante el desarrollo, y está modulada por eventos epigenéticos, como las modificaciones post-traduccionales de las histonas y la metilación del ADN las cuales fomentan su silenciamiento transcripcional selectivo. Actualmente CTCF parece ser un factor importante en la biogénesis nucleolar, ya que existen evidencias que sugieren una estrecha interacción entre la PARP-1, CTCF y la proteína nucleolar nucleofosmina/B23. En particular se ha observado la distribución de CTCF en la región periférica del nucléolo (Yusufzai et al., 2004). Además, Torrano y colaboradores han sugerido que CTCF poli(ADP-ribosil)ado puede reprimir la transcripción de genes ribosomales, debido que un tratamiento con el inhibidor de la PARP, conocido como 3-

aminobenzamide (3-ABA), induce una reactivación de la expresión de dichos genes (Torrano et al., 2006). Todos estos antecedentes sugieren que CTCF juega un papel relevante en la expresión de los genes ribosomales. Dentro de nuestro estudio demostramos que la ausencia de CTCF, inducido por un RNAi promueve una mayor expresión del gen 28s (ver Figura 54). A su vez, la ausencia de dicho factor conlleva a una desorganización en las regiones organizadoras nucleolares o NOR. En particular, micrografías del nucléolo en células HeLa-kd-CTCF demuestran la presencias de “hoyos” en el componente granular y una desorganización de los componentes denso fibrilar y centros fibrilares. Estos datos novedosos sugieren que CTCF no solo está involucrado en la actividad génica de los genes ribosomales, sino que también juega un papel importante a nivel estructural.

En conclusión, hemos demostrado que CTCF es un elemento importante en la biogénesis ribosomal, y que su ausencia deriva no solo en una actividad anormal de la expresión propia de los genes ribosomales, sino que también a nivel ultra estructural del nucleolo.

PERSPECTIVAS.

Los datos presentados de esta parte del proyecto representan un aspecto novedoso ligado a la biología del factor multi-funcional CTCF. Dentro de las perspectivas complementamos el analizar más componentes del NOR como nucleofosmina, B23 entre otros y determinar con mayor detalle los cambios estructurales que sufre el nucléolo en ausencia del factor CTCF. Se podría analizar la transcripción de estos genes, como también analizar presencia *in vivo* de CTCF en los promotores de los genes del NOR y su posible vínculo con la estructura cromatínica de los genes ribosomales. Otro

aspecto que debe ser analizado a corto plazo tiene que ver con posibles defectos en la maquinaria traduccional derivadas del abatimiento en los niveles de CTCF y por ende, defectos en la organogénesis del nucléolo.