



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Reactivación de genes mediante desmetilación dirigida del ADN

Gene reactivation by targeted DNA demethylation

Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Directora

Dra. Mª Teresa Roldán Arjona

Directora

Dra. Mª Teresa Morales Ruiz

Autor

Iván Devesa Guerra

Fecha de depósito: 06/09/2019

TITULO: *REACTIVACION DE GENES MEDIANTE DESMETILACION DIRIGIDA
DEL ADN*

AUTOR: *Iván Devesa Guerra*

© Edita: UCOPress. 2019
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



TÍTULO DE LA TESIS: Reactivación de genes mediante desmetilación dirigida del ADN

DOCTORANDO/A: Iván Devesa Guerra

La Tesis Doctoral de D. Iván Devesa Guerra se ha llevado a cabo en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, en el seno del Grupo “Epigenética y Reparación de ADN” (BIO-301). Su desarrollo ha permitido al doctorando adquirir una sólida formación en Genética y Biología Molecular. Durante la realización de la Tesis, D. Iván ha confirmado una excelente aptitud y vocación para la investigación científica, y ha demostrado poseer una espléndida capacidad de trabajo.

La investigación realizada durante la Tesis Doctoral ha permitido verificar que la expresión de las 5-meC ADN glicosilasas vegetales DME y ROS1 modifican los niveles de metilación de células humanas tumorales y que se pueden utilizar como herramientas de edición epigenética en células humanas. Los resultados obtenidos se han comunicado en varios congresos nacionales e internacionales, y una parte se ha recogido en la siguiente publicación:

Morales-Ruiz, T.*, García-Ortiz, M.V.*, Devesa-Guerra, I., Raya-Ruiz, L., Tejedor, J.R., Bayon, G.F., Sierra, M.I., Fraga, M.F., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2018) DNA methylation reprogramming of human cancer cells by expression of a plant 5-methylcytosine DNA glycosylase. *Epigenetics* 13, 95-107.

* Estas autoras contribuyeron igualmente en este trabajo como primeras autoras.

El resto forman parte de publicaciones que se encuentran en preparación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 06 de Septiembre de 2019

Firma del/de los director/es

Fdo.: Dra. Mª Teresa Roldán Arjona

Fdo.: Dra. Mª Teresa Morales Ruiz

Agradecimientos

Agradezco a los catedráticos M.^a Teresa Roldán Arjona y Rafael Rodríguez Ariza la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y poder desarrollar esta Tesis Doctoral.

Agradecer a todos los componentes del grupo de Epigenética, los que estuvieron y los que están, el cariño y el trato recibido, especialmente a la Dr. M.^a Victoria García Ortiz por estar al pie del cañón siempre que la he necesitado. También a Macarena Dorado León por su apoyo y los momentos inolvidables vividos, me llevo una amiga y eso vale más que cualquier publicación.

Sin embargo, esta Tesis no habría sido posible sin la Dr. Teresa Morales Ruiz. Gracias por todo lo que he aprendido contigo, relacionado con la ciencia o no. Porque si de algo me he dado cuenta en estos cinco años es que sobra politiquero y postureo y faltan buenas personas como tú, yo te querría siempre en mi equipo. Gracias también, por tu tiempo y dedicación, has quitado tiempo de tu vida personal para sacar adelante este trabajo, y eso no lo hace cualquiera. Agradecer también tu paciencia, si en los primeros compases de este Tesis no hablaba mucho, en los últimos no callaba y eso es porque me he sentido muy cómodo trabajando contigo. Gracias por todo.

A todos aquellos que se sientan partícipes de esta Tesis y no se hayan nombrado, gracias.

“ Las grandes cosas están hechas de las pequeñas. Si cuidas las pequeñas cosas las convertirás en grandes. Si cuidas solo las grandes siempre serás pequeño ”

Albert Espinosa

Índice de contenidos

RESUMEN	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN.....	9
1. Epigenética	11
2. Cromatina y modificaciones epigenéticas	12
2.1. Estructura de la cromatina	12
2.2. Marcas epigenéticas y modificaciones de la cromatina.....	14
3. Metilación del ADN	15
3.1. Metilación del ADN y cáncer	18
4. Desmetilación del ADN.....	20
4.1. Desmetilación activa del ADN en plantas	21
4.1.1 La familia DML de 5-meC ADN glicosilasas.....	21
4.2. Desmetilación del ADN en mamíferos	26
5. Edición genética y epigenética	27
5.1. Dominios de unión al ADN	28
5.1.1. Dominios de dedos de Zinc	28
5.1.2. Dominios TALE.....	29
5.1.3. El sistema CRISPR/Cas9	30
5.2. Dominios efectores	34
5.2.1 Activadores y represores transcripcionales	34
5.2.2. Efectores epigenéticos.....	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
RESULTADOS	41

CAPÍTULO 1: Efectos de la expresión de la ADN glicosilasa DME en células tumorales humanas	43
1. Transfectantes estables obtenidos a partir de células DLD-1 expresan la desmetilasa vegetal DME.....	44
2. La expresión de DME en células DLD-1 induce la desmetilación y reactivación de genes hipermetilados	44
3. La expresión DME sensibiliza las células DLD-1 a agentes antitumorales	48
4. La expresión de DME inhibe la formación de colonosferas <i>in vitro</i>	49
5. La expresión de DME inhibe el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	51
CAPÍTULO 2: Desarrollo de un sistema de desmetilación dirigida basado en CRISPR/dCas9 y la ADN glicosilasa ROS1	53
1. Expresión de dCas9 fusionada a distintas proteínas efectoras	54
2. Reactivación dirigida del gen reportero de la luciferasa silenciado por metilación ...	56
3. Reactivación génica inducida por efectores no implicados en la desmetilación del ADN	61
4. La reactivación inducida por los diferentes efectores es dependiente de la densidad de metilación	63
5. El incremento en la actividad luciferasa está asociado a una reactivación transcripcional	65
6. La reactivación inducida por dCas9-ROS1 no se incrementa al reclutar otros efectores	66
7. Efecto de proteínas de la ruta BER sobre la actividad de dCas9-ROS1.....	69
8. La reactivación transcripcional inducida por dCas9-ROS1 es concomitante con una desmetilación parcial del ADN	70
DISCUSIÓN.....	77
CAPÍTULO 1	78
1. La expresión de DME en células DLD-1 reactiva genes hipermetilados y altera características fenotípicas relacionadas con el desarrollo tumoral	78
CAPÍTULO 2	81

1. CRISPR/dCas9-ROS1: una herramienta para la reactivación dirigida de genes.....	81
CONCLUSIONES.....	87
MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
1. Diseño y construcción de plásmidos para la expresión de las proteínas efectoras.....	93
1.1. Construcción de los plásmidos para la expresión de DME y DME mut	93
1.2. Optimización de codones.....	93
1.3. Construcción de los plásmidos para la expresión de dCas9 fusionada a los dominios efectores	93
2. Diseño y clonación de los ARN guías	95
3. Plásmidos para la expresión de genes reporteros	98
4. Metilación <i>in vitro</i> de los plásmidos reporteros TK-Luc y TK-GFP	99
5. Cultivos bacterianos	99
6. Cultivos celulares	99
6.1. Mantenimiento de las líneas celulares	99
7. Transfección celular	100
7.1. Transfección de las células DLD-1.....	100
7.2. Transfección de las células HEK-293.....	100
8. Ensayos de actividad luciferasa.....	101
9. Citometría y <i>cell sorting</i>	101
10. Aislamiento de ADN	101
10.1. Extracción de ADN genómico a partir de las líneas celulares.....	101
10.2. Aislamiento de ADN plasmídico a partir de transfectantes.....	102
10.3. Aislamiento de ADN plasmídico de cultivos bacterianos	102
11. Determinación de los niveles de metilación	102
11.1. Tratamiento del ADN con bisulfito sódico.....	102
11.2. PCR cuantitativa específica del estado de metilación (qMSP).....	103
11.2. Pirosecuenciación	104

12. Cuantificación de expresión génica.....	105
12.1. Extracción de ARN.....	105
12.2. RT-PCR.....	106
12.3. RT-PCR cuantitativa.....	106
13. Análisis western-blot.....	106
14. Tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina.....	108
15. Tratamiento con Oxaliplatino o 5-fluorouracilo.....	108
16. Ensayos de formación de colonosferas.....	109
17. Generación de tumores subcutáneos (<i>xenografts</i>).....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	111
ANEXOS.....	127

Índice de Figuras

Figura 1. Organización del genoma en diferentes epigenomas.	12
Figura 2. Niveles de organización de la cromatina.	13
Figura 3. Mecanismo de metilación del ADN.	15
Figura 4. Mecanismos de represión mediados por la metilación del ADN.	16
Figura 5. Distribución de la metilación del ADN en el genoma de mamíferos y plantas.	17
Figura 6. Establecimiento y mantenimiento de patrones de metilación del ADN.	18
Figura 7. Patrones de metilación del ADN en células normales y tumorales.	19
Figura 8. Dominios conservados en las ADN glicosilasas de la familia DML.	22
Figura 9. Ruta de desmetilación activa del ADN en plantas.	24
Figura 10. Desmetilación del ADN en mamíferos.	27
Figura 11. Estrategias de edición epigenética.	28
Figura 12. Dominios de dedos de Zinc Cis_2His_2	29
Figura 13. Dominios TALE.	30
Figura 14. Sistema CRISPR-Cas.	32
Figura 15. CRISPR/Cas9 y CRISPR/dCas9.	33
Figura 16. Expresión de DME en las células DLD-1.	44
Figura 17. Nivel de metilación y expresión génica de <i>ROR2</i> , <i>p14</i> y <i>p16</i> en células que expresan DME.	46
Figura 18. Comparación de la desmetilación y reactivación génica inducidas por DME y por 5-Aza-2'-deoxicitidina.	47
Figura 19. Sensibilidad frente al oxaliplatino y al 5-FU.	48
Figura 20. Efecto de la expresión de DME sobre la capacidad de formación de colonosferas <i>in vitro</i>	50
Figura 21. Efecto de la expresión de DME sobre el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	51
Figura 22. Proteínas efectoras fusionadas a dCas9.	55

Figura 23. Localización de los sitios de unión de los ARN guía en la región promotora TK.....	56
Figura 24. Reactivación dirigida del gen reportero de la luciferasa mediante la expresión transitoria de dCas9-ROS1	57
Figura 25. Cuantificación de la densidad de metilación del vector TK-Luc mediante digestión con <i>HpaII</i>	57
Figura 26. Reactivación dirigida del gen reportero de la luciferasa mediante la expresión transitoria de dCas9-ROS1	58
Figura 27. Cuantificación de la densidad de metilación del vector TK-Luc.....	59
Figura 28. Posición de nuevos ARN guías situados “aguas arriba” de la región promotora TK.	59
Figura 29. Efecto de la densidad de metilación sobre la actividad de dCas9-ROS1 y dCas9-TET1.	60
Figura 30. Reactivación del gen reportero GFP mediante la expresión de distintos efectores fusionados a dCas9.....	62
Figura 31. Determinación de la densidad de metilación del promotor TK mediante digestión con <i>HpaII</i>	63
Figura 32. Efecto de la densidad de metilación sobre la actividad de los efectores ROS1, TET1, p300 y VP160.....	64
Figure 33. Actividad luciferasa y activación transcripcional inducida por los distintos efectores fusionados a dCas9.....	66
Figure 34. Efecto de la co-transfección de dCas9-ROS1 con distintos efectores.	68
Figure 35. Efecto de las proteínas de la ruta BER (ZDP y APE1L) sobre la actividad de dCas9-ROS1.	70
Figura 36. Análisis del nivel de metilación del promotor TK-Luc tras la transfección transitoria con dCas9-ROS1 o dCas9-ROS1Mut.	72
Figura 37. Análisis del nivel de metilación del promotor TK-Luc tras la transfección transitoria con diferentes efectores.	73
Figura 38. Desmetilación del promotor del gen <i>OCT-4</i> inducida por dCas9-ROS1 en células HEK-293.	75

Figura 39. Desmetilación del gen <i>INS</i> inducida por dCas9-ROS1 en células HEK-293.	76
Figura 40. Posible estrategia para el reclutamiento de dCas9-ROS1 junto a otros efectores.....	86
Figura 41. Esquema de la obtención del vector de expresión de los ARN guías.....	97
Figura 42. Fundamento de la técnica de tratamiento con bisulfito.....	103

Índice de Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la generación de las distintas construcciones.	95
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de los ARNs guía específicos del promotor TK.	96
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de los ARN guías específicos de dianas endógenas.	98
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en las qMSP.	104
Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la pirosecuenciación.	105
Tabla 6. Oligonucleótidos usados para las qRT-PCRs.....	107
Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados en los distintos ensayos western blot.	108
Tabla 8. Anticuerpos secundarios utilizados en los distintos ensayos western blot.....	108

Índice de abreviaturas

5-caC: 5-carboxilcitosina

5-fC: 5-formilcitosina

5-FU: 5-fluorouracilo

5-hmC: 5-hidroximetilcitosina

5-meC: 5-metilcitosina

Adomet: S-adenosil-L-metionina

Aza: 5-Aza-2'-deoxicitidina

BER: *Base Excision Repair* (reparación por escisión de bases)

Cas: Endonucleasa Cas

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CSCs: Células madre cancerosas

DBD: *DNA Binding Domain* (Dominio de Unión al ADN)

dCas9: Endonucleasa Cas9 catalíticamente inactiva

DLD-1: Línea celular de cáncer de colon humano

DME: DEMETER

DML: DEMETER-LIKE

DML2: DEMETER-LIKE 2

DML3: DEMETER-LIKE 3

DNMTs: ADN metiltransferasas

DSB: *Double Strand Break* (Rotura de doble cadena)

FBS: Suero fetal bovino

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP: *Green Fluorescent Protein* (proteína verde fluorescente)

HDAC: Histona desacetilasa

HDR: *Homologous direct recombination* (reparación por recombinación homóloga)

HEK-293: Línea celular embrionaria de riñón humano 293

HhH-GDP: Hélice-horquilla-Hélice-Glicina/Prolina/Aspártico

HSPF: *High Purify Salt Free*

KAT3: Lisina acetiltransferasa 3

KRAB: *Krüppel-associated box*

Luc: Luciferasa

MBP: *Methyl-CpG-Binding Proteins* (proteínas de unión a ADN metilado)

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NHEJ: *Non-Homologous-End-Joining* (reparación por unión de extremos no homólogos)

NLS: *Nuclear Localization Signal* (secuencias de localización nuclear)

p14: Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina

p16: Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina

p300: Histona acetiltransferasa

p53: Factor de transcripción nuclear p53

p65: Activador transcripcional de NF-kB

PAM: *Protospacer Adyacent Motif*

pb: Pares de bases

PGCs: Células germinales primordiales

RdDM: Metilación de ADN dirigida por ARN

ROR2: Receptor tyrosine kinase-like orphan 2

ROS1: REPRESSOR OF SILENCING 1

ROS1_CD: Dominio catalítico de ROS1

SAM: S-adenosilmetionina

sgRNA: ARN guía

TALE: *Transcription-Activator-Like Effector*

TDG: Timina ADN Glicosilasa

TET: *Ten Eleven Traslocation*

TET1_CD: Dominio catalítico de TET1

TK: Promotor mínimo de la timidina quinasa viral

TK-GFP: Plásmido que expresa el gen reportero GFP

TK-Luc: Plásmido que expresa el gen reportero de la luciferasa

TSS: *Transcription Start Site* (sitio de inicio de la transcripción)

VP16: Dominio de activación transcripcional del virus del herpes simple

VP160: Diez copias en tándem del dominio de activación transcripcional VP16 del virus del herpes simple

VP48: Tres copias en tándem del dominio de activación transcripcional VP16 del virus del herpes simple

VP64: Cuatro copias en tándem del dominio de activación transcripcional VP16 del virus del herpes simple

ZFPs: Proteínas de dedos de zinc

RESUMEN

La metilación de la citosina en el carbono 5 del anillo de pirimidina (5-meC) es una marca epigenética estable, pero reversible, que promueve el silenciamiento génico transcripcional, participando así en la regulación de la expresión génica y el control de la diferenciación celular. La alteración de los patrones de metilación del ADN es un componente fundamental de muchas enfermedades humanas, y en particular en muchos tipos de cáncer, que con frecuencia muestran una metilación aberrante.

Los niveles de metilación son controlados y modificados por mecanismos de desmetilación que aún no se conocen con exactitud en células humanas. Sin embargo, en plantas, estudios bioquímicos y genéticos han demostrado la existencia de una familia de ADN glicosilasas capaces de escindir directamente la 5-meC del ADN, generando un sitio abásico que ha de ser procesado y reemplazado por una citosina no metilada mediante un mecanismo análogo a la ruta de reparación por escisión de bases (*Base Excision Repair*, BER). Las principales representantes de estas ADN glicosilasas son la proteínas de *Arabidopsis thaliana* DEMETER (DME) y REPRESOR OF SILENCING 1 (ROS1).

El primer objetivo de esta tesis ha sido determinar si la expresión de DME en células humanas inicia un proceso de desmetilación activa, modificando el estado de metilación y el nivel de expresión de genes que se encuentran hipermetilados en células cancerosas. Para ello, se han obtenido transfectantes estables que expresan la proteína DME en la línea de cáncer de colon DLD-1. Los resultados indican que la expresión de DME conlleva la desmetilación de algunos genes y ésta se correlaciona con un aumento en su nivel de transcripción. Además, la presencia de DME en esta línea tumoral provoca una mayor sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos oxaliplatino y 5-FU, una menor capacidad de formar colonosferas y un menor crecimiento tumoral en xenoinjertos obtenidos en modelos murinos.

El segundo de los objetivos de esta tesis consistió en el desarrollo de una herramienta molecular que permita dirigir las 5-meC ADN glicosilasas a regiones específicas del genoma de mamíferos. Para ello, se ha utilizado la tecnología CRISPR, fusionando el dominio catalítico de ROS1 a una versión defectiva de la endonucleasa Cas9 (dCas9-ROS1) que es guiada a secuencias específicas de ADN por pequeñas moléculas de ARN (ARNs guía). Los resultados indican que la expresión del sistema de edición epigenética dCas9-ROS1 en células HEK-293 es capaz de reactivar distintos genes reporteros (luciferasa y GFP) silenciados previamente por metilación, así como inducir la desmetilación parcial de los genes endógenos *INS* y *OCT4*. La actividad catalítica de

dCas9-ROS1 se ve afectada por la densidad de la metilación en la región diana y su rango de acción está limitado a las primeras 50 pb respecto al sitio de unión del ARN guía.

SUMMARY

DNA methylation at carbon 5 of cytosine (5-methylcytosine, 5-meC) is a stable but reversible epigenetic mark that promotes transcriptional repression, participating in gene expression and cell differentiation regulation. Alterations in DNA methylation patterns have an important role in several human diseases and particularly in many cancers, which often show aberrant methylation.

DNA methylation levels are controlled and modified by demethylation mechanisms that are not yet well understood in human cells. However, in plants genetics and biochemical evidences have revealed a family of DNA glycosylases that directly excise 5-meC from DNA, allowing its replacement with an unmethylated cytosine through a base excision repair pathway (BER). Two proteins from *Arabidopsis thaliana*, DEMETER (DME) and REPRESOR OF SILENCING 1 (ROS1), are the main representative members of this family of 5-meC DNA glycosylases.

The first objective of this thesis has been to determine if DME expression in DLD-1 human colorectal cancer cells initiates a process of active DNA demethylation, by modifying the methylation status and expression level of genes that are hypermethylated. To this end, stable transfectants expressing DME in DLD-1 cells were obtained and analyzed. The results indicate that expression of DME in DLD-1 cells cause loss of methylation at certain hypermethylated silenced *loci* and concomitant reactivation of their expression. In addition, cells expressing active DME displayed increased sensitivity to both oxaliplatin and 5-fluorouracil agents, a reduced ability to form colonospheres and decreased tumor growth in xenografts models.

The second objective of this thesis was to develop a molecular tool to target 5-meC DNA glycosylases to specific regions in mammalian genome. For this, CRISPR technology has been used, fusing the catalytic domain of ROS1 to the catalytically inactive Cas9 (dCas9-ROS1), that is targeted to specific DNA sequences by single-guide RNA (sgRNAs). The results show that the dCas9-ROS1 epigenetic editing system in human HEK-293 cells is effective in reactivating different reporter genes (luciferase and GFP) previously silenced by *in vitro* methylation and causes partial loss of methylation in the endogenous target genes *INS* and *OCT4*. We found that the catalytic activity of dCas9-ROS1 is affected by DNA methylation density at the target region and its range of action is limited to the first 50 bp with respect to the sgRNA binding site.

INTRODUCCIÓN

1. Epigenética

El término Epigenética fue acuñado por Conrad Hal Waddington a mediados del siglo pasado en un esfuerzo por comprender fenómenos que aparentemente no obedecían principios genéticos conocidos. Los avances más recientes en el campo de la biología, y más concretamente en el de la Genética, han permitido definir la Epigenética como “el estudio de aquellos cambios en la expresión génica, heredables mitótica y/o meióticamente, que no pueden explicarse por cambios en la secuencia de ADN” (Russo et al., 1996). Sabemos ahora que la causa molecular de éstos y otros fenómenos epigenéticos reside en modificaciones químicas del ADN y de las histonas, que reciben el nombre de “marcas epigenéticas”. Éstas constituyen una capa de información adicional, denominada “epigenoma”, superpuesta a la contenida en la secuencia de nucleótidos del genoma (Reik, 2007; Yung and Elsassser, 2017). Se ha propuesto que el epigenoma es el principal responsable de la regulación del genoma (Beck et al., 1999).

El epigenoma, a diferencia del genoma, es dinámico y varía en los diferentes tipos celulares y en cada momento del ciclo vital. Se puede afirmar que la información contenida en un mismo genoma se puede organizar en multitud de epigenomas que dan lugar a variaciones fenotípicas estables en el contexto de una información genética constante (Figura 1). De este modo, un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo que utiliza la información genética de forma selectiva, activando y desactivando diversos genes sin alterar la naturaleza esencial de la información contenida en la secuencia de bases (Wolffe and Matzke, 1999). La importancia de este tipo de mecanismos se manifiesta en multitud de procesos biológicos tales como el desarrollo embrionario, el ciclo celular, la diferenciación celular y las adaptaciones al ambiente. Además, alteraciones en los patrones epigenéticos están detrás del desarrollo de un gran número de enfermedades (Brooks et al., 2010).

Hasta la fecha, se han identificado dos tipos de marcas epigenéticas: la metilación del ADN y las modificaciones de las proteínas histónicas que conforman la cromatina (Holliday, 2005; Jenuwein and Allis, 2001; Nakao, 2001; Tamaru and Selker, 2001).

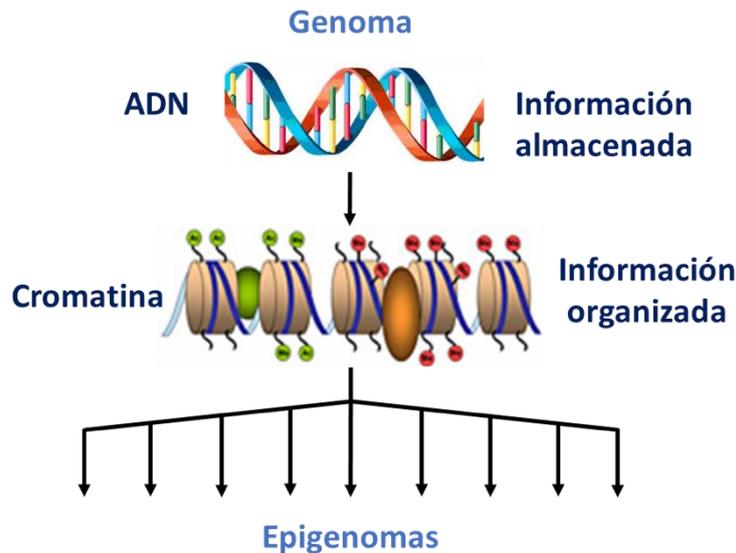


Figura 1. Organización del genoma en diferentes epigenomas. Adaptada de (Allis et al., 2007).

2. Cromatina y modificaciones epigenéticas

2.1. Estructura de la cromatina

El ADN de las células eucarióticas se encuentra organizado y compactado en el interior del núcleo en forma de cromatina (Hsieh and Fischer, 2005). La organización de la cromatina se basa en la unión del ADN a histonas para formar una estructura de 10 nm de diámetro denominada nucleosoma (Oudet et al., 1975). Esta estructura se compone de unas 150 pares de bases (pb) de ADN que envuelven un octámero central, constituido por un tetrámero de las histonas H3 y H4, y dos dímeros de las histonas H2A-H2B (Luger et al., 1997). Los nucleosomas están conectados entre sí por segmentos de ADN de 50 a 70 pb, denominados ADN de enlace. Gracias a la presencia de una quinta histona, la histona H1 o histona de enlace, los nucleosomas se asocian en un solenoide para formar una fibra de cromatina de unos 30 nm de diámetro. Esta estructura adopta a su vez niveles superiores de compactación hasta obtenerse el máximo nivel de condensación en los cromosomas metafásicos, que se hacen visibles durante la división celular (Figura 2) (Felsenfeld and Groudine, 2003).

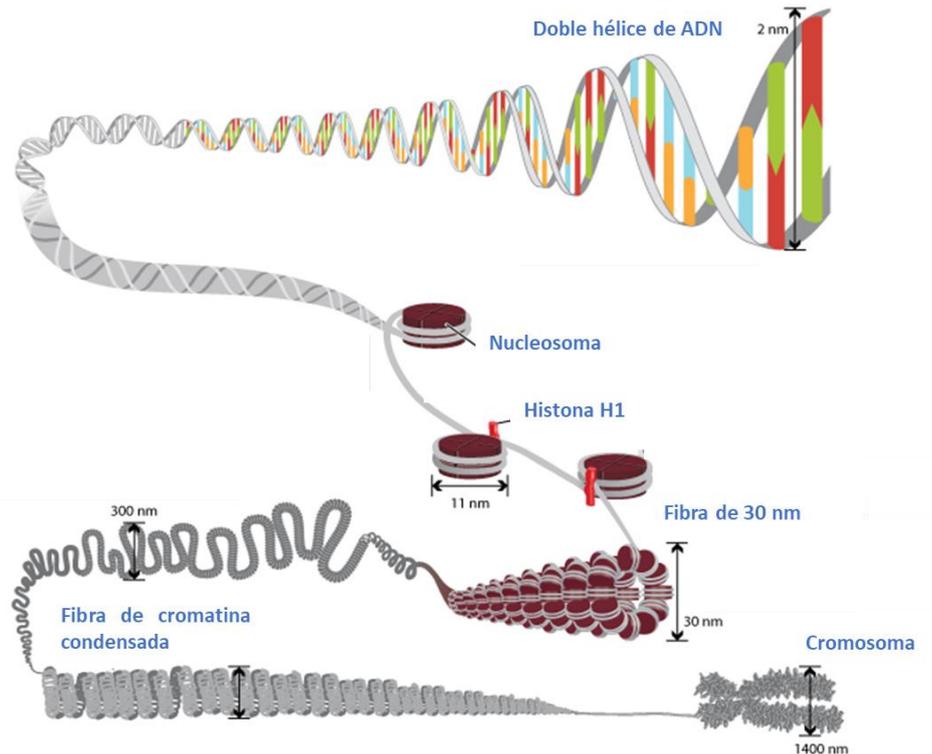


Figura 2. Niveles de organización de la cromatina. Ver detalles en el texto. Adaptado de (Pierce, 2005).

En las células que no se encuentran en división, la cromatina se distribuye por todo el núcleo en regiones altamente condensadas (heterocromatina) y regiones más abiertas (eucromatina) (Felsenfeld and Groudine, 2003).

La estructura y los diferentes grados de empaquetamiento de la cromatina están relacionados con la actividad transcripcional: mientras que la heterocromatina es transcripcionalmente inactiva, la eucromatina es transcripcionalmente activa (Bender, 2004), representa la proporción más grande del genoma y el ADN puede expresarse, replicarse y repararse. La heterocromatina puede ser de dos tipos: facultativa y constitutiva. La heterocromatina facultativa varía en los distintos tipos celulares y se corresponde con regiones que se encuentran transcripcionalmente inactivas en ciertos tipos celulares o en momentos específicos del desarrollo (Richards and Elgin, 2002). La heterocromatina constitutiva es idéntica en todos los tipos celulares, y se corresponde generalmente con amplias regiones no codificantes. Ésta se localiza en los telómeros y en las regiones pericentroméricas de los cromosomas, donde suele encontrarse un elevado contenido en secuencias repetitivas (Saksouk et al., 2015).

2.2. Marcas epigenéticas y modificaciones de la cromatina

La cromatina presenta una organización dinámica que le permite participar en procesos como la transcripción, la replicación, la recombinación y la reparación del ADN, que requieren del uso del ADN como molde (Hsieh and Fischer, 2005). Las marcas epigenéticas (metilación del ADN y las modificaciones covalentes de las histonas) juegan un papel clave para permitir esa interacción reversible entre el ADN y las histonas ya que dichas modificaciones químicas permiten regular la accesibilidad del ADN. Adicionalmente, otros procesos como la incorporación de variantes histónicas en los nucleosomas y la remodelación de la cromatina dependiente de ATP participan también en la regulación estructural de la cromatina (Kouzarides, 2007).

La metilación del ADN en el carbono 5 de la citosina genera 5-metilcitosina (5-meC). Ésta es considerada una marca epigenética relacionada con el silenciamiento génico que está implicada en multitud de procesos biológicos (ver apartado Metilación del ADN) (Hsieh and Fischer, 2005).

Las modificaciones postraduccionales de las histonas tienen lugar en sus extremos N-terminales e incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, glicosilación y sumoilación, entre otras. Actúan interfiriendo en la interacción del ADN con las histonas, afectando a la estructura general de la cromatina o regulando el reclutamiento de proteínas no histónicas (Bannister and Kouzarides, 2011). En conjunto, todas estas modificaciones conforman un segundo grupo de marcas epigenéticas que constituyen el denominado “código de histonas” y que, junto con la metilación del ADN, participa en el control de la organización funcional de la cromatina (Jenuwein and Allis, 2001).

Otro proceso implicado en la reestructuración de la cromatina resulta de reemplazar las histonas canónicas por variantes de histonas. A diferencia de las canónicas, las variantes de histonas se incorporan a lo largo del ciclo celular y se asocian a la cromatina de forma independiente a la replicación del ADN para responder a distintas situaciones de la célula relacionadas con la regulación de la transcripción (Talbert and Henikoff, 2017). La mejor documentada hasta la fecha es la incorporación de variantes de las histonas, H2A y H3 (Malik and Henikoff, 2003). En mamíferos se han identificado cuatro variantes de la histona H2A: H2A.Z y H2A.Bbd, implicadas en la iniciación de la transcripción (Adam et al., 2001; Soboleva et al., 2011), y H2A.X y macroH2A, asociadas con la inmovilización del nucleosoma y el silenciamiento transcripcional (Ratnakumar et al.,

2012). Por otro lado, la variante más común de la histona H3 es la histona H3.3, que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad del genoma durante el desarrollo (Jang et al., 2015).

Además, los nucleosomas pueden cambiar de posición, reestructurando o remodelando la estructura de la cromatina. Este proceso es llevado a cabo por complejos de proteínas dependientes de ATP que catalizan la translocación del ADN alrededor del nucleosoma, permitiendo así la condensación o descondensación de la cromatina (Hsieh and Fischer, 2005; Kouzarides, 2007).

3. Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la adición covalente de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina (Adomet) al carbono 5 de la citosina, para generar 5-meC (Figura 3) (Bender, 2004; Bird, 2002). La 5-meC está presente en el genoma de vertebrados, plantas y algunos hongos (Bender, 2004; Bird, 2002). En mamíferos, un 3-8% de los residuos de citosinas se encuentran metilados, mientras que en plantas el porcentaje de metilación es de un 6-30% (Chen and Li, 2004). En otros organismos como *Drosophila melanogaster*, los niveles de metilación son mucho más bajos, no superando el 0,034% en individuos adultos (Capuano et al., 2014).

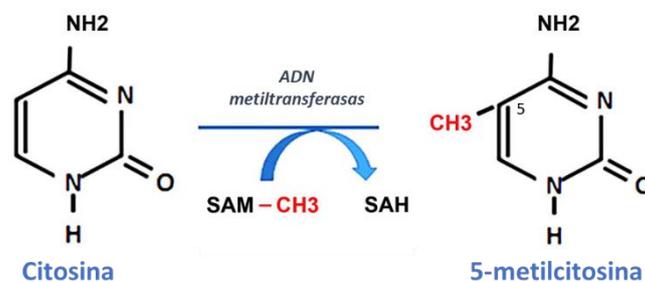


Figura 3. Mecanismo de metilación del ADN. Adaptado de (Nasu et al., 2011).

La metilación del ADN es una modificación epigenética que causa silenciamiento génico (Ooi et al., 2007), bien de forma directa (Figura 4A) impidiendo la unión de los factores de la transcripción a sus secuencias diana, o bien de forma indirecta a través de la unión de proteínas con afinidad por dinucleótidos CpG metilados (*methyl-CpG-binding proteins*, MBP), que a su vez reclutan represores de la transcripción y/o factores remodeladores de la cromatina que reprimen la expresión génica (Figura 4B) (Klose and Bird, 2006).

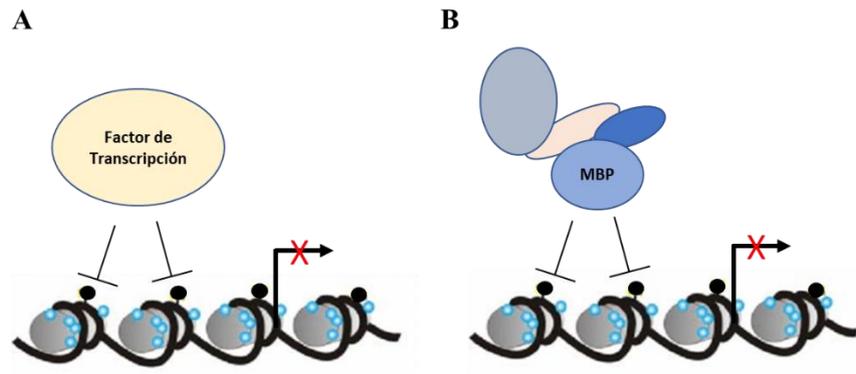


Figura 4. Mecanismos de represión mediados por la metilación del ADN. (A) Mecanismo directo. La metilación del ADN inhibe directamente la activación transcripcional al bloquear la unión de los factores de transcripción. (B) Mecanismo indirecto. Proteínas que se unen específicamente al ADN metilado (MBP) y reclutan moléculas correpresoras para silenciar la transcripción y modificar la cromatina circundante. Adaptado de (Klose and Bird, 2006).

En mamíferos, la presencia de 5-meC tiene lugar preferentemente en secuencias 5'-CG-3', usualmente denominadas sitios CpG. Los dinucleótidos CpG están infrarrepresentados en el conjunto del genoma, pero se acumulan en ciertas regiones, conocidas como "islas CpG" (Figura 5). Las islas CpG, se encuentran normalmente no metiladas y se localizan cerca de los sitios de inicio de la transcripción y en regiones promotoras permitiendo la expresión génica (Deaton and Bird, 2011). Por el contrario, los sitios CpG localizados en las regiones repetitivas, intergénicas, transposones y en el cuerpo de los genes se encuentran normalmente metilados, impidiendo la expresión génica (Bernstein et al., 2007; Keller et al., 2016).

En plantas, a diferencia de en mamíferos, no existe esa acumulación de dinucleótidos CpG, y aunque la metilación de la citosina se produce principalmente en el contexto CG, también se puede encontrar en otros contextos tanto simétricos (CHG) como asimétricos CHH (siendo H=C, A o T) (Henderson and Jacobsen, 2007). La metilación del ADN en plantas se localiza mayoritariamente en regiones heterocromáticas con abundancia en secuencias repetitivas tales como centrómeros y telómeros, así como en los elementos transponibles (Finnegan et al., 1998; Zhang et al., 2006) (Figura 5).

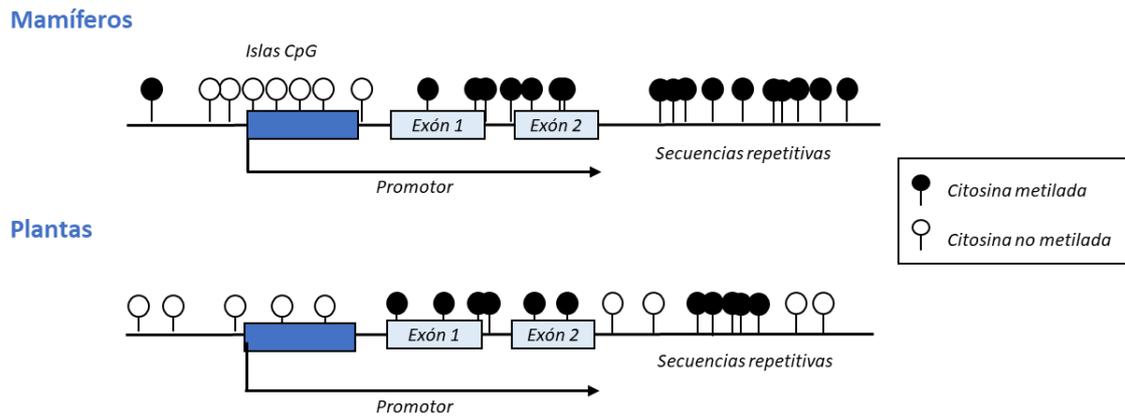


Figura 5. Distribución de la metilación del ADN en el genoma de mamíferos y plantas.

La metilación de citosinas es llevada a cabo por un grupo especializado de enzimas, evolutivamente muy conservadas, denominadas ADN metiltransferasas (DNMTs). En mamíferos se han identificado varias DNMTs que se clasifican en dos grupos: 1) ADN metiltransferasas *de novo* y 2) ADN metiltransferasas de mantenimiento (Bestor, 2000). Al grupo de ADN metiltransferasas *de novo* pertenecen DNMT3A y DNMT3B, y son las encargadas de establecer los patrones de metilación del ADN durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, actuando sobre ADN bicatenario no metilado (Figura 6) (Chen and Li, 2006). Dicho proceso está regulado por la proteína DNMT3L, carente de actividad metiltransferasa (Goll and Bestor, 2005). Por otro lado, en el grupo de ADN metiltransferasas de mantenimiento se encuentra DNMT1 que cataliza la metilación del ADN hemimetilado resultante tras la replicación (Figura 6). Este proceso se lleva a cabo junto con el cofactor UHRF1 (Chen and Li, 2006) y es vital para preservar los patrones de metilación del ADN durante los sucesivos ciclos de replicación (Bird, 2002; Finnegan et al., 1998; Kress et al., 2001).

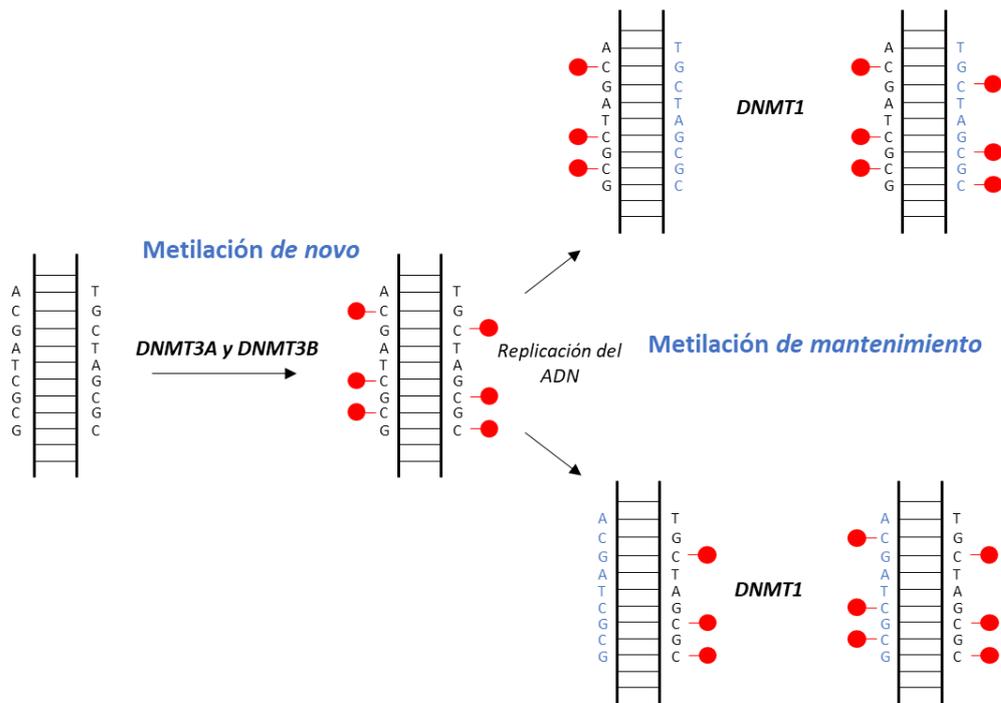


Figura 6. Establecimiento y mantenimiento de patrones de metilación del ADN. Representación esquemática de la metilación *de novo* y de la metilación *de mantenimiento* del ADN llevadas a cabo por las ADN metiltransferasas.

En plantas las ADN metiltransferasas se clasifican en tres familias según su función y homología con las ADN metiltransferasas de mamíferos (Tariq and Paszkowski, 2004):

- 1) la familia MET1 constituida por proteínas similares a DNMT1 de mamíferos; son las ADN metiltransferasas de mantenimiento en secuencias 5'-CG-3' (Finnegan and Kovac, 2000), aunque también parece estar implicada en el mantenimiento de la metilación en otros contextos de secuencia (Lindroth et al., 2001).
- 2) las cromometiltransferasas, como CMT2 y CMT3, son exclusivas del reino vegetal y están implicadas en la metilación de mantenimiento en secuencias 5'-CHG-3' (Lindroth et al., 2001).
- 3) la familia DRM (*Domain Rearranged Methyltransferase*), a la que pertenecen DRM2 y DRM3, está constituida por proteínas similares a las DNMT3 de mamíferos. Son las encargadas de la metilación *de novo* en todos los contextos de secuencia, siendo CMT2 la encargada de mantener la metilación en secuencias 5'-CHH-3' mediante metilación *de novo* recurrente (Tariq and Paszkowski, 2004).

3.1. Metilación del ADN y cáncer

La metilación regula multitud de procesos biológicos incluida la impronta génica, la inactivación del cromosoma X (Zhang and Zhu, 2012), el desarrollo, o la defensa del

genoma frente a elementos transponibles (Yoder et al., 1997), pero también interviene en procesos patológicos relacionados con la aparición de distintos tipos de enfermedades incluido el cáncer (Esteller, 2007; Jaenisch and Bird, 2003; Wolffe and Matzke, 1999). En comparación con células normales, las células tumorales muestran con frecuencia patrones de metilación aberrantes (Figura 7) (Robertson, 2005), caracterizados generalmente por una hipometilación global del genoma junto con una hipermetilación local en promotores de genes supresores de tumores (Esteller, 2007). La hipometilación global tiene consecuencias muy graves para el correcto funcionamiento celular ya que por un lado contribuye a la inestabilidad del genoma, principalmente causada por la movilización de transposones y secuencias endoparasíticas, y por otro, favorece la expresión aberrante de genes bien porque se expresen en momentos inadecuados o bien en tejidos inapropiados (genes de la línea germinal, específicos de tejido, sobreexpresión de oncogenes, etc.) lo que favorece la progresión del tumor (Ehrlich, 2009). Este fenómeno ha sido descrito, entre otros, en tumores hepáticos donde se ha observado una reducción de los niveles de metilación en una variedad de proto-oncogenes, como *c-fos*, *c-myc*, *H-ras* y *K-ras* (Nambu et al., 1987; Vorce and Goodman, 1989). Por otro lado, la hipermetilación local de genes supresores de tumor induce una represión transcripcional generalizada de los mismos, dando lugar a una ventaja selectiva en el crecimiento de las células malignas frente a las células no tumorales y representando uno de los principales pasos en la secuencia de eventos que conducen a la malignidad (Baylin and Jones, 2016; Sandoval and Esteller, 2012).

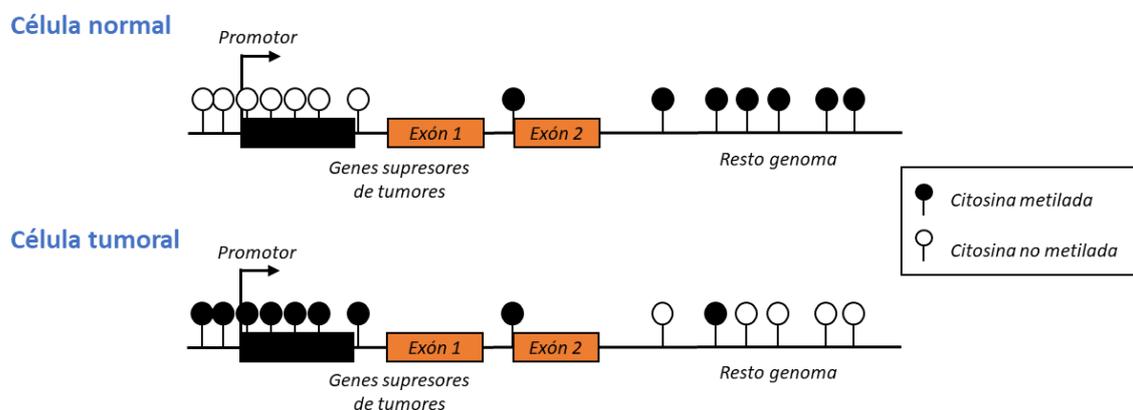


Figura 7. Patrones de metilación del ADN en células normales y tumorales. En las células tumorales, se observa una pérdida de metilación del ADN que conduce a la hipometilación global del genoma junto con la hipermetilación del ADN en sitios específicos, tales como promotores de genes supresores de tumores.

4. Desmetilación del ADN

La metilación del ADN es una marca epigenética estable pero reversible (Ramchandani et al., 1999). Esto sugiere que la metilación del ADN es un proceso dinámico, resultado de cambios continuos de metilación y desmetilación en respuesta a señales durante el desarrollo y del entorno (Goll and Bestor, 2005; Roldan-Arjona and Ariza, 2009).

La pérdida de metilación puede ocurrir de forma pasiva o activa. La desmetilación pasiva es consecuencia de la inhibición o ausencia de actividad de las ADN metiltransferasas de mantenimiento durante las sucesivas rondas de replicación, con la consiguiente dilución progresiva de las citosinas metiladas (Saze et al., 2003). Esta desmetilación no explica, sin embargo, la que tiene lugar en células que no se encuentran en división. En este caso, son necesarios mecanismos activos de desmetilación que actúan en ausencia de replicación y que requieren la presencia de una o más enzimas.

En mamíferos se ha observado que tiene lugar una reprogramación epigenética completa que implica un proceso de desmetilación activa de ADN en al menos dos etapas de su ciclo vital: la primera en el cigoto durante la fase de preimplantación y la segunda, en las células germinales primordiales (PGCs) durante el desarrollo de la línea germinal (Hemberger et al., 2009; Sasaki and Matsui, 2008; Surani et al., 2007). En células somáticas también se ha observado desmetilación activa del ADN, pero en este caso la desmetilación no es global, sino que tiene lugar de forma localizada en tejidos, en genes concretos y en momentos específicos del desarrollo (Zhu, 2009).

En plantas, no se ha descrito una desmetilación global del genoma del cigoto tras la fertilización ni una posterior remetilación durante el desarrollo embrionario (Jacobsen and Meyerowitz, 1997). Sin embargo, sí se ha observado una pérdida global de metilación y una movilización de los transposones durante la gametogénesis masculina y femenina, indicando que los patrones de metilación del ADN en plantas son dinámicos durante el desarrollo (Sasaki and Matsui, 2008). También existen pruebas convincentes de que, en plantas, se produce una desmetilación activa de genes improntados tales como *MEA*, *FIS2* y *FWA* expresados a partir del alelo materno en la célula central del endospermo (Jullien et al., 2006; Kinoshita et al., 2004). Además, la desmetilación activa del ADN también juega un papel importante en la reactivación génica de dianas específicas en respuesta a perturbaciones ambientales (Zhang and Zhu, 2012). Por ejemplo, en plantas de tabaco, la metilación de ADN en la región codificante del gen *glycerophosphodiesterase-like*

protein (NtGPD_L) se reduce rápidamente tras tratamiento con aluminio, NaCl, frío o estrés oxidativo (Choi and Sano, 2007).

Si bien la desmetilación pasiva es un proceso ampliamente aceptado, la naturaleza exacta de las proteínas responsables de llevar a cabo la desmetilación activa en mamíferos no se conoce con exactitud, pero estudios recientes apuntan a la implicación de dioxigenasas que generan derivados oxidados de la 5-meC (ver apartado 4.2 de Introducción). En plantas, sin embargo, el mecanismo de desmetilación activa del ADN se conoce con mayor detalle e implica la escisión de la 5-meC como base libre (Morales-Ruiz et al., 2006; Ortega-Galisteo et al., 2008).

4.1. Desmetilación activa del ADN en plantas

Distintos estudios bioquímicos y genéticos llevados a cabo en *Arabidopsis thaliana* han revelado la existencia en plantas de una familia de proteínas, denominadas DML (DEMETER-LIKE), que reconocen y escinden la 5-meC del ADN permitiendo su sustitución por una citosina no metilada mediante un mecanismo análogo a la reparación por escisión de bases (BER) (Gong et al., 2002; Morales-Ruiz et al., 2006; Choi et al., 2002; Agius et al., 2006; Penterman et al., 2007; Ortega-Galisteo., 2008).

4.1.1. La familia DML de 5-meC ADN glicosilasas

La familia DML (DEMETER-LIKE), está constituida por proteínas con actividad 5-meC ADN glicosilasa cuyos miembros fundadores son dos enzimas de *Arabidopsis thaliana* denominadas DME (DEMETER) y ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002). Las 5-meC ADN glicosilasas parecen ser específicas de plantas, con probables ortólogos en musgos (*Patena phycomitrella*) y algas verdes unicelulares (*Ostreococcus*), lo que sugiere que la desmetilación activa mediante escisión de la 5-meC surgió en las primeras etapas en la evolución de las plantas (Roldan-Arjona and Ariza, 2009) (Figura 8).

Las proteínas de la familia DML contienen un dominio catalítico que presenta una alta similitud de secuencia con ADN glicosilasas pertenecientes a la superfamilia HhH-GPD (Hélice-horquilla-Hélice Glicina/Prolina-Aspártico) (Nash et al., 1996; Ponferrada-Marin et al., 2011). A diferencia del resto de miembros de la superfamilia, las proteínas DML se caracterizan por presentar un dominio catalítico discontinuo constituido por dos segmentos separados por una región no conservada variable en tamaño (Ponferrada-

Marin et al., 2011). El primer segmento corresponde a una región que, en los miembros de la superfamilia HhH-GPD, contiene el residuo que ayuda a extraer la base diana fuera de la doble hélice (*base flipper*), además de residuos que tapizan el sitio activo (Mol et al., 2002) (Figura 8). El segundo segmento incluye el motivo HhH-GPD, que contiene un residuo invariante de ácido aspártico esencial para la actividad catalítica (Nash et al., 1996), un residuo conservado de lisina característico de las ADN glicosilasas bifuncionales de esta superfamilia y cuatro residuos de cisteína que forman un complejo sulfoférrico [4Fe-4S] (Nash et al., 1996). La región que conecta ambos segmentos varía en longitud y secuencia entre los distintos miembros de la familia DML (Ponferrada-Marin et al., 2011). Además del dominio ADN glicosilasa, los miembros de la familia DML presentan también un dominio carboxilo-terminal muy conservado en los ortólogos de todas las especies donde se han detectado, pero que no está relacionado con ningún otro tipo de proteína conocida y cuya función es desconocida (Figura 8) (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002; Morales-Ruiz et al., 2006). También presentan un dominio N-terminal corto de carácter básico, rico en residuos de lisina, pero cuya secuencia no está conservada entre las distintas proteínas DML (Figura 8). En el caso de ROS1, esta región es importante para la unión no específica al ADN y el deslizamiento de la proteína a lo largo del ADN en búsqueda de 5-meC (Ponferrada-Marin et al., 2010).

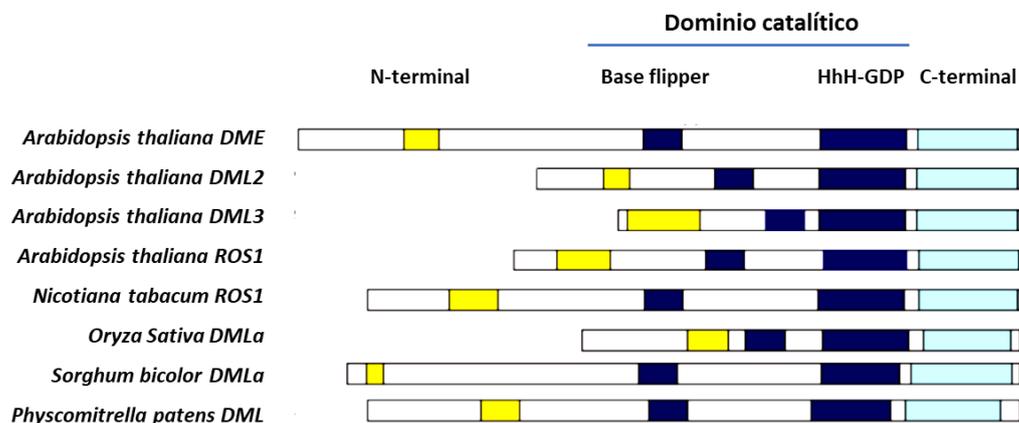


Figura 8. Dominios conservados en las ADN glicosilasas de la familia DML. Las cajas de color representan regiones conservadas entre las proteínas de la familia DML: una región rica en lisina no conservada N-terminal (amarillo), un dominio ADN glicosilasa distribuido en dos segmentos (azul oscuro) separados por una región no estructurada, y un dominio C-terminal altamente conservado (azul claro) que no se encuentra en ninguna otra familia de proteínas.

Las proteínas de *Arabidopsis* DME y ROS1 son los miembros de la familia DML mejor caracterizados *in vitro* (Agius et al., 2006; Gehring et al., 2006; Morales-Ruiz et al., 2006). Tras la eliminación de la 5-meC del ADN como base libre, ambas proteínas rompen el esqueleto azúcar-fosfato mediante una β - o β, δ -eliminación. En el caso de la β -eliminación se origina un hueco flanqueado por un grupo aldehído α, β insaturado en el extremo 3' (3'-PUA) y un extremo 5'-fosfato (5'-P). La β, δ -eliminación genera un hueco flanqueado por un extremo 3'-P y un extremo 5'-P. En ambos casos se genera un extremo 3' bloqueado que debe ser procesado. El 3'-PUA es convertido a 3'-OH por la acción de la endonucleasa APE1L (Li et al., 2015) y el 3'-P, por la acción principalmente de la ADN fosfatasa ZDP (Martinez-Macias et al., 2012), y en menor medida por la AP endonucleasa APE2 que muestra una leve actividad fosfatasa (Li et al., 2018). La restauración de la cadena se completa mediante la acción de una ADN polimerasa que puede insertar uno (*vía short-patch*) o varios nucleótidos (*long-patch*) y el sellado de la misma lo lleva a cabo la ADN ligasa1 (Cordoba-Canero et al., 2009). Además, la proteína de andamiaje XRCC1 participa en diferentes etapas de la ruta de desmetilación como la de iniciación catalizada por ROS1, la del procesamiento de los intermediarios con extremos 3'-P catalizada por ZDP, y en el paso final de ligación que sella la cadena procesada (Figura 9) (Martinez-Macias et al., 2013).

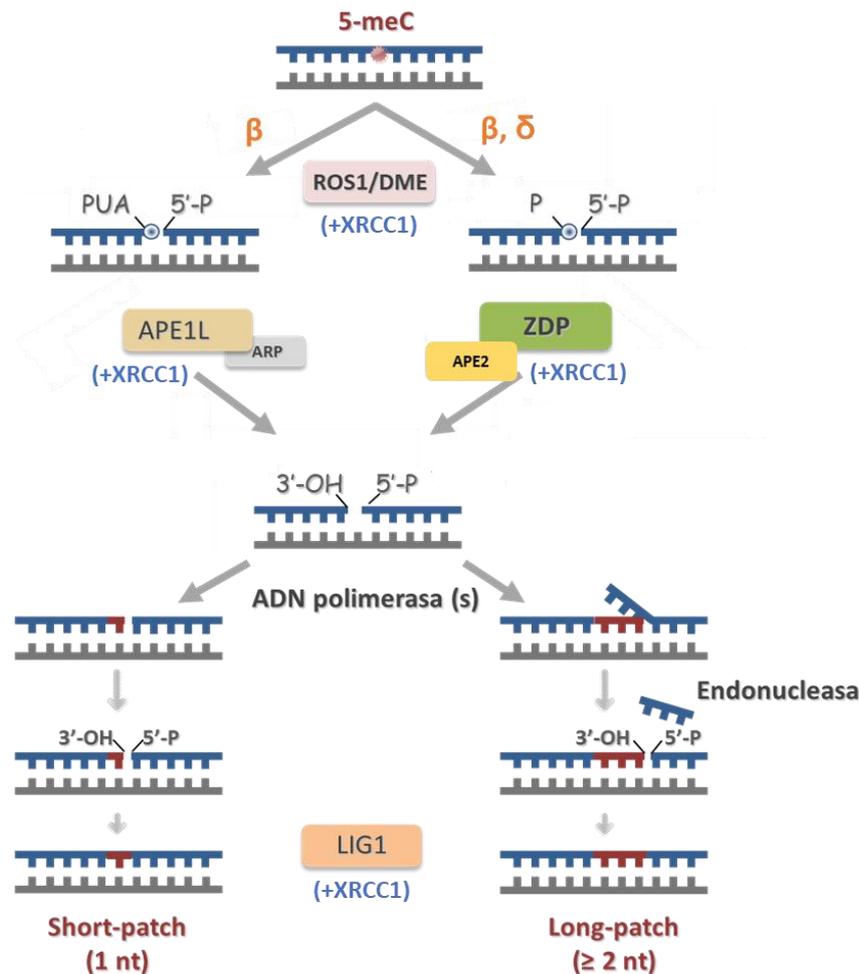


Figura 9. Ruta de desmetilación activa del ADN en plantas. Ver detalles en el texto.

4.1.1.1. Funciones *in vivo*

Aunque no se conocen con exactitud las funciones desempeñadas *in vivo* por las ADN desmetilasas de plantas, todo parece indicar que la principal función de DME y ROS1 es el control dinámico de la metilación (Hsieh et al., 2009; Zhu et al., 2007).

DME se identificó en un escrutinio diseñado para detectar mutaciones cuyos efectos en la viabilidad de las semillas dependiesen del origen parental del alelo mutante. La pérdida de función de esta proteína causa daños en el endospermo, alteraciones en el desarrollo del embrión y, como consecuencia, semillas abortivas (Choi et al., 2002). Esta proteína se expresa fundamentalmente en la célula central del gametofito femenino, donde se requiere para la expresión de los alelos maternos de los genes improntados *MEA*, *FWA* y *FIS2* (Choi et al., 2002; Jullien et al., 2006; Kinoshita et al., 2004).

Por su parte, ROS1 se identificó en una búsqueda de mutantes con expresión desregulada en el transgén *RD29A-LUC* (Gong et al., 2002). Mientras que en plantas silvestres el transgén y el gen endógeno homólogo se expresan, los mutantes *ros1* presentan silenciamiento transcripcional e hipermetilación de ambos *loci* (Gong et al., 2002). ROS1 previene el silenciamiento de transgenes y algunos genes endógenos, así como el mantenimiento de niveles mínimos de expresión de muchos transposones (He et al., 2011). Al contrario que DME, que sólo se expresa en el gametofito femenino, ROS1 se expresa en una amplia variedad de tejidos. Los mutantes *ros1* muestran anomalías en su desarrollo vegetativo, con un crecimiento más lento y una menor producción de silicuas, y en el desarrollo reproductivo, con una alta proporción de semillas abortivas (Gong et al., 2002).

Además de DME y ROS1, el genoma de *Arabidopsis* codifica dos parálogos adicionales, DML2 y DML3 (DEMETER-LIKE 2 y 3, respectivamente) (Ortega-Galisteo et al., 2008). A diferencia de los mutantes *dme* y *ros1*, que presentan un fenotipo pleiotrópico con alteraciones severas en el desarrollo (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002), los mutantes *dml2* y *dml3* no muestran ninguna alteración fenotípica evidente bajo condiciones de crecimiento normales (Ortega-Galisteo et al., 2008). El análisis de los patrones de metilación del ADN en el triple mutante *ros1 dml2 dml3* ha identificado 179 *loci* hipermetilados, sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles globales de metilación (Lister et al., 2009; Penterman et al., 2007). En este estudio se demostró que estas desmetilasas funcionan de forma redundante, aunque se observa especificidad para algunos *loci* (Penterman et al., 2007). Estos resultados sugieren que una importante función *in vivo* de ROS1, DML2 y DML3 es proteger al genoma de un exceso de metilación, contrarrestando la metilación *de novo* dirigida por RdDM (metilación del ADN dirigida por ARN) de cientos de regiones a lo largo del genoma de plantas (Ortega-Galisteo et al., 2008; Penterman et al., 2007; Zhu et al., 2007).

El efecto específico de ROS1, DML2 y DML3 sobre ciertos *loci* sugiere que hay mecanismos que guían a estas proteínas hacia sus dianas. Sin embargo, aún se desconoce si estas proteínas son guiadas hacia secuencias de ADN específicas o simplemente a regiones genómicas con una alta probabilidad de sufrir una metilación excesiva. No está claro cómo se dirigen a regiones específicas, pero hay evidencias que sugieren que ROS1 podría ser dirigida por pequeños ARNs unidos a la proteína ROS3 (Zheng et al., 2008). Mutantes *ros3* causan hipermetilación y silenciamiento transcripcional en varios *loci*, alguno de los cuales coincide con las regiones hipermetiladas en *ros1*. ROS1 y ROS3

podrían formar parte de un complejo de desmetilación, ya que colocalizan en discretos focos del nucleoplasma y en el nucléolo (Zheng et al., 2008).

4.2. Desmetilación del ADN en mamíferos

La desmetilación activa en mamíferos fue descrita por primera vez en cigotos de ratones, donde tras la fertilización se producía una rápida pérdida global de 5-meC en el genoma paterno que no podía ser explicada por dilución pasiva dependiente de replicación (Mayer et al., 2000). Estudios recientes sugieren que la desmetilación activa de ADN podría ocurrir mediante un mecanismo de desmetilación oxidativa mediada por la familia de proteínas *Ten Eleven Translocation* (TET) (Teperek-Tkacz et al., 2011). La familia TET engloba a las enzimas TET1, TET2 y TET3. TET1 cataliza la oxidación de la 5-meC a 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), y de forma consecutiva a 5-formilcitosina (5-fC) y 5-carboxilcitosina (5-caC) en una serie de reacciones dependientes de α -cetoglutarato y Fe (II) (Ito et al., 2011; Tahiliani et al., 2009). Se ha podido constatar la existencia de una correlación entre el aumento de la expresión de TET y el incremento de los niveles de 5-hmC (Ito et al., 2011; Tahiliani et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito que una represión de TET1 durante la diferenciación de células madre embrionarias, se ve acompañada por una disminución de los niveles de 5-hmC (Tahiliani et al., 2009).

La 5-hmC inhibe la acción de la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1, favoreciendo así un proceso de desmetilación pasiva dependiente de replicación (Hashimoto et al., 2012). Por otra parte, los otros dos derivados oxidados de la 5-meC (5-fC y 5-caC) son susceptibles de ser procesados por la Timina ADN Glicosilasa (TDG) iniciando así su sustitución por una citosina no metilada a través del mecanismo de reparación por escisión de bases. Por ahora, no está claro si las proteínas TET intervienen en una desmetilación pasiva, activa, o ambas (Wu and Zhang, 2017) (Figura 10).

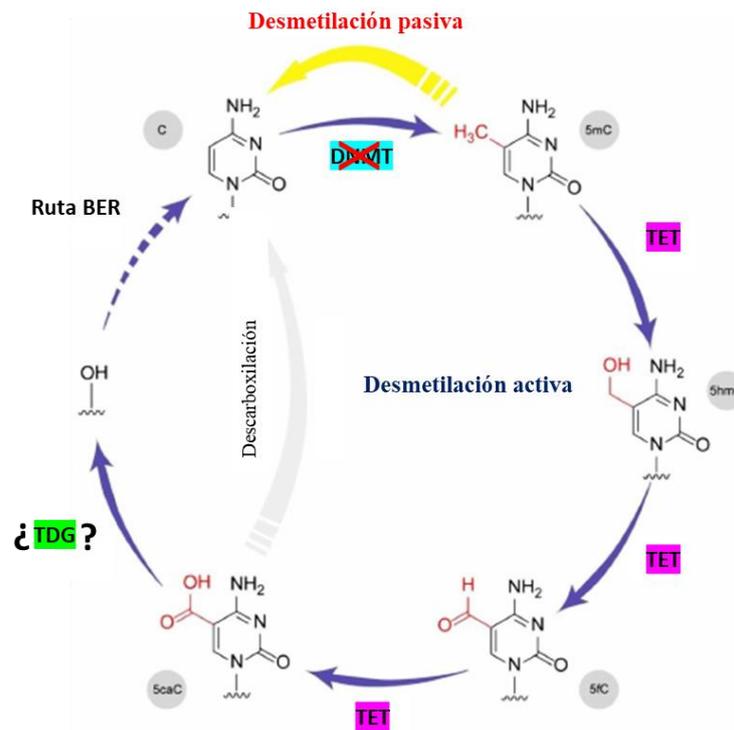


Figura 10. Desmetilación del ADN en mamíferos. Ver detalles en el texto. Adaptado de (Xu and Walsh, 2014).

5. Edición genética y epigenética

La edición epigenética hace uso de la región catalítica de una proteína con funciones epigenéticas (dominio efector) acoplada a un dominio de unión al ADN (*DNA Binding Domain*, DBD) con el fin de introducir, eliminar o alterar marcas epigenéticas de las histonas o el ADN en una región de interés, pudiendo así modular la expresión génica (Chong and Whitelaw, 2004; Holliday, 2005; Youngson and Whitelaw, 2008).

Tradicionalmente los dominios de unión al ADN se han empleado para la edición génica fusionados al dominio catalítico de la endonucleasa de restricción *FokI* la cual genera una rotura de doble cadena (DSB) que es reparada posteriormente bien por recombinación homóloga (*Homology Directed Repair*, HDR) o por *Non Homologous End Joining* (NHEJ). La reparación mediante HDR facilita la inserción o el reemplazo de una secuencia mediante recombinación con una secuencia génica de interés (McCaffrey et al., 2016), mientras que la reparación mediante NHEJ provoca la inserción o eliminación de nucleótidos al azar en la región diana, pudiendo causar cambios en el marco de lectura de la región codificante (Cong et al., 2013; Mao et al., 2008).

Actualmente existen multitud de dominios con especificidad de unión a ADN, entre los que destacan los dominios de dedos de zinc (*Zinc Finger Domains*, ZFDs) (Figura 11A) y los dominios TALE (*Transcription activator-like effectors*) (Figura 11B). Recientemente, la tecnología CRISPR/Cas9 ha surgido como una nueva herramienta molecular que permite editar el genoma de cualquier célula. Además, en dicho sistema, la versión desactivada de la nucleasa Cas9 (dCas9) se puede utilizar como un nuevo dominio de unión al ADN (Figura 11C) (Laufer and Singh, 2015). La utilización de dichos dominios fusionados a diferentes proteínas efectoras con actividad epigenética se está revelando como una herramienta muy prometedora para modificar de forma dirigida el epigenoma y controlar la expresión génica (Kronfol et al., 2017).

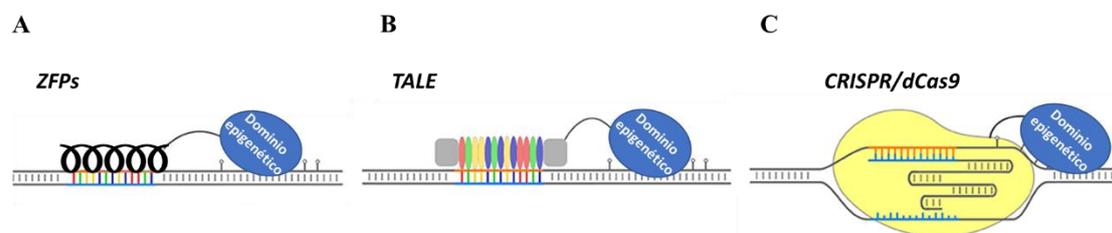


Figura 11. Estrategias de edición epigenética. (A) Proteínas de dedos de Zinc. (B) Proteínas con dominios TALE. (C) El sistema CRISPR/dCas9.

5.1. Dominios de unión al ADN

5.1.1. Dominios de dedos de Zinc

Los dominios de dedos de zinc (*Zinc Finger Domains*, ZFDs) se identificaron por primera vez en el factor de transcripción TFIIIA de *Xenopus laevis* (Miller et al., 1985). Se trata de dominios modulares capaces de interactuar con el ADN de forma específica. Deben su nombre a estar constituidos por una o más unidades estructurales (*Zinc Fingers*, ZFs) que adoptan forma de dedo y consisten en aproximadamente 30 aminoácidos que se disponen alrededor de un átomo de zinc, que ayuda a estabilizar sus pliegues (Pavletich and Pabo, 1991). La especificidad de unión al ADN viene determinada por los aminoácidos presentes en la región de reconocimiento, donde cada ZF reconoce una secuencia de ADN de 3 a 4 pb (Wolfe et al., 2000). La unión en tándem de varios ZFs permite crear un sistema capaz de reconocer una secuencia génica lo suficientemente grande como para que sea única en el genoma (Beerli et al., 2000; Kim et al., 2009).

Los ZFs se clasifican en tres clases basándose en su estructura: Cis₆, Cis₂Cis₂ y Cis₂His₂ (Papworth et al., 2006). Esta última es la mejor caracterizada, y es muy común en los factores de transcripción de mamíferos (Pearson et al., 2011; Swamynathan, 2010). Cada ZF se compone de 30 aminoácidos formando una estructura ββ con 2 residuos de histidina y 2 residuos de cisteína estabilizados por un átomo de zinc (Figura 12A) (Zhang et al., 2011).

Los ZFDs se utilizaron inicialmente para la interrupción génica (Figura 12B), sin embargo, recientemente, y tomando como base este tipo de aproximación, también se han utilizado para la edición epigenética sustituyendo el dominio endonucleasa por distintos efectores epigenéticos (Groner et al., 2012).

Los ZFDs presentan algunas ventajas respecto a otros dominios DBD. Una de ellas es que debido a su pequeño tamaño se incrementa la eficiencia de transfección (Falahi et al., 2015; Jurkowski et al., 2015). Además, puesto que los ZFDs se diseñan a partir de proteínas de mamíferos, las posibles respuestas inmunes adversas que se podrían generar en su uso en clínica serían menores. Sin embargo, la necesidad de generar nuevas proteínas para cada región diana del ADN, la convierte en una tecnología compleja que consume mucho tiempo (Ramirez et al., 2008).

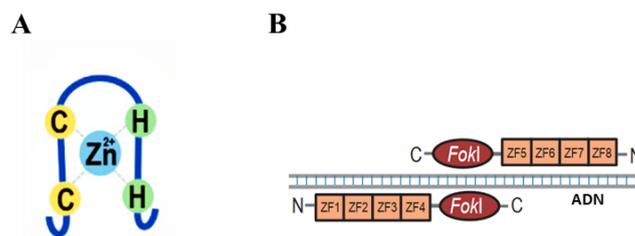


Figura 12. Dominios de dedos de Zinc Cis₂His₂. (A) Representación esquemática de la estructura del dominio de dedos de zinc C₂His₂. Adaptado de (Cassandri et al., 2017). (B) Herramienta para la edición génica basada la fusión de proteínas dedos de Zinc fusionadas al dominio de escisión de la endonucleasa FokI (ZFN). Adaptado de (Lau and Suh, 2017).

5.1.2. Dominios TALE

Otra clase de dominios de unión a ADN son los TALE (*Transcription-Activator-Like Effector*). Éstos fueron descritos por primera vez en el patógeno bacteriano de plantas *Xanthomonas* (Deng et al., 2014). Las proteínas naturales con dominios TALE actúan como factores de transcripción que reconocen secuencias específicas en el ADN gracias

a un dominio central altamente conservado que está constituido por una serie de repeticiones de secuencias de 34 aminoácidos. Cada repetición reconoce de manera independiente un nucleótido específico a través de dos residuos variables (Miller et al., 2011; Scholze and Boch, 2011). Al igual que los dominios de dedos de zinc, los dominios TALE se pueden diseñar para dirigirlos a secuencias específicas mediante la unión de las unidades de repetición apropiadas. Inicialmente, también se utilizaron para la edición génica (Figura 13) (Mussolino and Cathomen, 2012), aunque también se han utilizado con posterioridad fusionados a efectores con funciones epigenéticas (Maeder et al., 2013b; Mendenhall et al., 2013).

La mayor ventaja de los efectores TALE es que muestran una mayor especificidad por la región diana debido a una simplificación del mecanismo de reconocimiento (Moscou and Bogdanove, 2009). Sin embargo, conllevan una menor eficiencia de transfección, en comparación con los ZFP, debido a su mayor tamaño (Falahi et al., 2015; Jurkowski et al., 2015). Además, algunos dominios TALE son sensibles a la metilación del ADN en la región diana (Maeder et al., 2013b). Al igual que los dominios de dedos de zinc, la necesidad de generar nuevas proteínas para cada región diana del ADN hace que esta tecnología sea compleja.

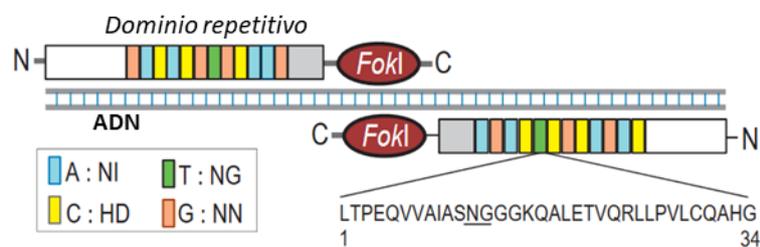


Figura 13. Dominios TALE. Herramienta para la edición génica basada en los efectores TALE fusionados al dominio de escisión de la endonucleasa *FokI*. Adaptado de (Lau and Suh, 2017).

5.1.3. El sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) fue descrito inicialmente como un sistema inmune adaptativo de bacterias y arqueas. Está basado en un conjunto de genes localizados en una pequeña región del cromosoma bacteriano rico en secuencias palindrómicas repetidas, entre las que se intercalan pequeños fragmentos de ADN exógeno proveniente de fagos o plásmidos que

previamente han infectado la bacteria y frente a los cuales ésta ha adquirido resistencia (Barrangou et al., 2007; Garneau et al., 2010; Mojica et al., 2005). Adyacente a esta región cromosómica se encuentra una zona codificante de las proteínas Cas (*CRISPR Associated Proteins*) (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005), que participan activamente en este sistema, tanto reconociendo e integrando el ADN exógeno en el propio cromosoma bacteriano durante una primera infección, como destruyéndolo en infecciones subsiguientes (Haft et al., 2005).

Se han identificado distintos tipos de sistemas CRISPR que varían en función de la especie bacteriana, siendo el sistema CRISPR tipo II, perteneciente a *Streptococcus pyogenes*, el más utilizado para la edición génica (Makarova et al., 2002). En este sistema, se produce una primera fase de *Integración* mediada por dos proteínas Cas (Cas1 y Cas2), que reconocen y degradan el ADN extraño, incorporando al propio genoma bacteriano fragmentos cortos de dicho ácido nucleico (conocidos como *protospacers*). De esta forma se genera una especie de memoria molecular de microorganismos invasores conocida como “CRISPR *array*” (Figura 14). Cuando un ADN exógeno es introducido una segunda vez, se inicia la fase de *Expresión*, en la cual tiene lugar la transcripción del “CRISPR *array*”. Se genera así un precursor denominado pre-ARN CRISPR (pre-crRNA) que, tras su procesamiento mediante la ribonucleasa III, da lugar a un ARN de menor tamaño que es complementario a la secuencia de ADN foráneo y se denominan crRNA. De forma paralela, se genera otra molécula de ARN distinta que recibe el nombre de ARN CRISPR trans-activador (tracrRNA) (Figura 14). En una tercera fase o fase de *Ruptura*, el ARN CRISPR maduro (crRNA) se asocia a la secuencia activadora tracrRNA, formando un híbrido de ARN (tracrRNA:crRNA), necesario para dirigir a la endonucleasa Cas9 hacia el ADN exógeno promoviendo su degradación (Figura 14). De esta forma se evita la infección y se adquiere inmunidad frente al invasor (Bhaya et al., 2011).

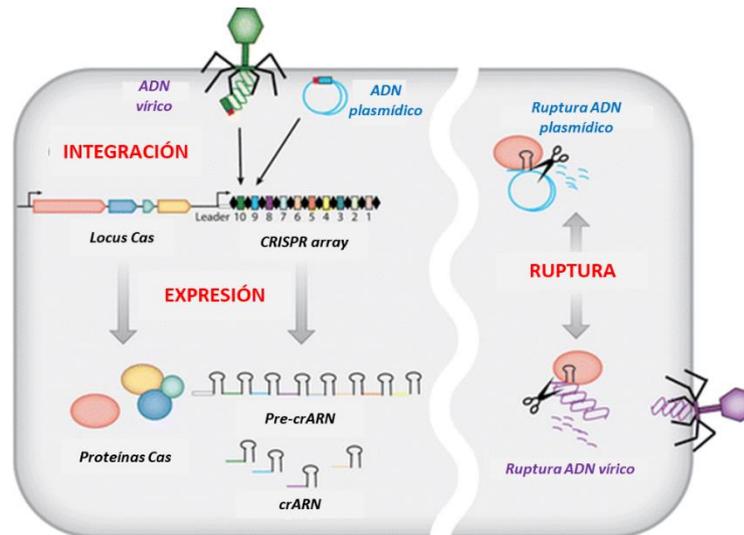


Figura 14. Sistema CRISPR-Cas. Ver detalles en el texto. Adaptado de (Bhaya et al., 2011).

El principal requerimiento para que este sistema funcione es la presencia de una pequeña secuencia de 3-5 pares de bases de ADN denominada PAM (*protospacer adjacent motif*) inmediatamente adyacente a la secuencia diana en el material genético del organismo invasor. La secuencia PAM, que no forma parte del “CRISPR *array*”, es reconocida por la propia endonucleasa Cas9 y permite que el sistema sea capaz de distinguir entre el ADN propio y el exógeno (Malí et al., 2013b). Las secuencias PAM presentan especificidad para cada ortólogo de Cas9 que se conoce (Hsu et al., 2013). En el caso del sistema CRISPR II, la secuencia PAM es 5′-NGG-3′ donde N puede ser cualquier nucleótido (Jinek et al., 2012).

El sistema CRISPR/Cas9 ha tenido un gran impacto en el campo de la edición genética, empleándose en una amplia variedad de organismos tales como bacterias, células humanas, ratones, ratas, pez cebra, moscas de la fruta, levaduras y nematodos (Cong et al., 2013; Hsu et al., 2013; Jinek et al., 2012; Mali et al., 2013b; Pennisi, 2013). Al igual que ocurre con las endonucleasas dirigidas por DBDs mencionados anteriormente, la maquinaria de reparación celular puede reparar el daño en el ADN producido por las proteínas Cas9 por dos mecanismos: NHEJ o HDR.

Recientemente, se ha conseguido simplificar esta tecnología mediante el uso de la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* y un único ARN guía quimérico (ARN guía) que combina el tracrRNA y el crRNA y permite dirigir al complejo Cas9/ARN a una región génica de interés (Jinek et al., 2012) (Figura 15A).

Además, la optimización de la tecnología CRISPR ha permitido la obtención de una versión catalíticamente inactiva de la nucleasa Cas9 (dCas9) (Figura 15B) con los dominios con actividad endonucleasa (RuvC1 y HNH) mutados y que carece de actividad catalítica, aunque conserva la capacidad de unión al ARN guía y ADN diana (Jinek et al., 2012).

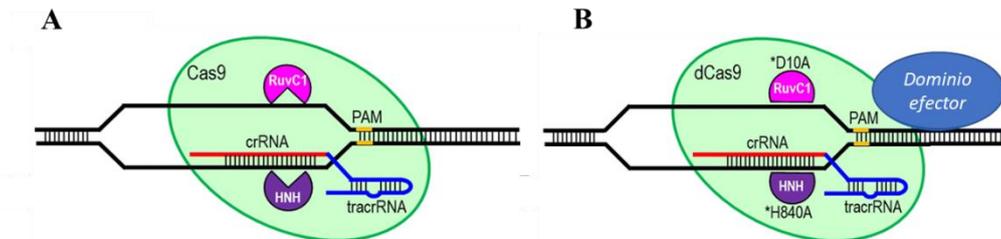


Figura 15. CRISPR/Cas9 y CRISPR/dCas9. (A) Sistema CRISPR/Cas9 empleado para la edición génica. (B) Sistema CRISPR/dCas9 empleado para la edición epigenética. Adaptado de (Lau and Suh, 2018).

A diferencia de ZFs y TALE donde para cada región diana es necesaria la construcción de una nueva proteína, la proteína dCas9 se puede dirigir a distintas regiones del genoma cambiando únicamente la secuencia de 20 nucleótidos del ARN guía complementaria a la región de interés (Cong et al., 2013).

Además, su efectividad no se ve afectada por el estado de metilación del ADN debido a que el reconocimiento de secuencias de ADN del complejo CRISPR/dCas9 se basa en el emparejamiento de bases de éste con la secuencia del ARN guía y no por interacción proteína-ADN, como es el caso de ZFs y TALE (Hsu et al., 2013). Asimismo, el descubrimiento de ortólogos de Cas9, ha permitido usar proteínas de menor tamaño que permiten mejorar considerablemente las eficiencias de transfección. Con estos ortólogos también es posible el uso de secuencias PAM alternativas, ampliando el rango de acción de la nucleasa (Qi et al., 2013). Además, uno de los inconvenientes del uso de los dominios de unión al ADN para la edición epigenética es la generación de efectos no deseados en otras zonas del genoma distintas a la región diana (efecto *off-target*) (Ma et al., 2014). El sistema CRISPR ha supuesto un avance significativo ya que, aunque no elimina por completo el efecto *off-target*, sí ha conseguido reducirlo varios órdenes de magnitud en comparación con las otras metodologías (Qi et al., 2013), convirtiéndose en una herramienta sencilla de usar, eficaz, versátil y asequible.

5.2. Dominios efectores

Al igual que ocurre con los dominios de unión al ADN de dedos de zinc y TALE, la fusión de diferentes activadores o represores transcripcionales, así como de efectores epigenéticos a la proteína dCas9, permite usar el sistema para modular la expresión génica de un gen de interés (Brocken et al., 2018; Cheng et al., 2013).

Los dominios efectores utilizados hasta la fecha se pueden clasificar en dos grandes grupos. Los de tipo transcripcional, que son aquellos que dan lugar a una activación o represión de la transcripción. Y en segundo lugar, los de tipo epigenético, que incluyen aquellas enzimas que modifican la cromatina, tales como las ADN metilasas o desmetilasas, y las modificadoras de las histonas, destacando las histonas acetiltransferasas o desacetilasas (Kungulovski and Jeltsch, 2016).

5.2.1. Activadores y represores transcripcionales

Los primeros estudios fusionaron a dCas9 la subunidad ω de la ARN polimerasa en *Escherichia coli*, consiguiendo incrementar tres veces la expresión del gen reportero GFP (Bikard et al., 2013; Hsu et al., 2013). En las células eucariotas, la primera generación de activadores fusionados a dCas9 fueron los dominios de activación de p65 y VP16. El primero (p65) es un activador transcripcional de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). La proteína de fusión dCas9-p65 es capaz de activar un gen reportero UAS-GFP en la línea celular HEK-293 (Gilbert et al., 2013). Por otro lado, VP16 es un factor de transcripción del virus herpes simple que interacciona con multitud de proteínas implicadas en la transcripción, tales como proteínas de unión a la caja TATA (TBP) y factores de transcripción tipo II entre otras. El factor de transcripción VP16 puede ser repetido en tándem para aumentar su función activadora de manera que suelen usarse conjugados de 3 copias (VP48), 4 copias (VP64) o 10 copias (VP160) (Beerli et al., 1998; Graslund et al., 2005). La fusión de VP48 a dCas9 (dCas9-VP48) permitió reactivar el gen reportero GFP bajo el control del promotor *NANOG* en cigotos de ratón (Cheng et al., 2013). Resultados similares se consiguieron con la unión de VP64 a la proteína dCas9 (dCas9-VP64) permitiendo reactivar genes reporteros y endógenos, así como incrementar la expresión de genes ya activos (Maeder et al., 2013a; Perez-Pinera et al., 2013a). Asimismo, la proteína dCas9-VP160 permitió la reactivación de los genes endógenos *IL1RN*, *OCT4* y *SOX2* en líneas celulares humanas (Cheng et al., 2013).

Además, se ha demostrado que la fusión de dCas9 con el dominio represor modificador de la cromatina *Krüppel-associated box* (KRAB) permite silenciar genes eficazmente en células de mamíferos (Gilbert et al., 2013). Concretamente, la proteína de fusión dCas9-KRAB dirigida a secuencias UAS (*Upstream activating sequence*) induce el silenciamiento génico del gen reportero UAS-GFP (Gilbert et al., 2013).

5.2.2. Efectores epigenéticos

Las modificaciones postraduccionales en los extremos amino terminales de las histonas constituyen uno de los tipos cambios que pueden efectuarse de forma dirigida mediante edición epigenética. La proteína p300 es una enzima nuclear altamente conservada de 300 kDa perteneciente a la familia KAT3 de lisinas acetiltransferasas. Esta proteína cataliza la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27), y recientemente también se ha implicado en la acetilación de la lisina 9 de esa misma histona (H3K9) (Gimenez et al., 2016; Puchta, 2017). La proteína p300 fusionada a dCas9 se ha empleado para reactivar de forma eficiente la transcripción de diferentes genes diana en células humanas, incluyendo *IL1RN*, *MYOD* y *OCT4* (Hilton et al., 2015). En este mismo estudio, la proteína de fusión dCas9-p300 dirigida a la región de control de locus de β -globina de mamíferos (LCR) indujo la expresión génica de los genes de hemoglobina (Hilton et al., 2015). También se ha fusionado a dCas9 la histona desmetilasa LSD1, permitiendo la desmetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me2) en sitios alejados hasta 350 pares de bases del sitio de unión del ARN guía en células madre embrionarias (Kearns et al., 2015).

Otros efectores epigenéticos ampliamente utilizados son las ADN-metiltransferasas (Stepper et al., 2017). En estudios recientes se consiguió un incremento del 50% en la metilación en células HEK-293 usando la proteína de fusión dCas9-DNMT3A (Anton and Bultmann, 2017; McDonald et al., 2016; Vojta et al., 2016). También se ha conseguido el silenciamiento de genes reporteros y endógenos mediante metilación de sus secuencias promotoras (Liu et al., 2016). En otro estudio, la fusión de dCas9 con la metiltransferasa MQ1 de procariontas es capaz de inducir la metilación de sitios CpG en ratones mediante microinyección en el cigoto, demostrando su utilidad potencial en el estudio del desarrollo temprano (Lei et al., 2017). En todos estos estudios, se observaron incrementos sustanciales de los niveles de metilación del ADN en la región diana, que se correlacionaron con una disminución de la expresión génica derivados de dicha metilación.

Varios grupos han trabajado con fusiones de dCas9 a proteínas de la familia TET (TET1, TET2 y TET3) ya que hasta el momento son las únicas a las que se atribuye un papel en los procesos de desmetilación de ADN en mamíferos (Wu and Zhang, 2017). La proteína de fusión dCas9-TET1 es capaz de reactivar el gen reportero GFP fusionado al promotor *Snrpn*, al inducir un descenso de un 90% en los niveles de metilación en dicho promotor (Liu et al., 2016). En otro estudio reciente, se ha logrado la desmetilación del ADN y la regulación de los *loci RANKL* o *MAGEB2* en las células HEK293-FT mediante la fusión del dominio catalítico de TET1 a dCas9 (Xu et al., 2016). En este contexto, también se ha empleado el sistema *SunTag* para dirigir TET1 de forma específica. Dicho sistema se basa en la adición de un péptido en el extremo C-terminal de dCas9 que contiene varias repeticiones de un epítipo que es reconocido por un anticuerpo fusionado al dominio catalítico de TET1, permitiendo el reclutamiento de forma simultánea de múltiples copias dicho dominio. Recientemente se emplearon distintas versiones de dicho sistema utilizando como diana un residuo de citosina en el sitio de unión STAT3 “aguas arriba” del gen (*Gfap*) que codifica la proteína ácida fibrilar glial específica del marcador de astrocitos (GFAP). Este residuo está metilado en la mayoría de los tipos de células, excepto en los astrocitos, y la desmetilación de este sitio juega un papel crítico en la diferenciación de las células precursoras neurales (CPNs) en astrocitos. Los resultados mostraron una desmetilación del 7%, 14% y 9% en las tres regiones dianas alrededor del sitio STAT3 (Morita et al., 2016).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los patrones normales de metilación de ADN son el resultado de continuos procesos de metilación y desmetilación. Las alteraciones de dichos patrones son un factor importante en el inicio y desarrollo de algunas enfermedades humanas, incluido el cáncer. Aunque los mecanismos de desmetilación en animales no se conocen con exactitud, se ha demostrado que las plantas utilizan ADN glicosilasas de la familia DML para iniciar una desmetilación activa del ADN mediante un proceso análogo a la ruta de reparación por escisión de bases. La hipótesis de partida de esta tesis doctoral es que las 5-meC ADN glicosilasas de plantas pueden expresarse en células humanas e iniciar un proceso de desmetilación activa del ADN.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido determinar si es posible utilizar 5-meC ADN glicosilasas de plantas para modificar los patrones de metilación en células humanas.

Se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar si la ADN glicosilasa vegetal DME es capaz de modificar el metiloma de células tumorales humanas.
2. Diseñar un sistema basado en la tecnología CRISPR/dCas9 y la ADN glicosilasa vegetal ROS1 para inducir la desmetilación de secuencias específicas en células humanas.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Efectos de la expresión de la ADN glicosilasa DME en células tumorales humanas

La metilación del ADN es una marca epigenética estable, pero reversible, que promueve el silenciamiento génico transcripcional, participando así en la regulación de la expresión génica (Goll and Bestor, 2005). La alteración de los patrones de metilación de ADN es un componente fundamental de muchas enfermedades humanas, y en particular en muchos tipos de cáncer, que con frecuencia muestran una metilación aberrante (Baylin and Jones, 2016; Sandoval and Esteller, 2012).

Los niveles de metilación son controlados y modificados por mecanismos de desmetilación que aún no se conocen con exactitud en células humanas. En mamíferos, se ha descrito la familia de proteínas TET, que modifican la 5-meC a través de reacciones sucesivas de oxidación, pero aún se desconoce con exactitud si son éstas las enzimas implicadas en la eliminación directa de esta marca epigenética (Ito et al., 2011; Tahiliani et al., 2009). Sin embargo, en plantas, estudios bioquímicos y genéticos han demostrado la existencia de ADN glicosilasas capaces de desmetilar el ADN escindiendo directamente la 5-meC. Su mecanismo de acción implica la generación de un sitio abásico que ha de ser procesado y reemplazado por una citosina no metilada mediante un mecanismo análogo a la ruta BER (Gong et al., 2002; Kapoor et al., 2005; Morales-Ruiz et al., 2006).

En este contexto, el primer objetivo de esta tesis se propone determinar si la expresión de la ADN glicosilasa vegetal DME en células humanas derivadas de cáncer de colon (DLD-1), inicia un proceso de desmetilación activa y revierte el silenciamiento de genes relacionados con el desarrollo tumoral.

1. Transfectantes estables obtenidos a partir de células DLD-1 expresan la desmetilasa vegetal DME

Las construcciones pcDNA-DME y pcDNA-DMEmut, junto con el vector vacío pcDNA3.1, se utilizaron para transfectar la línea de cáncer de colon DLD-1 y se obtuvieron transfectantes estables mediante selección con neomicina. Los clones resistentes se crecieron durante varias semanas hasta conseguir una elevada densidad celular y la expresión de DME y DMEmut se determinó mediante RT-PCR. Así mismo, se corroboró la presencia de las proteínas DME y DMEmut en los transfectantes estables mediante western blot de extractos nucleares (Figura 16).

Los resultados obtenidos confirman la presencia tanto del ARNm (Figura 16A) de DME y DMEmut, como de sus proteínas correspondientes (Figura 16B) en todos los transfectantes estables analizados. No se observó expresión en las células DLD-1 sin transfectar ni en aquellas células transfectadas con el vector vacío.

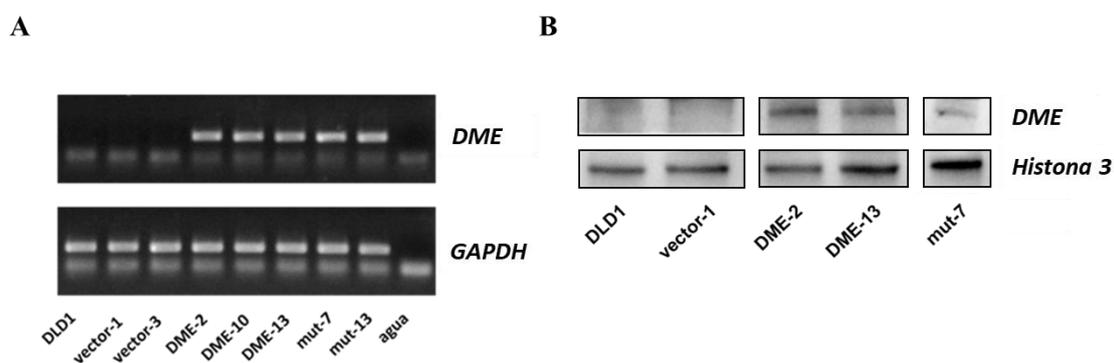


Figura 16. Expresión de DME en las células DLD-1. (A) Análisis de expresión de *DME* mediante RT-PCR. Se utilizó ARN total y se usaron cebadores específicos para *DME*. El gen *GAPDH* se utilizó como control de expresión constitutiva. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2%. (B) Análisis mediante western-blot de la proteína DME. Se empleó un anticuerpo contra la región C-terminal de ROS1 en extractos nucleares. La Histona 3 se utilizó como control interno de carga.

2. La expresión de DME en células DLD-1 induce la desmetilación y reactivación de genes hipermetilados

Con el objetivo de determinar si la enzima DME era capaz de llevar a cabo un proceso de desmetilación activa en la línea DLD-1, se estudió el nivel de metilación de diversos *loci* relacionados con el proceso tumoral y cuyos promotores se encuentran hipermetilados en

esta línea celular. En particular se analizó el estado de metilación de los genes *ROR2* (Lara et al., 2010), *p14* (Esteller et al., 2000) y *p16* (Merlo et al., 1995).

ROR2 (*receptor tyrosine kinase-like orphan 2*) es una proteína transmembrana perteneciente a una familia altamente conservada de receptores tirosina quinasa que inhibe la ruta de señalización Wnt canónica dependiente de β -catenina (Ford et al., 2013). El gen *p14* codifica una proteína nuclear que actúa como un supresor de tumor activando a p53, que a su vez promueve la expresión de genes inhibidores del ciclo celular y de genes inductores de apoptosis (Ozenne et al., 2010). Por su parte, el gen *p16* codifica un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CDK) que actúa como gen supresor de tumor frenando el ciclo celular e impidiendo la progresión desde la fase G1 a la fase S (Rayess et al., 2012).

Los niveles de metilación de los promotores de los genes seleccionados se determinaron a partir de ADN_g de cada clon, al que se sometió a un tratamiento con bisulfito sódico seguido de una PCR cuantitativa con cebadores específicos para el estado de metilación (qMSP). Los resultados obtenidos muestran una disminución cercana al 100 % en los niveles de metilación de los promotores de los genes *ROR2* y *p14* en los transfectantes que expresan la enzima DME silvestre, respecto de los que expresan una versión catalíticamente inactiva o contienen solo el vector vacío (Figura 17A). Esta disminución fue de aproximadamente un 50% en el caso del promotor del gen *p16* (Figura 17A).

Para determinar si estos descensos en los niveles de metilación se correlacionaban con un incremento de la expresión génica de los genes diana, se llevó a cabo un análisis mediante qRT-PCR (Figura 17B). Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo de expresión en todos los genes analizados sólo en aquellos transfectantes que expresan la versión silvestre de la proteína DME, siendo los niveles de expresión prácticamente indetectables en el resto de las condiciones de estudio (Figura 17B).

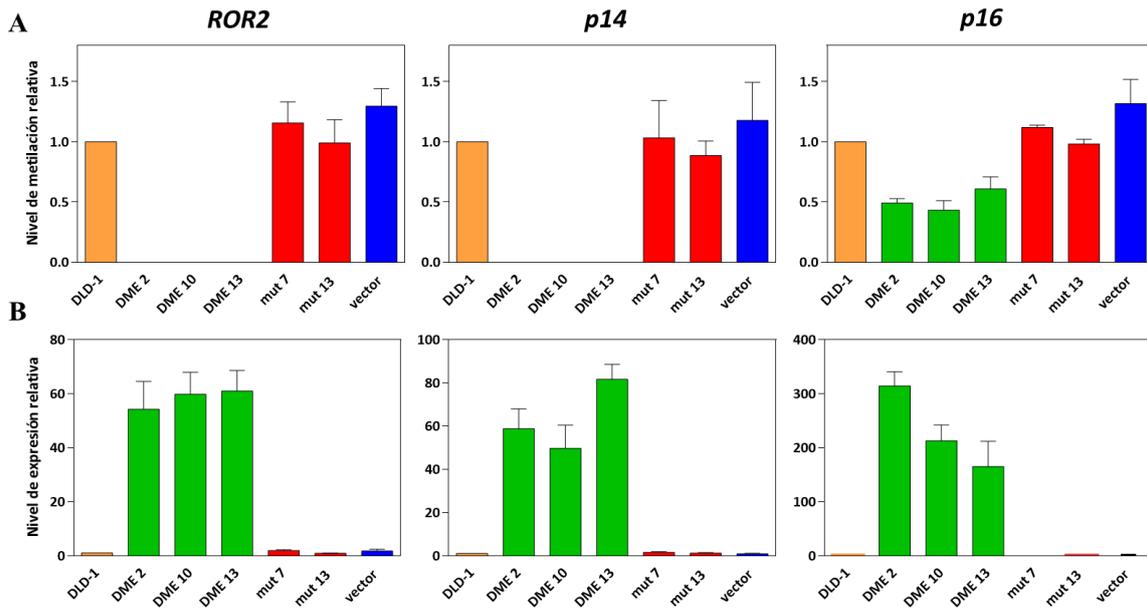


Figura 17. Nivel de metilación y expresión génica de *ROR2*, *p14* y *p16* en células que expresan DME. (A) Niveles de metilación analizados mediante qMSP. (B) Niveles de expresión génica analizados mediante qRT-PCR. Se utilizaron células no transfectadas (DLD-1), tres transfectantes independientes que expresaban la proteína DME silvestre (DME 2, DME 10 y DME 13), dos que expresaban la proteína DME mutante (mut 7 y mut 13) y uno que expresaban el vector vacío (vector). Los valores fueron normalizados frente a los obtenidos en las células no transfectadas (DLD-1). Los datos son la media \pm error estándar de la media (media \pm EEM) de tres experimentos independientes.

La 5-Aza-2'-deoxicitidina (aza) es un agente antitumoral análogo de citidina que se incorpora en el ADN durante la replicación impidiendo la actuación de las ADN-metiltransferasas, dando lugar a una desmetilación pasiva del ADN (Issa and Kantarjian, 2009). Los clones estables se sometieron a un tratamiento con aza con el fin de comparar la efectividad de este agente desmetilante con la obtenida a partir de la actividad de DME. Los resultados muestran que los niveles de metilación de los promotores de las tres dianas analizadas se redujeron más de un 50% en las células parentales tratadas con aza en comparación con las células sin tratar (Figura 18A). En los transfectantes que expresaban DME esta disminución fue mucho mayor que la inducida por aza en el caso de los genes *ROR2* y *p14*. Por el contrario, en el caso del gen *p16*, fueron las células tratadas con aza las que presentaron una disminución ligeramente más pronunciada en comparación con aquellas que expresaban DME (Figura 18A).

Para determinar si la disminución en los niveles de metilación se correlacionaba con una reactivación de la expresión génica, se realizó un análisis mediante qRT-PCR. Los

resultados revelaron que en el caso de los genes *ROR2* y *p14* el tratamiento con aza sólo indujo un incremento moderado de su expresión génica, siendo dicho incremento significativamente más pronunciado en aquellas células que expresaban DME (Figura 18B). Sin embargo, en el caso de *p16*, la reactivación fue mayor en las células tratadas con este agente que en aquellas que expresaban DME (Figura 18B).

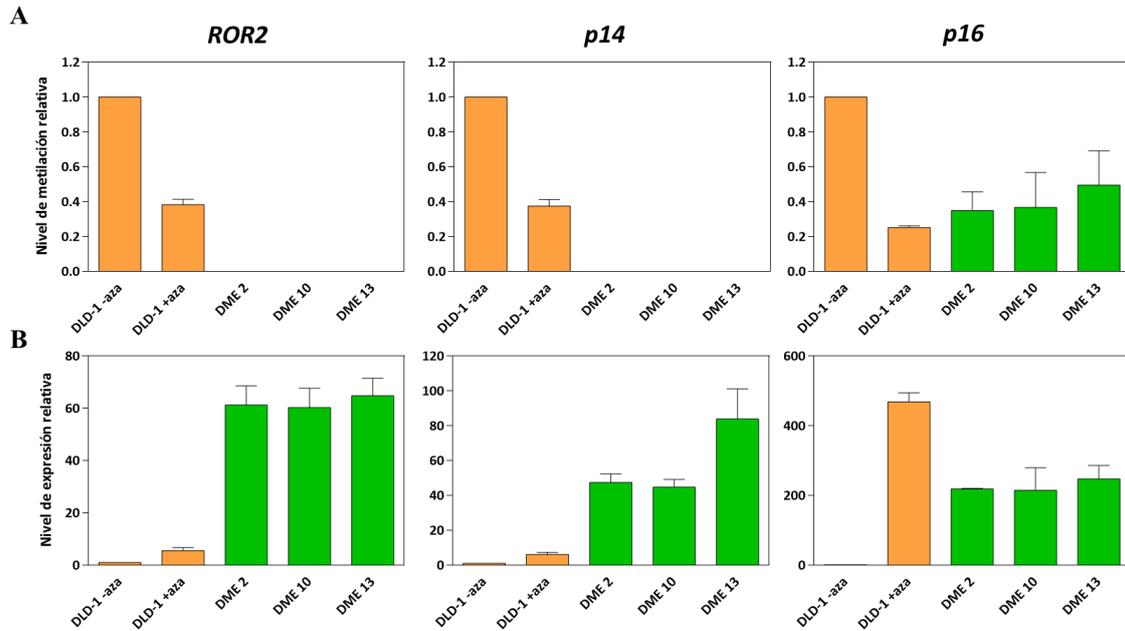


Figura 18. Comparación de la desmetilación y reactivación génica inducidas por DME y por 5-Aza-2'-deoxicitidina. (A) Niveles de metilación analizados por qMSP. (B) Niveles de expresión génica analizados por qRT-PCR. Las células DLD-1 se trataron (DLD-1+aza) o no (DLD1-aza) con 5-Aza-2'-deoxicitidina (2.5 μ M) durante 72 h. Se representan los valores relativos a los obtenidos con las células DLD-1 sin tratar (DLD-1-aza). Los datos son la media \pm EEM de tres experimentos independientes.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que la actividad de la proteína DME en células DLD-1 provoca una disminución de la metilación en el promotor de los genes estudiados y su consiguiente reactivación génica. Dicha reactivación es más eficaz que la conseguida con el agente desmetilante aza, en el caso de *ROR2* y *p14*, o comparable a la obtenida con dicho agente, en el caso de *p16*.

3. La expresión DME sensibiliza las células DLD-1 a agentes antitumorales

Estudios recientes indican que los mecanismos epigenéticos pueden tener un importante papel en el campo de la quimioresistencia. Existen ensayos preclínicos que sugieren que los inhibidores de histonas desacetilasas o ADN metiltransferasas pueden alterar el grado de quimioresistencia en distintos tipos de tumores (Kelly et al., 2010). Para determinar si la expresión de DME en DLD-1 afecta su sensibilidad a agentes antineoplásicos, se analizó el nivel de proliferación de los transfectantes tras un tratamiento con concentraciones crecientes de oxaliplatino y 5-fluorouracilo (5-FU), dos de los agentes quimioterapéuticos más usados en el tratamiento del cáncer de colon.

El oxaliplatino es un agente que interacciona con el ADN formando enlaces intra e intercatenarios que bloquean la síntesis de ADN (Takara et al., 2012; Todd and Lippard, 2009). Por otro lado, el 5-FU inhibe la timidilato sintasa y, por lo tanto, interfiere con la síntesis del ADN y del ARN (Grem and Fischer, 1989; Longley et al., 2003).

Los resultados muestran que, para todas las concentraciones analizadas de ambos agentes quimioterapéuticos, las células que expresan DME son más sensibles que las células sin transfectar, las transfectadas con el vector vacío o las que expresan la versión catalíticamente inactiva de DME (Figura 19).

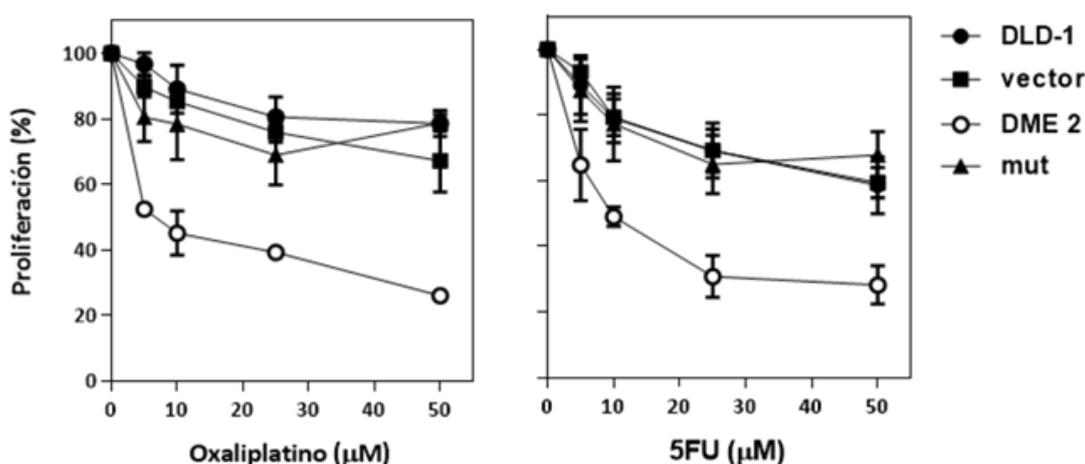


Figura 19. Sensibilidad frente al oxaliplatino y al 5-FU. La viabilidad celular de DLD-1 y los diferentes transfectantes estables se determinó tras un tratamiento durante 48 h con distintas concentraciones de oxaliplatino o 5-FU. Los datos son la media \pm EEM de tres experimentos independientes.

4. La expresión de DME inhibe la formación de colonosferas *in vitro*

Recientemente se ha descrito en diversos cánceres, incluido el de colon, la existencia de un conjunto de células que tienen capacidad de autorenovación, migración, invasión y generación de tumores (Visvader and Lindeman, 2012). A estas células se les ha denominado células madre cancerosas (*Cancer Stem Cells*, CSCs) y se ha propuesto que desempeñan un papel crucial en la recurrencia del cáncer (Visvader, 2011). Una característica de las CSCs es su capacidad de formar de esferoides flotantes, llamados colonosferas en el caso del cáncer de colon, en condiciones de baja adherencia en un medio libre de suero (Shaheen et al., 2016).

Para determinar si la expresión de DME en DLD-1 alteraba la capacidad de formación de colonosferas, se analizó el tamaño y morfología de las colonosferas generadas tras cultivar las células en condiciones de no adherencia (ver apartado 16 de Materiales y Métodos) (Figura 20A). Los resultados muestran que las colonosferas primarias y secundarias generadas por las células que expresan la versión silvestre de DME tienen un tamaño y morfología muy diferente a las generadas por las células sin transfectar o las que expresan la versión catalíticamente inactiva de DME (mut 7, mut 13), que presentan un tamaño significativamente mayor (Figura 20B).

Estos resultados sugieren que las células que expresan DME tienen una capacidad reducida de formar colonosferas, alterando una de las características principales de las CSCs.

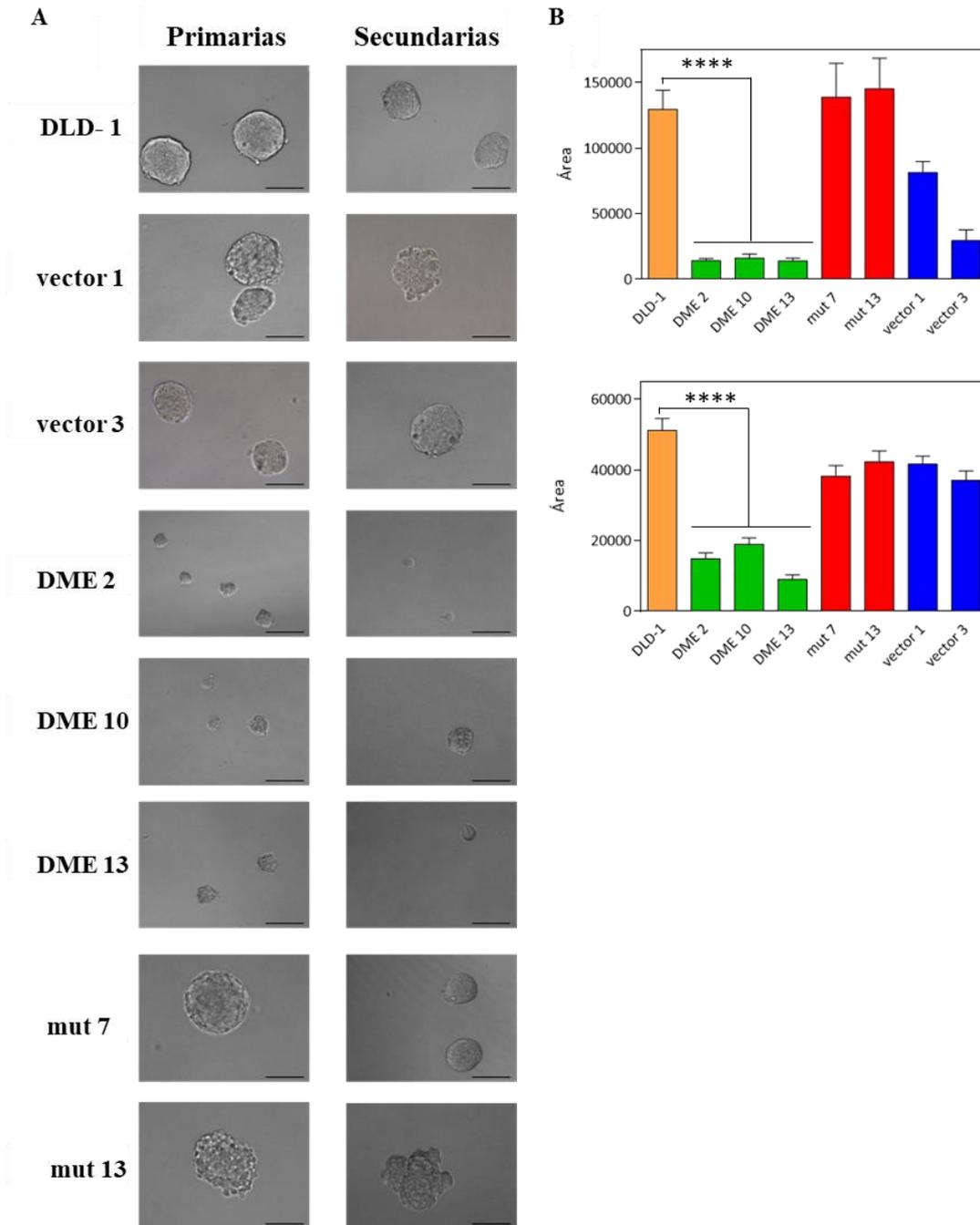


Figura 20. Efecto de la expresión de DME sobre la capacidad de formación de colonosferas *in vitro*. (A) Imágenes representativas de colonosferas primarias (panel izquierdo) y secundarias (panel derecho) generadas por células DLD-1 y los diferentes transfectantes. (B) Tamaño de las colonosferas primarias (gráfica superior) y secundarias (gráfica inferior) en las diferentes líneas celulares. Los datos son la media \pm EEM de 20 colonosferas primarias y 40 colonosferas secundarias. Los asteriscos indican diferencias significativas en un test *t* de Student (****: $P < 0.0001$).

5. La expresión de DME inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*

A continuación, se examinó si la expresión de DME tenía algún efecto en la capacidad de las células DLD-1 para inducir tumores *in vivo* mediante la realización de xenoinjertos en modelos murinos (Golovko et al., 2015; Morton and Houghton, 2007).

Para ello, se inyectaron por vía subcutánea células que expresan DME en el flanco izquierdo y células que expresan la versión catalíticamente inactiva de DME (mut) en el flanco derecho de ratones inmunodeprimidos. En ambos casos se generaron tumores visibles a nivel macroscópico (Figura 21A), pero aquellos originados a partir de las células que expresaban la versión silvestre de la desmetilasa vegetal fueron de un tamaño significativamente menor que los generados por células portadoras de la versión mutante de la proteína (Figura 21B).

Estos resultados sugieren que DME es capaz de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*.

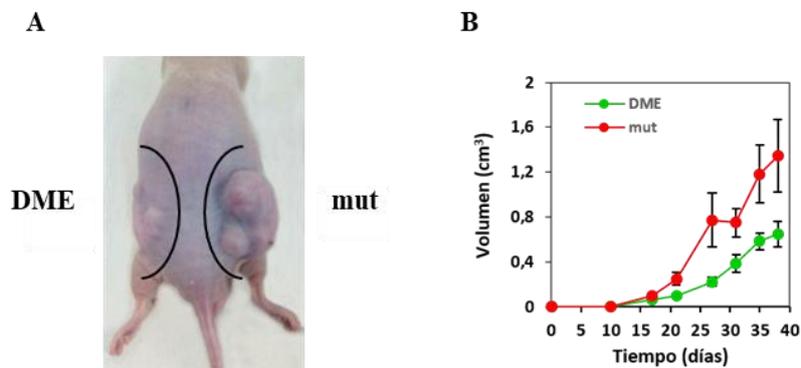


Figura 21. Efecto de la expresión de DME sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. (A) Transfectantes estables ($2,5 \times 10^6$ células) que expresan DME o DME mutante (mut) se inyectaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo y derecho, respectivamente, en ratones *nude* ($n = 10$). (B) El tamaño del tumor se evaluó a varios tiempos tras la inyección. Los datos son la media \pm EEM.

CAPÍTULO 2: Desarrollo de un sistema de desmetilación dirigida basado en CRISPR/dCas9 y la ADN glicosilasa ROS1

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior abren la posibilidad de utilizar proteínas con actividad 5-meC ADN glicosilasa para dirigirlas a regiones específicas del genoma de mamíferos, utilizando la metodología CRISPR/dCas9 (Cong et al., 2013; Hsu et al., 2014; Mali et al., 2013a; Mali et al., 2013b; Pennisi, 2013; Qi et al., 2013).

La proteína ROS1 es el miembro de la familia DML mejor caracterizado hasta la fecha. Presenta un dominio ADN glicosilasa discontinuo esencial para su actividad catalítica (Ponferrada-Marin et al., 2011), y un dominio N-terminal, que, aunque no es esencial para la misma, facilita su unión inespecífica al ADN (Ponferrada-Marin et al., 2010). Recientemente, se ha conseguido dirigir ROS1 a secuencias diana específicas mediante su fusión al dominio de unión al ADN de levadura GAL4 (GBD), utilizando el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor TK (Parrilla-Doblas et al., 2017). Además, ROS1 es una proteína de menor tamaño que DME, lo que puede facilitar su manipulación genética durante el proceso de transfección. Por todo ello, en este capítulo se utilizó ROS1 como proteína efectora.

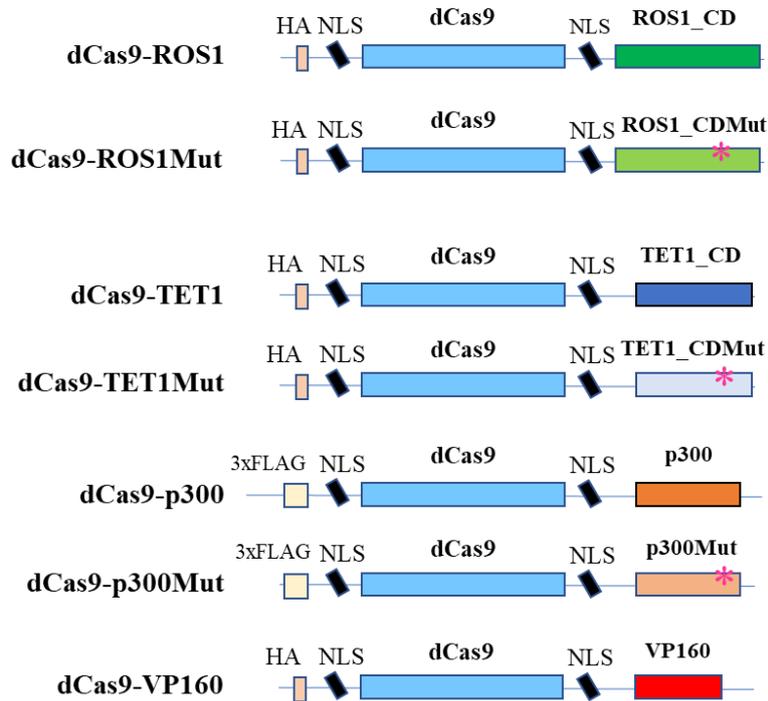
El segundo objetivo de esta tesis se plantea la obtención de una herramienta molecular que permita dirigir la desmetilasa ROS1 a secuencias específicas del genoma humano, fusionando el dominio catalítico de ROS1 a la proteína dCas9.

1. Expresión de dCas9 fusionada a distintas proteínas efectoras

Las diferentes proteínas efectoras fusionadas a dCas9 usadas en esta tesis se muestran en la Figura 22A. Para obtener una 5-meC ADN glicosilasa que pudiera ser dirigida a regiones específicas del genoma, se fusionó el dominio catalítico de ROS1 (ROS1_CD) a dCas9. Como control se generó una versión catalíticamente inactiva (ROS1_CDMut) que contenía una mutación en un aspartato conservado (D971A en la proteína completa), que suprime completamente la actividad catalítica de la enzima (Morales-Ruiz et al., 2006). Se seleccionó TET1 como segundo tipo de efector para llevar a cabo un proceso de desmetilación dirigida del ADN y se fusionó a dCas9, tanto la versión silvestre de TET1 (TET1_CD) como una versión mutante en su dominio catalítico (TET1_CDMut) (Maeder et al., 2013c). Adicionalmente, se usaron construcciones descritas previamente que contenían la proteína dCas9 fusionada a las versiones silvestres o mutantes de la histona acetiltransferasas p300 (Hilton et al., 2015) y al activador transcripcional VP160 (Cheng et al., 2013).

La expresión transitoria de todas las proteínas de fusión en células HEK-293 se verificó mediante análisis western-blot utilizando extractos proteicos de las células y el anticuerpo anti-Cas9 (Figura 22B). En todos los casos se utilizó un anticuerpo anti-Actina como control interno de carga (Figura 22B).

A



B

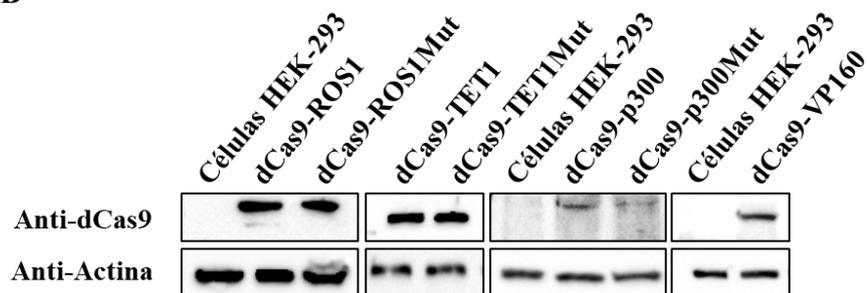


Figura 22. Proteínas efectoras fusionadas a dCas9. (A) Representación esquemática de las distintas construcciones empleadas. Todas contienen un *tag* HA en su extremo N-terminal seguido de la proteína dCas9 flanqueada por dos secuencias de localización nuclear (NLS), y la proteína efectora en la región C-terminal. En la proteína de fusión dCas9p300 y su versión mutante el *tag* HA se sustituye por un 3xFlag. (B) Análisis de la expresión transitoria de las proteínas de fusión en células HEK-293. El western-blot se llevó a cabo empleando un anticuerpo anti-Cas9 (CRISPR/Cas9-4G10, Diagenode) en extractos celulares (80 μ g) preparados 48 h después de la transfección con las diferentes construcciones. El anticuerpo anti-Actina se utilizó como control interno de carga.

2. Reactivación dirigida del gen reportero de la luciferasa silenciado por metilación

En primer lugar, se analizó la capacidad de dCas9-ROS1 para reactivar el gen reportero de la luciferasa silenciado por metilación y situado bajo el control del promotor TK (TK-Luc). El gen reportero se metiló previamente *in vitro* mediante incubación con la metilasa *M.SssI* y posteriormente se utilizó en un experimento de transfección junto con los plásmidos que expresan dCas9-ROS1 o su versión mutante y los correspondientes a los diferentes ARN guía (Figura 23).

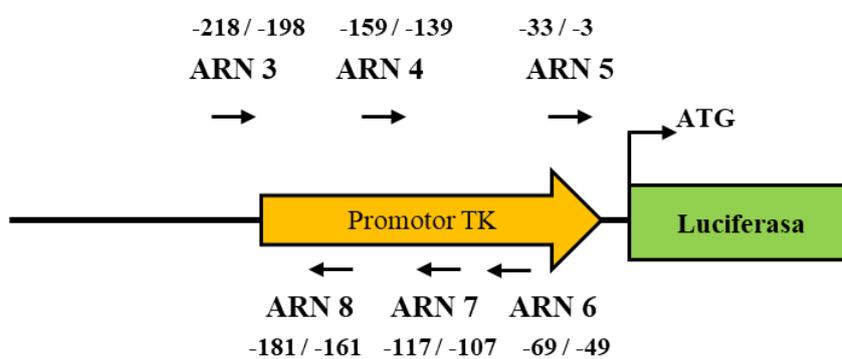


Figura 23. Localización de los sitios de unión de los ARN guía en la región promotora TK. Las flechas indican las regiones a las que se unen de los diferente ARN guía utilizados. Los números indican las distancias respecto al codón de inicio (ATG).

La actividad luciferasa se determinó a las 48 horas tras la transfección. Sólo se obtuvo un incremento significativo de actividad luciferasa con dCas9-ROS1 cuando se utilizó el ARN guía 3. Un efecto similar se observó cuando este ARN guía se utilizó en combinación con el ARN guía 8, con incrementos de aproximadamente un 3,5% respecto a la actividad sin dirigir (Figura 24). Por su parte, no se detectó reactivación significativa cuando se utilizó la versión mutante de ROS1 (dCas9-ROS1Mut) (Figura 24).

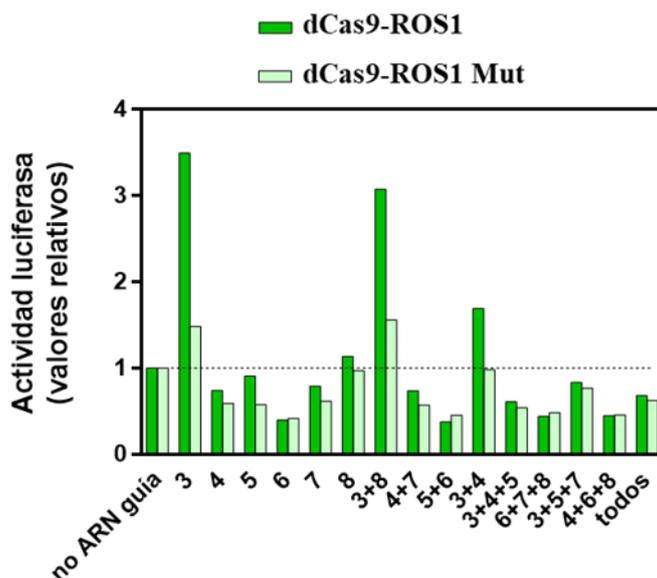


Figura 24. Reactivación dirigida del gen reportero de la luciferasa mediante la expresión transitoria de dCas9-ROS1. La actividad luciferasa se determinó a las 48 h tras la transfección con dCas9-ROS1 o dCas9-ROS1Mut, el vector que expresa el gen reportero metilado *in vitro* al 88% y los plásmidos para la expresión de los distintos ARN guías. Los niveles de actividad se normalizaron usando como control la transfección sin ARN guía (no ARN guía).

La capacidad de ROS1 para reactivar el gen de la luciferasa se vio fuertemente influenciada por el grado de metilación del promotor TK. Así, cuando se utilizó un reportero metilado al 98% (Figura 25) los niveles actividad luciferasa se redujeron significativamente con respecto a los obtenidos con porcentajes de metilación más bajos (Figura 26).

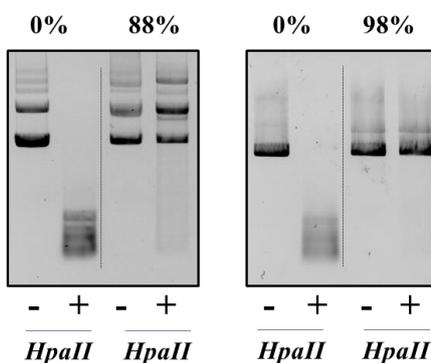


Figura 25. Cuantificación de la densidad de metilación del vector TK-Luc mediante digestión con *HpaII*. TK-Luc se incubó a 37°C con la metiltransferasa *M.SssI* (160 unidades, NEB) junto con 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM DTT y 0.8 mM S-adenosylmethionine (SAM). El nivel de metilación se estimó mediante análisis de sensibilidad a la enzima de restricción *HpaII*. Las cantidades relativas de

plásmido sensible y resistente a *HpaII* se cuantificaron con el software *Image Lab* (BioRad) y el nivel de metilación se determinó como el porcentaje de plásmido resistente a *HpaII*.

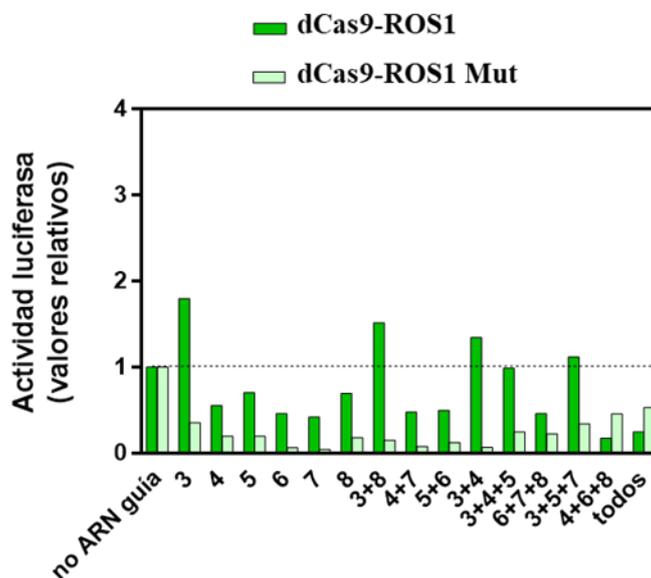


Figura 26. Reactivación dirigida del gen reportero de la luciferasa mediante la expresión transitoria de dCas9-ROS1. La actividad luciferasa se determinó 48 h tras la transfección con dCas9-ROS1 o dCas9-ROS1Mut, el vector que expresa el gen reportero metilado *in vitro* al 98% y con los plásmidos para la expresión de los distintos ARN guías. Los niveles de actividad se normalizaron usando como control la transfección sin ARN guía (no ARN guía).

Estos resultados sugieren que la capacidad de ROS1 para reactivar el gen reportero depende de la densidad de metilación de su promotor.

Por ello, para comparar la capacidad de dCas9-ROS1 y dCas9-TET1 para reactivar el gen reportero de la luciferasa, se obtuvieron preparaciones del plásmido reportero con diferentes niveles de metilación (Figura 27) y se determinó la actividad luciferasa tras la transfección.

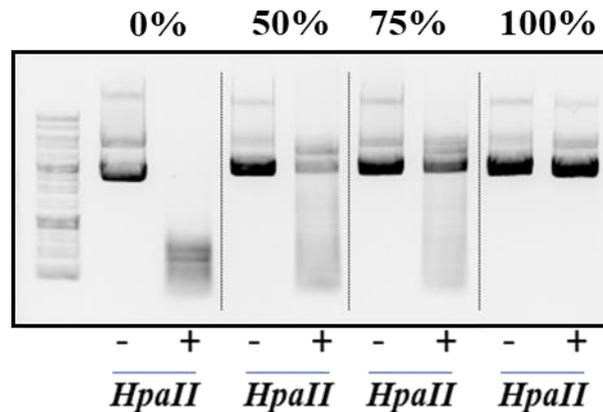


Figura 27. Cuantificación de la densidad de metilación del vector TK-Luc. TK-Luc se incubó a 37°C con la metiltransferasa *M.SssI* (160 unidades, NEB) a distintos tiempos (0, 1, 2 y 24 h) junto con 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM DTT y 0.8 mM S-adenosylmethionine (SAM). El nivel de metilación se estimó mediante análisis de sensibilidad a la enzima de restricción *HpaII*. Las cantidades relativas de plásmido sensible y resistente a *HpaII* se cuantificaron con el software *Image Lab* (BioRad) y el nivel de metilación se determinó como el porcentaje de plásmido resistente a *HpaII*.

Además de los ARNs 3 y 8, se diseñaron nuevos ARNs guía dirigidos “aguas arriba” del promotor TK (Figura 28) con el fin de aumentar la zona de análisis.

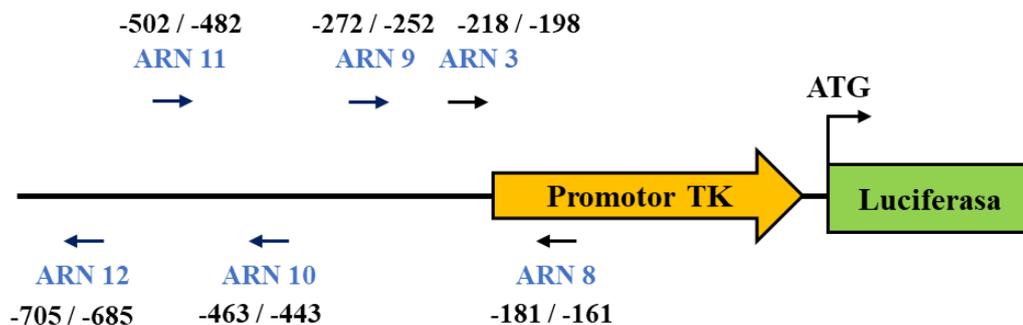


Figura 28. Posición de nuevos ARN guías situados “aguas arriba” de la región promotora TK. Las flechas indican las regiones de unión de los ARN guías utilizados. Los números indican las distancias respecto al codón de inicio (ATG).

Células HEK-293 se transfectaron con el plásmido reportero metilado, y los efectores dCas9-ROS1 o dCas9-TET1 (o sus correspondientes versiones mutantes), junto con ARN guías individuales o combinados (Figura 29). Se encontró que dCas9-ROS1 fue capaz de aliviar la represión inducida por niveles de metilación del 50 y 75 %, sobre todo cuando se utilizaron los ARN 3 y 9, o una combinación de ambos. Este efecto no se observó

cuando se utilizó la versión mutante de ROS1 (dCas9-ROS1Mut) donde los niveles de actividad luciferasa fueron similares a los obtenidos sin ARN guía o sin efector. Esto indica que la reactivación inducida por ROS1 es dependiente de su actividad enzimática (Figura 29). Sin embargo, no se detectó reactivación cuando los niveles de metilación del plásmido reportero fueron del 100%.

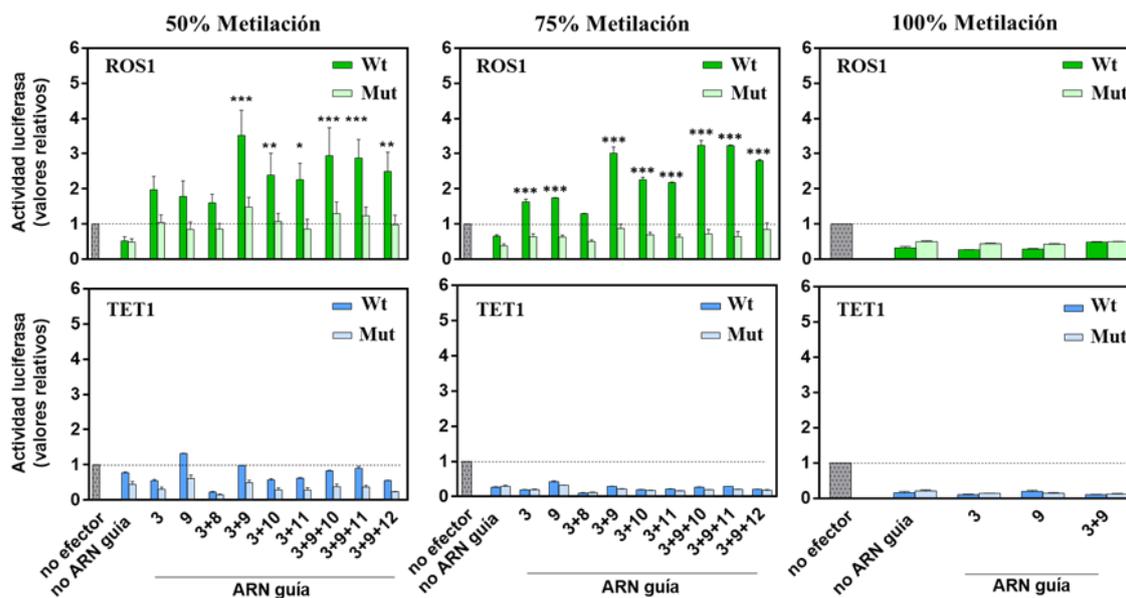


Figura 29. Efecto de la densidad de metilación sobre la actividad de dCas9-ROS1 y dCas9-TET1. En ambos ensayos se empleó el vector TK-Luc con diferentes grados de metilación (50, 75 y 100%). La actividad luciferasa se determinó 48 h tras la transfección con las distintas proteínas efectoras, el correspondiente vector TK-Luc metilado y los plásmidos para la expresión de los distintos ARN guías. Los incrementos de actividad se muestran en relación con la detectada sin efector. Los valores son la media +/- EEM de tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba *t* de Student (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

En contraposición a los resultados obtenidos con dCas9-ROS1, no se observó reactivación detectable en células que expresaban dCas9-TET1, independientemente de la combinación de ARNs guía utilizados o el nivel de metilación del plásmido reportero (Figura 29).

Estos resultados sugieren que dCas9-ROS1 puede ser dirigida para reactivar un gen silenciado por metilación, pero sus efectos son dependientes de la densidad de metilación del gen diana.

3. Reactivación génica inducida por efectores no implicados en la desmetilación del ADN

A continuación, nos preguntamos si los niveles de reactivación logrados por dCas9-ROS1 son similares a los obtenidos cuando se utiliza un gen reportero distinto, en este caso GFP (Figura 30A), y a los inducidos por proteínas efectoras no implicadas en la desmetilación del ADN. Para ello, se utilizaron los ARN guías 3 y 9, individualmente o en combinación, junto con los efectores ROS1, TET1, p300 o VP160. Los resultados obtenidos muestran que ROS1 induce niveles de reactivación similares en el gen reportero GFP a los observados cuando se utilizó el gen de la luciferasa, y de nuevo el efecto fue mayor con la combinación de los ARN guías 3 y 9. Dicha actividad no se observó cuando se utilizó la versión mutante de ROS1 (Figura 30B).

En comparación, los niveles de reactivación inducidos por p300 y VP160 son aproximadamente 2,5 y 12 veces superiores, respectivamente, a los inducidos por ROS1 (Figura 30B). VP160, al igual que con ROS1, fue más efectivo cuando su actividad fue dirigida por la combinación de los ARN guías 3 y 9, mientras que p300 fue algo más eficiente cuando se utilizó el ARN guía 9 de forma individual (Figura 30B). Como se observó anteriormente con el gen reportero de luciferasa, no se detectó reactivación de GFP con dCas9-TET1 (Figura 30B).

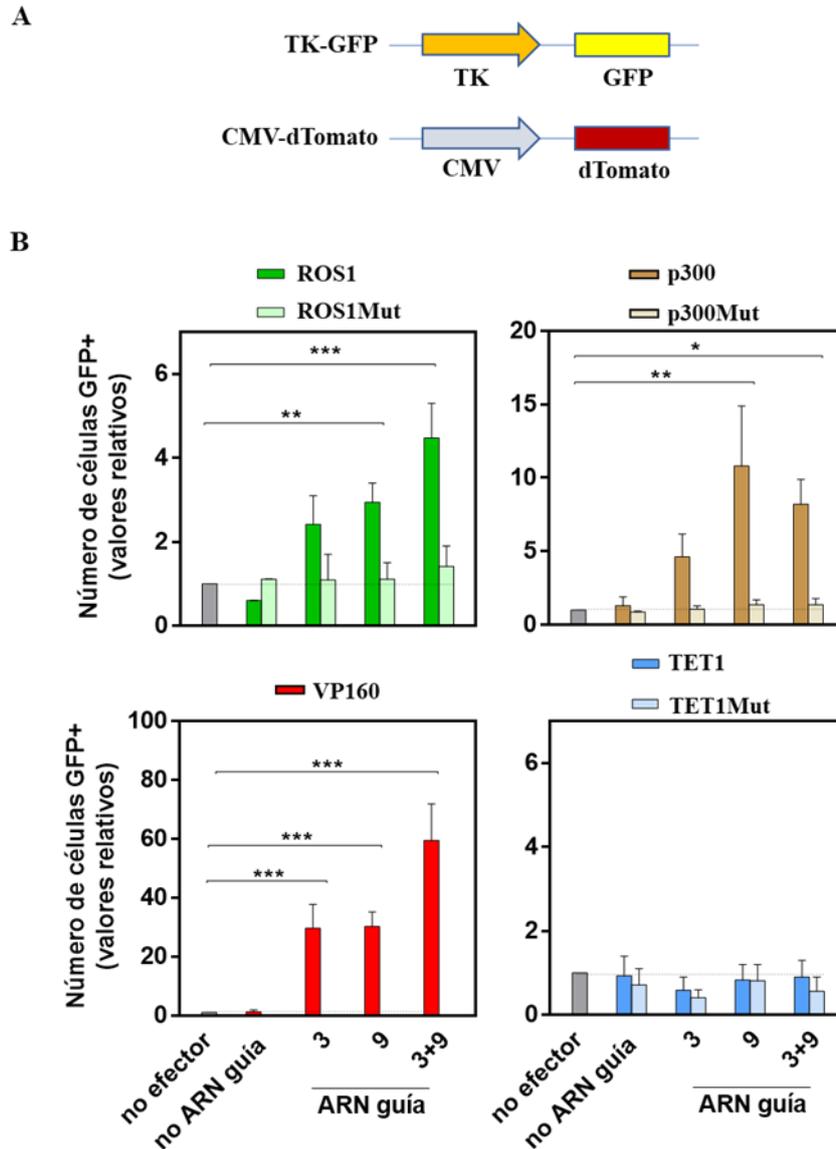


Figura 30. Reactivación del gen reportero GFP mediante la expresión de distintos efectores fusionados a dCas9. (A) Representación esquemática del gen reportero GFP y del control interno dTomato (ver apartado 3 de Materiales y Métodos) (B) Análisis de la actividad GFP. El número de células GFP⁺ se determinó mediante citometría de flujo 24 h tras la transfección con las distintas proteínas de fusión, el vector TK-GFP metilado (50% metilación) junto con vector CMV-dTomato sin metilar, y los plásmidos para la expresión de los distintos ARN guías. Se muestra el valor normalizado del número de células GFP⁺ con respecto al detectado en transfecciones control sin efector. Los valores son la media +/- EEM de dos ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba *t* de Student (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

4. La reactivación inducida por los diferentes efectores es dependiente de la densidad de metilación

Los resultados mostrados previamente indican que la reactivación inducida por dCas9-ROS1 se veía bloqueada cuando la región diana presenta elevados niveles de metilación. Así, con el fin de determinar si la densidad de metilación del ADN podría afectar también a la capacidad de reactivación de los efectores VP160 y p300, se realizaron ensayos de actividad luciferasa utilizando el plásmido que expresa dicho gen reportero con diferentes niveles de metilación: 0%, 10%, 30% y 90% (Figura 31).

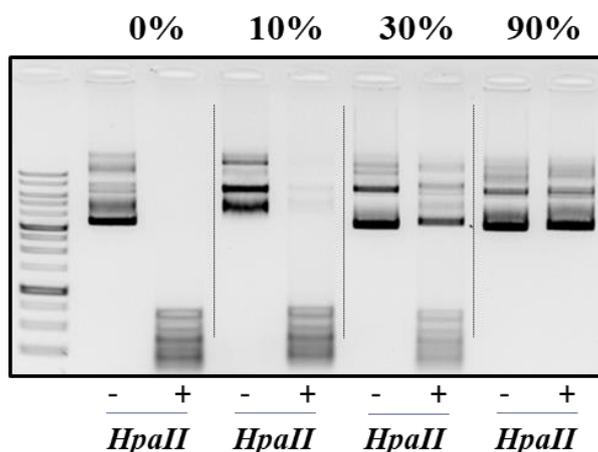


Figura 31. Determinación de la densidad de metilación del promotor TK mediante digestión con *HpaII*. El plásmido reportero se incubó a 37°C con la metiltransferasa *M.SssI* (160 unidades, NEB) a distintos tiempos junto con 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM DTT y 0.8 mM S-adenosylmethionine (SAM). El nivel de metilación se estimó mediante análisis de sensibilidad a la enzima de restricción *HpaII*. Las cantidades relativas de plásmido sensible y resistente a *HpaII* se cuantificaron con el software *Image Lab* (BioRad) y el nivel de metilación se determinó como el porcentaje de plásmido resistente a *HpaII*.

Las células HEK-293 se co-transfectaron con las distintas proteínas efectoras, el correspondiente vector reportero diferencialmente metilado y la combinación de ARNs guía 3 y 9.

Los resultados muestran como en las transfecciones control (sin la proteína efectora o sin el ARN guía), el aumento de la metilación del ADN redujo significativamente la actividad luciferasa, llevándola a niveles prácticamente indetectables con una metilación del 90% (Figura 32). La expresión de dCas9-ROS1 dirigida por la combinación de los ARN guías

3 y 9, redujo la represión inducida por metilación en un factor de 2 a 3 veces cuando se utilizaron plásmidos luciferasa metilados al 10% o 30% (Figura 32A). Sin embargo, esta reactivación se vio completamente bloqueada cuando el vector TK-Luc presentaba un 90% de metilación (Figura 32A).

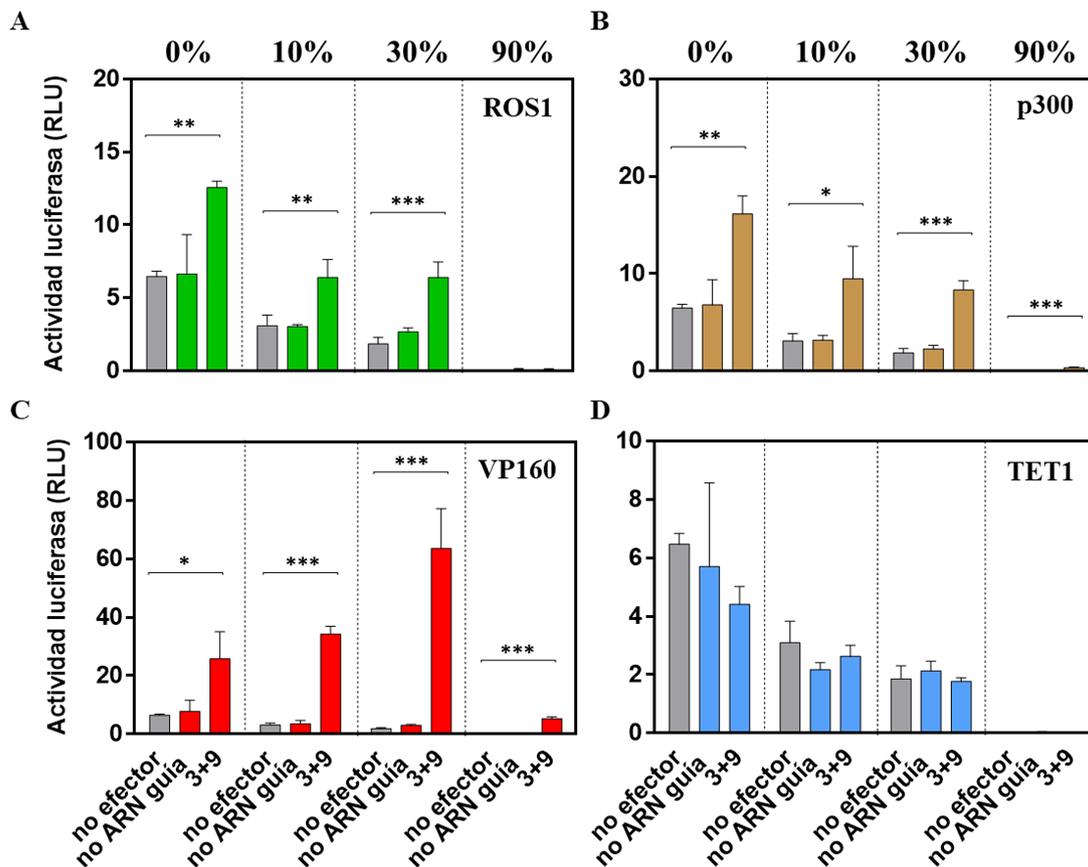


Figura 32. Efecto de la densidad de metilación sobre la actividad de los efectores ROS1, TET1, p300 y VP160. Análisis de la actividad luciferasa detectada tras la expresión transitoria de dCas-ROS1 (A), dCas9-p300 (B), dCas9-VP160 (C) y dCas9-TET1 (D) en células HEK-293 utilizando el vector TK-Luc con diferentes grados de metilación (0, 10, 30 y 90%). La actividad luciferasa absoluta expresada en Unidades Relativas de Luz (RLU), se determinó 48 h tras la transfección con las distintas proteínas efectoras indicadas en cada gráfica. Los valores son la media \pm EEM de dos ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en una prueba *t* de Student (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

Como se observó anteriormente para el caso de GFP, dCas9-p300 consiguió niveles de reactivación superiores a los observados con ROS1, pero su efecto se vio igualmente reducido cuando los niveles de metilación del plásmido reportero fueron elevados, siendo prácticamente indetectables con una metilación de 90% (Figura 32B). Por el contrario, la reactivación inducida por dCas9-VP160 mostró un patrón diferente, con niveles de reactivación crecientes conforme incrementó la metilación de TK-Luc hasta el 30%. Pero de nuevo, al igual que en el caso del ROS1 y p300, la capacidad de VP160 para reactivar la expresión del gen reportero disminuyó drásticamente cuando la metilación de TK-Luc fue del 90 % (Figura 32C). No se detectó reactivación en las células que expresan dCas9-TET1, independientemente del nivel de metilación del plásmido reportero (Figura 32D).

En conjunto, estos resultados indican que la reactivación del silenciamiento catalizada por tres efectores diferentes (ROS1, p300 y VP160) es dependiente de la densidad de metilación, observándose patrones similares en el caso de ROS1 y p300.

5. El incremento en la actividad luciferasa está asociado a una reactivación transcripcional

Con el fin de determinar si la reactivación del gen de la luciferasa mediada por los distintos dominios efectores se correlacionaba con un incremento en el nivel de ARNm, se llevaron a cabo análisis de qRT-PCR. Para ello se utilizó como molde el ADNc obtenido a partir del ARNm de células transfectadas con el plásmido reportero metilado al 50% junto con las distintas proteínas de fusión y los ARNs guías previamente empleados.

Los resultados mostraron que los cambios detectados en la actividad luciferasa se correlacionan con los inducidos en los niveles de ARNm, aunque hubo algunas diferencias entre los diferentes efectores. En el caso de dCas9-ROS1 o dCas9-p300, los incrementos de actividad luciferasa se correlacionaron con los de los niveles de ARNm (Figura 33). Sin embargo, los aumentos en los niveles de ARNm inducidos por dCas9-VP160 fueron aproximadamente 5 veces menores que los incrementos correspondientes en la actividad de la luciferasa (Figura 33). Finalmente, la expresión de dCa9-TET1 indujo aumentos pequeños, aunque estadísticamente significativos, en los niveles de ARNm, siendo mínimos los cambios en la actividad luciferasa (Figura 33).

Estos resultados indican que la reactivación transcripcional inducida por los diferentes efectores tiene impactos diferentes en la cantidad y/o estabilidad del producto génico final, lo que posiblemente es reflejo de sus distintos mecanismos de acción.

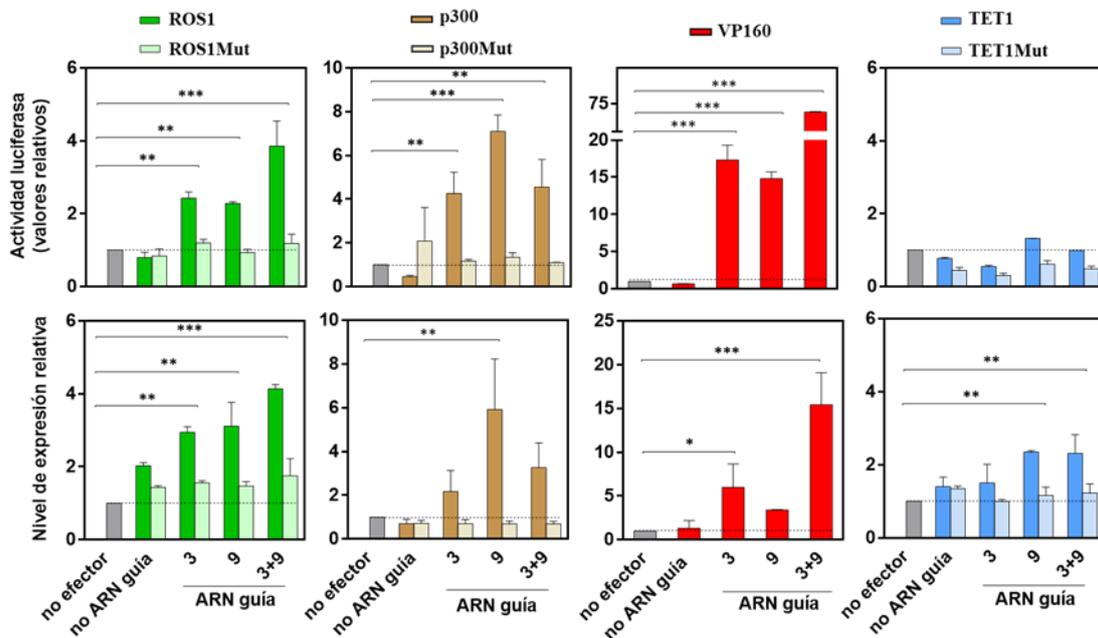


Figure 33. Actividad luciferasa y activación transcripcional inducida por los distintos efectores fusionados a dCas9. (A) Ensayos de actividad luciferasa. La actividad luciferasa, se determinó 48 h tras la transfección con las distintas proteínas efectoras indicadas en cada gráfica. La actividad luciferasa se expresa normalizada respecto a la detectada en transfecciones sin efector. (B) Análisis cuantitativo de los niveles de expresión del ARNm de la luciferasa mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión se determinaron 48 h después de la transfección mediante qRT-PCR normalizada con *GAPDH*, y se muestran los valores relativos respecto a los obtenidos en transfecciones control sin efector. Los valores son la media +/- EEM de dos ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba *t* de Student (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

6. La reactivación inducida por dCas9-ROS1 no se incrementa al reclutar otros efectores

A continuación, nos preguntamos si el co-reclutamiento de dCas9-ROS1 junto con un segundo tipo de efector podría incrementar de forma sinérgica la reactivación del gen reportero de la luciferasa, previamente silenciado por metilación.

Para ello, se llevaron a cabo ensayos de co-transfección en células HEK-293 similares a los descritos previamente, utilizando diferentes plásmidos de expresión de las proteínas

de fusión de manera individual o en distintas combinaciones. Para lograr eficiencias de transfección comparables, la cantidad total de plásmidos dCas9-efectores se mantuvo constante en todas las transfecciones.

Los resultados obtenidos no mostraron efecto sinérgico en ninguna de las combinaciones ensayadas (Figura 34). De hecho, la mezcla de diferentes efectores provocó una disminución, en lugar de un aumento, en la capacidad de reactivación de la actividad luciferasa. Así, dCas9-ROS1 y dCas9-p300 indujeron niveles de reactivación más altos cuando se utilizaron individualmente que de forma combinada (Figura 34A). Los niveles de reactivación se redujeron aún más cuando las combinaciones incluyeron una o las dos versiones mutantes (Figura 34A). De manera similar, la combinación de ROS1 con TET1 dio lugar a una menor reactivación (Figura 34C). Por otro lado, los altos niveles de reactivación inducidos por VP160 se redujeron considerablemente cuando se combinó con ROS1 o su versión mutante (Figura 34B).

Estos resultados indican que, al menos en las condiciones experimentales empleadas, no existen efectos sinérgicos entre dCas9-ROS1 y los diferentes efectores, y que la disminución en los niveles de reactivación observada en las co-transfecciones son probablemente debidos a disminución en las cantidades de plásmido de cada efector usadas cuando se ensayan solos respecto de las empleadas cuando se analizan en combinación.

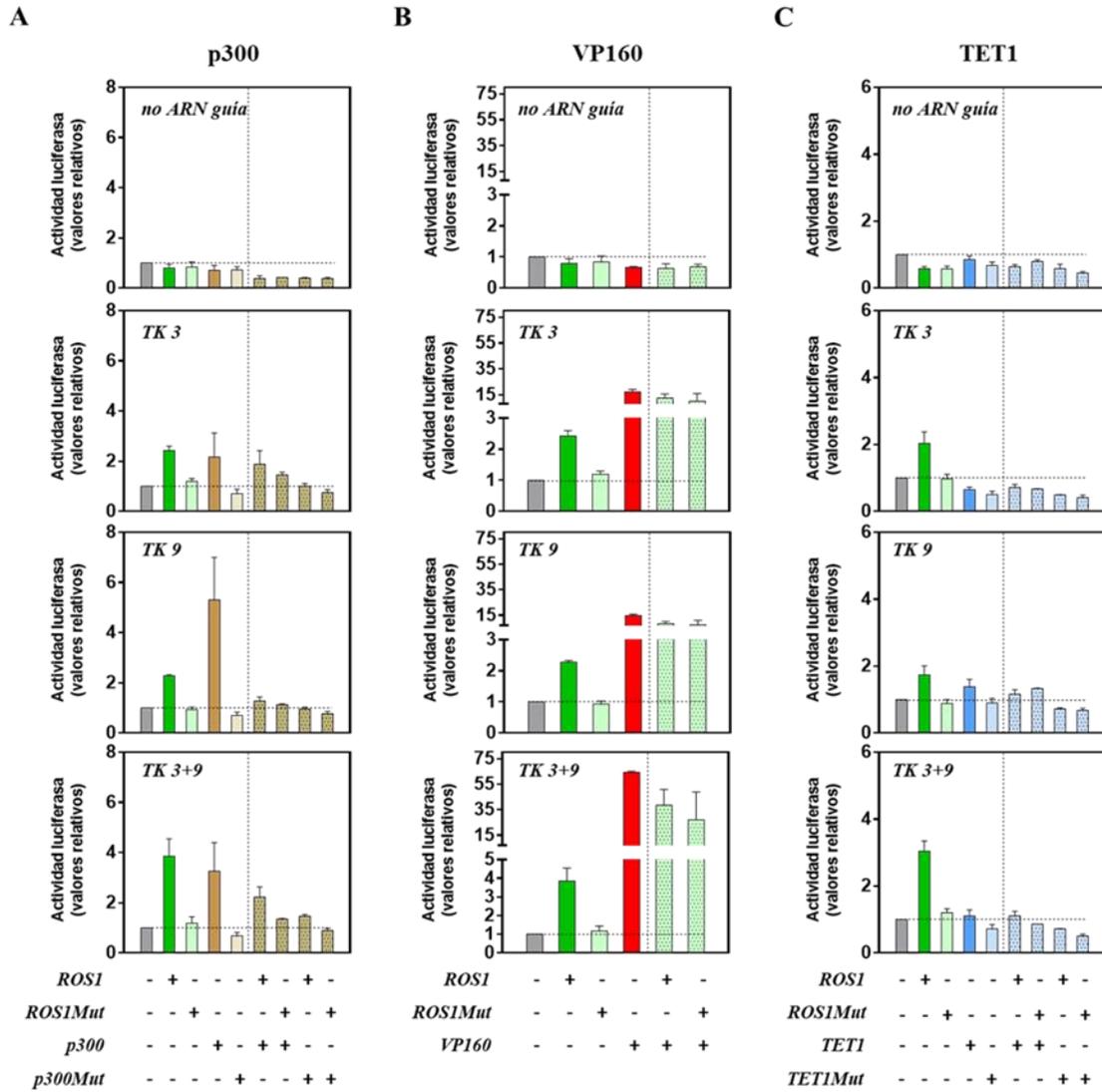


Figure 34. Efecto de la co-transfección de dCas9-ROSI con distintos efectores. (A) Co-transfección con dCas9-p300 y dCas9-p300Mut. (B) Co-transfección con dCas9-VP160. (C) Co-transfección con dCas9-TET1 y dCas9-TET1Mut. La actividad luciferasa se determinó 48 h después de la co-transfección con las distintas proteínas de fusión y sus respectivos mutantes. La actividad luciferasa se expresa en relación con la detectada sin effector. Los valores son la media +/- EEM de dos ensayos independientes.

7. Efecto de proteínas de la ruta BER sobre la actividad de dCas9-ROS1

En la desmetilación activa iniciada por ROS1 en plantas, las proteínas APE1L y ZDP desempeñan funciones vitales para el procesamiento de los extremos generados tras la eliminación de la base metilada y la incisión producida en el esqueleto azúcar-fosfato (ver apartado 4.1.1. de Introducción) (Li et al., 2015; Martínez-Macias et al., 2012). Aunque las células humanas están dotadas de actividades enzimáticas equivalentes en el ortólogo PNK de ZDP y en el ortólogo APE1 de APE1L, razonamos que el co-reclutamiento de ZDP y/o APE1L en los sitios de desmetilación del ADN podría mejorar el proceso de reactivación.

Para ello, ambas proteínas se fusionaron a la proteína dCas9 usando la misma estrategia que con las distintas proteínas efectoras usadas previamente (ver Materiales y Métodos) (Figura 35A). La expresión de las proteínas dCas9-APE1L y dCas9-ZDP se confirmó mediante análisis western-blot utilizando extractos proteicos de las células y el anticuerpo anti-Cas9, y empleando como control interno de carga el anticuerpo anti-Actina (Figura 35B). De nuevo, se llevaron a cabo ensayos de co-transfección similares a los previamente descritos, co-transfectando los diferentes plásmidos de expresión de las proteínas de fusión en células HEK-293 de manera individual o en varias combinaciones.

Como era de esperar, en las transfecciones individuales sólo las células que expresan dCas9-ROS1 mostraron reactivación génica (Figura 35C). Sin embargo, la co-expresión de dCas9-ROS1 con ZDP y/o APE1L indujo una disminución de los niveles de reactivación (Figura 35C).

Estos resultados permiten concluir que el reclutamiento conjunto de factores de la ruta BER no mejora la reactivación génica inducida por ROS1.

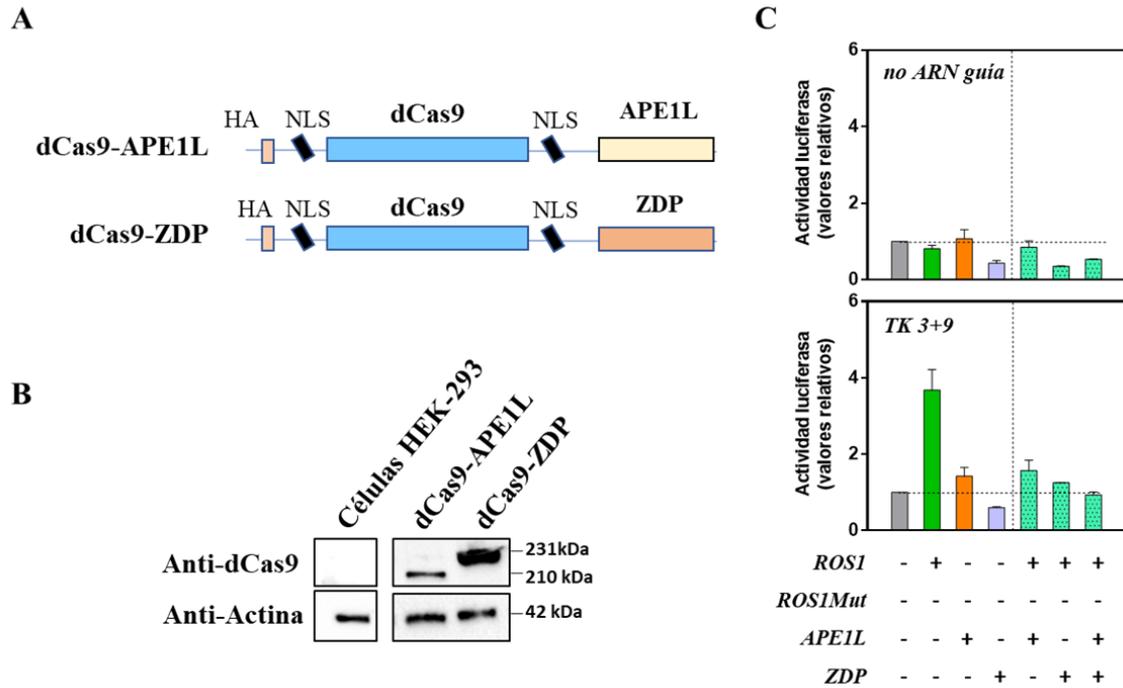


Figure 35. Efecto de las proteínas de la ruta BER (ZDP y APE1L) sobre la actividad de dCas9-ROS1.

(A) Representación esquemática de las proteínas de fusión dCas9APE1L y dCa9ZDP. Las construcciones dCas9-APE1L y dCa9ZDP contienen un *tag* HA en el extremo N-terminal, seguido de la proteína dCas9 flanqueada por dos secuencias de localización nuclear (NLS), y la proteína APE1L o ZDP, respectivamente, en la región C-terminal. (B) Análisis de expresión de las proteínas dCas9-APE1L y dCas9-ZDP mediante western blot. El análisis de western-blot se llevó a cabo empleando un anticuerpo anti-Cas9 (CRISPR/Cas9-4G10, Diagenode) en extractos celulares (80 μ g) preparados 48 h después de la transfección. Adicionalmente, se utilizó un anticuerpo anti-Actina como control interno de carga. (C) Actividad luciferasa tras la co-transfección de dCas9-ROS1 con dCas9-APE1L o dCas9-ZDP. La actividad luciferasa se determinó 48 h tras la co-transfección con las distintas proteínas de fusión y sus respectivos mutantes. La actividad luciferasa se expresa en relación con la detectada sin efector. Los valores son la media \pm EEM de dos ensayos independientes.

8. La reactivación transcripcional inducida por dCas9-ROS1 es concomitante con una desmetilación parcial del ADN

Los resultados mostrados anteriormente indican que la proteína dCas9-ROS1 es capaz de inducir la reactivación transcripcional de un gen reportero silenciado por metilación en ADN que no se está replicando. Para determinar si dicha reactivación está asociada a una disminución en los niveles de metilación del promotor TK, se co-transfectaron células con el plásmido reportero metilado al 50% y dCas9-ROS1, bien sin dirigir o dirigido mediante los ARN guías 3 y 9 de forma individual o en combinación. Como control se

usó la versión inactiva de ROS1. Tras 48 h, se extrajo el ADN plasmídico, se modificó con bisulfito sódico y se empleó como molde para la amplificación y posterior pirosecuenciación de un fragmento que incluía parte del promotor TK. Esta región abarca 100 pb con 12 posiciones CpGs susceptibles de metilación, 6 situadas en el inicio del promotor TK y las restantes “aguas arribas” del mismo (Figura 36A).

No se detectó ningún cambio en el nivel de metilación en las células que expresaban la proteína ROS1 mutada. Sin embargo, las células que expresaban la proteína dCas9-ROS1 activa mostraron una disminución ligera pero significativa en los niveles de metilación de sitios CpG específicos, cuando se comparan con los obtenidos en células que no expresan ningún ARN guía. Los resultados obtenidos indican que la localización de los sitios de unión del ARN guía afecta al nivel de desmetilación alcanzado. Así, cuando dCas9-ROS1 fue dirigido por un único ARN guía, la mayor parte de la desmetilación observada se localiza en una región que se extiende unas 50 pb “aguas abajo” de su sitio de unión. Sin embargo, cuando se utilizaron combinaciones de ARN guías, la zona desmetilada se amplía y comprende las dos regiones (Figura 36B).

Por lo tanto, la reactivación transcripcional inducida por dCas9-ROS1 es concomitante con una desmetilación parcial del ADN que depende de la actividad catalítica de ROS1, y en un rango de acción que oscila entre los 0 y 50 pb respecto al sitio de unión del ARN guía.

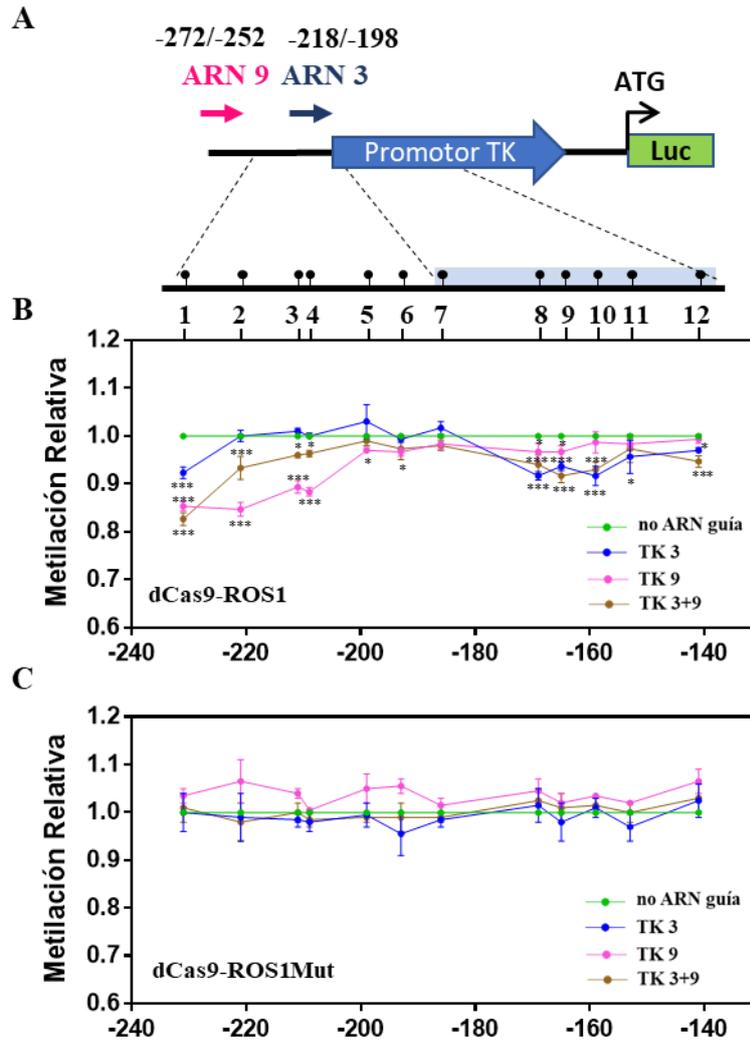


Figura 36. Análisis del nivel de metilación del promotor TK-Luc tras la transfección transitoria con dCas9-ROS1 o dCas9-ROS1Mut. (A) Representación esquemática de la región analizada. Las flechas indican la orientación y sitio de unión de los ARN guía utilizados. (B) Análisis de los niveles de metilación del promotor TK-Luc mediante pirosecuenciación tras la transfección con el efector silvestre (dCas9-ROS1) o Mutante (dCas9-ROS1Mut) (C). Los datos muestran el porcentaje de metilación en cada sitio de CpG normalizado respecto al detectado en transfecciones control sin ARN guía. Los valores son la media +/- EEM de dos ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba *t* de Student (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

También se analizó el efecto del resto de efectores fusionados a dCas9 sobre los niveles de metilación del ADN (Figura 37). No se detectaron cambios significativos en las células que expresan dCas9-VP160 (Figura 37B) o dCas9-TET1 (Figura 37C). Sin embargo, se detectó una disminución de la metilación del ADN en las células co-transfectadas con dCas9-p300 (Figura 37A).

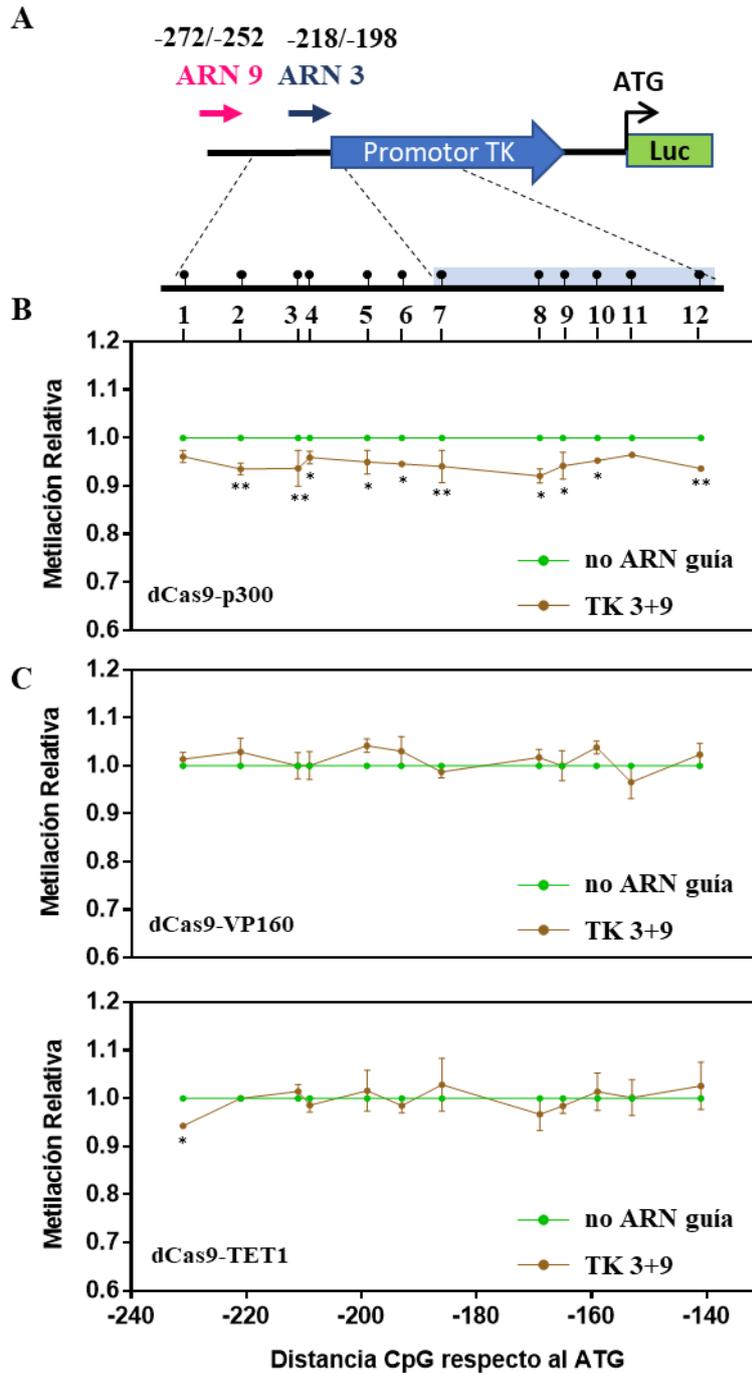


Figura 37. Análisis del nivel de metilación del promotor TK-Luc tras la transfección transitoria con diferentes efectores. dCas9-p300 (A), dCas9-VP160 (B) y dCas9-TET1 (C). Los datos representados muestran el porcentaje de metilación en cada sitio de CpG normalizado respecto a los valores sin dirigir (no ARN guía). Los valores son la media +/- EEM de dos ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba *t* de Student (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

A continuación, se analizó si dCas9-ROS1 puede inducir la desmetilación del ADN en *loci* endógenos celulares. Como dianas se seleccionaron los promotores de los genes *OCT4* (Hilton et al., 2015) e *INS* (Gimenez et al., 2016).

El gen *OCT4* codifica un factor de transcripción que desempeña un papel clave en el desarrollo embrionario y la pluripotencia de las células madre. La expresión aberrante de este gen en tejidos adultos está asociada con la tumorigénesis. Por otro lado, el gen *INS* codifica la insulina, una hormona peptídica que desempeña un papel vital en la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos.

Con el fin de analizar el estado de metilación del promotor de *OCT4*, se realizaron transfecciones en HEK-293 con dCas9-ROS1 dirigida con el ARN guía OCT4-1 (Figura 38A), y sin dirigir, así como las correspondientes las transfecciones control con dCas9-ROS1Mut. No se observaron cambios significativos en la metilación del ADN en células que expresan el efector ROS1 mutado (Figura 38B). Sin embargo, la forma catalíticamente activa dCas9-ROS1 indujo una desmetilación parcial en dos sitios CpG del promotor de *OCT4*, observándose un descenso significativo de 0.07 en la posición CpG 2 y 0.21 en la CpG 3 (Figura 38B), las cuales se encuentran a una distancia de 0 y 30 pb respecto al sitio de unión del ARN guía OCT4-1.

Tras realizar ensayos de transfección similares a los descritos anteriormente, se analizó el estado de metilación de la zona promotora de *INS* mediante pirosecuenciación. Esta zona comprende 120 pb y 4 posiciones CpGs (Figura 39A).

Con el ARN guía INS 1 se obtuvo un descenso en el nivel de metilación de 0.15 en la posición CpG 3, situada a 6 pb del lugar de unión de dicho ARN guía (Figura 39B). Con el ARN guía INS 2 se detectó una disminución en los niveles de metilación de 0.41, 0.11 y 0.12 en las CpG 1, CpG 2 y CpG3, localizadas a 1, 9 y 35 pb, respectivamente, del sitio de unión del ARN guía (Figura 39B). Por último, con el ARN guía 3 se obtuvo un descenso de 0.38 en la posición CpG 2 situada a 40 pb del sitio de unión del ARN (Figura 39B).

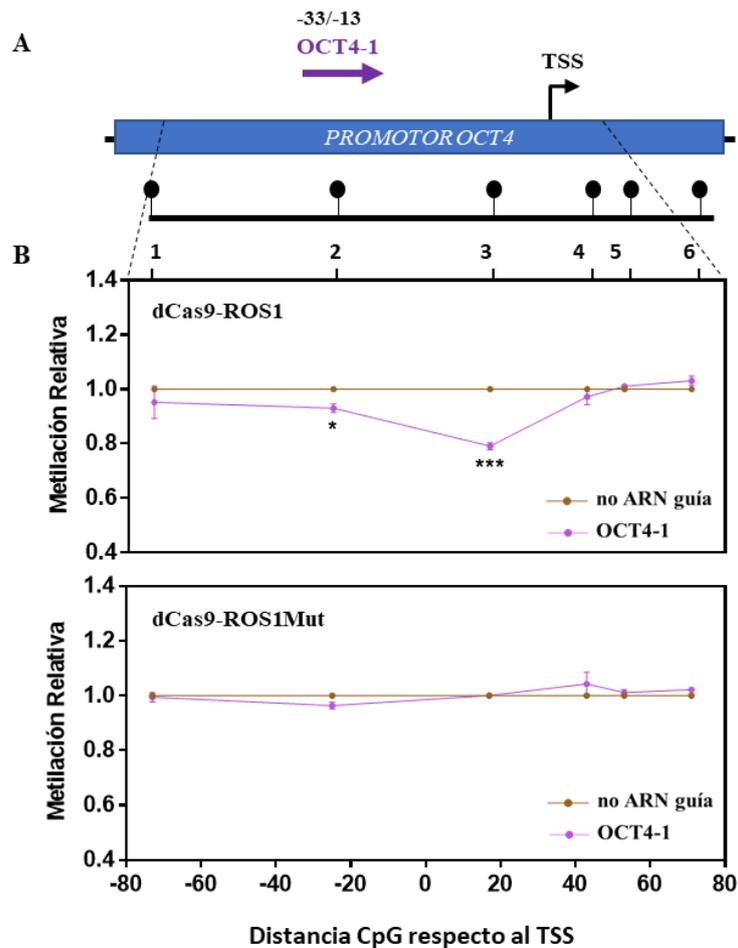


Figura 38. Desmetilación del promotor del gen *OCT-4* inducida por dCas9-ROS1 en células HEK-293. (A) Representación esquemática de la región analizada del promotor del gen *OCT-4*. La flecha indica el sentido y sitio de unión del ARN guía utilizado. Los números indican las distancias a las que se encuentran el ARN guía con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS). (B) Análisis cuantitativo de los niveles de metilación tras la expresión transitoria de dCas9-ROS1 (panel superior) o dCa9-ROS1Mut (panel inferior), junto con el ARN guía OCT4-1. Las gráficas muestran el porcentaje de metilación, determinado mediante pirosecuenciación, en cada posición CpG normalizado respecto al obtenido en transfecciones sin ARN guía. Los valores son la media \pm EEM de dos ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en una prueba *t* de Student (*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$).

Los niveles de metilación no se vieron afectados cuando se utilizó la proteína control dCas9-ROS1Mut y los diferentes ARN guía (Figura 39B).

En conjunto, estos resultados sugieren que dCas9-ROS1 puede ser usada para efectuar cambios en la metilación del ADN en localizaciones cromosómicas específicas en células humanas.

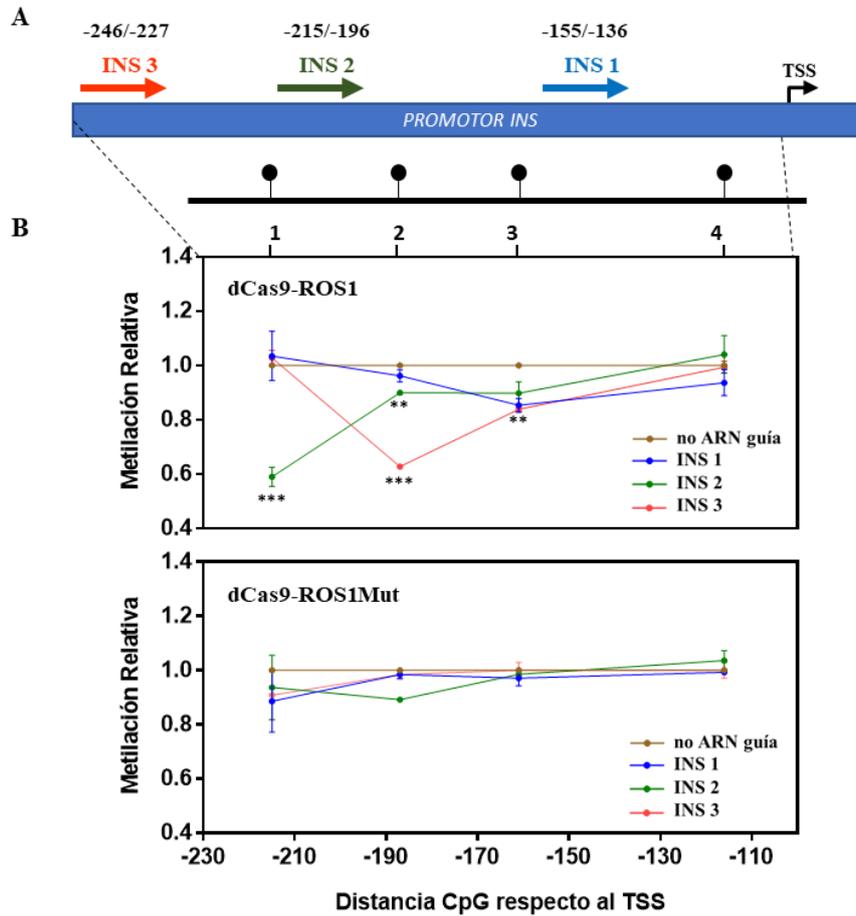


Figura 39. Desmetilación del gen *INS* inducida por dCas9-ROS1 en células HEK-293. (A) Representación esquemática de la región analizada del promotor del gen *INS*. Las flechas indican el sentido y los sitios de unión de los ARN guía utilizados. Los números indican las distancias a las que se encuentran los ARN guía con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS). (B) Análisis cuantitativo de los niveles de metilación tras la expresión transitoria de dCas9-ROS1 (panel superior) o dCa9-ROS1Mut (panel inferior), junto con los diferentes ARNs guía. Las gráficas muestran el porcentaje de metilación, determinado mediante pirosecuenciación, en cada posición CpG normalizado con respecto al detectado en transfecciones sin ARN guía. Los valores son la media \pm EEM de dos ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en una prueba *t* de Student (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

1. La expresión de DME en células DLD-1 reactiva genes hipermetilados y altera características fenotípicas relacionadas con el desarrollo tumoral

El avance en el campo de la epigenética ha permitido profundizar en el conocimiento de aspectos del máximo interés científico y social, como la biología del cáncer (Ellis et al., 2009; Verma et al., 2004). Una de las marcas epigenéticas más estudiadas, la metilación del ADN se ha relacionado con distintos aspectos de la progresión tumoral. En concreto, las células cancerosas se caracterizan por presentar una hipometilación generalizada, que favorece la progresión del tumor y la expresión de oncogenes, así como una hipermetilación local en promotores de genes supresores de tumores, que causa su silenciamiento génico (Esteller, 2007). Es ampliamente conocido que la metilación del ADN es una marca epigenética estable pero reversible (Ramchandani et al., 1999), a diferencia de otros procesos relacionados con el desarrollo de tumores como son las mutaciones génicas (Jones and Baylin, 2002). Sin embargo, los mecanismos por los cuales las células cancerosas podrían revertir dichos patrones epigenéticos no se conocen con exactitud.

En este contexto, uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido obtener células de cáncer de colon (DLD-1) que expresen la ADN glicosilasa vegetal DME, con el fin de determinar si esta enzima es capaz de llevar a cabo un proceso de desmetilación activa en células tumorales. Los resultados derivados del análisis RT-PCR y western blot confirman la expresión génica y la expresión proteica, respectivamente, en los diferentes clones estables para DME, DME-Mut y vector analizados.

El análisis del nivel de metilación de genes silenciados por metilación en dichos transfectantes revela que la expresión de la ADN glicosilasa vegetal DME produjo una drástica disminución de niveles de metilación en los promotores de los genes *ROR2* y *p14*, mientras que en *p16* el descenso se aproximó al 50%. Dicho descenso no se observa en los transfectantes que expresan la versión catalíticamente inactiva de DME o en células transfectadas con el vector vacío, lo que indica que los cambios de metilación son un efecto directo de la actividad catalítica de la ADN glicosilasa. Además, esta disminución

se correlacionó con un aumento en la expresión génica de los genes estudiados. Éstos son genes que desempeñan un papel importante en el desarrollo del tumor, por lo que la reversión de su metilación aberrante podría ser uno de los primeros pasos para frenar la enfermedad. La desmetilación del ADN y reactivación transcripcional inducida por la expresión de DME en las dianas analizadas son comparables o superiores a las obtenidas tras el tratamiento con el agente 5-Aza-2'-deoxicitidina. Sin embargo, cabe destacar que la desmetilación inducida por este agente es transitoria, mientras que la inducida por la desmetilasa vegetal es estable en el tiempo (Morales-Ruiz et al., 2018). Este fenómeno podría tener una especial relevancia dado que la utilización de este agente en clínica requiere una administración continuada debido a su dependencia del ciclo celular (Balch et al., 2017).

Los cambios observados en el metiloma de las células DLD-1 que expresan DME alteran algunas de las características relacionadas con el desarrollo tumoral. Un hecho notable es que la expresión de DME produce una mayor sensibilidad de las células DLD-1 frente a los agentes quimioterapéuticos oxaliplatino y 5-fluorouracilo, concomitante con alteraciones específicas de la respuesta del ciclo celular a estos agentes antitumorales. Estos resultados sugieren que dicha respuesta podría estar bajo control epigenético. De hecho, la expresión de DME conlleva la desmetilación y reactivación génica de dos reguladores importantes del ciclo celular, *p14* y *p16*. Recientemente se ha descrito que la inducción de células madre pluripotentes reprogramadas a partir de la línea DLD-1 se acompaña de la reactivación de *p16* y un aumento a la sensibilidad al 5-FU (Miyoshi et al., 2010).

Otra alteración fenotípica observada en las células que expresan la proteína DME, es la reducción del tamaño de las colonias que éstas generan cuando se crecen en condiciones de no adherencia. Estos resultados sugieren que el control de la metilación es importante para la formación de esferas y, presumiblemente, para el mantenimiento de la subpoblación de CSC en tumores de colon. Esto concuerda con resultados previos que demuestran que la metilación del ADN es esencial para el mantenimiento de las CSCs en el cáncer de colon (Morita et al., 2013).

Uno de los resultados más llamativos es que la expresión de DME inhibe el crecimiento de xenoinjertos tumorales. Este fenómeno ha sido observado en células de cáncer colorrectal, donde la sobreexpresión de TET1 inhibe el crecimiento *in vivo*, así como la formación de esferoides (Neri et al., 2015). El efecto de TET1 ha sido ligado a su

capacidad para reactivar los inhibidores de la vía Wnt por hidroximetilación del ADN (Neri et al., 2015). Nuestros resultados muestran que la expresión DME en células tumorales conlleva la desmetilación y reactivación génica de *ROR2*, que inhibe la ruta de señalización Wnt canónica dependiente de β -catenina (Ford et al., 2013). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que la interrupción epigenética de la vía de señalización Wnt/ β -catenina está implicada en numerosas neoplasias malignas, incluyendo el cáncer colorrectal (Lara et al., 2010; Li et al., 2010). Curiosamente, la expresión de DME aumenta la proliferación celular *in vitro* (Morales-Ruiz et al., 2018), pero disminuye el crecimiento del tumor *in vivo*. Tal discrepancia enfatiza el hecho de que el crecimiento tumoral *in vivo* es debido a múltiples factores, tales como la interacción con la matriz extracelular y las células estromales, que no pueden ser recreadas *in vitro*. Nuestros resultados también sugieren que el crecimiento *in vitro* e *in vivo* se ven afectados por cambios estables en el metiloma de las células cancerosas.

Los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis doctoral muestran que la expresión estable de una 5-meC ADN glicosilasa de plantas en células humanas derivadas de cáncer colorrectal revierte parcialmente su metilación aberrante e induce cambios en las propiedades de las células relacionados con el proceso tumoral. Las ADN desmetilasas de plantas pueden proporcionar nuevas opciones para estudiar el papel que juega la metilación del ADN en cáncer en humanos, donde no existen homólogos conocidos con una actividad desmetilante similar.

CAPÍTULO 2

1. CRISPR/dCas9-ROS1: una herramienta para la reactivación dirigida de genes

La fusión de diferentes dominios efectores a la versión desactivada de la endonucleasa Cas9 (dCas9) permite usar el sistema CRISPR/dCas9 como una herramienta de edición epigenética con una alta especificidad y con un mínimo efecto *off-target* en el global del genoma (Mendenhall et al., 2013; Thakore et al., 2015).

En concreto, el uso de esta tecnología en la desmetilación activa del ADN podría ayudar a esclarecer el papel de la metilación del ADN y su función en la regulación de la expresión génica. Los mecanismos de desmetilación en mamíferos son complejos y generan derivados de 5-meC que participan en la eliminación de la metilación tanto de forma activa como pasiva. Las plantas, sin embargo, poseen ADN glicosilasas específicas que reconocen y eliminan directamente 5-meC, lo que las convierten en unas potentes herramientas en el campo de la edición epigenética (Morales-Ruiz et al., 2018; Parrilla-Doblas et al., 2017).

En esta tesis doctoral, hemos fusionado el dominio catalítico de la ADN glicosilasa vegetal ROS1 a dCas9, y hemos demostrado que la expresión en células humanas de la proteína de fusión resultante dCas9-ROS1 reactiva la transcripción de genes silenciados por metilación en ADN que no se está replicando. Además, dicha reactivación se acompaña de una disminución de los niveles de metilación en varios sitios CpG de las secuencias diana. Nuestros resultados muestran que la reactivación inducida por dCas9-ROS1 requiere de su actividad catalítica ADN glicosilasa/liasa, sugiriendo que este proceso ocurre reemplazando la 5-mC por una citosina no metilada.

En contraste con los resultados obtenidos con ROS1, la fusión del efector TET1 a dCas9 (dCas9-TET1) no indujo incremento alguno en la actividad luciferasa. Aunque varios estudios muestran que proteínas de la familia TET fusionadas a ZFPs, TALEs, o la proteína dCas9 son capaces de reactivar genes silenciados por metilación en células de mamíferos (Chen et al., 2014; Maeder et al., 2013a; Xu et al., 2016), son escasas las evidencias que apoyan su implicación directa en la desmetilación activa del ADN, principalmente porque las condiciones experimentales utilizadas no permiten descartar

un efecto pasivo debido a la replicación del ADN. Son pocos los estudios que han abordado la reactivación de genes mediada por TET en condiciones de no replicación del ADN. Se ha observado que en células madre embrionarias (ESCs) se puede conseguir una inducción de 10 veces en la expresión de un gen reportero silenciado si antes de la transfección el plásmido portador del mismo es oxidado *in vitro* por TET1, y que dicha reactivación es dependiente de la ADN glicosilasa TDG (Muller et al., 2014). Por otro lado, la transfección de células HEK-293T con el dominio catalítico de TET2 (TET2CD) no incrementó de manera significativa la actividad de un plásmido reportero metilado *in vitro*, sin embargo, sí se observó un aumento de la actividad de aproximadamente 13 veces cuando las células sobreexpresaron TDG (Li et al., 2015). Todos estos resultados sugieren que la desmetilación activa del ADN dirigida utilizando proteínas TET podría requerir la administración simultánea de TDG. En estudios donde se ha utilizado dCas9-TET1 para reactivar *loci* cromosómicos reprimidos por metilación, se ha observado que dCas9-TET1 multiplica por 6 la expresión del factor de crecimiento BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) en neuronas postmitóticas embrionarias (Liu et al., 2016). En dicho estudio se encontró esta reactivación se reduce aproximadamente dos veces cuando se inhibe PARP [*Poly (ADP-ribose) polymerase*], una de las proteínas implicadas en la ruta BER, lo que se consideró como una prueba a favor de una desmetilación activa del ADN. Sin embargo, debe recordarse que la proteína PARP desempeña papeles adicionales importantes en el proceso de transcripción (Kraus and Lis, 2003). También se ha descrito la desmetilación y reactivación del gen FMR1 (*Fragile X Mental Retardation 1*) mediada por dCas9-TET1 en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) FX52 (Liu et al., 2018). Sin embargo, dicho efecto se detectó a los 9 días de la infección lo que desfavorece la idea de que TET participe en un mecanismo activo de desmetilación del ADN. Otros estudios, no han podido demostrar reactivación transcripcional de distintos *loci* cromosómicos mediada por dCas9-TET1, aunque sí su capacidad para potenciar el efecto observado con otros efectores tales como dCas9-VP64 (Baumann et al., 2019).

Además de ROS1 y TET1, en esta tesis doctoral se han utilizado dos modificadores de cromatina (VP160 y p300) que tienen diferentes mecanismos de acción y no están implicados directamente en la desmetilación del ADN. VP160 contiene diez copias en tándem de la proteína 16 (VP16) del virus del herpes simple y pertenece a un grupo de activadores ácidos con capacidad de inducir una descondensación a gran escala de la

cromatina (Carpenter et al., 2005). Este tipo de activadores contiene motivos ácidos-hidrofóbicos cortos que reclutan complejos remodeladores de cromatina, así como modificadores de histonas tales como p300 (Memedula and Belmont, 2003). Por tanto, el efecto inducido por dCas9-p300 podría ser parte del que a su vez induce dCas9-VP160, lo que podría explicar las diferencias observadas en sus respectivos efectos a la hora de activar la transcripción de genes silenciados por metilación.

Nuestros resultados muestran que p300 y, en particular, VP160 son más eficientes que ROS1 en aliviar la represión inducida por metilación. La metilación del ADN promueve indirectamente la formación de cromatina condensada mediante el reclutamiento de proteínas de unión a ADN metilado (MBPs), que a su vez favorecen la unión de histonas desacetilasas y complejos remodeladores de la cromatina (Miranda and Jones, 2007). En este contexto se puede especular que p300 y VP160, pero no ROS1, podrían contrarrestar directamente los efectos finales de la metilación del ADN actuando sobre la estructura y composición de la cromatina. De hecho, se ha descrito previamente que GAL4-VP16 puede prevenir el ensamblaje de una estructura represiva de la cromatina en ADN metilado ectópicamente inyectado en núcleos de ovocitos de *Xenopus* (Kass et al., 1997). Dado que la proteína Cas9 es insensible a la metilación (Hsu et al., 2013; Wu et al., 2014), ésta podría dirigir los efectores a las secuencias diana independientemente de su estado de metilación, permitiendo la modificación en la estructura y/o composición de la cromatina y revertiendo o previniendo transitoriamente el silenciamiento génico inducido por la metilación. Por el contrario, la eliminación de la metilación ejercería un efecto más indirecto sobre la descondensación de la cromatina y, eventualmente, sobre la actividad transcripcional de los genes diana. No obstante, un aspecto importante que habrá que dilucidar en futuros estudios es si el efecto en la desmetilación del ADN es menos transitorio que los que producen VP160 y/o p300.

En estudios previos se ha observado que la reactivación inducida por dCas9-VP160 no se ve acompañada de cambios en los niveles de metilación. De hecho, resultados recientes han demostrado que la expresión transitoria de TALE-VP64 induce la activación transcripcional de *OCT4* en células NIH3T3, pero no altera su estado de metilación (Hu et al., 2014). Sin embargo, en esta tesis se ha encontrado que la activación transcripcional inducida por dCas9-p300 disminuye apreciablemente los niveles de metilación. En trabajos anteriores donde se ha observado activación génica inducida por p300 no se ha realizado el correspondiente análisis de los niveles de metilación (Garcia-Bloj et al., 2016;

Hilton et al., 2015; Wang et al., 2017). Sin embargo, existen indicios de que la acetilación de histonas puede facilitar la desmetilación del ADN. Por ejemplo, el tratamiento con diferentes inhibidores de histonas desacetilasas causa una desmetilación global en el genoma de distintas líneas celulares humanas (Szyf et al., 1985). Otras investigaciones apoyan la afirmación de que la inhibición de la desacetilación de la histona puede causar desmetilación selectiva de algunos genes como el receptor *IgfII*, pero no de ciertos genes supresores de tumores (Cameron et al., 1999). En *Neurospora* el inhibidor de histonas deacetilasa tricostatina A causa desmetilación selectiva (Selker, 1998) y en células HEK-293 es capaz de desmetilar genes reporteros ectópicamente metilados (Cervoni and Szyf, 2001). Todos estos resultados sugieren que podría ser necesario un cambio conformacional de la cromatina inducido por p300 para que ocurran eventos de desmetilación en el ADN. Sin embargo, no pudimos detectar ningún efecto cooperativo entre dCas9-ROS1 y dCas9-p300, lo que sugiere que la acetilación puede facilitar la desmetilación del ADN a través de mecanismos independiente de BER.

Independientemente de sus diferencias, los tres efectores (ROS1, p300 y VP160) mostraron una menor capacidad de reactivación génica cuando el ADN se encontraba altamente metilado. Estudios previos realizados con plásmidos metilados *in vitro* muestran que la represión transcripcional aumenta en función de la densidad de metilación (Boyes and Bird, 1992; Hsieh, 1994; Kass et al., 1997). Se ha sugerido que una alta densidad de metilación podría conllevar una unión más estable de las proteínas de unión a ADN metilado (MBPs), como MECP1, lo que evitaría su desplazamiento por factores activadores (Boyes and Bird, 1992). Además, se ha observado que la metilación de los dinucleótidos CpG puede provocar un cambio conformacional en la estructura del ADN, afectando a las interacciones ADN-proteína (Rao et al., 2018). De esta forma, una elevada densidad de metilación podría afectar a la capacidad de unión de las distintas proteínas de fusión al ADN, limitando su potencial catalítico a zonas con niveles de metilación reducidos.

Se ha descrito previamente que algunos efectores muestran una mayor actividad cuando están dirigidos por varios ARN guías y/o cuando se co-expresan con otros efectores (Maeder et al., 2013b; Perez-Pinera et al., 2013b; Wang et al., 2017). De acuerdo con estudios previos (Hilton et al., 2015) en este trabajo no detectamos efecto cooperativo de varios ARN guía en el caso de dCas9-p300. Sin embargo, sí hemos detectado que tanto dCas9-ROS1 como dCas9-VP160 son más activas cuando son dirigidas a sus dianas por

más de un ARN guía. En el caso de dCas9-ROS1 este efecto cooperativo puede deberse a una ampliación del rango de acción del efector, puesto que hemos observado que solo las CpGs situadas a una distancia inferior a las 50 pares de bases del sitio de unión de cada ARN guía son susceptibles de ser desmetiladas. Estos datos coinciden con estudios recientes que muestran que dCas9-DNMT3A es capaz de metilar determinadas posiciones CpG solo si se localizan a una distancia de 25 pares de bases tanto "aguas arriba" como "aguas abajo" del sitio de unión al ARN guía (Vojta et al., 2016). En otro estudio similar, la actividad de dicha proteína muestra un rango de acción dentro de las 50 primeras pares de bases respecto al sitio de unión del ARN guía (McDonald et al., 2016). Por otra parte, la expresión de la proteína de fusión dCas9 junto con una metiltransferasa *M.SssI* bacteriana incrementa los niveles de metilación en CpGs situadas entre 8 y 25 pares de bases respecto al sitio PAM (Xiong et al., 2017).

En esta tesis doctoral también nos preguntamos si el reclutamiento de dCas9-ROS1 junto con otros dominios efectores podría incrementar de forma sinérgica la reactivación del gen reportero de la luciferasa previamente silenciado por metilación. Estudios recientes muestran como la co-transfección con diferentes represores transcripcionales (KRAB, DNMT3A y DNMT3L) origina un efecto sinérgico en la metilación del ADN y de H3K9me3 del gen *B2M* (Amabile et al., 2016). Adicionalmente, el sistema dCas9-VPR, que combina los dominios efectores VP64, p65 y Rat, incrementa de forma sinérgica la activación de genes endógenos codificantes y no codificantes de forma simultánea, llegando a estimular la diferenciación neuronal de las células madre pluripotentes (CMPi) (Chavez et al., 2015). Por otra parte, estudios en los que combinan dCas9VP64 con proteínas ZF-VP64 muestran un efecto cooperativo entre estos factores de transcripción artificiales en la regulación de la expresión del gen diana *MASPIN* (Garcia-Bloj et al., 2016). Sin embargo, en los resultados obtenidos en esta tesis doctoral no se observó efecto sinérgico en la activación del gen reportero en ninguna de las co-transfecciones ensayadas. De hecho, los resultados muestran como dCas9-ROS1 origina un menor incremento de actividad luciferasa en presencia de dCas9-p300 y dCas9-TET1. Es posible que los efectos sinérgicos sean más probables entre dominios efectores que actúan a través de mecanismos similares. Así, p300 muestra un efecto cooperativo con UTX (H3K27 desmetilasa) y MLL4 (H3K4 metiltransferasa), que también son modificadores de histonas (Wang et al., 2017), pero no con el dominio trans-activador VP64 (Hilton et al., 2015). Otra explicación podría estar en que se produjera una inhibición competitiva por

el sitio de unión al ADN entre las distintas proteínas de fusión. El uso de ARN guías que contengan motivos que sean reconocidos por otros efectores permite su reclutamiento en la misma zona de reconocimiento reduciendo el efecto competidor (Koneremann et al., 2015; Zalatan et al., 2015). Esta estrategia podría usarse en futuros estudios para incrementar sinérgicamente el efecto reactivador inducido por dCas9-ROS1 (Figura 40).

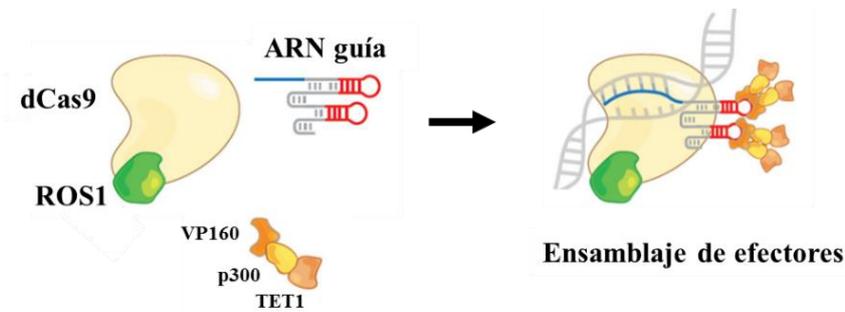


Figura 40. Posible estrategia para el reclutamiento de dCas9-ROS1 junto a otros efectores. Adaptado de (Koneremann et al., 2015).

Por otro lado, tampoco se pudo observar un incremento en la reactivación inducida por dCas9-ROS1 cuando se co-expresó con dos factores de la ruta BER (ZDP y/o APE1L). Estos resultados sugieren que el procesamiento de los intermediarios de ADN generados tras la escisión de la 5-meC no es un paso limitante en la desmetilación inducida por ROS1 en células humanas.

En definitiva, los resultados obtenidos en el segundo capítulo de esta tesis doctoral han revelado que es posible inducir la desmetilación dirigida del ADN utilizando la tecnología CRISPR/dCas9 y la ADN glicosilasa ROS1. Aunque serán necesarios ulteriores esfuerzos para mejorar y optimizar esta herramienta molecular, nuestro estudio es el primero en demostrar que una proteína efectora fusionada a dCas9 es capaz de iniciar un proceso directo de desmetilación activa de ADN en células humanas.

CONCLUSIONES

- 1) La expresión de DME en células tumorales DLD-1 causa pérdida de metilación en los *loci* hipermetilados *ROR2*, *p14* y *p16* y reactiva su expresión.
- 2) La expresión de DME induce cambios en características fenotípicas de las células DLD-1 relacionadas con el proceso tumoral.
- 3) La expresión transitoria de dCas9-ROS1 en células humanas HEK-293 induce la desmetilación y reactivación dirigida de genes silenciados por metilación en un proceso independiente de la replicación de ADN.
- 4) El efecto reactivador de dCas9-ROS1, así como el de otros efectores fusionados a dCas9, disminuye con la densidad de la metilación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño y construcción de plásmidos para la expresión de las proteínas efectoras

1.1. Construcción de los plásmidos para la expresión de DME y DME mut

El ADNc de la ADN glicosilasa DME de *Arabidopsis thaliana*, así como el de su versión catalíticamente inactiva (D1562A), se obtuvieron a partir de los vectores pET30b-DME y pET30b-DME D1562A (Morales-Ruiz et al., 2018), respectivamente. Ambos ADNc se subclonaron en el vector pcDNA 3.1 (Invitrogen), mediante digestión con las enzimas *KpnI* y *NotI*. Las construcciones resultantes se verificaron por secuenciación Sanger y se denominaron pcDNA-DME y pcDNA-DME mut.

1.2. Optimización de codones

El ADNc correspondiente al dominio catalítico de la ADN glicosilasa ROS1 de *Arabidopsis thaliana* (ROS1_CD) se modificó para optimizar la preferencia de codones y así facilitar su expresión en células humanas. Esta versión optimizada fue adquirida en la casa comercial GenScript y se diseñó utilizando el algoritmo OptimumGene™ (GenScript, NJ, USA). Con dicho algoritmo se identificaron, en la secuencia original, aquellos codones de plantas que se encontraban representados con una menor frecuencia en humanos y se sustituyeron por codones sinónimos de acuerdo con la tabla de preferencia de codones para *Homo sapiens* del GenBank Database. El ADNc optimizado fue suministrado por la casa comercial insertado en el vector de clonación pUC57 y flanqueado por los sitios de restricción *AscI* y *PmeI*.

1.3. Construcción de los plásmidos para la expresión de dCas9 fusionada a los dominios efectores

El plásmido pAC93-pmax-dCas9VP160 se adquirió de la casa comercial Addgene (Plásmido #48225). Dicho plásmido permite la expresión, bajo el control del promotor CAGGS, de la proteína dCas9-VP160 que contiene la versión inactiva de la nucleasa Cas9 (dCas9) fusionada al dominio de activación transcripcional VP160. La proteína de fusión incluye además el *tag* HA en su extremo N-terminal y dos secuencias de localización nuclear (NLS) flanqueando a la proteína dCas9. Este plásmido se utilizó como base para la obtención de varias de las construcciones empleadas en esta tesis.

Los plásmidos pcDNA-dCas9-p300Core y pcDNA-dCas9-p300Core D1399Y, fueron adquiridos de la casa comercial Addgene (Plásmido #61357 y plásmido #61358, respectivamente). Éstos permiten la expresión, bajo el control del promotor CMV, de la proteína dCas9 fusionada a la acetiltransferasa de histonas p300 (dCas9-p300) o a una versión mutante de la misma (dCas9-p300Mut). Ambas proteínas incluyen un *tag* 3xFlag y dos NLS flanqueando a la proteína dCas9.

Para obtener el vector de expresión de la proteína dCas9 fusionada al dominio catalítico de ROS1 (dCas9-ROS1), el ADNc de ROS1 optimizado fue amplificado usando la ADN polimerasa de alta fidelidad *Taq Platinum*TM (Invitrogen) y oligonucleótidos específicos con sitios *FseI* y *PacI* en sus extremos (Tabla 1). El producto de PCR fue purificado, digerido y posteriormente subclonado en el vector dCas9-VP160, previamente digerido con *FseI* y *PacI*, lo que permitió reemplazar VP160 por el ADNc de ROS1. El vector para la expresión de la correspondiente versión catalíticamente inactiva (dCas9-ROS1Mut) se obtuvo introduciendo una mutación puntual que da lugar a la sustitución del residuo de aspártico esencial para la actividad catalítica por Alanina (D611A). Para ello, se empleó el kit de mutagénesis dirigida *Quick-Change II XL* (Stratagene) y los oligonucleótidos ROS1_CD D677A Fw y ROS1_CD D677A Rv (Tabla 1).

El vector para la expresión de dCas9 fusionada al dominio catalítico de TET1 (dCas9-TET1) se obtuvo amplificando el ADNc del dominio catalítico de la oxidasa humana TET1 a partir del vector MLM3727 adquirido en Addgene (Plásmido #49239), utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad *Taq Platinum*TM (Invitrogen) y oligonucleótidos específicos con sitios *FseI* y *PacI* en sus extremos (Tabla 1). El producto de la amplificación se purificó, digirió y subclonó en el vector dCas9-VP160, reemplazando VP160 por el ADNc de TET1_CD. La construcción con la versión mutante de TET1 (dCas9-TET1Mut) se consiguió siguiendo la misma estrategia, pero usando como molde el plásmido MLM3743 (Plásmido #49239) que contiene una versión inactiva de dicha proteína.

Finalmente, los vectores de expresión de las proteínas efectoras APE1L y ZDP, implicadas en la ruta de reparación por escisión de bases en plantas, se obtuvieron amplificando a partir de las construcciones pET28c- APE1L (Li et al., 2015) y pET28c-ZDP (Martinez-Macias et al., 2012), respectivamente, utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad *Taq Platinum*TM (Invitrogen) y oligonucleótidos específicos con sitios *FseI* y *PacI* en sus extremos (Tabla 1). El producto de amplificación resultante se purificó,

digirió y se subclonó en vector dCas9-VP160, reemplazando VP160 por el ADNc de APE1L o ZDP. Las construcciones obtenidas se denominaron dCas9-APE1L y dCas9-ZDP.

Todas las construcciones obtenidas se confirmaron mediante secuenciación Sanger.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la generación de las distintas construcciones.

Nombre	Secuencia (5'-3')
FseI-ROS1_CD-Fw	AAATTGGCCGGCCGCAGGGTCAAGCGGCAAC
ROS1_CD-PacI-Rv	TAATATTAATTAATTATGCCAGATTAGCCTGCTGTCCTTTC
FseI-TET1_CD-Fw	AAATTGGCCGGCCGGATCCCTGCCCCACCTGC
TET1_CD-PacI-Rv	TAATATTAATTAATTAATTAATCAGACCCAATGGTTATAGGGCCCC
FseI-Ape1-Fw	AAATTGGCCGGCCATGAAGCGATTCTTCAAGCC
Ape1-PacI-Rv	TAATATTAATTAATTAGTTTGACACCTGGTTCTGT
FseI-ZDP-Fw	AAATTGGCCGGCCATGCCGGTGGTTGCTGAGTA
ZDP- PacI-Rv	TAATATTAATTAACTAAGTCCCTGGCGATGTACTT
ROS1_CD D677A Fw	GCCTTCCAGTGGCCACCAATGTGGGC
ROS1_CD D677A Rv	GCCCACATTGGTGGCCACTGGAAAGGC
NheI-CMVGFP Fw1	AAATTGCTAGCACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGT
CMVGFP-NheI- Rv1	TAATAGCTAGCTTACTTGTACAGCTCGTCC

El subrayado indica las dianas de las enzimas de restricción.

2. Diseño y clonación de los ARN guías

Cada ARN guía se obtiene a partir de una pareja de oligonucleótidos de cadena simple que se anillan para generar un fragmento de doble cadena de ADN con extremos cohesivos para su clonación en un plásmido de expresión.

Los oligonucleótidos para la expresión de los ARN guías específicos del promotor TK (ARN 9, ARN 10, ARN 11 y ARN 12) se diseñaron usando los programas informáticos de uso libre “Feng Zhang lab’s Target Finder” (<http://crispr.mit.edu>) o “CHOPCHOP” (<http://chopchop.cbu.uib.no/index.php>) (Tabla 2). Los plásmidos para la expresión de ARN 3, ARN 4, ARN 5, ARN 6, ARN 7 y ARN 8 específicos del promotor TK se obtuvieron en trabajos previos (Parrilla Doblas, 2016) siguiendo la misma metodología (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de los ARNs guía específicos del promotor TK.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Diana	Posición respecto al ATG (pb)
ARN 3-sg-s-Fw	<u>ACACCGCTCTTACGCGTGCTAGCCCG</u>	Promotor TK (Sentido +)	-218 a -199
ARN 3-sg-s-Rv	<u>AAAACGGGCTAGCACGCGTAAGAGCG</u>		
ARN 4-sg-s-Fw	<u>ACACCGCGAACACGCAGATGCAGTCGG</u>	Promotor TK (Sentido +)	-159 a -140
ARN 4-sg-s-Rv	<u>AAAACCGACTGCATCTGCGTGTTTCGCG</u>		
ARN 5-sg-s-Fw	<u>ACACCGCTTGGCATTCCGGTACTGTG</u>	Promotor TK (Sentido +)	-33 a -14
ARN 5-sg-s-Rv	<u>AAAACACAGTACCGGAATGCCAAGCG</u>		
ARN 6-sg-as-Fw	<u>ACACCGCTGTTAAGCGGGTCGCTGCG</u>	Promotor TK (Sentido -)	-69 a -50
ARN 6-sg-as-Rv	<u>AAAACGCAGCGACCCGCTTAACAGCG</u>		
ARN 7-sg-as-Fw	<u>ACACCGCGTCACCTTAATATGCGAAGG</u>	Promotor TK (Sentido -)	-117 a -98
ARN 7-sg-as-Rv	<u>AAAACCTTCGCATATTAAGGTGACGCG</u>		
ARN 8-sg-as-Fw	<u>ACACCGTTCGCCAATGACAAGACGCTG</u>	Promotor TK (Sentido -)	-181 a -162
ARN 8-sg-as-Rv	<u>AAAACAGCGTCTTGTCATTGGCGAACG</u>		
ARN 9-s Fw	<u>ACACCGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCG</u>	Promotor TK (Sentido +)	-273 a 254
ARN 9-s Rv	<u>AAAACGCACCTTGCACTGGGGACAGCG</u>		
ARN 10-as Fw	<u>ACACCGGGCTGGCGTAATAGCGAAGG</u>	Promotor TK (Sentido -)	-463 a 444
ARN 10-as Rv	<u>AAAACCTTCGCTATTACGCCAGCCCG</u>		
ARN 11-s Fw	<u>ACACCGGCTGCGCAACTGTTGGGAAG</u>	Promotor TK (Sentido +)	-502 a 483
ARN 11-s Rv	<u>AAAACCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCG</u>		
ARN 12-as Fw	<u>ACACCGACGTGGACTCCAACGTCAAAG</u>	Promotor TK (Sentido -)	-705 a 686
ARN 12-as Rv	<u>AAAACCTTTGACGTTGGAGTCCACGTCG</u>		

El subrayado indica las dianas la secuencia de *BsmBI*

Las parejas de oligonucleótidos de los ARN guías específicos del promotor TK se fosforilaron mediante su incubación en *1x Reaction Buffer A* de la enzima T4 PNK, 1mM dATP con 10 unidades de la enzima T4 PNK (Thermo Scientific) durante 30 minutos a 37°C y la reacción se inactivó calentando a 75°C durante 10 min. A continuación, cada pareja de oligonucleótidos se anilló incubando 5 minutos a 95°C y dejándola enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente, cada una de las parejas de oligonucleótidos se clonaron en el vector de expresión pMLM3636 (#43860 Addgene) bajo el control del promotor U6 (Figura 41). Dicho promotor presenta preferencia por un nucleótido guanina (G) como la primera base de su transcrito (Ran et al., 2013), por lo que se agregó un G adicional al 5' del ARN guía en caso de que este no comenzase con G. Además, dicho

plásmido presenta dos dianas de restricción para la enzima *BsmBI*, por lo que para el diseño de los ARN guías se tuvo en cuenta que los extremos que quedarán tras el *annealing* fueran compatibles con los extremos que deja el corte de dicha enzima.

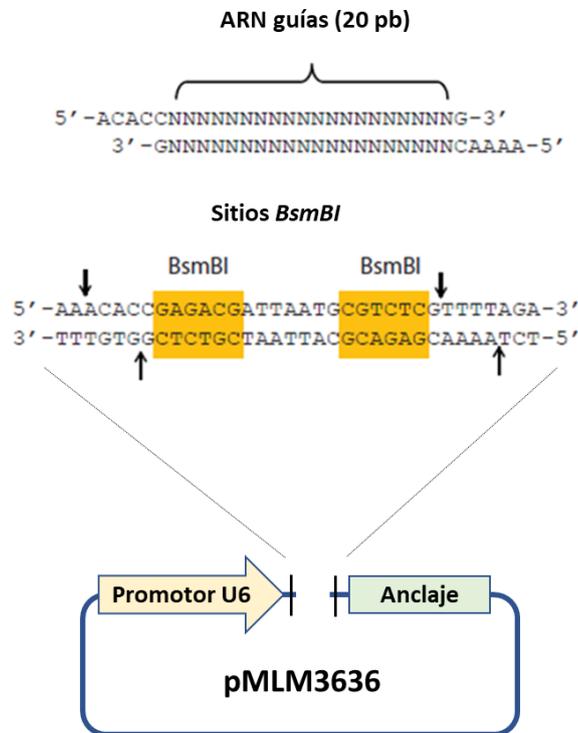


Figura 41. Esquema de la obtención del vector de expresión de los ARN guías.

Por otro lado, la secuencia de los oligonucleótidos para la expresión de los ARN guías específicos de dianas endógenas se obtuvieron a partir de trabajos previos (Gimenez et al., 2016; Hilton et al., 2015; Xu et al., 2016) (Tabla 3). Estos oligonucleótidos se anillaron siguiendo la estrategia descrita anteriormente, pero utilizando pMLM3636-GFP como vector de clonación, que expresaba la proteína verde fluorescente (GFP). Dicho plásmido se obtuvo mediante la amplificación GFP a partir de pcDNA3-GFP adquirido en Addgene (Plásmido #13031), utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad *Q5*[®] *High-Fidelity* (New England Biolabs) con oligonucleótidos específicos que portan la secuencia de la enzima de restricción *NheI* en sus extremos (Tabla 1), y posterior clonación en el vector pMLM3636 previa digestión con *NheI*.

Todos los oligonucleótidos se obtuvieron de la casa comercial Isogen Life Science, y se purificaron mediante HSPF (*High Purify Salt Free*).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de los ARN guías específicos de dianas endógenas.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Diana (Promotor)	Posición respecto al TSS (pb)
Oct4 ARN _{sg1} - Fw	<u>ACACCGGGACTGGGGAGGGAGAGAGG</u>	OCT4 (Sentido +)	-33 a -14
Oct4 ARN _{sg1} - Rv	<u>AAAACCTCTCTCCCTCCCCAGTCCCG</u>		
Oct4 ARN _{sg2} - Fw	<u>ACACCGTGGAGAGGGGGTCAAGCACCG</u>	OCT4 (Sentido +)	-79 a 60
Oct4 ARN _{sg2} - Rv	<u>AAAACGGTGCTTGACCCCTCTCCACG</u>		
Oct4 ARN _{sg3} - Fw	<u>ACACCGACCTCTGGCACTGTGCCTTCG</u>	OCT4 (Sentido +)	-102 a 83
Oct4 ARN _{sg3} - Rv	<u>AAAACGAAGGCACAGTGCCAGAGGTCCG</u>		
Oct4 ARN _{sg4} - Fw	<u>ACACCGCCTGAAGAACATGGAGTTGTG</u>	OCT4 (Sentido +)	-53 a 34
Oct4 ARN _{sg4} - Rv	<u>AAAACGAAGGCACAGTGCCAGAGGTCCG</u>		
INS ARN _{sg1} - Fw	<u>ACACCGGGGCTGAGGCTGCAATTTTCG</u>	INS (Sentido -)	-114 a -133
INS ARN _{sg1} - Rv	<u>AAAACGAAATTCAGCCTCAGCCCCG</u>		
INS ARN _{sg2} - Fw	<u>ACACCGCCAGCACCAGGGAAATGGTCCG</u>	INS (Sentido +)	-136 a -155
INS ARN _{sg2} - Rv	<u>AAAACGACCATTTCCCTGGTGCTGGCG</u>		
INS ARN _{sg3} - Fw	<u>ACACCGCTAATGACCCGCTGGTCTTGG</u>	INS (Sentido +)	-196 a -215
INS ARN _{sg3} - Rv	<u>AAAACCAGGACCAGCGGGTCATTAGCG</u>		
INS ARN _{sg4} - Fw	<u>ACACCGAGGCTTGCCACCGGGCCCCCG</u>	INS (Sentido +)	-227 a -246
INS ARN _{sg4} - Rv	<u>AAAACGGGGCCCCGTGGCCAGACCTTCG</u>		

El subrayado indica las dianas la secuencia de *BsmBI*

3. Plásmidos para la expresión de genes reporteros

Los plásmidos para la expresión de los genes reporteros de la luciferasa y de GFP (a partir de ahora plásmidos reporteros TK-Luc y TK-GFP, respectivamente) se obtuvieron en trabajos previos realizados por el grupo donde se ha llevado a cabo esta tesis (Dorado León, 2016; Parrilla Doblás, 2016). Dichos plásmidos permiten la expresión de la luciferasa y la proteína verde fluorescente respectivamente, bajo el control del promotor mínimo (156 pares de bases) de la timidina quinasa (TK).

El plásmido que permite la expresión de la *Renilla* bajo el control del promotor CMV (pRL-CMV, Promega) se utilizó como referencia para normalizar de la reacción de luminiscencia. Por su parte, el plásmido que codifica para el dTomato (CMV-dTomato), fue adquirido de la casa comercial Addgene (Plásmido #54642) y se usó como referencia para normalizar la eficiencia de transfección en los ensayos de citometría.

4. Metilación *in vitro* de los plásmidos reporteros TK-Luc y TK-GFP

Los plásmidos TK-Luc y TK-GFP se propagaron en la estirpe bacteriana BL21 *dcm*⁻ deficiente en la ADN metiltransferasa *dcm*. Tras su purificación el ADN plasmídico se metiló *in vitro* en una mezcla de reacción que contenía 50 µg de ADN, 160 unidades de *CpG methyltransferase (M.SssI)* (New England BioLabs), 50 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM DTT y 1600 µM *S-adenosilmetionina* (SAM). Esta mezcla se incubó a 37°C durante distintos tiempos según el grado de metilación que se pretendía obtener (ver sección Resultados). A continuación, el ADN se purificó mediante precipitación con etanol. El nivel de metilación se comprobó mediante análisis de sensibilidad a la enzima de restricción *HpaII* y se cuantificó mediante el programa informático Image Lab (BioRad).

5. Cultivos bacterianos

Las estirpes bacterianas que contenían las construcciones de interés se cultivaron a 37°C en medio *Luria Bertani* (LB) sólido (10 g/l bactotripton, 5 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl, 15 g/l bactoagar), suplementado con el antibiótico de selección. A continuación, se inocularon las colonias de interés en medio LB líquido a 37°C con agitación para su posterior procesado.

La conservación de las distintas estirpes bacterianas durante largos periodos se llevó a cabo a -80°C en medio LB líquido con glicerol (15 % v/v). Para periodos cortos, se mantuvieron a 4 °C en medio LB sólido.

6. Cultivos celulares

6.1. Mantenimiento de las líneas celulares

Se emplearon la línea celulares humana de cáncer colorrectal DLD-1 y la línea celular humana embrionaria de riñón HEK-293 la cual carece del antígeno-T de SV40, por lo que no tiene lugar la replicación episomal de plásmidos transfectados que contengan el origen de replicación del SV40.

Ambas líneas celulares se cultivaron en medio *Dulbecco's modified Eagle's High Glucose* (DMEM, 4.5 g/L, Biowest) suplementado con un 10% de suero fetal bovino

(FBS), previamente inactivado durante una hora a 56°C, y junto con una solución al 1% de penicilina-estreptomina. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas. Una vez que las células alcanzaron un estado subconfluyente, los cultivos se tripsinizaron con 0.05% de tripsina/EDTA.

7. Transfección celular

7.1. Transfección de las células DLD-1

Un total de 3.5×10^6 células DLD-1 se sembraron en placas de 15 cm de diámetro y se incubaron durante una noche para permitir la adhesión celular. A continuación, se transfectaron con 50 µg de los plásmidos pcDNA 3.1, pcDNA-DME o pcDNA-DME mut, respectivamente, utilizando *Lipofectamine LTX Reagent* (Invitrogen), según las recomendaciones de la casa comercial. Los transfectantes estables se seleccionaron en medio DMEM que contenía 1 mg/ml de G418 (Neomicina, Calbiochem). En los clones positivos se confirmó la expresión de DME y de su versión catalíticamente inactiva mediante RT-PCR y western blot, como se describe en los apartados correspondientes de materiales y métodos.

7.2. Transfección de las células HEK-293

Un total de 1×10^5 células HEK-293 por pocillo se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos y se incubaron durante una noche para permitir la adhesión celular. A continuación, se co-transfectaron con un total de 500 ng de ADN distribuidos de la siguiente manera: 5 ng del plásmido que permite la expresión del gen reportero *Renilla*, 250 ng del plásmido TK-Luc o TK-GFP metilado *in vitro*, 125 ng del plásmido para la expresión de ROS1 o su versión mutada y 125 ng del plásmido para la expresión de los ARNs guías. En todos los casos la mezcla de transfección incluía 100 µl de *Opti-MEM*[®] *I Reduced Serum Media* (Gibco) y 1,5 µl de *Lipofectamine LTX Reagent* (Invitrogen). Dicha mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación se añadió gota a gota al cultivo celular. Tras 48 horas las células se lavaron con PBS, se recogieron y se analizaron por citometría de flujo o se determinó su actividad luciferasa.

8. Ensayos de actividad luciferasa

La actividad luciferasa se cuantificó empleando el sistema *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. En primer lugar, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 100 μ l de *Passive Lysis Buffer* (1X PLB). Tras 15 minutos de incubación en agitación, los lisados celulares se centrifugaron durante 30 s a 13.000 rpm y 10 μ l del sobrenadante se mezclaron con 50 μ l del *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II) en placas blancas *Greiner Bio-One μ Clear*. A continuación, se cuantificó la actividad luciferasa, se detuvo la reacción añadiendo 50 μ l de *Stop & Glo[®] Reagent* y se procedió a determinar la actividad de Renilla. Todas las determinaciones se llevaron a cabo en un lector de placas TECAN infinite F200 PRO usando el programa informático i-Control 1.7. La eficiencia de transfección se determinó utilizando la actividad Renilla como valor de referencia.

9. Citometría y *cell sorting*

El número de células con actividad GFP (GFP⁺) se cuantificó 24 h tras la transfección utilizando un citómetro de flujo LSRFortessa SORP (Becton Dickinson) y el programa BD FACS Diva (Becton Dickinson) y se expresó como el porcentaje de células que co-expresan GFP-Tomato dividido entre el porcentaje total de células que expresan Tomato.

Los ensayos de *cell sorting* se realizaron con el equipo FACS Aria III (Becton Dickinson) en la unidad de Microscopía, Citometría e Imagen Científica del Instituto Maimónides de Investigaciones Biomédicas de Córdoba (IMIBIC).

10. Aislamiento de ADN

10.1. Extracción de ADN genómico a partir de las líneas celulares

Los pellets celulares fueron homogenizados en 900 μ l de tampón de lisis (10 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA y 100 mM NaCl) y tras añadir 100 μ l SDS 10% y 5 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) se incubaron durante toda la noche a 37°C. A continuación, se precipitó el ADN añadiendo NaCl hasta una concentración final de 1.5 M e isopropanol, se realizó un lavado con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 20 μ l de agua. La concentración del ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de

260 nm en un espectrofotómetro DS-11 Spectrophotometer (DeNovix). La calidad del ADN fue determinada mediante el cálculo de la relación entre la densidad óptica obtenida a 260 y 280 nm. El ADN se consideró válido para análisis posteriores sólo cuando dicha relación fue de 1,8 o superior. Además, las muestras se visualizaron en geles de agarosa y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

10.2. Aislamiento de ADN plasmídico a partir de transfectantes

Las células HEK-293 transfectadas con los distintos plásmidos reporteros (ver apartado 7.2 de Materiales y Métodos) se centrifugaron, los precipitados celulares se resuspendieron en 500 µl de tampón de lisis CPEB (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.075% IGEPAL, 1% v/v cocktail inhibidores de proteasas, 1% v/v cocktail inhibidores de fosfatasas 1 y 1% v/v cocktail inhibidores de fosfatasas 2, y se incubaron durante 30 min en hielo. Tras la incubación, se volvieron a centrifugar, el pellet obtenido se resuspendió en 250 µl de CPEB sin IGEPAL y se incubaron durante 10 min en hielo. A continuación, se procedió a la extracción de los núcleos mediante centrifugación a 1.800 rpm durante 10 min a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 500 µl de tampón NEB (20 mM HEPES pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.2 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 25% glicerol) y se incubó durante 30 min en hielo. Una vez transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 14.000 rpm, durante 20 min a temperatura ambiente.

10.3. Aislamiento de ADN plasmídico de cultivos bacterianos

El ADN plasmídico se aisló utilizando el Kit *Nzytech genes & enzymes nzyMiniprep* (NZYTech), siguiendo las instrucciones del fabricante.

11. Determinación de los niveles de metilación

El nivel de metilación de las secuencias de interés se evaluó mediante las siguientes técnicas: 1) PCR cuantitativa específica del estado de metilación, y 2) pirosecuenciación. En todas ellas, se realizó un paso previo de modificación del ADN mediante incubación con bisulfito sódico.

11.1. Tratamiento del ADN con bisulfito sódico

La modificación del ADN con bisulfito sódico se realizó empleando el kit *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* (Zymo Research), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En presencia de bisulfito sódico, las citosinas no metiladas, se convierten en uracilos por desaminación mientras que las 5-meC son resistentes a dicho tratamiento (Wang et al., 1980) (Figura 42). En el proceso de PCR posterior, los residuos de uracilo se amplifican como timinas, mientras que los de 5-meC se amplifican como citosinas.

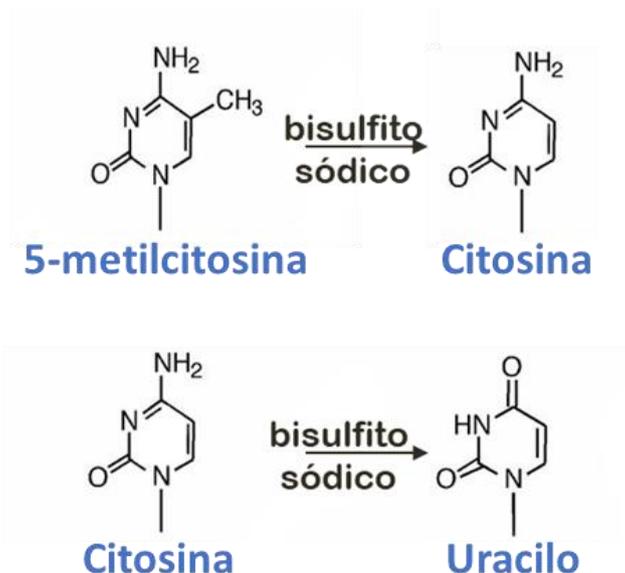


Figura 42. Fundamento de la técnica de tratamiento con bisulfito.

11.2. PCR cuantitativa específica del estado de metilación (qMSP)

La PCR cuantitativa específica de metilación (qMSP) se basa en el uso de cebadores con 2-3 posiciones CpGs para discriminar entre secuencias metiladas y no metiladas (Jeronimo et al., 2004). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa MethPrimer o descritos previamente en referencias bibliográficas (Tabla 4). En cada reacción se mezcló 1 µl de ADN_g modificado con bisulfito, 5 µl de *iQ SYBR[®] Green Supermix* (BioRad) y la pareja de cebadores a una concentración final de 500 nM. Estas reacciones se llevaron a cabo en un equipo CFX Connect Real-Time System (BioRad). Las muestras se analizaron por triplicado, incluyendo ADN_g sin metilar como control negativo y ADN completamente metilado un control positivo, (Zymo Research). Como control de referencia interno se utilizó el gen *AluC4*, y los niveles de relativos de metilación se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en las qMSP.

Nombre	Secuencia (5'-3')
ROR2 Fw	GTTTCGTTTTGTTTATCGGGGC
ROR2 Rv	ACTAAAAAATTCCTTAACGCGAA
p14 Fw	ACGGGCGTTTTTCGGTAGTT
p14 Rv	CCGAACCTCCAAAATCTCGA
p16 Fw	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC
p16 Rv	GACCCCGAACC GCGACCGTAA
AlucC4 Fw	GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGTA
AlucC4 Rv	ATTAACCTAAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA

11.2. Pirosecuenciación

El ADNg modificado con bisulfito se amplificó mediante PCR utilizando cebadores específicos, uno de los cuales se encuentra marcado con biotina (BTN) en su extremo 5' (Tabla 5) y diseñados con el programa Pyromark Assay Design 2.0. Los productos de PCR biotinilados se incubaron a temperatura ambiente, durante 10 min en agitación en una suspensión que contiene pequeñas esferas (“beads”) de sefarosa cubiertas con estreptavidina. A continuación, el ADN se desnaturalizó, se añadió el cebador de secuenciación (Tabla 5), se incubó a 80 °C durante 2 min y se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

La pirosecuenciación se llevó a cabo en el equipo PyroMark™ Q24 (Quiagen) y la determinación de los niveles de metilación para cada sitio CpG se determinaron usando el programa PyroMark Q24 (Quiagen).

Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la pirosecuenciación.

Nombre	Secuencia (5'-3')
TK piro Fw1	GGTTGTTTTTAGTGTAAGTGTAGG
TK piro R1-biotina	[BTN] TCCATAATAACTTTACCAACAATA
TK piro S1	GTGTAGGTGTTAGAATATTTTT
Piro INS Fw1	TATTTGTTTTTAGTTGTGAGTAGGGATAG
Piro INS Rv1	[BTN] ACCATTTCCCTAATACTAAATCTATAA
INS S1	GAGTAGGGATAGGTTTG
Piro INS Fw3	TTTTATAGATTTAGTATTAGGGAAATGGT
Piro INS Rv3	[BTN] AAAAACCCCTTAAAACAAACCTACTT
INS S3	AGTATTAGGGAAATGGTT
Piro Oct4 Fw2	GAGGGAGAGAGGGGTTGAGT
Piro OCT4 Rv2	[BTN] CCCCTAACCCATCACCTCCA
OCT4 S2	GGGGTTGAGTAGTTT
Piro Oct4 Fw3	GGGGGATTTGTATTGAGGTTT
Piro OCT4 Rv3	[BTN] CACCCACTAACCTTAACCTCTA
OCT4 S3	GAGGTTTTTGAGGGG
Piro RANKL Fw1	GAGGTTTTTAAAAAGTTTTAGTAAGGT
Piro RANKL Rv1	[BTN] TTCCCAAATCCCTATTTCTACATCTTA
RANKL S1	ATTAATATTTAATTGTATTATTAGT

12. Cuantificación de expresión génica

12.1. Extracción de ARN

El ARN total de los distintos pellets celulares fue extraído usando el kit comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN se resuspendió en agua y se cuantificó en un espectrofotómetro DS-11 Spectrophotometer, DeNovix.

La concentración del ARN se obtuvo midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro DS-11 Spectrophotometer (DeNovix). La calidad del ARN fue determinada mediante el cálculo de la relación de la densidad óptica obtenida a 260 y 280 nm. El ARN se consideró válido para análisis posteriores solo si dicha relación fue de 2 o superior. Además, las muestras se visualizaron en geles de agarosa y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

12.2. RT-PCR

Con el fin de eliminar posibles contaminaciones de ADNg en las muestras de ARN, el ARN aislado se trató con una unidad de *DNasa RNasafree* (Thermo Scientific). El ADNc se obtuvo mediante una reacción de retrotranscripción (RT) utilizando el kit *qScriptTM cDNA Synthesis* (Quanta Biosciences) en un volumen final de 20 μ L a partir de 1 μ g de ARN total utilizando cebadores de secuencia aleatoria y oligo (dT).

El ADNc se amplificó mediante PCR utilizando cebadores específicos de la secuencia correspondiente a los genes de interés (Tabla 6). Como control de expresión constitutiva se empleó el gen *GAPDH* (Tabla 6). Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 1,5%.

12.3. RT-PCR cuantitativa

Cada reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l mezclando 1 μ l de ADNc, 5 μ l de *iQ SYBR[®] Green Supermix* (Bio-Rad) y la pareja de cebadores (Tabla 6) a una concentración final de 500 nM. Todas las medidas se realizaron por triplicado y como control negativo se incluyó una reacción donde se añadió agua en lugar de ADNc. Las reacciones de PCR llevaron a cabo usando la CFX Connect Real-Time System (BioRad) y los datos se analizaron usando el programa CFX Manager (BioRad). La normalización se llevó a cabo usando el gen *GAPDH* y el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

13. Análisis western-blot

Los extractos nucleares se obtuvieron a partir de los transfectantes estables DLD-1 usando el kit *Qproteome Cell Compartment Kit* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Por otro lado, los extractos proteicos totales se obtuvieron lisando las células HEK-293 con el tampón RIPA suplementado con cocktail de inhibidores de proteasas humanas (Calbiochem).

En todos los casos la cantidad de proteína del extracto se cuantificó mediante la técnica Bradford, utilizando una recta patrón con concentraciones conocidas de BSA (*Bovine Serum Albumin*) y midiendo la densidad óptica a 595 nm en un espectrofotómetro iMark Microplate Reader (BioRad). Los extractos se conservaron a -20°C.

Tabla 6. Oligonucleótidos usados para las qRT-PCRs.

Nombre	Secuencia (5'-3')
DME Fw	TGTGTCCCAGGTACCTCCAT
DME Rv	AATGCTTTGGGTGCAGTCTC
GAPDH-Fw2	TGTCCCCACTGCCAACGTGTCA
GAPDH-Rv2	AGCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT
Fluc-M1 Fw	AGGTGGCTCCCGCTGAAT
Fluc-M1 Rv	CATCGTCTTTCCGTGCTCCA
Fluc-M2 Fw	TGACCGCCTGAAGTCTCTG
Fluc-M2 Rv	GACCTGCGACACCTGCGT
OCT4 Fw1	GAGAACCGAGTGAGAGGCAA
OCT4 Rv1	CACACTCGGACCACATCCTT
INS Fw	GCAGCCTTTGTGAACCAACACC
INS Rv	TGTTCCACAATGCCACGCTTC
ROR2 Fw	CTCATGATCGAGTGCTGGAA
ROR2 Rv	CGTTGCTCACATTGCTCACT
P14 Fw	CCTCGTGCTGATGCTACTGAGG
P14 Rv	GTGGAGCAGCAGCAGCTCC
P16 Fw	GCCCAACGCACCGAATAGTTAC
P16 Rv	GTGGAGCAGCAGCAGCTCC

Las proteínas de cada extracto separaron mediante electroforesis SDS-PAGE usando geles al 12% de poliacrilamida o en 4-20% *Mini-Protean[®] TGX Stain-Free[™] Precast Gels* (BioRad). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia en tampón (48 mM Tris; 39 mM Glicina; 20% Metanol v/v; 0.038% SDS) a un voltaje constante de 30 V a 4 °C durante toda la noche. A continuación, la membrana se incubó en solución de bloqueo (3% Skim Milk en solución TBS (10 mM Tris pH 7.4; 150 mM NaCl) o 3% BSA en TBS) durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó tres veces con TBS. Posteriormente, se procedió a su incubación con el anticuerpo primario (Tabla 7) durante toda la noche a 4°C. Tras varios lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1%, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa (*horseradish peroxidase*, HRP) (Tabla 8) durante 1-2 h a temperatura ambiente y seguidamente se lavaron de nuevo con TBS-Tween 0.1%. Para la detección de las proteínas se utilizó el sistema comercial ECL Prime (Amersham) en proporción 1:1. Para la detección de la quimioluminiscencia se utilizó una cámara Molecular Imager Chemi-Doc[™] XRS⁺ y el software Image Lab[™] (BioRad).

Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-HistonaH3 cuando se utilizaron los extractos nucleares y anti-Actina 1 cuando se usaron los extractos totales de proteínas. En todos los casos se utilizó el marcador de peso molecular *Precision Plus ProteinTM Western^{CTM} Standards* (BioRad).

Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados en los distintos ensayos western blot.

Nombre	Dilución	Casa comercial
anti-C-terminal ROS1 de conejo	1:500	N/A
anti-Histona H3	1:5000	Millipore
anti-Actina 1	1:2000	Sigma
antiCRISPR/Cas9-4G10	1:2000	Diagenode

Tabla 8. Anticuerpos secundarios utilizados en los distintos ensayos western blot.

Nombre	Dilución	Casa comercial
anti-IgG de conejo, conjugado a peroxidasa	1:5000 1:10000	Sigma
anti-IgG de ratón, conjugado a peroxidasa	1:3000 1:5000	Cell Signaling Technology

14. Tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina

Para el tratamiento con aza (Sigma-Aldrich), se sembraron 2×10^5 células en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas de incubación para lograr la fijación celular, se añadió aza a una concentración final de $2.5 \mu\text{M}$. El medio se reemplazó por medio fresco completo con aza diariamente y tras 72 h de incubación se recogieron las células para su análisis.

15. Tratamiento con Oxaliplatino o 5-fluorouracilo

La viabilidad celular de los transfectantes estables de DLD-1 tras el tratamiento con los quimioterapéuticos oxaliplatino y 5-fluorouracilo (Sigma-Aldrich) se cuantificó utilizando el kit *Cell Proliferation Reagent WST-1* (Roche). Este ensayo colorimétrico está basado en la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa que lleva a cabo la reducción metabólica de las sales tetrazolio (WST-1) a formazán, generando un compuesto de color anaranjado solo en células que están metabólicamente activas.

Se sembraron 8×10^3 células en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante 24 h. Posteriormente, las células fueron sometidas al tratamiento con oxaliplatino o 5-

fluoruracilo. Cada concentración del quimioterapéutico se ensayó por triplicado. Tras el tratamiento, se añadió 10 μ l de *Cell Proliferation Reagent WST-1* a cada pocillo y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 30 min. A continuación, se determinó la absorbancia 450 nm usando el lector de microplacas ImarkTM (Biorad).

La viabilidad celular se calculó el cociente de la absorbancia en cada tiempo dividido entre la obtenida en el tiempo 0 h.

16. Ensayos de formación de colonosferas

Las células se sembraron a una densidad de 1×10^3 células/ml en placas de 6 pocillos en condiciones de no adherencia con medio *DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham* (Sigma-Aldrich) suplementado con 1% de metilcelulosa y los factores de crecimiento EGF (Epidermal Growth Factor) y bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) a una concentración final de 20 ng/ μ l y 10 ng/ μ l respectivamente. Cada 48 h las células se refrescaron con 1 ml de medio fresco. La identificación de las colonosferas generadas se evaluó por microscopía óptica 7 días después de la siembra.

Para obtener colonosferas secundarias las colonosferas primarias se disgregaron con tripsina/EDTA y a continuación, se sembraron de nuevo (2 ml) en condiciones de no adherencia a una densidad clonal de 1×10^3 células/ml en placas de 6 pocillos. Cada 48 horas las células se refrescaron con 1 ml de medio fresco. A la semana de incubación se identificaron colonosferas secundarias por microscopía óptica.

El tamaño de las colonosferas, tanto primarias como secundarias, se determinó midiendo su área con el programa de análisis de imagen ImageJ.

17. Generación de tumores subcutáneos (*xenografts*)

Para la generación de tumores subcutáneos, se utilizaron diez ratones macho Nude-Foxn1_{nu/un} (Janvier Labs) de cinco semanas de edad. En cada flanco se inyectaron subcutáneamente 2.5×10^6 células en 100 μ l Matrigel^R Matrix (Corning). Las células transfectadas con DME se inyectaron en el flanco izquierdo y las transfectadas con la versión mutante en el flanco derecho. Se realizó un seguimiento rutinario de los animales para valorar su apariencia y su estado de salud. El tamaño de los tumores se determinó con la ayuda de un calibre, midiendo tanto la anchura (W) como la longitud (L) de los mismos, y su volumen se estimó aplicando la fórmula $V = 0.4 \times L \times W^2$ (L = longitud

máxima; W = anchura máxima). Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical previa anestesia. Los tumores fueron extraídos y conservados a -80°C hasta su uso.

Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en las instalaciones especializadas del animalario de la Universidad de Córdoba y se siguieron los protocolos experimentales del Comité Ético de Experimentación Animal de dicha Universidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* *21*, 6270-6279.
- Agius, F., Kapoor, A., and Zhu, J.K. (2006). Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 11796-11801.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhhattar, R., *et al.* (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* *131*, 633-636.
- Amabile, A., Migliara, A., Capasso, P., Biffi, M., Cittaro, D., Naldini, L., and Lombardo, A. (2016). Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell* *167*, 219-232.e214.
- Anton, T., and Bultmann, S. (2017). Site-specific recruitment of epigenetic factors with a modular CRISPR/Cas system. *Nucleus-Phila* *8*, 279-286.
- Balch, C., Ramapuram, J.B., and Tiwari, A.K. (2017). The Epigenomics of Embryonic Pathway Signaling in Colorectal Cancer. *Front Pharmacol* *8*, 267.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* *21*, 381-395.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* *315*, 1709-1712.
- Baumann, V., Wiesbeck, M., Breunig, C.T., Braun, J.M., Koflerle, A., Ninkovic, J., Gotz, M., and Stricker, S.H. (2019). Targeted removal of epigenetic barriers during transcriptional reprogramming. *Nat Commun* *10*, 2119.
- Baylin, S.B., and Jones, P.A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *8*.
- Beck, S., Olek, A., and Walter, J. (1999). From genomics to epigenomics: a loftier view of life. *Nat Biotechnol* *17*, 1144.
- Berli, R.R., Dreier, B., and Barbas, C.F., 3rd (2000). Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 1495-1500.
- Berli, R.R., Segal, D.J., Dreier, B., and Barbas, C.F., 3rd (1998). Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the *erbB-2/HER-2* promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 14628-14633.
- Bender, J. (2004). Chromatin-based silencing mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* *7*, 521-526.
- Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* *128*, 669-681.
- Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* *9*, 2395-2402.
- Bhaya, D., Davison, M., and Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* *45*, 273-297.

- Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., and Marraffini, L.A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 41, 7429-7437.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Ehrlich, S.D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551-2561.
- Boyes, J., and Bird, A. (1992). Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J* 11, 327-333.
- Brocken, D.J.W., Tark-Dame, M., and Dame, R.T. (2018). dCas9: A Versatile Tool for Epigenome Editing. *Current issues in molecular biology* 26, 15-32.
- Brooks, W.H., Le Dantec, C., Pers, J.O., Youinou, P., and Renaudineau, Y. (2010). Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun* 34, J207-219.
- Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myohanen, S., Herman, J.G., and Baylin, S.B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21, 103-107.
- Capuano, F., Mulleder, M., Kok, R., Blom, H.J., and Ralser, M. (2014). Cytosine DNA methylation is found in *Drosophila melanogaster* but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and other yeast species. *Anal Chem* 86, 3697-3702.
- Carpenter, A.E., Memedula, S., Plutz, M.J., and Belmont, A.S. (2005). Common effects of acidic activators on large-scale chromatin structure and transcription. *Mol Cell Biol* 25, 958-968.
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., and Raschella, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell death discovery* 3, 17071.
- Cervoni, N., and Szyf, M. (2001). Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 276, 40778-40787.
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B.W., Tuttle, M., E, P.R.I., Lin, S., Kiani, S., Guzman, C.D., Wiegand, D.J., *et al.* (2015). Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods* 12, 326-328.
- Chen, H., Kazemier, H.G., de Groote, M.L., Ruiters, M.H., Xu, G.L., and Rots, M.G. (2014). Induced DNA demethylation by targeting Ten-Eleven Translocation 2 to the human ICAM-1 promoter. *Nucleic Acids Res* 42, 1563-1574.
- Chen, T., and Li, E. (2004). Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol* 60, 55-89.
- Chen, T., and Li, E. (2006). Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Current topics in microbiology and immunology* 301, 179-201.
- Cheng, A.W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T.W., Rangarajan, S., Shivalila, C.S., Dadon, D.B., and Jaenisch, R. (2013). Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res* 23, 1163-1171.

- Choi, C.S., and Sano, H. (2007). Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics* 277, 589-600.
- Choi, Y.H., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E., and Fischer, R.L. (2002). DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell* 110, 33-42.
- Chong, S., and Whitelaw, E. (2004). Epigenetic germline inheritance. *Curr Opin Genet Dev* 14, 692-696.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., *et al.* (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.
- Cordoba-Canero, D., Morales-Ruiz, T., Roldan-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2009). Single-nucleotide and long-patch base excision repair of DNA damage in plants. *Plant J* 60, 716-728.
- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.
- Deng, D., Yan, C., Wu, J., Pan, X., and Yan, N. (2014). Revisiting the TALE repeat. *Protein Cell* 5, 297-306.
- Dorado León, M. (2016). Desarrollo de un sistema de detección para analizar mecanismos de silenciamiento génico. In Departamento de Genética (Universidad de Córdoba).
- Ehrlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 1, 239-259.
- Ellis, L., Atadja, P.W., and Johnstone, R.W. (2009). Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Molecular cancer therapeutics* 8, 1409-1420.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286-298.
- Esteller, M., Tortola, S., Toyota, M., Capella, G., Peinado, M.A., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000). Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 60, 129-133.
- Falahi, F., Sgro, A., and Blancafort, P. (2015). Epigenome engineering in cancer: fairytale or a realistic path to the clinic? *Frontiers in oncology* 5, 22.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (1998). DNA METHYLATION IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 223-247.
- Finnegan, E.J., and Kovac, K.A. (2000). Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 43, 189-201.
- Ford, C.E., Qian Ma, S.S., Quadir, A., and Ward, R.L. (2013). The dual role of the novel Wnt receptor tyrosine kinase, ROR2, in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 133, 779-787.

- Garcia-Bloj, B., Moses, C., Sgro, A., Plani-Lam, J., Arooj, M., Duffy, C., Thiruvengadam, S., Sorolla, A., Rashwan, R., Mancera, R.L., *et al.* (2016). Waking up dormant tumor suppressor genes with zinc fingers, TALEs and the CRISPR/dCas9 system. *Oncotarget* 7, 60535-60554.
- Garneau, J.E., Dupuis, M.E., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadan, A.H., and Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468, 67-71.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B., and Fischer, R.L. (2006). DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124, 495-506.
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., *et al.* (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442-451.
- Gimenez, C.A., Ielpi, M., Mutto, A., Grosebacher, L., Argibay, P., and Pereyra-Bonnet, F. (2016). CRISPR-on system for the activation of the endogenous human INS gene. *Gene Ther* 23, 543-547.
- Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74, 481-514.
- Golovko, D., Kedrin, D., Yilmaz, O.H., and Roper, J. (2015). Colorectal cancer models for novel drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* 10, 1217-1229.
- Gong, Z.H., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L., and Zhu, J.K. (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111, 803-814.
- Graslund, T., Li, X., Magnenat, L., Popkov, M., and Barbas, C.F., 3rd (2005). Exploring strategies for the design of artificial transcription factors: targeting sites proximal to known regulatory regions for the induction of gamma-globin expression and the treatment of sickle cell disease. *J Biol Chem* 280, 3707-3714.
- Grem, J.L., and Fischer, P.H. (1989). Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipiridamole. *Pharmacol Ther* 40, 349-371.
- Groner, A.C., Tschopp, P., Challet, L., Dietrich, J.E., Verp, S., Offner, S., Barde, I., Rodriguez, I., Hiiragi, T., and Trono, D. (2012). The Kruppel-associated box repressor domain can induce reversible heterochromatinization of a mouse locus in vivo. *J Biol Chem* 287, 25361-25369.
- Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F., and Nelson, K.E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1, e60.
- Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A.K., Chang, Y., Howerton, S.B., Vertino, P.M., Zhang, X., and Cheng, X. (2012). Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res* 40, 4841-4849.
- He, X.J., Chen, T.P., and Zhu, J.K. (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res* 21, 442-465.
- Hemberger, M., Dean, W., and Reik, W. (2009). Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 526-537.

- Henderson, I.R., and Jacobsen, S.E. (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447, 418-424.
- Hilton, I.B., D'Ippolito, A.M., Vockley, C.M., Thakore, P.I., Crawford, G.E., Reddy, T.E., and Gersbach, C.A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* 33, 510-U225.
- Holliday, R. (2005). DNA methylation and epigenotypes. *Biochemistry (Mosc)* 70, 500-504.
- Hsieh, C.L. (1994). Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 14, 5487-5494.
- Hsieh, T.F., and Fischer, R.L. (2005). Biology of chromatin dynamics. *Annu Rev Plant Biol* 56, 327-351.
- Hsieh, T.F., Ibarra, C.A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R.L., and Zilberman, D. (2009). Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. *Science* 324, 1451-1454.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, 1262-1278.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., *et al.* (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31, 827-832.
- Issa, J.P., and Kantarjian, H.M. (2009). Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res* 15, 3938-3946.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* 333, 1300-1303.
- Jacobsen, S.E., and Meyerowitz, E.M. (1997). Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in arabidopsis. *Science* 277, 1100-1103.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 245-254.
- Jang, C.W., Shibata, Y., Starmer, J., Yee, D., and Magnuson, T. (2015). Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development. *Genes Dev* 29, 1377-1392.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Jeronimo, C., Henrique, R., Hoque, M.O., Ribeiro, F.R., Oliveira, J., Fonseca, D., Teixeira, M.R., Lopes, C., and Sidransky, D. (2004). Quantitative RARbeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. *Clin Cancer Res* 10, 4010-4014.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816-821.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.

- Jullien, P.E., Kinoshita, T., Ohad, N., and Berger, F. (2006). Maintenance of DNA methylation during the Arabidopsis life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell* 18, 1360-1372.
- Jurkowski, T.P., Ravichandran, M., and Stepper, P. (2015). Synthetic epigenetics-towards intelligent control of epigenetic states and cell identity. *Clin Epigenetics* 7, 18.
- Kapoor, A., Agius, F., and Zhu, H.K. (2005). Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett* 579, 5889-5898.
- Kass, S.U., Landsberger, N., and Wolffe, A.P. (1997). DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 7, 157-165.
- Kearns, N.A., Pham, H., Tabak, B., Genga, R.M., Silverstein, N.J., Garber, M., and Maehr, R. (2015). Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat Methods* 12, 401-403.
- Keller, T.E., Han, P., and Yi, S.V. (2016). Evolutionary Transition of Promoter and Gene Body DNA Methylation across Invertebrate-Vertebrate Boundary. *Mol Biol Evol* 33, 1019-1028.
- Kelly, T.K., De Carvalho, D.D., and Jones, P.A. (2010). Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* 28, 1069-1078.
- Kim, H.J., Lee, H.J., Kim, H., Cho, S.W., and Kim, J.S. (2009). Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res* 19, 1279-1288.
- Kinoshita, T., Miura, A., Choi, Y.H., Kinoshita, Y., Cao, X.F., Jacobsen, S.E., Fischer, R.L., and Kakutani, T. (2004). One-way control of FWA imprinting in Arabidopsis endosperm by DNA methylation. *Science* 303, 521-523.
- Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31, 89-97.
- Konermann, S., Brigham, M.D., Trevino, A.E., Joung, J., Abudayyeh, O.O., Barcena, C., Hsu, P.D., Habib, N., Gootenberg, J.S., Nishimasu, H., *et al.* (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 517, 583-588.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kraus, W.L., and Lis, J.T. (2003). PARP goes transcription. *Cell* 113, 677-683.
- Kress, C., Thomassin, H., and Grange, T. (2001). Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett* 494, 135-140.
- Kronfol, M.M., Dozmorov, M.G., Huang, R., Slattum, P.W., and McClay, J.L. (2017). The role of epigenomics in personalized medicine. *Expert review of precision medicine and drug development* 2, 33-45.
- Lara, E., Calvanese, V., Huidobro, C., Fernandez, A.F., Moncada-Pazos, A., Obaya, A.J., Aguilera, O., Gonzalez-Sancho, J.M., Sanchez, L., Astudillo, A., *et al.* (2010). Epigenetic repression of ROR2 has a Wnt-mediated, pro-tumourigenic role in colon cancer. *Mol Cancer* 9, 170.
- Lau, C.H., and Suh, Y. (2017). Genome and Epigenome Editing in Mechanistic Studies of Human Aging and Aging-Related Disease. *Gerontology* 63, 103-117.

- Lau, C.H., and Suh, Y. (2018). In vivo epigenome editing and transcriptional modulation using CRISPR technology. *Transgenic Res* 27, 489-509.
- Laufer, B.I., and Singh, S.M. (2015). Strategies for precision modulation of gene expression by epigenome editing: an overview. *Epigenetics Chromatin* 8, 34.
- Lei, Y., Zhang, X., Su, J., Jeong, M., Gundry, M.C., Huang, Y.-H., Zhou, Y., Li, W., and Goodell, M.A. (2017). Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein. *Nat Commun* 8, 16026.
- Li, J., Liang, W., Li, Y., and Qian, W. (2018). APURINIC/APYRIMIDINIC ENDONUCLEASE2 and ZINC FINGER DNA 3'-PHOSPHOESTERASE Play Overlapping Roles in the Maintenance of Epigenome and Genome Stability. *Plant Cell* 30, 1954-1970.
- Li, J., Ying, J., Fan, Y., Wu, L., Ying, Y., Chan, A.T., Srivastava, G., and Tao, Q. (2010). WNT5A antagonizes WNT/beta-catenin signaling and is frequently silenced by promoter CpG methylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer biology & therapy* 10, 617-624.
- Li, Y., Cordoba-Canero, D., Qian, W., Zhu, X., Tang, K., Zhang, H., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., and Zhu, J.K. (2015). An AP endonuclease functions in active DNA demethylation and gene imprinting in Arabidopsis [corrected]. *Plos Genet* 11, e1004905.
- Li, Z., Gu, T.P., Weber, A.R., Shen, J.Z., Li, B.Z., Xie, Z.G., Yin, R., Guo, F., Liu, X., Tang, F., *et al.* (2015). Gadd45a promotes DNA demethylation through TDG. *Nucleic Acids Res* 43, 3986-3997.
- Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S., and Jacobsen, S.E. (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292, 2077-2080.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., *et al.* (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322.
- Liu, X.S., Wu, H., Ji, X., Stelzer, Y., Wu, X., Czauderna, S., Shu, J., Dadon, D., Young, R.A., and Jaenisch, R. (2016). Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell* 167, 233-247 e217.
- Liu, X.S., Wu, H., Krzisch, M., Wu, X., Graef, J., Muffat, J., Hnisz, D., Li, C.H., Yuan, B., Xu, C., *et al.* (2018). Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene. *Cell* 172, 979-992 e976.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3, 330-338.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Ma, S., Chang, J., Wang, X., Liu, Y., Zhang, J., Lu, W., Gao, J., Shi, R., Zhao, P., and Xia, Q. (2014). CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of BmKu70 in *Bombyx mori*. *Sci Rep* 4, 4489.

- Maeder, M.L., Linder, S.J., Cascio, V.M., Fu, Y., Ho, Q.H., and Joung, J.K. (2013a). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods* *10*, 977-979.
- Maeder, M.L., Linder, S.J., Reyon, D., Angstman, J.F., Fu, Y., Sander, J.D., and Joung, J.K. (2013b). Robust, synergistic regulation of human gene expression using TALE activators. *Nat Methods* *10*, 243-245.
- Maeder, M. L., Angstman, J. F., Richardson, M. E., Linder, S. J., Cascio, V. M., Tsai, S. Q., Ho, Q. H., Sander, J. D., Reyon, D., Bernstein, B. E., *et al.* (2013c). Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nat Biotechnol* *31*, 1137-1142.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Grishin, N.V., Rogozin, I.B., and Koonin, E.V. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res* *30*, 482-496.
- Mali, P., Esvelt, K.M., and Church, G.M. (2013a). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* *10*, 957-963.
- Mali, P., Yang, L.H., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013b). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* *339*, 823-826.
- Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* *10*, 882-891.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* *7*, 2902-2906.
- Martinez-Macias, M.I., Cordoba-Canero, D., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2013). The DNA Repair Protein XRCC1 Functions in the Plant DNA Demethylation Pathway by Stimulating Cytosine Methylation (5-meC) Excision, Gap Tailoring, and DNA Ligation. *Journal of Biological Chemistry* *288*, 5496-5505.
- Martinez-Macias, M.I., Qian, W., Miki, D., Pontes, O., Liu, Y., Tang, K., Liu, R., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., *et al.* (2012). A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in Arabidopsis. *Mol Cell* *45*, 357-370.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., and Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* *403*, 501-502.
- McCaffrey, J., Sibert, J., Zhang, B., Zhang, Y., Hu, W., Riethman, H., and Xiao, M. (2016). CRISPR-CAS9 D10A nickase target-specific fluorescent labeling of double strand DNA for whole genome mapping and structural variation analysis. *Nucleic Acids Res* *44*, e11.
- McDonald, J.I., Celik, H., Rois, L.E., Fishberger, G., Fowler, T., Rees, R., Kramer, A., Martens, A., Edwards, J.R., and Challen, G.A. (2016). Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation. *Biol Open* *5*, 866-874.
- Memedula, S., and Belmont, A.S. (2003). Sequential recruitment of HAT and SWI/SNF components to condensed chromatin by VP16. *Curr Biol* *13*, 241-246.

- Mendenhall, E.M., Williamson, K.E., Reyon, D., Zou, J.Y., Ram, O., Joung, J.K., and Bernstein, B.E. (2013). Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nat Biotechnol* *31*, 1133-1136.
- Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B., and Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* *1*, 686-692.
- Miller, J., McLachlan, A.D., and Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J* *4*, 1609-1614.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., *et al.* (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* *29*, 143-148.
- Miranda, T.B., and Jones, P.A. (2007). DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* *213*, 384-390.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagai, K., Hoshino, H., Mimori, K., Tanaka, F., Nagano, H., Sekimoto, M., Doki, Y., and Mori, M. (2010). Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 40-45.
- Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., and Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* *60*, 174-182.
- Mol, C.D., Arvai, A.S., Begley, T.J., Cunningham, R.P., and Tainer, J.A. (2002). Structure and activity of a thermostable thymine-DNA glycosylase: evidence for base twisting to remove mismatched normal DNA bases. *J Mol Biol* *315*, 373-384.
- Morales-Ruiz, T., Garcia-Ortiz, M.V., Devesa-Guerra, I., Raya-Ruiz, L., Tejedor, J.R., Bayon, G.F., Sierra, M.I., Fraga, M.F., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2018). DNA methylation reprogramming of human cancer cells by expression of a plant 5-methylcytosine DNA glycosylase. *Epigenetics* *13*, 95-107.
- Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A.P., Ponferrada-Marin, M.I., Martinez-Macias, M.I., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2006). DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 6853-6858.
- Morita, R., Hirohashi, Y., Suzuki, H., Takahashi, A., Tamura, Y., Kanaseki, T., Asanuma, H., Inoda, S., Kondo, T., Hashino, S., *et al.* (2013). DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. *Experimental and molecular pathology* *94*, 322-329.
- Morita, S., Noguchi, H., Horii, T., Nakabayashi, K., Kimura, M., Okamura, K., Sakai, A., Nakashitna, H., Hata, K., Nakashima, K., *et al.* (2016). Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol* *34*, 1060-1065.
- Morton, C.L., and Houghton, P.J. (2007). Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* *2*, 247-250.
- Moscou, M.J., and Bogdanove, A.J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* *326*, 1501.

- Muller, U., Bauer, C., Siegl, M., Rottach, A., and Leonhardt, H. (2014). TET-mediated oxidation of methylcytosine causes TDG or NEIL glycosylase dependent gene reactivation. *Nucleic Acids Res* 42, 8592-8604.
- Mussolino, C., and Cathomen, T. (2012). TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr Opin Biotechnol* 23, 644-650.
- Nakao, M. (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278, 25-31.
- Nambu, S., Inoue, K., and Sasaki, H. (1987). Site-specific hypomethylation of the c-myc oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 78, 695-704.
- Nash, H.M., Bruner, S.D., Scharer, O.D., Kawate, T., Addona, T.A., Spooner, E., Lane, W.S., and Verdine, G.L. (1996). Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 6, 968-980.
- Nasu, K., Kawano, Y., Tsukamoto, Y., Takano, M., Takai, N., Li, H., Furukawa, Y., Abe, W., Moriyama, M., and Narahara, H. (2011). Aberrant DNA methylation status of endometriosis: epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target. *J Obstet Gynaecol Res* 37, 683-695.
- Neri, F., Dettori, D., Incarnato, D., Krepelova, A., Rapelli, S., Maldotti, M., Parlato, C., Paliogiannis, P., and Oliviero, S. (2015). TET1 is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the WNT pathway. *Oncogene* 34, 4168-4176.
- Ooi, S.K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.P., Allis, C.D., *et al.* (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448, 714-717.
- Ortega-Galisteo, A.P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2008). Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol* 67, 671-681.
- Oudet, P., Grossbellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron-Microscopic and Biochemical Evidence That Chromatin Structure Is a Repeating Unit. *Cell* 4, 281-300.
- Ozenne, P., Eymin, B., Brambilla, E., and Gazzeri, S. (2010). The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer* 127, 2239-2247.
- Papworth, M., Kolasinska, P., and Minczuk, M. (2006). Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene* 366, 27-38.
- Parrilla-Doblas, J.T., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2017). Targeted DNA demethylation in human cells by fusion of a plant 5-methylcytosine DNA glycosylase to a sequence-specific DNA binding domain. *Epigenetics* 12, 296-303.
- Parrilla Doblas, J.T. (2016). Desmetilación del DNA por escisión de 5-metilcitosina. Bases moleculares y potenciales aplicaciones. In Departamento de Genética (Universidad de Córdoba).
- Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252, 809-817.
- Pearson, R.C., Funnell, A.P., and Crossley, M. (2011). The mammalian zinc finger transcription factor Kruppel-like factor 3 (KLF3/BKLF). *IUBMB life* 63, 86-93.

- Pennisi, E. (2013). The CRISPR Craze. *Science* *341*, 833-836.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S., and Fischer, R.L. (2007). DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 6752-6757.
- Perez-Pinera, P., Kocak, D.D., Vockley, C.M., Adler, A.F., Kabadi, A.M., Polstein, L.R., Thakore, P.I., Glass, K.A., Ousterout, D.G., Leong, K.W., *et al.* (2013a). RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods* *10*, 973-976.
- Perez-Pinera, P., Ousterout, D.G., Brunger, J.M., Farin, A.M., Glass, K.A., Guilak, F., Crawford, G.E., Hartemink, A.J., and Gersbach, C.A. (2013b). Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors. *Nat Methods* *10*, 239-242.
- Pierce, B.A. (2005). *Genetics: A Conceptual Approach*. W H FREEMAN, 715.
- Ponferrada-Marin, M.I., Martinez-Macias, M.I., Morales-Ruiz, T., Roldan-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2010). Methylation-independent DNA Binding Modulates Specificity of Repressor of Silencing 1 (ROS1) and Facilitates Demethylation in Long Substrates. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 23030-23037.
- Ponferrada-Marin, M.I., Parrilla-Doblas, J.T., Roldan-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2011). A discontinuous DNA glycosylase domain in a family of enzymes that excise 5-methylcytosine. *Nucleic Acids Res* *39*, 1473-1484.
- Puchta, H. (2017). Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Curr Opin Plant Biol* *36*, 1-8.
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., and Lim, W.A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* *152*, 1173-1183.
- Ramchandani, S., Bhattacharya, S.K., Cervoni, N., and Szyf, M. (1999). DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6107-6112.
- Ramirez, C.L., Foley, J.E., Wright, D.A., Muller-Lerch, F., Rahman, S.H., Cornu, T.I., Winfrey, R.J., Sander, J.D., Fu, F., Townsend, J.A., *et al.* (2008). Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods* *5*, 374-375.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* *8*, 2281-2308.
- Rao, S., Chiu, T.-P., Kribelbauer, J.F., Mann, R.S., Bussemaker, H.J., and Rohs, R. (2018). Systematic prediction of DNA shape changes due to CpG methylation explains epigenetic effects on protein-DNA binding. *Epigenetics Chromatin* *11*, 6.
- Ratnakumar, K., Duarte, L.F., LeRoy, G., Hasson, D., Smeets, D., Vardabasso, C., Bonisch, C., Zeng, T., Xiang, B., Zhang, D.Y., *et al.* (2012). ATRX-mediated chromatin association of histone variant macroH2A1 regulates alpha-globin expression. *Genes Dev* *26*, 433-438.
- Rayess, H., Wang, M.B., and Srivatsan, E.S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer* *130*, 1715-1725.
- Reik, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* *447*, 425-432.

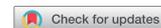
- Richards, E.J., and Elgin, S.C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489-500.
- Robertson, K.D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6, 597-610.
- Roldan-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res-Rev Mutat* 681, 169-179.
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., and Riggs, A.D. (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Saksouk, N., Simboeck, E., and Dejardin, J. (2015). Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* 8, 3.
- Sandoval, J., and Esteller, M. (2012). Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev* 22, 50-55.
- Sasaki, H., and Matsui, Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 9, 129-140.
- Saze, H., Mittelsten Scheid, O., and Paszkowski, J. (2003). Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet* 34, 65-69.
- Scholze, H., and Boch, J. (2011). TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current opinion in microbiology* 14, 47-53.
- Selker, E.U. (1998). Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9430-9435.
- Shaheen, S., Ahmed, M., Lorenzi, F., and Nateri, A.S. (2016). Spheroid-Formation (Colonosphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem cell reviews* 12, 492-499.
- Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Pahwa, A., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2011). A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat Struct Mol Biol* 19, 25-30.
- Stepper, P., Kungulovski, G., Jurkowska, R.Z., Chandra, T., Krueger, F., Reinhardt, R., Reik, W., Jeltsch, A., and Jurkowski, T.P. (2017). Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 45, 1703-1713.
- Surani, M.A., Hayashi, K., and Hajkova, P. (2007). Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 128, 747-762.
- Swamynathan, S.K. (2010). Kruppel-like factors: three fingers in control. *Human genomics* 4, 263-270.
- Zyfl, M., Eliasson, L., Mann, V., Klein, G., and Razin, A. (1985). Cellular and viral DNA hypomethylation associated with induction of Epstein-Barr virus lytic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8090-8094.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., *et al.* (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.

- Takara, K., Fujita, M., Minegaki, T., Yamamoto, K., Takahashi, M., Yokoyama, T., and Okumura, K. (2012). Treatment schedule-dependent effect of 5-fluorouracil and platinum derivatives in colorectal cancer cells. *Eur J Pharm Sci* *45*, 272-281.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2017). Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* *18*, 115-126.
- Tamaru, H., and Selker, E.U. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* *414*, 277-283.
- Tariq, M., and Paszkowski, J. (2004). DNA and histone methylation in plants. *Trends in genetics* : TIG *20*, 244-251.
- Teperek-Tkacz, M., Pasque, V., Gentsch, G., and Ferguson-Smith, A.C. (2011). Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction* *142*, 621-632.
- Thakore, P.I., D'Ippolito, A.M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N.K., Kabadi, A.M., Reddy, T.E., Crawford, G.E., and Gersbach, C.A. (2015). Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods* *12*, 1143-1149.
- Todd, R.C., and Lippard, S.J. (2009). Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* *1*, 280-291.
- Verma, M., Maruvada, P., and Srivastava, S. (2004). Epigenetics and cancer. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* *41*, 585-607.
- Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* *469*, 314-322.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* *10*, 717-728.
- Vojta, A., Dobrinic, P., Tadic, V., Bockor, L., Korac, P., Julg, B., Klasic, M., and Zoldos, V. (2016). Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res* *44*, 5615-5628.
- Vorce, R.L., and Goodman, J.I. (1989). Altered methylation of ras oncogenes in benzidine-induced B6C3F1 mouse liver tumors. *Toxicol Appl Pharmacol* *100*, 398-410.
- Wang, R.Y., Gehrke, C.W., and Ehrlich, M. (1980). Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* *8*, 4777-4790.
- Wang, S.P., Tang, Z., Chen, C.W., Shimada, M., Koche, R.P., Wang, L.H., Nakadai, T., Chramiec, A., Krivtsov, A.V., Armstrong, S.A., *et al.* (2017). A UTX-MLL4-p300 Transcriptional Regulatory Network Coordinately Shapes Active Enhancer Landscapes for Eliciting Transcription. *Mol Cell* *67*, 308-321 e306.
- Wolfe, S.A., Nekludova, L., and Pabo, C.O. (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* *29*, 183-212.
- Wolffe, A.P., and Matzke, M.A. (1999). Epigenetics: Regulation through repression. *Science* *286*, 481-486.

- Wu, S.C., and Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome (vol 11, pg 607, 2010). *Nat Rev Mol Cell Bio* 11.
- Wu, X., Scott, D.A., Kriz, A.J., Chiu, A.C., Hsu, P.D., Dadon, D.B., Cheng, A.W., Trevino, A.E., Konermann, S., Chen, S., *et al.* (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 32, 670-676.
- Wu, X., and Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet* 18, 517-534.
- Xiong, T., Meister, G.E., Workman, R.E., Kato, N.C., Spellberg, M.J., Turker, F., Timp, W., Ostermeier, M., and Novina, C.D. (2017). Targeted DNA methylation in human cells using engineered dCas9-methyltransferases. *Sci Rep* 7, 6732.
- Xu, G.L., and Walsh, C.P. (2014). Enzymatic DNA oxidation: mechanisms and biological significance. *BMB reports* 47, 609-618.
- Xu, X., Tao, Y., Gao, X., Zhang, L., Li, X., Zou, W., Ruan, K., Wang, F., Xu, G.L., and Hu, R. (2016). A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discov* 2, 16009.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P., and Bestor, T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13, 335-340.
- Youngson, N.A., and Whitelaw, E. (2008). Transgenerational epigenetic effects. *Annual review of genomics and human genetics* 9, 233-257.
- Yung, P.Y.K., and Elsasser, S.J. (2017). Evolution of epigenetic chromatin states. *Curr Opin Chem Biol* 41, 36-42.
- Zalatan, J.G., Lee, M.E., Almeida, R., Gilbert, L.A., Whitehead, E.H., La Russa, M., Tsai, J.C., Weissman, J.S., Dueber, J.E., Qi, L.S., *et al.* (2015). Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell* 160, 339-350.
- Zhang, H., and Zhu, J.K. (2012). Active DNA demethylation in plants and animals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 77, 161-173.
- Zhang, W., Xu, C., Bian, C., Tempel, W., Crombet, L., MacKenzie, F., Min, J., Liu, Z., and Qi, C. (2011). Crystal structure of the Cys2His2-type zinc finger domain of human DPF2. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 58-61.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., *et al.* (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell* 126, 1189-1201.
- Zheng, X.W., Pontes, O., Zhu, J.H., Miki, D., Zhang, F., Li, W.X., Iida, K., Kapoor, A., Pikaard, C.S., and Zhu, J.K. (2008). ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in Arabidopsis. *Nature* 455, 1259-U1270.
- Zhu, J.H., Kapoor, A., Sridhar, V.V., Agius, F., and Zhu, J.K. (2007). The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in Arabidopsis. *Current Biology* 17, 54-59.
- Zhu, J.K. (2009). Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* 43, 143-166.

ANEXOS

RESEARCH PAPER



DNA methylation reprogramming of human cancer cells by expression of a plant 5-methylcytosine DNA glycosylase

Teresa Morales-Ruiz ^{a,b,c,f}, María Victoria García-Ortiz ^{a,b,c,f}, Iván Devesa-Guerra ^{a,b,c}, Laura Raya-Ruiz^{a,b,c}, Juan R. Tejedor ^d, Gustavo F. Bayón ^d, Marta I. Sierra^d, Mario F. Fraga ^{d,e}, Rafael R. Ariza ^{a,b,c} and Teresa Roldán-Arjona ^{a,b,c}

^aMaimónides Biomedical Research Institute of Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain; ^bDepartment of Genetics, University of Córdoba, Córdoba, Spain; ^cReina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain; ^dCancer Epigenetics Laboratory, Institute of Oncology of Asturias (IUOPA), HUCA, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain; ^eNanomaterials and Nanotechnology Research Center (CINN-CSIC)-Universidad de Oviedo-Principado de Asturias, Spain

ABSTRACT

Patterns of DNA methylation, an important epigenetic modification involved in gene silencing and development, are disrupted in cancer cells. Understanding the functional significance of aberrant methylation in tumors remains challenging, due in part to the lack of suitable tools to actively modify methylation patterns. DNA demethylation caused by mammalian DNA methyltransferase inhibitors is transient and replication-dependent, whereas that induced by TET enzymes involves oxidized 5mC derivatives that perform poorly understood regulatory functions. Unlike animals, plants possess enzymes that directly excise unoxidized 5mC from DNA, allowing restoration of unmethylated C through base excision repair. Here, we show that expression of *Arabidopsis* 5mC DNA glycosylase DEMETER (DME) in colon cancer cells demethylates and reactivates hypermethylated silenced loci. Interestingly, DME expression causes genome-wide changes that include both DNA methylation losses and gains, and partially restores the methylation pattern observed in normal tissue. Furthermore, such methylome reprogramming is accompanied by altered cell cycle responses and increased sensibility to anti-tumor drugs, decreased ability to form colonospheres, and tumor growth impairment *in vivo*. Our study shows that it is possible to reprogram a human cancer DNA methylome by expression of a plant DNA demethylase.

ARTICLE HISTORY

Received 11 October 2017
Revised 24 November 2017
Accepted 29 November 2017

KEYWORDS

Epigenetics; colon cancer; DNA methylation; DNA demethylation; base excision repair

Introduction

DNA methylation at the C5 position of cytosine (5-methylcytosine, 5mC) is an epigenetic mark with important roles in embryonic development, X-chromosome inactivation, imprinting, and control of transposon activity [1,2]. Altered methylation patterns are common in a growing number of human diseases, including disorders of the immune system [3] and cancer [4]. Tumor cells display local hypermethylation of gene promoters and global hypomethylation of gene-poor regions and repetitive sequences [5]. It has been proposed that the former leads to transcriptional silencing of tumor suppressor genes, whereas the latter contributes to genome instability [6,7]. However, elucidation of the functional significance of aberrant DNA methylation in cancer and its causal relationship to tumorigenesis remains difficult, due in part to the lack of appropriate tools to actively modify methylation patterns in human cells.

DNA hypermethylation in cancer cells may be reversed by DNA methyltransferase inhibitors, such 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azaCdR), that cause passive genome-wide DNA demethylation and have antitumoral properties *in vivo* [8]. However, demethylation is followed by re-methylation after drug withdrawal [9], which limits their usefulness for functional studies.

An alternative option is the use of enzymes involved in DNA demethylation. The ten-eleven translocation (TET) proteins TET1, TET2, and TET3 are alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases that catalyze conversion of 5mC to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC), and 5-carboxylcytosine (5caC) by consecutive oxidation reactions [10,11]. TET proteins have been proposed as promising candidates for mediating DNA demethylation in mammalian cells either via passive dilution, since 5hmC prevents maintenance DNA methylation, or in an active pathway, because 5fC and 5caC are substrates of the thymine DNA glycosylase (TDG) that initiates a base excision repair (BER) that would replace them with unmethylated cytosines [12–14]. However, some oxidized derivatives of 5mC have been found to be stable and recognized by specific readers [15], and accumulating evidence suggests that they perform specific regulatory functions [16,17]. Therefore, the use of TET proteins for functional studies on the role of aberrant DNA methylation in cancer remains problematic.

DNA demethylation mechanisms have independently evolved in plants and animals. In plants, a family of 5mC DNA glycosylases directly excise unoxidized 5mC, initiating restoration of unmethylated C through BER [18–20]. These

CONTACT Teresa Roldán-Arjona  ge2roarm@uco.es  Department of Genetics, Edif. Gregor Mendel, Campus de Rabanales, University of Córdoba, 14071-Córdoba, Spain.

^fThese authors contributed equally to this work as first authors

 Supporting Information accompanies this paper on the Epigenetics website  <http://www.tandfonline.com/loi/kepi20/>.

enzymes, with no counterparts in animal cells, are typified by *Arabidopsis thaliana* DEMETER (DME) and its paralogs REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) and DEMETER-LIKE 2 and 3 (DML2 and DML3) [20–23]. We have recently shown that a fusion protein containing the catalytic domain of ROS1 and the DNA binding domain of yeast GAL4 specifically demethylates and reactivates a methylation-silenced reporter gene in human cells [24]. Here, we show that overexpression of DME in human colorectal cancer (CRC) DLD-1 cells causes genome-wide DNA methylation changes, including both gains and losses, that partially revert aberrant methylation to normal levels. Furthermore, the DNA methylome reprogramming induced by DME is accompanied by altered cell-cycle responses and enhanced sensitivity to chemotherapeutic agents *in vitro* and reduced tumorigenesis *in vivo*.

Results

Expression of DME in DLD-1 cells demethylates and reactivates hypermethylated silenced loci

We stably transfected DLD-1 cells with the pcDNA3.1 vector either containing a wild type DME cDNA or a mutant version (D1562A) encoding a catalytically inactive enzyme [20]. Following transfection, G418-resistant transfectants were selected. Stable transfectants containing the empty vector were also obtained. DME expression was detected by RT-PCR and protein expression was confirmed by western blot using nuclear extracts (Fig. S1).

We first used bisulfite pyrosequencing and bisulfite sequencing of multiple clones to examine the methylation status of three loci reported to be hypermethylated in DLD-1 cells: *ROR2* [25], *p14* [26], and *p16* [27]. Bisulfite pyrosequencing revealed that methylation at promoters of *ROR2* and *p14* in cells expressing active DME was reduced to nearly undetectable levels, whereas demethylation of the *p16* promoter was about 50 percent (Fig. 1A–B). Bisulfite sequencing of multiple clones confirmed that hypermethylation of *ROR2* promoter was virtually abolished by DME expression, and that demethylation at *p14* and *p16* was partially extended to gene body regions (Fig. S2). We next tested whether DNA demethylation was accompanied by gene reactivation. We re-analyzed the methylation status of *ROR2*, *p14*, and *p16* by quantitative methylation-specific PCR (qMSP) analysis and, in parallel, we measured their expression levels by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The three genes were reactivated in cells expressing DME, but not in non-transfected cells or in control transfectants with the mutant version or the empty vector (Fig. 1C–D). DNA demethylation and transcriptional activation induced by DME expression are either comparable or stronger than those achieved by treatment with 5-aza-CdR (Fig. S3). However, whereas 5-aza-CdR-induced demethylation is transient, DME-induced demethylation is stable over time (Fig. S4). All together, these results indicate that expression of DME in DLD-1 cells causes loss of methylation at hypermethylated silenced loci and concomitant reactivation of their expression. Furthermore, both effects are dependent on the catalytic activity of the 5mC DNA glycosylase.

DME-induced DNA demethylation is dependent upon the base excision repair pathway

We employed a methylated GFP reporter plasmid to examine whether DME-induced demethylation involves the base excision repair pathway. Cells were transfected with *SssI*-methylated or unmethylated CMV-GFP plasmid, and fluorescence was analyzed after 48 h (Fig. 2A–B). The expression of the methylated GFP reporter gene was specifically reactivated in DME-expressing cells, but not in either untransfected cells or in cells expressing a catalytically inactive version of the DNA glycosylase. Next, we analyzed the effect of two different BER inhibitors on such DME-dependent reactivation (Fig. 2C). DME is a bifunctional DNA glycosylase that generates as a final product a single-nucleotide gap flanked by 3'-phosphate and 5'-phosphate termini [20]. In mammalian cells, processing of such intermediates during BER does not require AP endonuclease activity [28] but involves PARP [29]. We found that reactivation of the silenced GFP reporter gene was significantly reduced by treatment with the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor ABT, but was not affected by the AP endonuclease inhibitor CRT (Fig. 2C). All together, these results suggest that expression of DME in DLD-1 cells initiates an active DNA demethylation process that involves the BER pathway.

Effect of DME expression on hypomethylated loci and repetitive DNA sequences

We next asked whether DME expression has any effect on hypomethylated genes. To this end, we specifically compared the effect of DME expression on three loci (*DNMT3b*, *CSF2*, and *BRD4*) that display different types of methylation changes in DLD-1 cells (Fig. 3). *DNMT3b* and *CSF2* are hypermethylated and hypomethylated, respectively, compared to normal colon cells [30,31]. *BRD4* is hypermethylated in most colon cancer cells lines, but is unmethylated in both DLD-1 and normal colon cells [32]. Bisulfite pyrosequencing confirmed that, as previously observed with *ROR2*, *p14*, and *p16*, hypermethylation of *DNMT3b* was virtually abolished in DME-expressing cells. Unexpectedly, however, both *CFS2* and *BRD4* became methylated (Fig. 3A). Analysis of mRNA levels by qRT-PCR confirmed that demethylation of *DNMT3b* was accompanied by reactivation, whereas methylation gain at *CFS2* and *BRD4* was concomitant with silencing (Fig. 3B). We also examined the effect of DME expression on three different types of DNA repetitive elements (Fig. S5). We found that DME expression caused a small, but significant, increase in DNA methylation levels at all three types of repeated sequences. All together, these results indicate that DME expression causes complex effects on the methylome of DLD-1 cells.

DME causes genome-wide DNA methylation losses and gains that partially restore normal patterns

In order to analyze the effects of DME expression on the methylome of DLD-1 cells, we performed a genome-wide DNA methylation analysis. We first examined global DNA methylation levels by UPLC-MS/MS (Table S1). The results show that there are no significant differences in 5mC global content

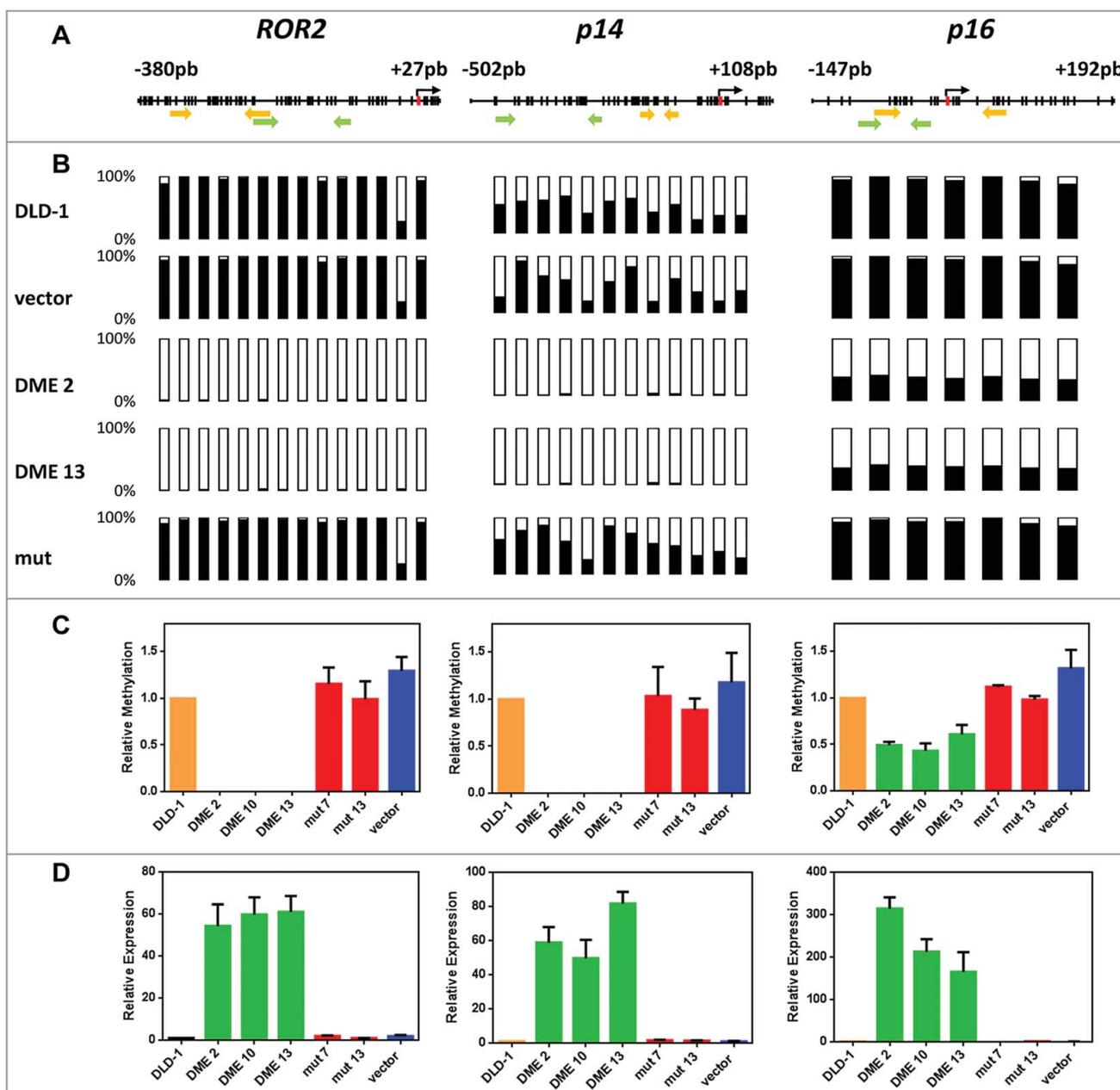


Figure 1. DNA demethylation of *ROR2*, *p14*, and *p16* in DME-expressing cells is accompanied by gene reactivation. (A) Schematic diagram of analyzed genes. Each vertical bar represents a CpG dinucleotide. Position of ATG codon is indicated as a red rectangle. Green arrows show the location of pyrosequencing primers and yellow arrows the location of qMSP primers. (B) Methylation levels analyzed by bisulfite pyrosequencing; CpG sites are shown as bars filled with black to represent percentage methylation. (C) Methylation levels analyzed by qMSP (D) Gene expression levels analyzed by qRT-PCR. Analyses were performed in non-transfected DLD-1 cells and independent transfectants expressing WT DME (DME 2, DME 10, and DME 13), a catalytically inactive mutant version (mut 7 and mut 13) or cells transfected with the empty vector. Values are shown relative to those detected in non-transfected cells. Data are the mean \pm SE of three independent experiments.

between control cells and cells expressing DME. Next, we used the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450K) array to analyze the methylation status at >480,000 CpG sites in DLD-1 cells transfected with the empty vector and cells expressing either active DME or a catalytically inactive mutant version. We found that cells expressing active DME displayed statistically significant differences in methylation levels for about 38,000 CpG sites (8% of analyzed sites), when compared either to cells transfected with the empty vector or cells expressing the mutant protein (Fig. 4A). Surprisingly, we found that expression of active DME was accompanied by both methylation gains and losses. The effect was very similar in the two

independent transfectants analyzed, which shared a high proportion (around 90%) of both hypermethylated and hypomethylated CpG sites (Table S2). These results suggest that methylation changes observed upon DME expression are not stochastic in nature and depend upon the catalytic activity of the protein.

We next examined the genomic distribution of the 35,212 CpG sites (27,175 hypermethylated and 8,037 hypomethylated relative to control samples) showing differential methylation in both transfectants expressing wild type (WT) DME when compared to cells expressing the mutant protein. Hypomethylated sites are enriched in promoters and 5UTRs (P value < 0.0001

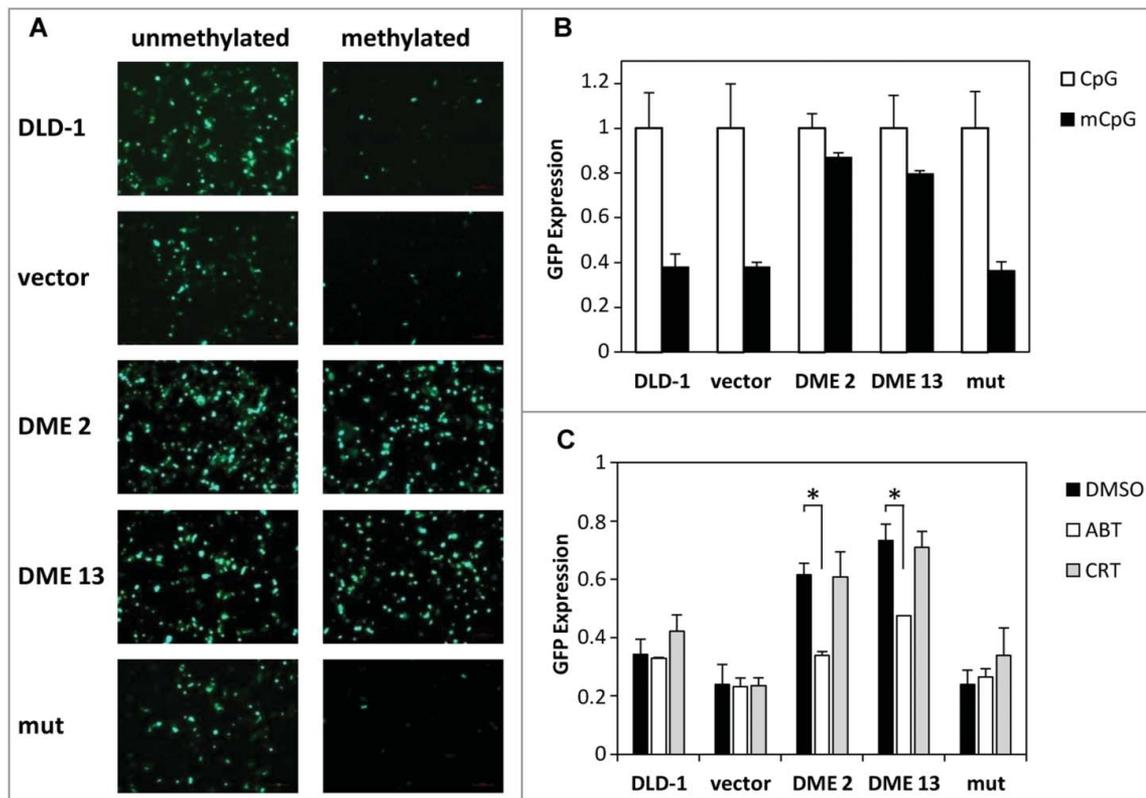


Figure 2. DME-induced DNA demethylation is dependent upon the base excision repair (BER) pathway. (A) Non transfected cells and stably transfected lines were transiently transfected with *SssI*-methylated (right) or unmethylated (left) CMV-GFP reporter plasmid. Fluorescence microscopy images were taken 48 h after transfection. (B) Flow cytometry measurements of GFP expression. Values are shown relative to those detected in cells transiently transfected with unmethylated plasmid. Data are the mean \pm SE of five independent experiments. (C) Effect of BER inhibitors on GFP reactivation. Cells transiently transfected with methylated CMV-GFP plasmid were plated either in the absence or presence of BER inhibitor (ABT or CRT; 50 mM), and GFP expression was measured after 24 h by flow cytometry. Values are shown relative to those detected in cells transiently transfected with unmethylated plasmid. Data are the mean \pm SE of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance as determined by Student's *t*-test (* $P < 0.05$).

when compared to array background), with a pronounced representation of CpG islands (CGI) in those promoter regions ($P < 0.0001$). In contrast, hypermethylated sites are enriched in intergenic regions ($P < 0.0001$) characterized by the presence of non-CGIs ($P < 0.0001$) (Fig. 4B). Very similar results were obtained when comparing DME-expressing cells with cells transfected with the empty vector (Fig. S6). We also found that, at promoters, absolute methylation change values were somewhat higher for hypomethylated sites as compared to hypermethylated regions ($P < 0.0001$). Moreover, these differences are more pronounced according to their genomic location, as significant changes are observed for hypomethylated promoters and hypomethylated 3'UTRs ($P < 0.0001$), but not between hypermethylated promoters and hypermethylated 3'UTRs (Fig. 4C).

The 35,212 CpG sites showing differential methylation upon DME expression are associated with 9,918 genes subdivided in three groups: 7,135 genes with only hypermethylated sites, 1,610 genes with only hypomethylated sites, and 1,173 genes including both hyper- and hypo-methylated sites (Fig. S7A). Interestingly, in the latter group hypomethylation preferentially occurs at promoters, 5'UTRs, and first exon, whereas hypermethylation takes place at the remaining of the gene body and 3'UTRs (Fig. 4D; Table S3). In genes only containing hyper- or hypo-methylated sites, no significant differences in absolute

methylation changes were detected across the different gene regions (Fig. S7B-C). However, in genes containing only hypomethylated sites these were enriched in proximal promoters (≤ 1 kb) and regions close to the transcription start site (TSS) (Fig. S7D-E) ($P < 0.0001$). Taken together, these results suggest that methylation gains and losses observed upon expression of DME are not randomly distributed over the genome.

A gene ontology (GO) analysis on the three gene groups showed that each one was enriched for genes involved in different cellular pathways (Fig. S8). The group of genes with both hyper- and hypo-methylated sites was enriched for genes associated with regulation of development. Although less noticeable, a similar result was found for the group of genes containing only hypomethylated sites. In contrast, the group of genes with only hypermethylated sites was enriched for genes involved in cell-cell adhesion and signaling.

Next, we performed unsupervised clustering analysis for healthy colon tissues, non-transfected DLD-1 cells, and several transfectants using the 3,000 probes with the highest variance (Fig. 4E-F). The two DLD-1 lines expressing WT DME clustered with normal tissues on the x-axis (Fig. 4E). On the y-axis, hypermethylated CpG sites that upon DME expression reverted to normal levels (cluster 1) are enriched in promoters and CGIs ($P < 0.0001$), whereas hypomethylated sites that gained methylation to reach normal levels (cluster 2) are enriched in

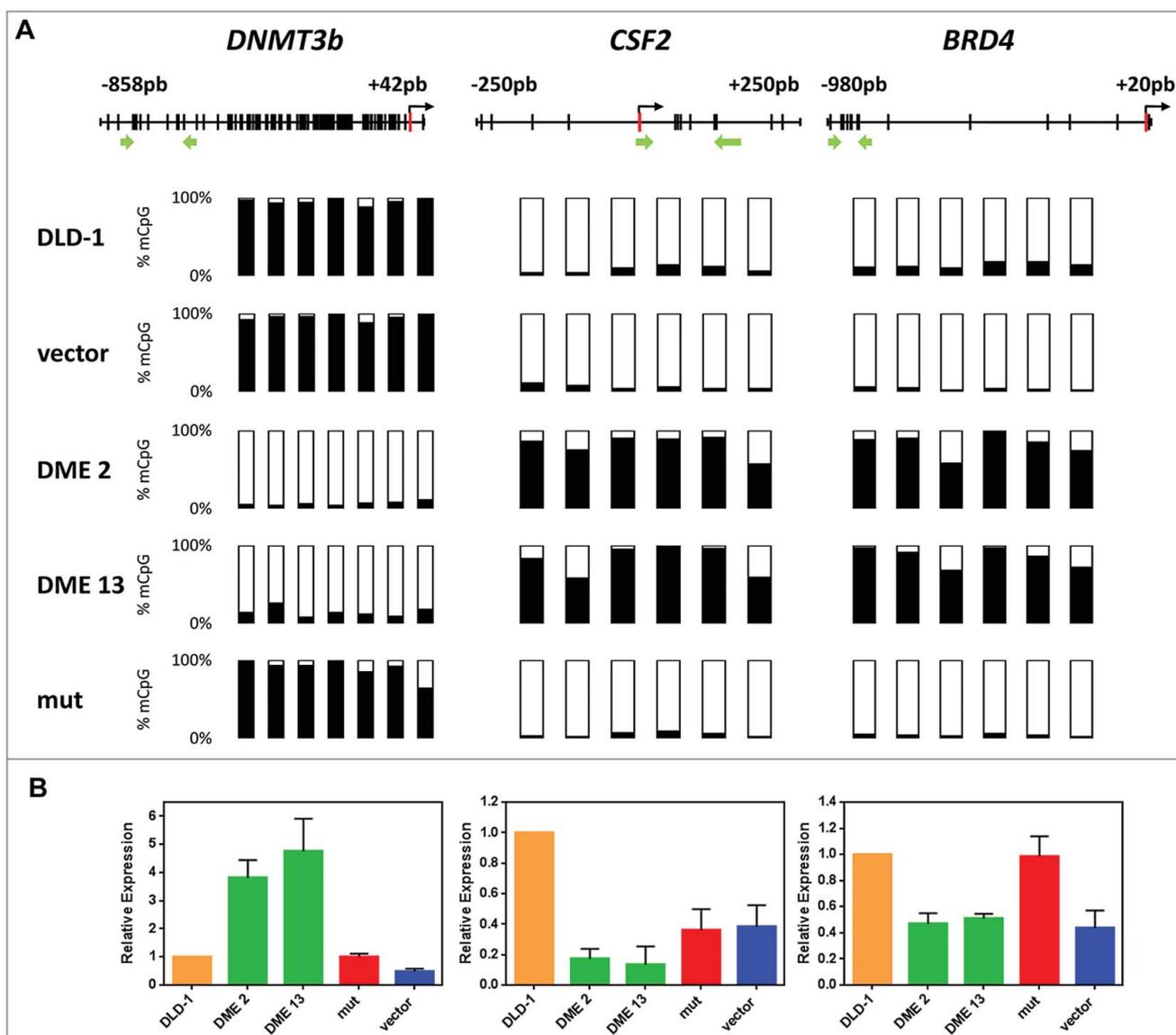


Figure 3. DME expression on three loci displays different types of methylation changes in DLD-1 cells. (A) Methylation levels analyzed by bisulfite pyrosequencing; Each vertical bar represents a CpG dinucleotide, and position of ATG codon is indicated as a red rectangle; green arrows show the location of pyrosequencing primers. Analyzed CpG sites are shown as bars filled with black to represent percentage methylation. (B) Gene expression levels analyzed by qRT-PCR. Values are shown relative to those detected in non-transfected cells. Data are the mean \pm SE of three independent experiments.

intergenic ($P < 0.05$) and intronic regions and non-CGIs ($P < 0.0001$) (Fig. 4F). Sites unmethylated in both normal tissues and DLD-1 cells but hypermethylated in DME-expressing cells (cluster 3), as well as hypermethylated sites that do not revert to normal levels upon DME expression (cluster 4) are also enriched in promoters and CGIs, although to a less extent. These results suggest that DME expression partially restores the methylation pattern observed in normal tissue.

DME expression alters the cell cycle response to anti-tumor agents

We next evaluated the effect of DME expression on the phenotype of DLD-1 cells. Measurements with the trypan blue exclusion assay showed that expression of DME increased cell proliferation *in vitro* (Fig. S9). We also analyzed the effect of DME expression on the response of DLD-1 cells to two drugs

clinically effective against colorectal cancers: oxaliplatin and 5-fluorouracil (5-FU) (Fig. 5A). Cells expressing active DME displayed increased sensitivity to both oxaliplatin and 5-FU at all concentration tested. Pre-incubation of non-transfected cells with 5-aza-CdR also increased sensitivity to oxaliplatin, although to a lesser extent than DME expression, but did not have any significant effect on the sensitivity to 5-FU.

To define the potential mechanisms underlying the sensitivity of DME-expressing cells to anti-tumor drugs, we evaluated their cell cycle profile in the absence and presence of either oxaliplatin or 5-FU (Fig. 5B). In the absence of anti-tumor drugs, no obvious differences in cell cycle phase distribution were observed between cells expressing active DME and control cells. However, significant differences were observed in drug-treated cells. Oxaliplatin induced S-phase arrest in control cells, but caused G2/M arrest in cells expressing active DME. On the other hand, exposure to 5-FU did not alter the phase

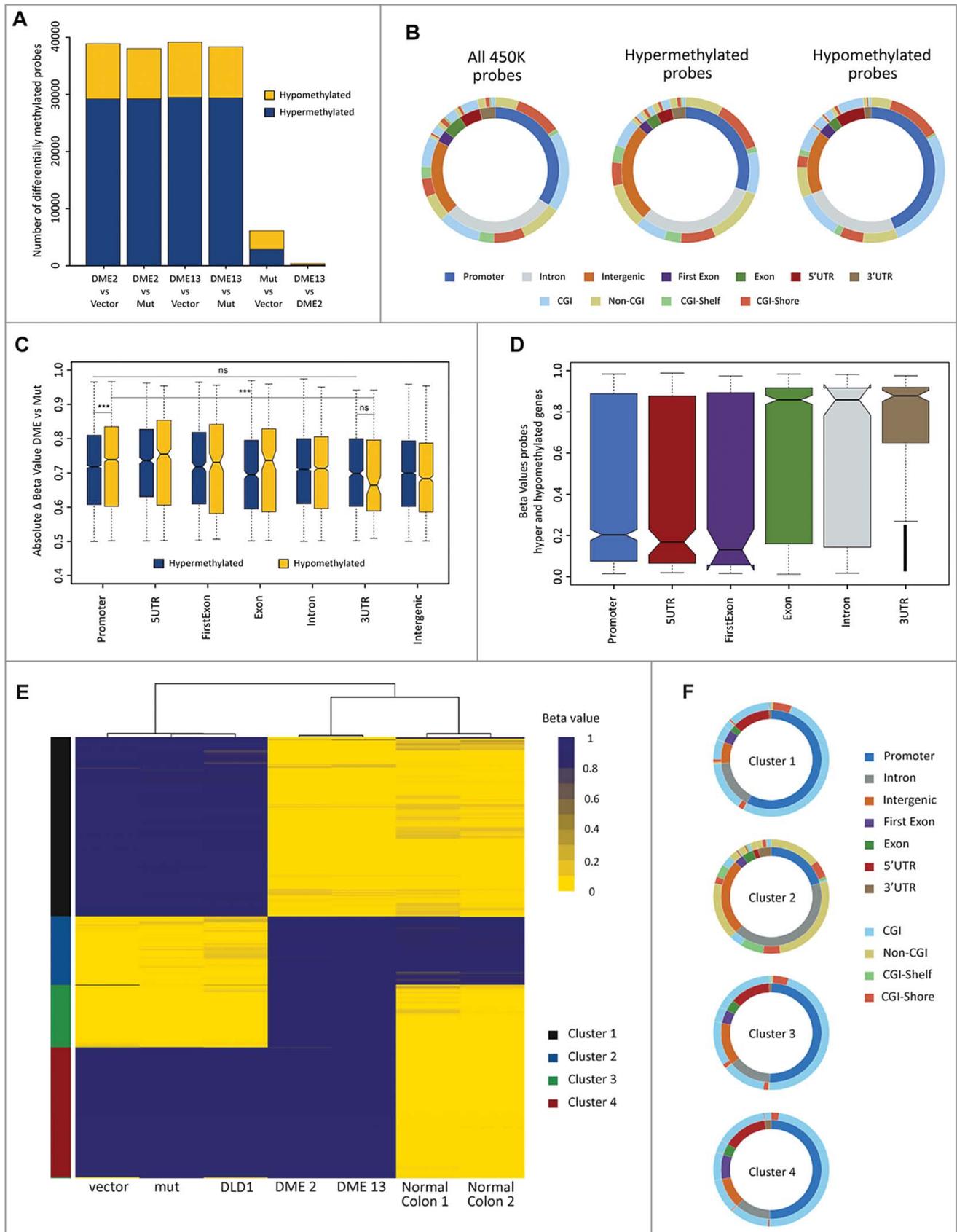


Figure 4. DME expression causes both losses and gains of DNA methylation, partially restoring the pattern of normal tissue. (A) Barplot depicting the number of CpG sites displaying differential methylation in several pairwise comparisons. Cell lines are DLD-1 cells transfected with the empty vector and transfectants expressing WT DME or a mutant version. Hyper-/hypo-methylation indicates a statistically significant methylation increase/decrease observed in the first member of each pair. (B) Distribution of differentially methylated CpG sites according to their genomic location (inner ring) and CpG class (outer ring). The left plot represents the distribution of all probes in the 450K methylation array. Center and right plots depict sites displaying hyper- or hypo-methylation in both DME 2 and DME 13 lines when compared to cells expressing

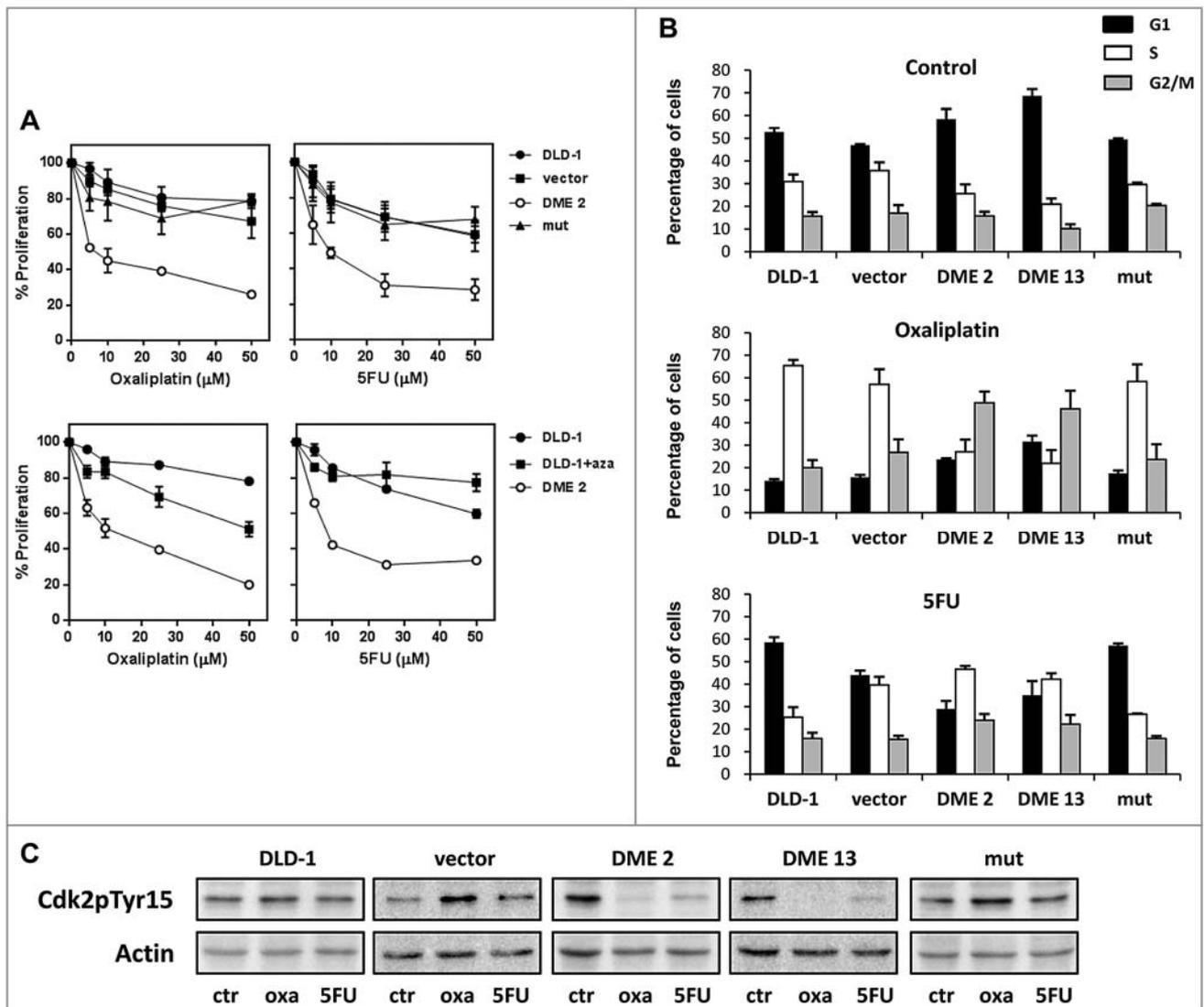


Figure 5. DME sensitizes cells to oxaliplatin and 5-FU and alters the cell cycle response to both anti-tumor drugs. (A) Upper panels: non-transfected DLD-1 cells and stable DME transfectants were treated with various concentrations of oxaliplatin or 5-FU for 48 h, and cell viability was measured. Lower panels: comparison of 5-azaCdr and DME on sensitivity to oxaliplatin or 5-FU. Cells were preincubated or not with 5-azaCdr (2.5 μM) for 72 h, and then treated with anticancer drug for 48 h before measuring cell viability. Data are the mean ± SE of three independent experiments. (B) Percentage of cells in each cell cycle phase after cytostatic treatment. DLD-1 cells and different transfectants were treated with oxaliplatin or 5-FU (25 mM) for 48 h, and analyzed by flow cytometry analysis. Values are the mean ± SE of three independent experiments. (C) Analysis of the phosphorylation status of Cdk2 at Tyr15 (Cdk2pTyr15) by immunoblotting.

distribution in control cells, but induced S-phase arrest in cells expressing DME. We also examined the phosphorylation status of Cdk2 at Tyr15 (Cdk2pTyr15) by immunoblot analysis (Fig. 5C). Cdk2, which operates in the transition from G1 to S phase and also in S phase progression, is subject to inhibitory phosphorylation at Thr14 and Tyr15 in proliferating cells [33]. We found that treatment with either oxaliplatin or 5-FU caused loss of inhibitory Tyr15 phosphorylation of Cdk2 in DME-expressing cells, but not in control cells. All together, these

results indicate that expression of active DME alters the cell cycle response to both oxaliplatin and 5-FU.

DME expression inhibits colonosphere formation in vitro and cancer growth in vivo

The majority of tumors, including CRC, are heterogeneous cell populations comprising a small sub-population of poorly differentiated cancer stem-like cells (CSCs). It has been proposed

a mutant DME version. Colors indicate the percentage of sites at each location, as indicated at the bottom. (C) Overall methylation changes in CpG sites displaying differential methylation according to their respective genomic locations. Absolute beta values are means for sites displaying hyper- or hypo-methylation in both DME 2 and DME 13 lines when compared to cells expressing a mutant DME version. (D) Boxplot indicating overall changes in beta values across different genomic locations for probes located in genes containing both hyper- and hypo-methylated sites. Values are means for sites displaying hyper- or hypomethylation in both DME 2 and DME 13 lines when compared to cells expressing a mutant DME version. (E) Heatmap representing the methylation status (beta-value) of the 3000 most variable probes (y-axis) for each of the different cell samples (x-axis). Unsupervised clustering analysis grouped cell samples in 3 main clusters (indicated by three major branches of the upper dendrogram) and CpG sites in 4 main groups (indicated on the left by different colors, see text for details). (F) Genomic location and CpG class distribution for each of the 4 groups of CpG sites identified by the unsupervised clustering algorithm.

that CSCs are responsible for tumor-initiating and metastatic ability [34,35] of a cancer. CRC-CSCs can be grown to form floating spheroids (known as colonospheres) when cultured under anchorage-independent conditions in a serum-free defined medium [36]. We compared the colonosphere forming ability of cells expressing active DME and control cells (Fig. 6A-B). There was no significant difference in the number of colonospheres, but primary and secondary colonospheres formed by DME-expressing cells were significantly smaller than those formed by control cells (Fig. 6B). These results indicate that DME-expressing cells have a reduced ability to form colonospheres and suggest an inhibition of their stemness properties.

We next examined whether DME expression has an effect on tumor growth *in vivo* by injecting cells expressing active DME or its catalytically inactive mutant version in nude mice. The size of xenografts expressing active DME was significantly smaller than those expressing the inactive version (Fig. 6C-D). Importantly, the growth rate of tumors expressing active DME was strongly inhibited from early stages. These results indicate that DME expression inhibits cancer growth *in vivo*.

Discussion

In this study, we show that stable expression of a plant 5mC DNA glycosylase induces genome-wide changes in the methylome of CRC cells and important alterations of their phenotype. There are few reports analyzing genome-wide effects upon expression of enzymes involved in DNA demethylation. Two recent studies reported genome-wide induction of 5hmC in HEK293T cells upon transient expression of the TET1 catalytic domain (TET1-CD) [37] and full-length TET2 [38]. However, methods used in both studies do not allow unambiguous distinction between genuine DNA demethylation and 5mC oxidation.

One unexpected result of our study is that DME expression is associated with both losses and gains of DNA methylation. Interestingly, demethylated regions are enriched in promoters and CGIs, whereas hypermethylated sites tend to be located at intergenic regions and non-CGIs. This result suggests that two different mechanisms are involved. Although most hypomethylation changes are likely to be a direct effect of DME catalytic activity, it is more difficult to explain the extensive hypermethylation changes observed. A possible explanation is that demethylation initiated by DME leads to activation of DNA methylation pathways. In agreement with this idea, we found that *DNMT3b*, which is hypermethylated and silenced in DLD-1 cells [30], becomes demethylated and reactivated upon DME expression. Interestingly, *DNMT3b* is required for remethylation observed after drug withdrawal in 5-aza-CdR-treated HCT116 colon cancer cells [39].

Locations of DNA methylation changes induced by DME expression are mostly reciprocal to those observed in tumor cells. In fact, our unsupervised clustering analysis indicates that DME expression partially reverts the aberrant methylation patterns of DLD-1 cells. The mechanisms leading to the simultaneous appearance of focalized DNA hypermethylation and global DNA hypomethylation in cancer cells are poorly understood [7]. However, there are hints that both processes are linked through developmentally regulated silencing programs,

as suggested by methylation profiling of colorectal cancer and normal tissues [40]. In this respect, it is interesting that genes whose promoters become hypomethylated upon DME expression are enriched in functions related to development regulation, whereas those hypermethylated are enriched for functions related to cell-cell signaling. Genomic distribution of active DNA demethylation mediated by DME and passive DNA demethylation induced by either mutation or inhibition of DNMTs is apparently different. HCT116 double-knockout cells for DNMT1 and DNMT3B (HCT116 DKO) show hypomethylation in 37% of CpG sites, equally distributed across promoter, gene body, and intergenic regions [41]. On the other hand, 5-aza-CdR-demethylated sites in HCT116 cells are enriched in gene body regions, but not promoters [39]. Interestingly, however, genes that remain demethylated 68 days after 5-aza-CdR withdrawal in HCT116 cells are, like those demethylated by DME in DLD-1 cells, enriched in functions related to developmental processes [39].

A second key observation in our study is that DNA methylome-reprogramming induced by DME is accompanied by important changes in tumor-related properties. This result is perhaps not unexpected, since CpG sites differentially methylated upon DME expression cover about half of the genes examined (9,918 out of 21,231). Notably, DME expression causes increased sensitivity to chemotherapy agents such as oxaliplatin and 5-FU, concomitant with specific alterations of the cell-cycle response to these anti-tumor agents. These results suggest that such response is under epigenetic control. In fact, DME expression demethylates and reactivates two important cell-cycle regulators, such as *p14* and *p16*. Interestingly, it has been reported that induced pluripotent stem (iPS) reprogramming of DLD-1 cells is accompanied by *p16* reactivation and increased sensitivity to 5-FU [42]. Another important feature of the altered phenotype of DME-expressing cells is the reduced size of the spheres formed under anchorage-independent conditions. This result suggests that methylation control is important for sphere formation and, presumably, for CSCs subpopulation maintenance in colon tumors. In fact, it has been previously reported that DNA methylation is essential for maintenance of human colon CSCs [43].

A significant result is that DME expression inhibits the growth of tumor xenografts. In this respect, it is interesting that overexpression of TET1 in colorectal cancer cells also inhibits *in vivo* growth of tumors derived of colorectal cancer cells, as well as spheroid formation [44]. The effect of TET1 has been linked to its capacity to de-repress inhibitors of the Wnt pathway by DNA hydroxymethylation [44]. Indeed, our study shows that DME expression demethylates and reactivates *ROR2*, which inhibits the canonical β -catenin dependent Wnt signaling [45]. These results agree with the notion that epigenetic disruption of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is implicated in numerous malignancies, including colorectal cancer [25,46]. Interestingly, DME expression increases cell proliferation *in vitro* but decreases tumor growth *in vivo*. Such discrepancy emphasizes the fact that tumor growth *in vivo* is affected by multiple factors, such as extracellular matrix and stromal cells, which cannot be recreated *in vitro*. Our observations also suggest that *in vitro* and *in vivo* growth are differentially affected by stable changes in the cancer cell methylome.

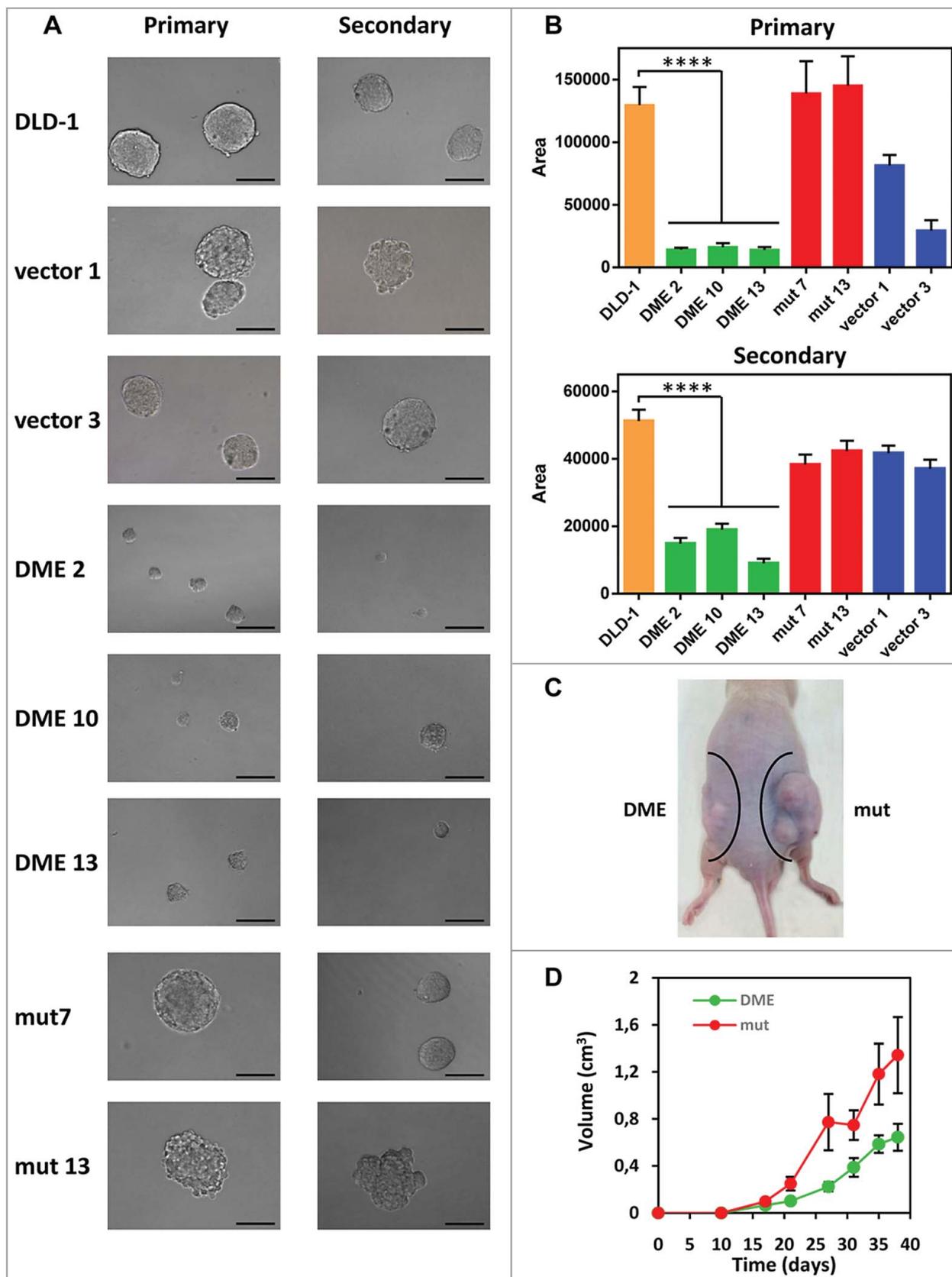


Figure 6. Effect of DME expression on colonosphere formation *in vitro* and tumor growth *in vivo*. (A) Representative images of primary (left panel) and secondary (right panel) colonospheres formed by DLD-1 cells and different transfectants. (B) Size of primary and secondary colonospheres formed by the different cell lines. Data are the mean \pm SE of 20 (primary) or 40 (secondary) colonospheres. Asterisks indicate statistical significance as determined by Student's *t*-test (**** $P < 0.0001$). (C) Stable DLD-1 transfectants (2.5×10^6 cells) expressing either wild-type DME (DME 2) or a catalytically-inactive mutant version (mut 7) were injected subcutaneously into the left or right flank, respectively, of athymic nude mice ($n = 10$). (D) Tumor size was assessed at various time points after injection. Data are the mean \pm SE.

In summary, our data show that expression of a plant 5mC DNA glycosylase in human CRC cells partially reverts their aberrant methylation and alters their tumoral phenotype. Plant DNA demethylases, with no counterpart in human cells, may provide new options to study the functional role of DNA methylation cancer. We have previously shown that a paralog of DME (ROS1) may be targeted to demethylate specific DNA sequences in human cells by fusion to a DNA binding domain [24]. Therefore, plant DNA demethylases may be a useful addition to the growing collection of effectors used for epigenetic editing.

Materials and methods

Ethics statement

All experiments and procedures involving animals were conducted in accordance with guidelines approved by the Animal Experimentation Service (SAEX) of the University of Cordoba (UCO), with current legislation (Directive 2010/63/EU, belong Commission Recommendation 2007/526/EC and Royal Decree 53/2013).

Cell culture

Cells were grown in Dulbecco's modified eagle's medium–high glucose (DMEM, 4.5 g/L d-glucose) (Sigma), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma). Cells were maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. After cultures became 80% confluent (usually 4 days), cells were trypsinized, centrifuged, and suspended in fresh medium.

Transfection and generation of stable cell lines

Wild-type DME cDNA and a catalytically inactive mutant version (D1562A) were subcloned into pcDNA3.1 vector (Invitrogen) from pET30b-DME and pET30b-DMED1562A, respectively [20], by *KpnI/NotI* digestion. DLD-1 cells were transfected with the empty plasmid or the different constructs using Lipofectamine LTX (Invitrogen), following the manufacturer's recommendations. Stable transfectants were obtained after 2 weeks selection with 1 mg/ml G418 (Calbiochem).

RNA Purification and Reverse Transcriptase-Polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA from cell lines was extracted using the RNeasy Minikit (Qiagen). Residual genomic DNA was removed by DNase I digestion with RNase-free (Thermo Scientific) and cDNA was synthesized using the qScriptTM cDNA Synthesis Kit (Quanta). Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) analysis was performed in a CFX ConnectTM Real-Time PCR Detection System (Biorad) by mixing cDNA (from 1 µg total RNA) with iQTM SYBR Green Supermix (Biorad) and specific primers (Table S4). Data were normalized using *GAPDH* and quantification of relative expression was determined by the 2^{-ΔΔCt} method [47].

Western blot analysis

For DME detection, nuclear extracts prepared with the Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen) were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with a rabbit polyclonal antibody generated against the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* ROS1 (1:500); an anti-Histone H3 antibody (1:5000, Millipore) was used for loading control. For Cdk2 Tyr15 detection, cell lysates were prepared in RIPA Buffer (Sigma) and incubated with a monoclonal primary antibody against phosphor-Cdk2 Tyr15 (1:250, Abcam), using an anti-Actin antibody (1:2000, Sigma) for loading control. All immunocomplexes were detected by the Enhanced Chemiluminescence Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences), using the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Images were captured on a ChemiDocTM XRS Imaging System (Biorad).

DNA methylation analysis

DNA was purified following standard protocols and 750 ng of each sample were bisulfite-modified with the EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research). Quantitative methylation-specific PCR (qMSP) analysis was performed using allele-specific primers complementary to methylated promoter target sequences (Table S4). To quantify input DNA after bisulfite treatment, a region of the *AluC4* locus free of CpG sites was amplified. The relative level of methylation at a specific locus was calculated by the 2^{-ΔΔCt} method [47]. Bisulfite sequencing of multiple clones was performed using primers shown in Table S4. At least twelve independent clones were sequenced for each sample. Bisulfite pyrosequencing was performed with primers shown in Table S4. The biotinylated PCR product was purified and made single-stranded to act as a template in a pyrosequencing reaction using the Pyrosequencing Vacuum Prep Tool (Qiagen). Methylation density was quantified using Pyrosequencing Analysis and the PyroMark Q24 system (Qiagen).

Global DNA methylation analysis by UPLC-MS/MS

Global 5mC levels were analyzed by high-performance liquid chromatography (UPLC 1290 Infinity System, Agilent Technology) coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer (6460 Jet Stream Series, Agilent Technologies). The chromatographic conditions and the optimized source parameters were based on those described by Le et al. [48] with some modifications. Briefly, a reverse phase column (Zorbax Eclipse plus C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm particle size) was used with a mobile phase gradient of formic acid and methanol (up to 80% in 8 min) flowing at 200 µL/min. Multiple reaction monitoring mode transition pairs of deoxycytidine (dC) and 5mC were set as m/z 228.1 → 112.1 and m/z 242.1 → 126.1, respectively. The dwell times per channel were set at 100 ms and collision energy at 5V, for both analytes in positive polarity mode. Previous to this analytical procedure, DNA samples were hydrolyzed to nucleosides with Degradase Plus (Zymo Research). The DNA methylation level was expressed as (5mC) / [(5mC) + (dC)].

HumanMethylation450 BeadChip data preprocessing

IDAT files from the HumanMethylation450 BeadChip were processed using the R/Bioconductor package *minfi* (R package version 1.14.0). In order to adjust for the different probe design types present in the HumanMethylation450 BeadChip architecture, red and green signals from the IDAT files were corrected using the SWAN algorithm [49]. No background correction or control probe normalization was applied. Probes where at least two samples had detection *P* values >0.01 were filtered out. Beta-values were computed and employed across the analysis pipeline.

Transient transfection with CMV-GFP reporter plasmid

In vitro methylation of pAcGFP1-C1 plasmid DNA (Clontech) was performed using *M.SssI* methyltransferase (New England Biolabs) and verified by *HpaII* digestion (New England Biolabs). DME stable cell lines were transfected with either non-methylated or *in vitro* methylated GFP plasmid using Lipofectamine LTX (Invitrogen). After 48 h cells were visualized in a Nikon ECLIPSE Ti inverted microscope and the numbers of GFP⁺ cells under different conditions were quantified using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Drug treatments

Cells were seeded and let to attach for 24 h before adding the drug(s) at the indicated concentrations, and incubation continued for different time periods. 5-aza-2-deoxycytidine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and CRT 0044876 were from Sigma, and ABT-888 was from Enzo Life Sciences.

Cell proliferation and cytotoxicity analysis

Cell proliferation rate was established by cell counting on consecutive days. Cells (7.5×10^5) were seeded in T75 culture flasks and collected daily for 4 days. Viable cells, as assessed by trypan blue staining, were counted under a microscope in a hemocytometer. Cytotoxicity was assessed using a WST-1 colorimetric assay (Roche Applied Science). Cells were seeded on 96-well plates at a density of 8,000 cells/well and let to attach for 24 h. After treatment at indicated times and doses, the WST-1 assay was performed following the protocol supplied by the manufacturer. The dye produced by viable cells was spectrophotometrically (420–480 nm) detected using an ImarkTM Microplate Reader (Biorad).

Cell cycle analysis

Cell cycle phase distribution was measured by cytometry. Briefly, 2.5×10^5 cells were recovered by centrifugation and fixed with 70% ethanol for at least 24 h at 4°C. Fixed cells were stained with 50 µg/ml propidium iodide (Sigma) and treated with 50 µg/ml RNase A (Sigma) for 20 minutes at room temperature protected from light. Analysis and measurement of propidium iodide fluorescence were performed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Colonsphere formation assay

The colonsphere formation assay was performed as previously described [50].

Mouse xenograft model

Five-week-old athymic Nude-Foxn1_{nu/nu} mice (Janvier Labs) were used for tumor xenograft experiments with pcDNA-DME and pcDNA-DME mutant transfected DLD-1 cells. Ten mice were used. Both flanks of each animal were injected subcutaneously with 2.5×10^6 cells in 100 µl Matrigel[®] Matrix (Corning); DME-transfected cells were injected into the left flank and DME mutant-transfected cells into the right flank. Tumor width (W) and length (L) were measured every 5 days. Tumor volume was estimated according to the formula $V = 0.4 \times L \times W^2$ (L = maximum length; W = maximum width).

Acknowledgements

We thank Araceli Valverde Estepa and Dr. Antonio Rodríguez-Ariza for help and guidance with the colonsphere assay. We also thank members of our laboratories for helpful discussions and advice. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the European Regional Development Fund [BFU2016-80728-P to T.R.A. and Pre-doctoral Fellowship BES-2014-067690 to I.D.G.]; Junta de Andalucía and the European Regional Development Fund [P11-CVI-7576 to T.R.A.]; Ministry of Economy and Competitiveness [Juan de la Cierva postdoctoral fellowship FJCI-2015-26965 to JRT]; the Plan Nacional de I+D+I 2013–2016/FEDER [PI15/00892 to M.F.F.]; Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias [to G.F.B. and M.I.S.]; and the Asturias Regional Government [GRUPIN14-052 to M.F.F.]. The IUOPA is supported by the Obra Social Cajastur, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Funding

This work was supported by Junta Andalucía [grant number P11-CVI-7576]; Spanish Ministry of Science [grant number BFU2016-80728-P]; Plan Nacional de I+D+I 2013–2016/FEDER [grant number PI15/00892]; Asturias Regional Government [grant number GRUPIN14-052].

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Teresa Morales-Ruiz  <http://orcid.org/0000-0002-6357-6977>
 María Victoria García-Ortiz  <http://orcid.org/0000-0001-6527-4908>
 Iván Devesa-Guerra  <http://orcid.org/0000-0002-8846-463X>
 Juan R. Tejedor  <http://orcid.org/0000-0002-4061-9698>
 Gustavo F. Bayón  <http://orcid.org/0000-0002-0763-0473>
 Mario F. Fraga  <http://orcid.org/0000-0001-8450-2603>
 Rafael R. Ariza  <http://orcid.org/0000-0002-0338-7306>
 Teresa Roldán-Arjona  <http://orcid.org/0000-0003-2842-3956>

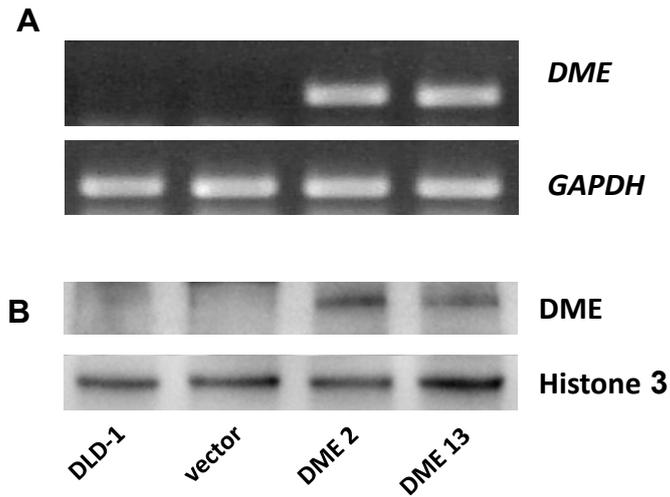
References

- [1] Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* 2010;11:204–220. doi:10.1038/nrg2719. PMID:20142834

- [2] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013;14:204–220. doi:10.1038/nrg3354. PMID:23400093
- [3] Rodriguez-Cortez VC, Hernando H, de la Rica L, et al. Epigenomic deregulation in the immune system. *Epigenomics.* 2011;3:697–713. doi:10.2217/epi.11.99. PMID:22126290
- [4] Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6:597–610. doi:10.1038/nrg1655. PMID:16136652
- [5] Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007;8:286–298. doi:10.1038/nrg2005. PMID:17339880
- [6] Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev.* 2012;22:50–55. doi:10.1016/j.gde.2012.02.008. PMID:22402447
- [7] Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 2016;8.
- [8] Issa JP, Kantarjian HM. Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res.* 2009;15:3938–3946. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2783. PMID:19509174
- [9] Bell JS, Kagey JD, Barwick BG, et al. Factors affecting the persistence of drug-induced reprogramming of the cancer methylome. *Epigenetics.* 2016;11:273–287. doi:10.1080/15592294.2016.1158364. PMID:27082926
- [10] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009;324:930–935. doi:10.1126/science.1170116. PMID:19372391
- [11] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science.* 2011;333:1300–1303. doi:10.1126/science.1210597. PMID:21778364
- [12] Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell.* 2014;156:45–68. doi:10.1016/j.cell.2013.12.019. PMID:24439369
- [13] Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature.* 2013;502:472–479. doi:10.1038/nature12750. PMID:24153300
- [14] Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:341–356. doi:10.1038/nrm3589. PMID:23698584
- [15] Spruijt CG, Gnerlich F, Smits AH, et al. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell.* 2013;152:1146–1159. doi:10.1016/j.cell.2013.02.004. PMID:23434322
- [16] Hashimoto H, Olanrewaju YO, Zheng Y, et al. Wilms tumor protein recognizes 5-carboxylcytosine within a specific DNA sequence. *Genes Dev.* 2014;28:2304–2313. doi:10.1101/gad.250746.114. PMID:25258363
- [17] Wang D, Hashimoto H, Zhang X, et al. MAX is an epigenetic sensor of 5-carboxylcytosine and is altered in multiple myeloma. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:2396–2407. doi:10.1093/nar/gkw1184. PMID:27903915
- [18] Choi Y, Gehring M, Johnson L, et al. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell.* 2002;110:33–42. doi:10.1016/S0092-8674(02)00807-3. PMID:12150995
- [19] Gong Z, Morales-Ruiz T, Ariza RR, et al. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell.* 2002;111:803–814. doi:10.1016/S0092-8674(02)01133-9. PMID:12526807
- [20] Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marin MI, et al. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:6853–6858. doi:10.1073/pnas.0601109103. PMID:16624880
- [21] Gehring M, Huh JH, Hsieh TF, et al. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell.* 2006;124:495–506. doi:10.1016/j.cell.2005.12.034. PMID:16469697
- [22] Penterman J, Zilberman D, Huh JH, et al. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:6752–6757. doi:10.1073/pnas.0701861104. PMID:17409185
- [23] Ortega-Galisteo AP, Morales-Ruiz T, Ariza RR, et al. Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol.* 2008;67:671–681. doi:10.1007/s11103-008-9346-0. PMID:18493721
- [24] Parrilla-Doblas JT, Ariza RR, Roldan-Arjona T. Targeted DNA demethylation in human cells by fusion of a plant 5-methylcytosine DNA glycosylase to a sequence-specific DNA binding domain. *Epigenetics.* 2017;12:296–303. doi:10.1080/15592294.2017.1294306. PMID:28277978
- [25] Lara E, Calvanese V, Huidobro C, et al. Epigenetic repression of ROR2 has a Wnt-mediated, pro-tumourigenic role in colon cancer. *Mol Cancer.* 2010;9:170. doi:10.1186/1476-4598-9-170. PMID:20591152
- [26] Esteller M, Tortola S, Toyota M, et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* 2000;60:129–133. PMID:10646864
- [27] Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1995;1:686–692. doi:10.1038/nm0795-686. PMID:7585152
- [28] Wiederhold L, Leppard JB, Kedar P, et al. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell.* 2004;15:209–220. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.003. PMID:15260972
- [29] Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Kompaniez K, et al. Coordination of DNA repair by NEIL1 and PARP-1: a possible link to aging. *Aging.* 2012;4:674–685. doi:10.18632/aging.100492. PMID:23104860
- [30] Huidobro C, Urduinguo RG, Rodriguez RM, et al. A DNA methylation signature associated with aberrant promoter DNA hypermethylation of DNMT3B in human colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2012;48:2270–2281. doi:10.1016/j.ejca.2011.12.019. PMID:22244828
- [31] Urduinguo RG, Fernandez AF, Moncada-Pazos A, et al. Immune-dependent and independent antitumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors. *Cancer Res.* 2013;73:395–405. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0806. PMID:23108143
- [32] Rodriguez RM, Huidobro C, Urduinguo RG, et al. Aberrant epigenetic regulation of bromodomain BRD4 in human colon cancer. *J Mol Med (Berl).* 2012;90:587–595. doi:10.1007/s00109-011-0837-0. PMID:22120039
- [33] Gu Y, Rosenblatt J, Morgan DO. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J.* 1992;11:3995–4005. PMID:1396589
- [34] Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature.* 2011;469:314–322. doi:10.1038/nature09781. PMID:21248838
- [35] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell.* 2012;10:717–728. doi:10.1016/j.stem.2012.05.007. PMID:22704512
- [36] Shaheen S, Ahmed M, Lorenzi F, et al. Spheroid-Formation (Colono-sphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem Cell Rev.* 2016;12:492–499. doi:10.1007/s12015-016-9664-6. PMID:27207017
- [37] Jin C, Lu Y, Jelinek J, et al. TET1 is a maintenance DNA demethylase that prevents methylation spreading in differentiated cells. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:6956–6971. doi:10.1093/nar/gku372. PMID:24875481
- [38] Kong L, Tan L, Lv R, et al. A primary role of TET proteins in establishment and maintenance of De Novo bivalency at CpG islands. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:8682–8692. doi:10.1093/nar/gkw529. PMID:27288448
- [39] Yang X, Han H, De Carvalho DD, et al. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell.* 2014;26:577–590. doi:10.1016/j.ccr.2014.07.028. PMID:25263941
- [40] Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, et al. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet.* 2011;44:40–46. doi:10.1038/ng.969. PMID:22120008
- [41] Sandoval J, Heyn H, Moran S, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics.* 2011;6:692–702. doi:10.4161/epi.6.6.16196. PMID:21593595
- [42] Miyoshi N, Ishii H, Nagai K, et al. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:40–45. doi:10.1073/pnas.0912407107. PMID:20018687
- [43] Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, et al. DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. *Exp Mol Pathol.* 2013;94:322–329. doi:10.1016/j.yexmp.2012.10.004. PMID:23064049
- [44] Neri F, Dettori D, Incarnato D, et al. TET1 is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of

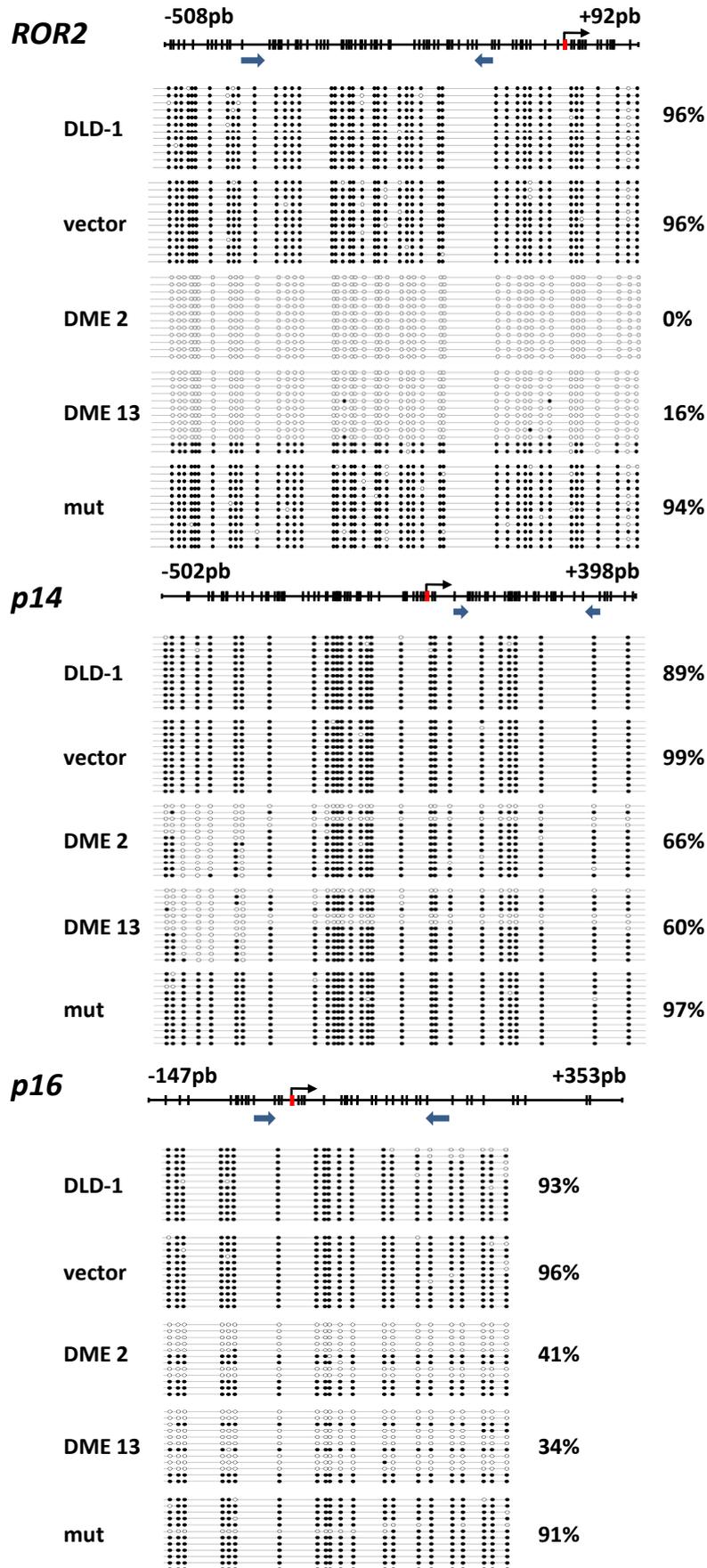
- the WNT pathway. *Oncogene*. 2015;34:4168–4176. doi:10.1038/onc.2014.356. PMID:25362856
- [45] Ford CE, Qian Ma SS, Quadir A, et al. The dual role of the novel Wnt receptor tyrosine kinase, ROR2, in human carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2013;133:779–787. doi:10.1002/ijc.27984. PMID:23233346
- [46] Ying Y, Tao Q. Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics*. 2009;4:307–312. doi:10.4161/epi.4.5.9371.
- [47] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262. PMID:11846609
- [48] Le T, Kim KP, Fan G, et al. A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples. *Anal Biochem*. 2011;412:203–209. doi:10.1016/j.ab.2011.01.026. PMID:21272560
- [49] Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A. SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome Biol*. 2012;13:R44. doi:10.1186/gb-2012-13-6-r44. PMID:22703947
- [50] Lopez-Sanchez LM, Jimenez C, Valverde A, et al. CoCl₂, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer. *PLoS One*. 2014;9:e99143. doi:10.1371/journal.pone.0099143. PMID:24932611

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1. DME expression in DLD-1 cells. (A) Detection of *DME* and *GAPDH* mRNA. RT-PCR was performed using specific primers from *DME* and *GAPDH* on total RNA from different stable transfectants. PCR products were analyzed on a 2% agarose gel. (B) Detection of DME protein by Western blotting using nuclear extracts and an antibody against DME. Anti-histone 3 antibody was used for loading control.

Supplemental Figure 2

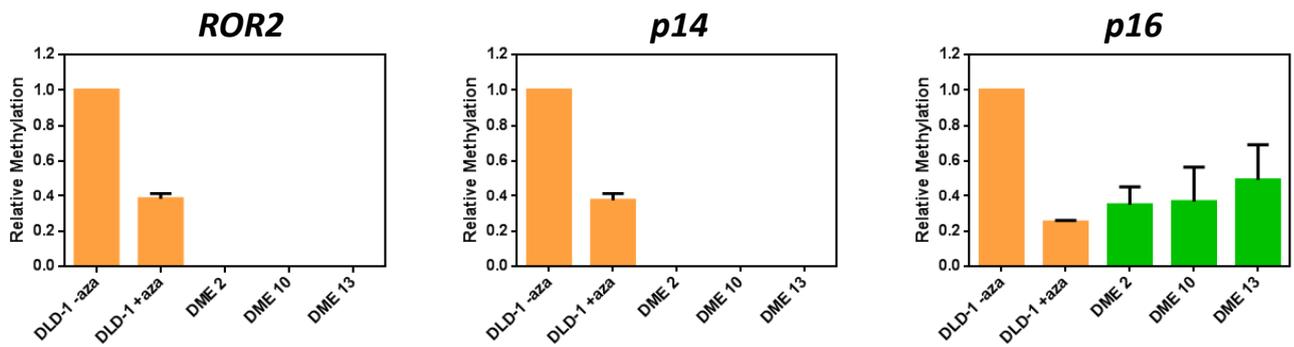


Supplemental Figure 2

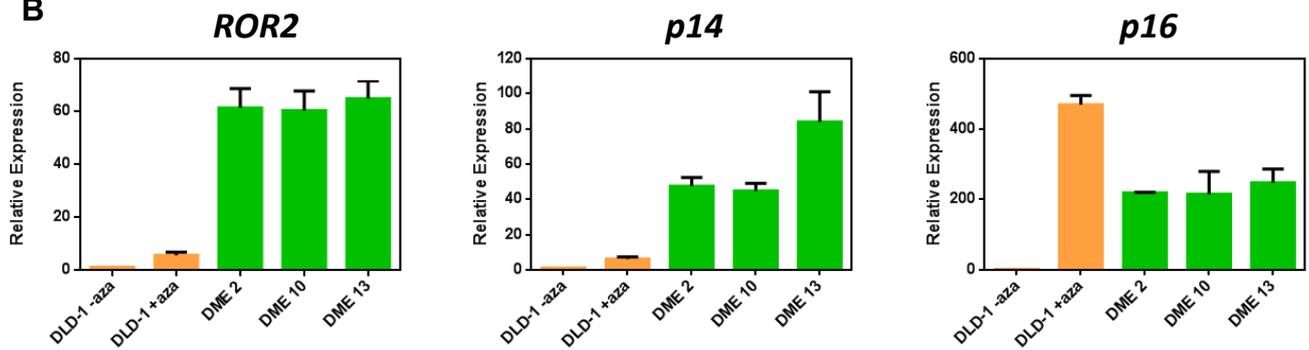
Supplemental Figure 2. DNA methylation analysis of *ROR2*, *p14* and *p16* genes in DLD-1 DME transfectants by bisulfite sequencing. Each vertical bar represents a CpG dinucleotide, and position of ATG codon is indicated as a red rectangle; blue arrows show the location of bisulfite sequencing primers. Lower panels show results of bisulfite sequencing of multiple clones, indicating methylated (black circles) or unmethylated cytosines (white circles).

Supplemental Figure 3

A

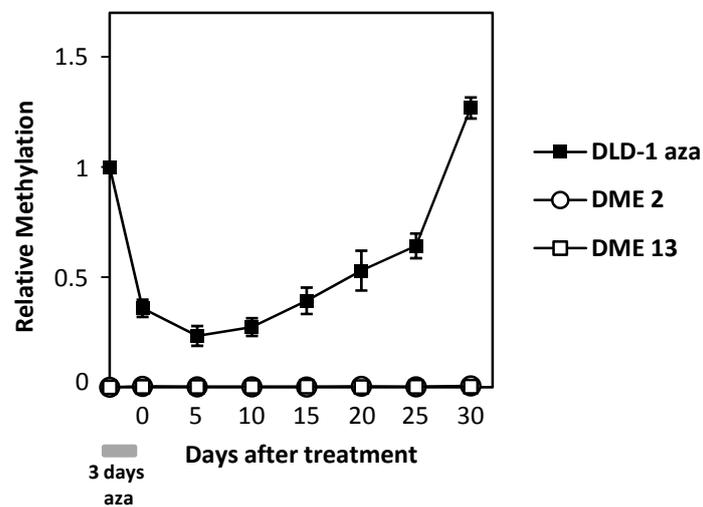


B



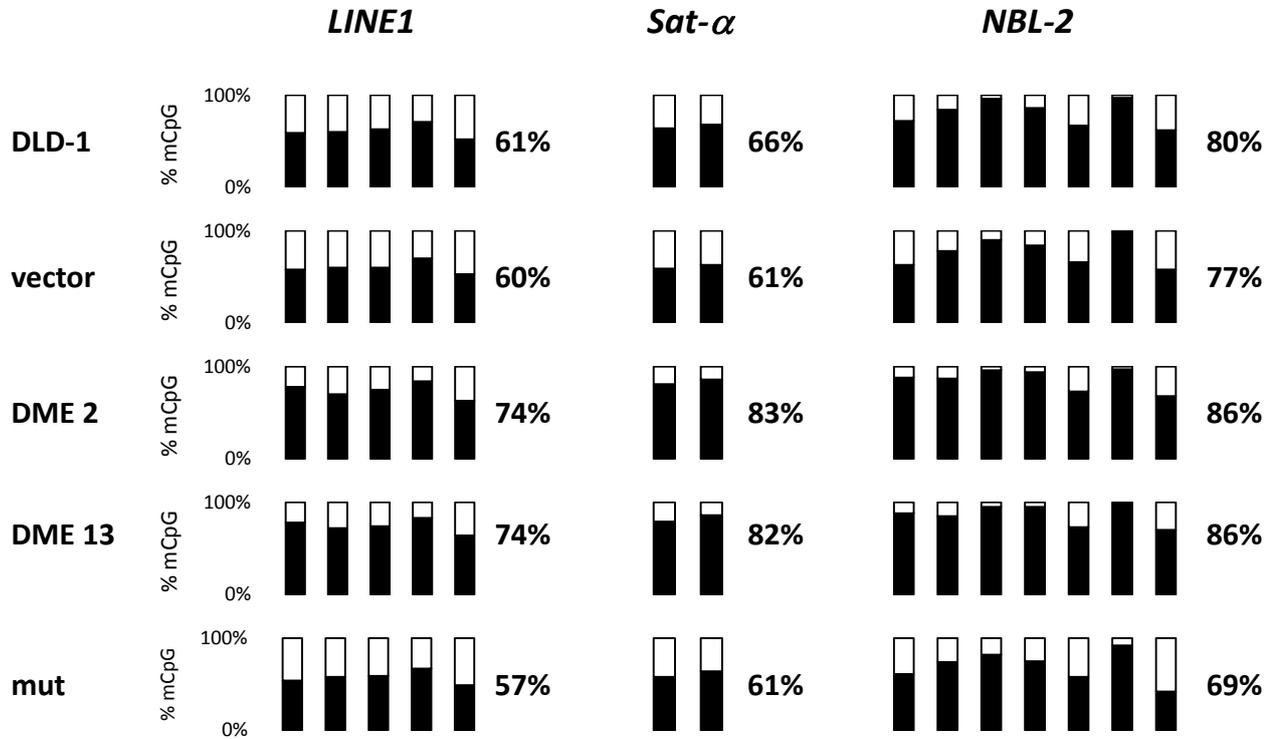
Supplemental Figure 3. Comparison of active and passive DNA demethylation. Methylation levels analyzed by qMSP (**A**) and gene expression levels analyzed by qRT-PCR (**B**) in untreated cells, 5-azaCdR-treated cells (2.5 mM for 72 h), and untreated transfectants expressing DME. Values are shown relative to those detected in non-transfected cells. Data are the mean \pm SE of three independent experiments.

Supplemental Figure 4



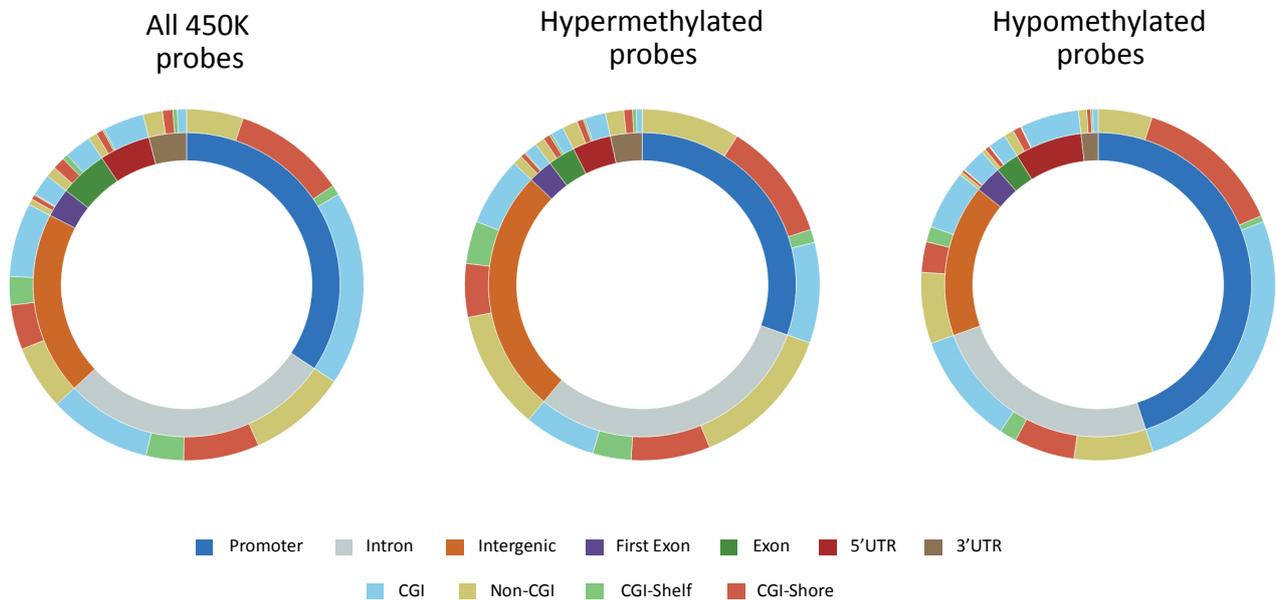
Supplemental Figure 4. Stability of DME-induced DNA demethylation. Methylation levels at the *ROR2* locus were analyzed by qMSP at different time points in 5-azaCdR-treated cells (2.5 mM for 72 h), and untreated transfectants expressing DME. Values are shown relative to those detected in non-transfected, untreated cells. Data are the mean \pm SE of three independent experiments.

Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 5. Effect of DME expression on methylation levels at repetitive DNA sequences. CpG sites analyzed by bisulfite pyrosequencing are shown as bars filled with black to represent percentage methylation.

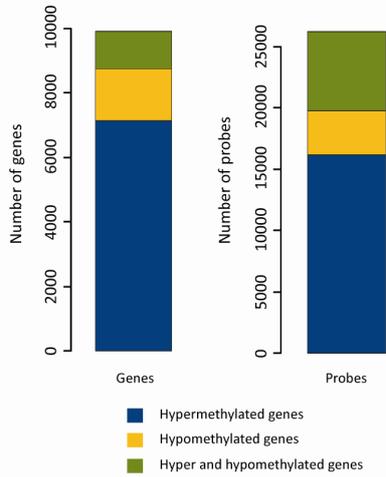
Supplemental Figure 6



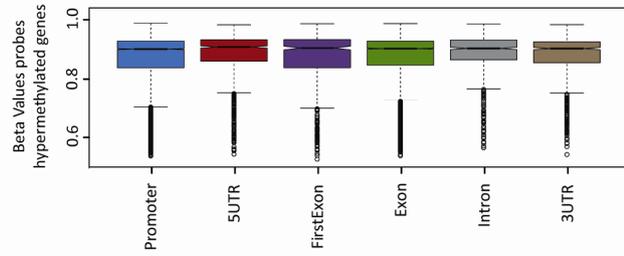
Supplemental Figure 6. Genomic distribution of CpG showing differential methylation in both DME 2 and DME 13 transfectants when compared to cells transfected with the empty vector. Distribution of differentially-methylated CpG sites according to their genomic location (inner ring) and CpG class (outer ring). The left plot represents the distribution of all probes in the 450K methylation array. Center and right plots depict sites displaying hyper- or hypomethylation in both DME 2 and DME 13 lines when compared to cells transfected with the empty vector. Colors indicate the percentage of sites at each location, as indicated at the bottom.

Supplemental Figure 7

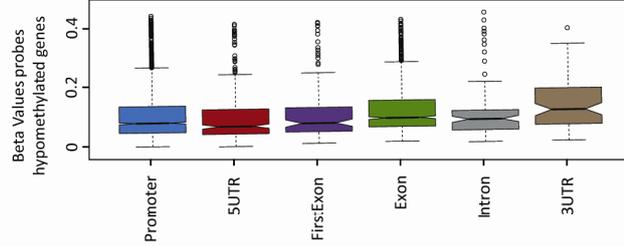
A



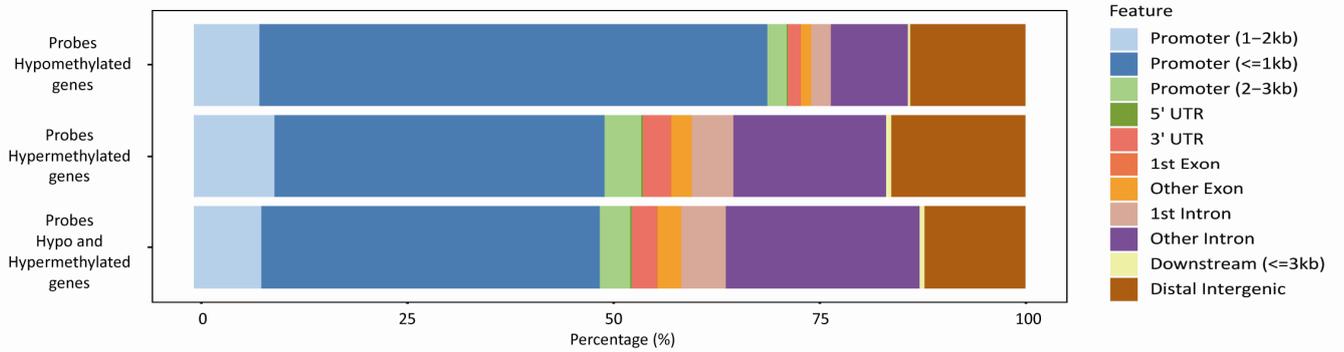
B



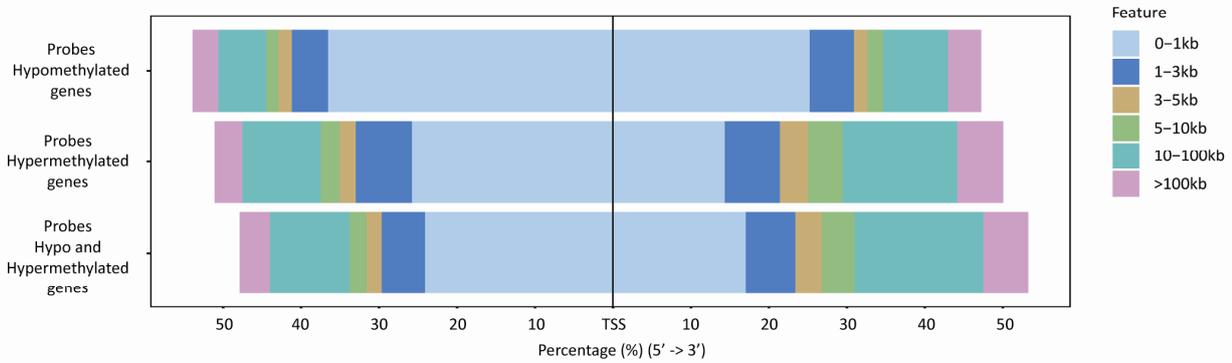
C



D



E

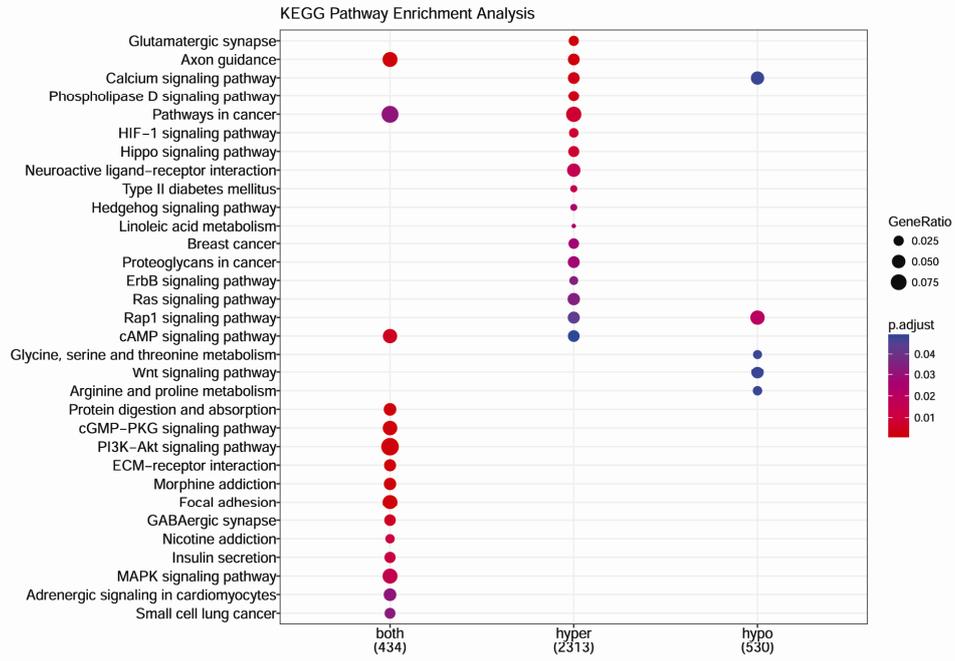


Supplemental Figure 7

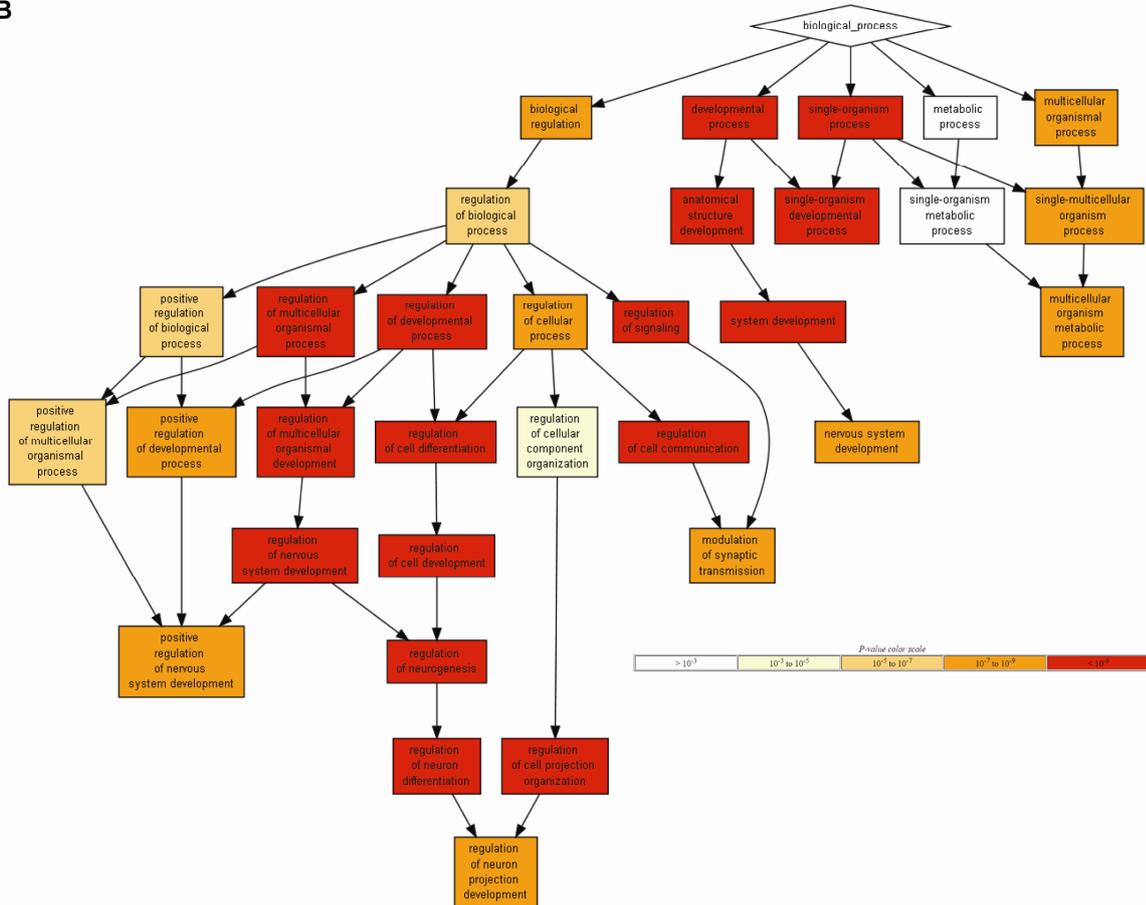
Supplemental Figure 7. Genomic distribution of CpG sites displaying differential methylation upon DME expression. (A) Genes displaying differential methylation upon DME expression. Left plot indicates the number of genes with hyper-, hypo-, or both hyper- and hypomethylated sites in both DME 2 and DME 13 lines when compared to cells expressing a mutant DME version. Right plot displays the number of sites in each gene class. (B) and (C) Boxplots depicting overall methylation levels (beta-values) across different genomic locations for probes located in genes containing only hyper- or hypomethylated sites. Values are means for sites displaying hyper- or hypomethylation in both DME 2 and DME 13 lines when compared to cells expressing a mutant DME version. (D) and (E) Percentage of differentially-methylated CpG sites across different genic regions or according to their relative position to the TSS in genes with hyper-, hypo-, or both hyper- and hypomethylated sites.

Supplemental Figure 8

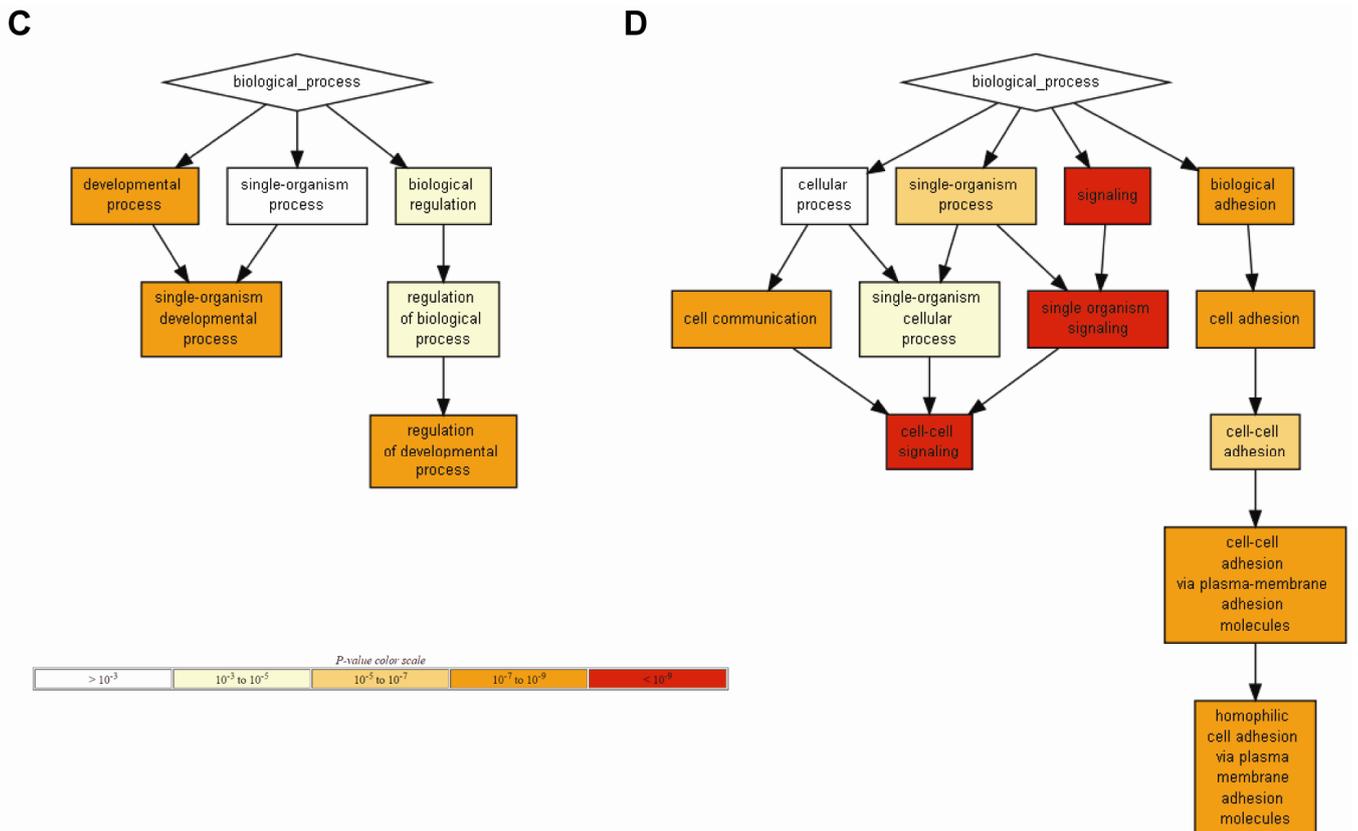
A



B

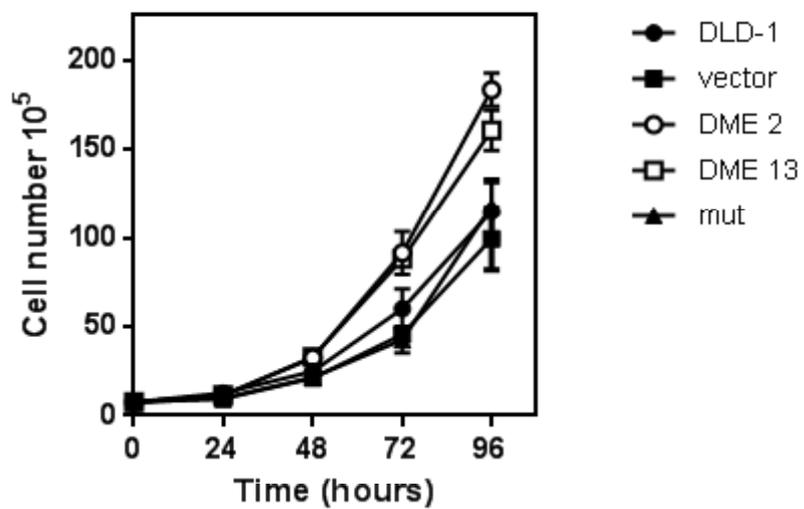


Supplemental Figure 8



Supplemental Figure 8. Gene ontology analysis for genes displaying hyper-, hypo-, or both hyper- and hypomethylated sites upon DME expression. (A) KEGG pathway enrichment analysis. Gene ratios and statistical significance (p-values) are depicted by circle diameter and color, respectively, as indicated on the right. **(B-D)** Gene ontology functional categories enriched for genes displaying both hyper- and hypomethylated sites **(B)**, only hypomethylated sites **(C)**, and only hypermethylated sites **(D)**. Colors indicate the degree of statistical significance (p-values) for each box.

Supplemental Figure 9



Supplemental Figure 9. *In vitro* cell proliferation assay. For each cell line, 7.5×10^5 cells were plated and the number of viable cells was determined at different time points. Data are mean \pm SE of three independent experiments.

Supplemental Table 1. Global DNA methylation levels in DLD-1 cells and stable transfectants

Cell line	% 5-meC ^a
DLD-1	5,49 ± 0,44
DME 2	5,72 ± 0,04
DME 13	5,02 ± 0,26
mut	5,82 ± 0,88

^aMean ± SD from two independent replicates

Supplemental Table 2. Number of differentially-methylated CpG sites in DME-expressing cells

Cell line	Compared to cells transfected with empty vector			Compared to cells expressing mutant DME		
	Hypermethylated	Hypomethylated	Total	Hypermethylated	Hypomethylated	Total
DME 2	29,238	9,662	38,900	29,241	8,794	38,035
DME 13	29,502	9,679	39,181	29,421	8,915	38,336
Shared DME 2/DME 13	27,377	8,747	36,124	27,175	8,037	35,212

Supplemental Table 3. p-values of pairwise comparisons across different locations in genes displaying both hyper- and hypomethylated sites, only hypomethylated sites, and only hypermethylated sites (see Figure 4D and Figure S7B-C).

Genes displaying both hypermethylated and hypomethylated CpG sites					
	Promoter	5'-UTR	FirstExon	Intron	Exon
5'-UTR	6,32E-01				
FirstExon	2,44E-01	7,22E-01			
Intron	3,97E-74	1,57E-27	5,99E-16		
Exon	1,09E-11	1,41E-10	3,93E-09	7,22E-01	
3'-UTR	2,68E-26	3,80E-22	1,17E-17	4,47E-03	9,50E-03
Genes displaying only hypomethylated CpG sites					
	Promoter	5'-UTR	FirstExon	Intron	Exon
5'-UTR	0,51				
FirstExon	1	0,51			
Intron	0,28	0,02	1		
Exon	1	1	1	1	
3'-UTR	0,30	0,04	1	1	0,69
Genes displaying only hypermethylated CpG sites					
	Promoter	5'-UTR	FirstExon	Intron	Exon
5'-UTR	8,71E-05				
FirstExon	9,74E-01	8,13E-02			
Intron	2,92E-02	2,92E-02	9,74E-01		
Exon	9,32E-08	7,24E-01	1,86E-03	8,71E-05	
3'-UTR	9,63E-02	9,06E-01	9,06E-01	9,06E-01	5,76E-02

Supplemental Table 4. List of primers used for qMSP, Bisulfite clone DNA sequencing and pyrosequencing, and qRT-PCR.

qMSP		
<i>Gene</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>
<i>ROR2</i>	GTTTCGTTTTGTTTATCGGGGC	ACTAAAAAATTCCTTAACGCGAA
<i>p14</i>	ACGGGCGTTTTCGGTAGTT	CCGAACCTCCAAAATCTCGA
<i>p16</i>	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC GCGACCGTAA
<i>AluC4</i>	GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGTA	ATTAAC TAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA

Bisulfite clone DNA sequencing		
<i>Gene</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>
<i>ROR2</i>	GGGGTTTTAGTTGTAGTTTTAGT	CTCCTCCTTCTCCCTAAC
<i>p14</i>	GTTGTTTTTTTTGGTGTTA	ACCTTTCCTACCTAATCTTC
<i>p16</i>	GGAGAGGGGGAGAGTAGG	ACCCTCTACCCACCTAAAT

Bisulfite DNA pyrosequencing			
<i>Gene</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>	<i>Sequencing (5'-3')</i>
<i>ROR2</i>	GTTAAGGAATTTTTTTAGTTAGTTTTTG	[BTN] CTCCTCCTTCTCCCTAAC	GGAATTTTTTTAGTTAGTTTTTGT
<i>p14</i>	GGGGAGTTAGGAATAAAATAAGGGGAATAG	[BTN] ACCCCCACCACCATCTTC	GAATAAAATAAGGGGAATAGG
<i>p16</i>	AGGGGTTGGTTGGTTATTAG	[BTN] TACCTACTCTCCCCCTCTC	GGTTGGTTGGTTATTAGA
<i>LINE 1</i>	TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA	[BTN] AAAATCAAAAAATTCCTTTTC	AGTTAGGTGTGGGATATAG
<i>Sat α</i>	AGTTTAATTTATAGAGTAGAGTAG	[BTN] AAATCTTCACTTACAAATACCAC	TGGGATTTTTTTGAGAATTT
<i>NBL2</i>	GTGGTTTGGGTTAGGTATAGA	[BTN] AACACTAACCAATCCCACAAC	GTGTATGGATTTTATTTTT
<i>DNMT3b</i>	AGGGTTTAAAGTAGGATGATAGG	[BTN] CCAAACCAAACCTCCTTCTAAAAC	ATGATAGGTAGGGGTA
<i>CSF2</i>	AGGATGTGGTTGTAGAGTT	[BTN] TTACCATCTCAACAACAATATCTCTACTCAAATTC	GTGAATGTTATTTAGGAGG
<i>BRD4</i>	GTGAAGGAGGATTAAGGTTTTTAAG	[BTN] CACAAA TAAAATTACTTTTCCATCTAA	GTGAAGGAGGATT

RT-PCR

<i>Gene</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>
<i>DME</i>	TGTGTCCCAGGTACCTCCAT	AATGCTTTGGGTGCAGTCTC
<i>GAPDH</i>	TGTCCCCACTGCCAACGTGTCA	AGCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT

qRT-PCR

<i>Gene</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>
<i>ROR2</i>	CTCATGATCGAGTGCTGGAA	CGTTGCTCACATTGCTCACT
<i>p14</i>	CCTCGTGCTGATGCTACTGAGG	GTGGAGCAGCAGCAGCTCC
<i>p16</i>	GCCCAACGCACCGAATAGTTAC	GTGGAGCAGCAGCAGCTCC
<i>DNMT3b</i>	TACACAGACGTGTCCAACATGGGC	GGATGCCTTCAGGAATCACACCTC
<i>CSF2</i>	ATGTGAATGCCATCCAGGAG	AGGGCAGTGCTGCTTGTAGT
<i>BRD4</i>	CCCTGAAGCCGTCCACACT	TTCTCAGCTTGAGGTTTCCTTTTC