



Tesina de Grado.
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Opción Genética y Evolución



Hipermetilación aberrante de promotores en genes vinculados a síndromes progeroides en cáncer humano.

Vanina Mercedes Peraza Geist



Laboratorio de epigenética del
envejecimiento y cáncer.

Jefe de laboratorio: Dr. Ruben Agrelo

Tribunal: Alfonso Cayota
Ruben Pérez
Juan Pablo Tosar

Diciembre 2015

Liste de abreviaciones

5mC	5-metilcitosina
AZA	5-Aza-2'-dedoxicitidina
BAF	<i>Barrier-to-autointegration factor</i>
<i>BANF1</i>	<i>Barrier-to-autointegration factor 1</i>
BSP	PCR de secuenciación dependiente de bisulfito
DNMT	ADN metiltransferasas
GST	genes supresores tumorales
ICG	islas CpG
<i>lamina A/C</i>	gen lamina A y C
lamina A/C	isoformas lamina A y lamina C
MSP	PCR específica de metilación
<i>WRN</i>	gen werner

Índice

Resumen.....	4.
Introducción.....	6.
Objetivos.....	9.
Materiales y métodos	
Cultivo celular.....	11.
Extracción de muestras, purificación y tratamiento del ADN.....	11.
Análisis del estado de metilación.	12.
Protocolo de clonación.....	14.
Obtención del ADN plasmidico	15.
Tratamiento con 5-Aza-2'-dedoxicitidina.	15.
Extracción de ARN total	15.
RT-PCR.	15.
Análisis con inmunofluorescencia.....	16.
Resultados.....	17.
Discusión.....	21.
Conclusiones.....	22.
Bibliografía.....	24.
Apéndice.....	26.

Resumen

El proceso de metilación de las citosinas de dinucleótidos CpG en el ADN genómico, es un mecanismo importante de regulación transcripcional en organismos eucariotas. En células cancerosas se han observado alteraciones en el patrón global de metilación, en comparación con células normales, produciéndose una hipometilación global del genoma y una hipermetilación en las islas CpG (ICG) localizadas en la región promotora de genes supresores tumorales (GST). Esta hipermetilación aberrante genera el silenciamiento de estos GST, siendo uno de los factores contribuyentes al desarrollo y la progresión del cáncer.

Las laminas proveen soporte estructural a la envoltura nuclear. En mamíferos, éstas están categorizadas en dos subfamilias: laminas tipo A y laminas tipo B. Las laminas tipo A más abundantes son codificadas por el gen *lamina A/C* que produce las isoformas lamina A y lamina C por medio de empalme alternativo. Ciertas mutaciones en este gen se asocian a enfermedades hereditarias como el síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford. Asimismo, dicho gen presenta hipermetilación aberrante en tumores hematológicos.

Werner (WRN) es un miembro de la familia de las RecQ helicasas, implicadas en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Mutaciones en el gen *WRN* son asociadas con el síndrome de Werner. Al igual que para el gen *lamina A/C*, en el gen *WRN* se ha encontrado hipermetilación aberrante en cáncer colorrectal.

La proteína codificada por el gen *BANF1* se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma en forma de homodímero. Esta proteína, denominada BAF, se asocia a funciones tales como unión no específica a ADN, histonas, factores de transcripción y proteínas de la lamina nuclear. BAF también interviene en la regulación y organización del ensamblaje de la envoltura nuclear y de la cromatina. Fueron identificadas mutaciones en el gen *BANF1* causantes del síndrome progeroide de Néstor-Guillermo.

En este trabajo se estudió perfil de metilación en la región promotora de estos genes asociados con síndromes progeroides. En líneas tumorales de neuroblastoma, glioblastoma y mieloma se examinó el estado de metilación para el gen *lamina A/C*, mientras que el gen *WRN* se analizó en líneas de mieloma. En el caso del gen *BANF1*, se realizó un escaneo en un panel de 57 líneas de cáncer humano provenientes de 15 tipos tumorales.

El estado de metilación de las ICG en la región promotora de estos genes fue examinado por medio de la PCR específica para metilación. Se encontró metilación en la región promotora del gen *BANF1*, en ocho líneas de cáncer de pulmón, mientras que el análisis realizado para el gen *WRN*, en las líneas de mieloma, mostró que la ICG está en un estado de no metilación. En el caso del gen *lamina A/C* sólo se encontró metilación en una línea de neuroblastoma, siendo confirmada esta

hipermetilación por medio de la técnica PCR de secuenciación dependiente de bisulfito. Finalmente, por medio de una droga desmetilante, se evaluó la correlación entre esta hipermetilación del gen *lamina A/C* en la línea de neuroblastoma y el posible silenciamiento de este gen a niveles de ARN y proteicos, usando las técnicas de RT-PCR e inmunofluorescencia, respectivamente. Concluyendo que el silenciamiento del gen *lamina A/C* por medio de la hipermetilación de la ICG en su promotor resulta en la pérdida de la expresión de la lamina A y C en la línea celular SK-N-DZ.

Introducción

La metilación del ADN cumple un importante rol en la regulación epigenética de la expresión génica. Se encuentra asociada con la organización de la cromatina y en un importante mecanismo de regulación de varios procesos, entre ellos la regulación transcripcional, inactivación del cromosoma X, impronta genética (modificación epigenética que permite que solo el alelo materno o paterno de un gen se exprese), una adecuada segregación cromosómica, la supresión de elementos genómicos repetidos, y el bloqueo de la expresión y recombinación de retrotransposones (Tost, 2009). En los mamíferos el proceso de metilación de los residuos de citosina que preceden a guaninas, dinucleótidos CpG, es una modificación covalente del ADN que consiste en la adición de un grupo metilo en la posición 5' de la base citosina del dinucleótido (Kulis & Esteller, 2010). La metilación de la citosina ocurre simultáneamente en ambas cadenas del palíndromo CpG. La mayor parte de los dinucleótidos CpG del genoma se concentra en las denominadas islas CpG (ICG) mayoritariamente localizadas en regiones promotoras, regiones reguladoras 5' de los genes (Jones, 2012). Se estima que alrededor de la mitad de los genes se encuentran asociados a ICG en su región promotora, estas islas poseen una longitud de 500 pb hasta varias Kbs (Esteller, 2002). La metilación del ADN es un mecanismo normal de silenciamiento génico con un papel en la represión de genes silenciados durante el desarrollo o en genes específicos de tejido, de manera que son silenciados por metilación de la ICG dentro de la región promotora.

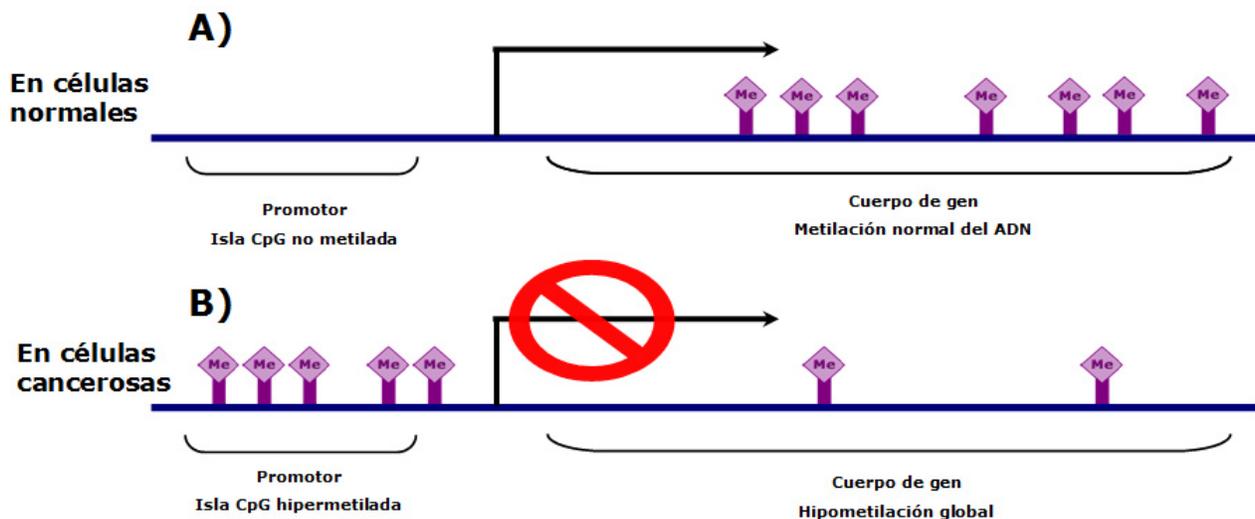


Figura 1. Representación de una isla CpG de un gen supresor de tumores. (A) En células normales, donde se presenta el promotor en un estado no metilado, permitiendo la transcripción del gen. (B) En células cancerosas, donde se observa una hipermetilación en el promotor del gen que imposibilita la transcripción, mientras se produce una hipometilación en el resto del genoma.

La metilación del ADN está catalizada por distintas familias de ADN metiltransferasas (DNMTs) (Esteller, 2007). Estas enzimas catalizan la transferencia de grupo metilo desde la S-Adenosil-L-metionina (SAM) a la posición 5' del anillo de la citosina, del dinucleótido CpG, formando la 5-metilcitosina (5mC) (Tost, 2009). Durante la fase S del ciclo celular, las DNMTs copian el patrón de metilación de la hebra parental a la hebra hija del ADN. En mamíferos se han identificado 5 miembros de la familia DNMTs (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L) (Kulis & Esteller, 2010). DNMT1, DNMT3a y DNMT3b son las principales encargadas de producir los patrones de metilación global. DNMT1 es la enzima responsable de la restauración de los patrones de metilación parentales en la hebra de ADN hija recién sintetizada, y exhibe preferencia por sustrato hemimetilado (Jones, 2012; Kulis & Esteller, 2010). DNMT3a y DNMT3b son las encargadas de la metilación de ADN *de novo* durante la embriogénesis y gametogénesis (Esteller, 2007; Kulis & Esteller, 2010).

La desregulación de la expresión génica es una de las características principales de las células cancerosas. Se ha observado que los patrones de metilación en células cancerosas humanas están considerablemente distorsionados (Figura 1). Las células cancerosas muestran un patrón de hipometilación en regiones intergénicas que en células normales se encontraría en forma 5mC (McCabe *et al.*, 2009). Consecuentemente, esta hipometilación tiene lugar en elementos repetidos del ADN que pueden contribuir a la inestabilidad genómica y a deleciones o translocaciones cromosómicas (Esteller, 2008). Además, las células cancerosas exhiben una hipermetilación de las regiones promotoras de GST. La existencia de 5mC en la región promotora de ciertos genes altera el reclutamiento de los diferentes represores y factores de transcripción a la secuencia de ADN afectada (Esteller, 2007; Esteller, 2008). Las 5mC establecidas sirven como sitios de unión para proteínas de la familia MBD (*Metil-CpG-binding domain proteins*) que atrae a complejos de histona deacetilasas e histona metiltransferasas, junto con enzimas dependientes de ATP para el remodelado de la cromatina. Las MBD generan para el ADN metilado un ambiente de cromatina compactada que reprime la transcripción, resultando principalmente en el silenciamiento de genes reguladores claves para una proliferación celular normal (Esteller, 2005).

La envoltura nuclear se encuentra constituida mayoritariamente por la lamina nuclear, la membrana nuclear interna y externa, y el complejo del poro nuclear. La lamina nuclear constituye una delgada red ortogonal de filamentos intermedios de tipo V localizados subyacentemente a la membrana nuclear interna, que provee soporte estructural a la envoltura nuclear. En vertebrados, estos filamentos se pueden categorizar en dos subfamilias: laminas tipo A y laminas tipo B. Los genes de la subfamilia de laminas tipo B son expresadas en todas las células de la línea germinal y las células somáticas, y son esencial para la viabilidad celular (Butin-Israeli *et al.*, 2012). Este tipo de laminas se encuentran mayoritariamente representados por laminas B₁ y B₂, las cuales derivan de dos genes separados,

LMNB1 y *LMNB2*, respectivamente. El gen *lamina A/C* codifica las laminas tipo A (A, C, C₂ y AΔ10), siendo laminas A y C (lamina A/C) las más abundantes (Davies *et al.*, 2011). Las laminas A/C comparten los primeros 566 aminoácidos (aa), pero difieren en sus extremos C-terminal. La lamina C contiene 6 aa característicos en su extremo C-terminal, mientras que la lamina A es sintetizado como un precursor con 98 aa característicos en su extremo C-terminal. Este precursor, denominado prelamina A, se le añade un grupo farnesol al residuo de cisteína del motivo CaaX en el extremo C-terminal, para luego ser procesado endoproteolíticamente por una metaloproteinasa, resultando en la lamina A madura que ha perdido los últimos 18 aa. Estas isoformas son el resultado del empalme alternativo del ARN del gen *lamina A/C* (Bertrand *et al.*, 2011). Lamina A/C se expresan solo en células diferenciadas (Worman, 2012), y estas proteínas aparecen en la etapa de organogénesis durante el desarrollo de ratón, sin embargo es indispensable para el desarrollo dado que en ratones *knockout* para el gen *lamina A/C* solo sobreviven hasta la adultez (Sullivan *et al.*, 1999). Se ha demostrado que muchas enfermedades hereditarias son causadas por mutaciones en el gen *lamina A/C*, entre éstas está el síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford, un síndrome de Werner atípico (Musich & Zou, 2011; Worman, 2012; Butin-Israeli *et al.*, 2012). Se ha reportado en líneas celulares cancerígenas de leucemia y linfomas que la presencia de hipermetilación en las ICG en el promotor del gen *lamina A/C* está correlacionada con la pérdida de ARN y proteína, además de resultados desfavorables en linfomas difusos a células B grandes (Agrelo *et al.*, 2005).

El síndrome de Werner es una enfermedad genética autosómica recesiva causada por la mutación del gen *WRN*. Los síntomas incluyen un envejecimiento a temprana edad y varios de los síntomas asociados con el envejecimiento, incluyendo cataratas bilaterales, el desarrollo de diabetes tipo 2, osteoporosis, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y cáncer. La proteína *WRN* es un miembro de la familia altamente conservada de las helicasas RecQ, implicadas en el mantenimiento de la estabilidad genómica. La proteína *WRN* se encuentra principalmente localizada en el nucléolo, aunque también puede ser detectada en el nucleoplasma. Esta proteína posee actividad helicasa 3'-5' ATP dependiente, actividad exonucleasa 3'-5' y actividad de unión a ADN monohebra (Pichierri *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2010; Shen & Loeb, 2001). El silenciamiento de *WRN* por medio de metilación de las islas CpG en su promotor, en células de cáncer colorrectal humano, induce un decrecimiento de la expresión, aumenta la inestabilidad cromosómica y la hipersensibilidad a inhibidores de topoisomerasa y agentes de daño al DNA (Agrelo *et al.*, 2006).

Entre los numerosos síndromes progeroides en niños se encuentra el síndrome progeroide de Néstor-Guillermo (NGPS, siglas en inglés). NGPS está caracterizada como una progeria crónica dado que el individuo comienza a manifestar los síntomas a temprana edad con un desarrollo clínico lento, permitiendo al individuo una vida relativamente mas larga en comparación con otras progerias del niño. La mutación en el gen *BANF1* (*Barrier-to-autointegration factor 1*) en homocigosis, es la

alteración genética responsable de este síndrome progeroide (Cabanillas *et al.*, 2011). *BANF1* codifica la proteína BAF (*Barrier-to-autointegration factor*), esta proteína altamente conservada de 10 kDa está mayoritariamente concentrada en la envoltura nuclear, aunque también se encuentra en el nucleoplasma y el citoplasma. Existen al menos 6 genes homólogos para BAF en los mamíferos que incluyen BAF y BAF-L (BAF-like). Esta proteína presenta muchos patrones de unión, siendo los dominios LEM (*lamina-associated polypeptide 2 (LAP2)-Emerin-MAN1*) los motivos mejor caracterizados. La unión de las proteínas LEM a BAF regula la infección de retrovirus, el ensamblaje nuclear, la progresión del ciclo celular, procesos en el desarrollo e incluso la expresión génica (Margalit *et al.*, 2007). Se ha visto que a través de la interacción de BAF con proteínas LEM, esta proteína regula la expresión de genes específicos, muchos de los cuales interactúan directamente con reguladores transcripcionales. La presencia de BAF junto al complejo de proteínas LEM puede contribuir a la represión génica a través del dominio de unión de ADN presente en BAF (Margalit *et al.*, 2007). Este dominio, junto su capacidad de unión a la cola de H3, podría explicar como BAF esta involucrado en la formación de heterocromatina (Montes de Oca *et al.*, 2005). Estudios en *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* mostraron la importancia de BAF en el proceso de desarrollo. Se ha demostrado que la delección del gen *BANF1* en *Drosophila* homocigotas y el silenciamiento de *BANF1* por ARN de interferencia en *C. elegans* causa una temprana muerte del embrión (Furukawa *et al.*, 2003; Gorjánácz *et al.*, 2007). Al nivel celular, la delección de BAF muestra una envoltura nuclear con defectos, con deslocalización de las laminas y las proteínas de la membrana nuclear interna. También, se ha visto que la expresión de una BAF mutada es incapaz de unirse al ADN, bloquea el reclutamiento de proteínas LEM e inhibe el ensamblaje de estas proteínas y la lamina A en la envoltura nuclear, en cambio la lamina B no es afectada (Margalit *et al.*, 2005).

Hipótesis de trabajo

La metilación del DNA participa en el silenciamiento transcripcional de genes con actividad supresora tumoral vinculados a síndromes progeroides.

Objetivos generales

Caracterizar el perfil de metilación en la región promotora de los genes *lamina A/C*, *WRN* y *BANF1*, asociados con síndromes progeroides y con relevancia en cánceres humanos.

Objetivos específicos

Caracterizar el perfil de metilación para *lamina A/C* y *WRN* en líneas celulares aun no analizadas para estos genes.

Buscar en un panel de diversas líneas tumorales humanas el perfil de metilación para el gen *BANF1*.

Materiales y métodos

En el presente estudio se examinó 58 líneas celulares de cáncer humano provenientes de 13 tipos tumorales. Se prosiguió con el cultivo de 6 líneas de mieloma y 3 líneas de neuroblastoma, con el objetivo de extraer su ADN. Muestras de ADN de las 49 líneas tumorales restantes fueron proporcionadas por el laboratorio.

Cultivo celular

Las líneas celulares de mieloma, U266B1, GMO1312, GMO1500, GMO2132, GMO4672 y GMO6923 fueron cultivadas en RPMI con 10% FCS, 1% L-Glutamina, 1% de Penicilina- estreptomicina, 1% de amino ácidos no esenciales, 1% de 100x fungisona. Las líneas celulares de neuroblastoma, SK-N-DZ, SK-N-SH y LAN-1, fueron cultivadas en DMEM alto en glucosa con 10% FCS, 1% L-Glutamina, 1% de Penicilina-estreptomicina, 1% de amino ácidos no esenciales, 1% de 100x fungisona (Tabla 1, apéndice).

Extracción de muestras, purificación y tratamiento del ADN

Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de sangre, para la realización de los controles, se realizó con el *Blood Genomic DNA kit* (Sigma), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El donante de sangre fue una persona joven y sana. La extracción de ADN a partir de las muestras de cultivos celulares se realizó incubándolas toda la noche a 55 °C, preferentemente con agitación, con una solución de 500 µl de *buffer* de lisis con 10 µl de proteinasa K [2,0] g/ml. Al día siguiente se agregó 200 µl NaCl 5M a la mezcla, donde se rescata el sobrenadante después de un vórtice y centrifugar a 4 °C durante 20 minutos a 13000 rpm. Al sobrenadante se le agrega 500 µl de isopropanol, prosiguiendo con un vórtice y centrifugar a 4 °C durante 20 minutos a 13000 rpm. Descartando el sobrenadante, se resuspende la fracción precipitada con 200 µl de EtoH 70%, realizando una última centrifugación a 4 °C durante 20 minutos a 13000 rpm. Finalmente al ADN se lo resuspende en TE 1x por agitación durante 30 minutos a 20 °C.

Se prosigue a realizar la purificación de este ADN obtenido de nuestros cultivos celulares. Cada 500 µl de ADN se añade 500 µl de fenol:cloroformo isofenilalcohol, seguido por vórtices hasta que la mezcla tome una coloración blanca. Prosiguiendo al rescate de la fase acuosa después de una centrifugación a 4 °C durante 3 minutos a 13000 rpm. A esta fase acuosa se le añade 500 µl de ADN, 50 µl de acetato de sodio 3M, 300 µl de isopropanol y 1 µl de glucogeno, después de un vórtice se centrifuga a 4 °C durante 30 minutos a 13000 rpm. Finalmente, se descartando el sobrenadante y se lava la fracción precipitada con 200 µl de EtoH 70%, realizando

una última centrifugación a 4 °C durante 20 minutos a 13000 rpm. Acabando con la resuspensión del ADN con TE 1× por agitación durante 30 minutos a 20 °C.

Una fracción de la muestra de ADN extraída de sangre fue sometida al tratamiento de metilación para la realización de nuestro control positivo. El protocolo consistió en que por cada 50 µg de ADN en 50 µl de H₂O [1 µg/µl] se le añadió 25 µl buffer NEB 10× 2.5 µl SAM y 12.5 µl SSI (*STAT-induced STAT inhibitor*), y se lo deja incubar durante 4 horas a 37 °C. Después de transcurridas estas 4 horas, se le adicionó 5 µl de SAM y 6.25 µl de SSI, permitiendo otras 4 horas de incubación a 37 °C. Finalmente se prosiguió con la purificación de ADN y modificación por bisulfito.

Modificación por bisulfito

La modificación por bisulfito induce la conversión química del ADN no metilado, desaminando las citosinas del DNA convirtiéndolas en uracilo, mientras que el ADN metilado permanece inalterado. La base del método es que el bisulfito por sus propiedades físico-químicas no actúa sobre las 5mC. Esta reacción fue realizada con los *kit* de *Qiagen (EpiTect® Bisulfito Handbook)* o el *kit* de *Sigma (Imprint® DNA Modification Kit)*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras de ADN utilizadas procedieron de nuestro control positivo (ADN extraído de sangre y modificado con el tratamiento de metilación), control negativo (ADN extraído de sangre sin el tratamiento), las líneas de mieloma y neuroblastoma cultivadas. Además de un *set* de 49 muestras de ADN pertenecientes a líneas de cáncer de pulmón (H1264, H2170, H1437, NCIH441, H157, H1975, H1299, DMS114, CALU3, SHP77P1, H524 y TERA2), cáncer de mama (HCC38, UACC3199, T47D, HDA-MB436, MCF10A, UACC812, MCF-7 y 468PT), leucemia (HMEC, MOLT16 y MOLT4) neuroblastomas y glioblastomas (SKNBE, IMR32, KPNYN, U87MG, LM229 Y SKNF1) cáncer de colon (RHO, SW48, COCO205, HCT116, LOVO, SW62C, SW480, COCO 824, CACO2, CO115, KM12C y DCD-1), cáncer de cérvix (C4I y HELA), cáncer de útero (SKUT1B), cáncer de hígado (HepG2 y SNU354), cáncer de próstata (DU145), cáncer de piel (A43INS), carcinoma gástrico (Kat0III) (Tabla 1, apéndice).

Análisis del estado de metilación

Mediante el uso de PCR específica de metilación (MSP), es posible identificar metilación en ICG del ADN genómico. La conversión química por medio de bisulfito de todo el ADN no metilado, pero no del ADN metilado, permite la subsecuente amplificación del ADN por medio de cebadores específicos para ADN metilado y ADN no metilado. Esta PCR de ADN rico en dinucleótidos CpG requiere el uso de controles positivos y negativos, ADN metilado (ADN metilado *in vitro*) y ADN no metilado (proveniente de tejido normal), respectivamente. Es importante destacar que esta técnica únicamente nos informa el estado de metilación de los sitios CpG comprendidos dentro de los cebadores diseñados (Bock, 2012; Esteller, 2007). Las

ICG de los genes estudiados fueron identificadas con el programa *Methyl Primer Express® Software*, siendo éste también utilizado para el diseño de los cebadores.

Por medio de MSP se analizó el estado de metilación para *BANF1*, *WRN* y *lamina A/C*. Para el caso de *BANF1* se realizó un escaneo de todas las líneas celulares, utilizando para la reacción no metilada los siguientes cebadores: 5'- AAT ATA GTA AAG GAA TTT GTT GGT -3' (sentido) y 5'- ACA ATT TTC AAA AAA ATC AAA CT -3' (antisentido) y para la reacción metilada los cebadores: 5'- ATA GTA AAG GAA TTT GTC GGC -3' (sentido) y 5'- ACG ATT TTC GAA AAA ATC AA -3' (antisentido). Las condiciones de la reacción de MSP para *BANF1* consistieron en una activación de 5 minutos a 95 °C segundos por 39 ciclos: 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, un minuto de *annealing* a 48 °C y 40 segundos de elongación a 72 °C, y 10 minutos a 72 °C para la elongación final.

En lo que respecta para *WRN* el estudio se realizó en las líneas de mieloma, siendo 5'- GTA GTT GGG TAG GGG TAT TGT TTG T -3' (sentido) y 5'- AAA CAA AAT CCA CCA CCC ACC CC -3' (antisentido) los cebadores utilizados para la reacción no metilada y 5'- CGG GTA GGG GTA TCG TTC GC -3' (sentido) y 5'- AAC GAA ATC CAC CGC CCG CC -3' (antisentido) los cebadores para el caso de la reacción metilada. Las condiciones de la reacción de MSP para *WRN* consistieron en una activación de 5 minutos a 95 °C seguido por 39 ciclos: 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, un minuto de *annealing* a 55 °C y 40 segundos de elongación a 72 °C, y 10 minutos a 72 °C para la elongación final.

Finalmente, en el caso del gen *lamina A/C* el estudio fue realizado para las líneas de mieloma, neuroblastoma y glioblastoma. La reacción de MSP para *lamina A/C* se utilizaron los cebadores 5'- AGG ATT TAT TAG AGT TTT TGT TTT GGT GTT -3' (sentido) y 5'- CAA AAT ACA CCA ACC AAC TAA CTC TCA -3' (antisentido) en la reacción no metilada y los cebadores 5'- TTA TTA GAG TTT TTG TTT CGG CGT C -3' (sentido) y 5'- CGC CGA CCG ACT AAC TCT CG -3' (antisentido) para la reacción metilada. Mientras que las condiciones consistieron en una activación de 5 minutos a 95 °C seguido por 39 ciclos: 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, un minuto de *annealing* a 54 °C y 40 segundos de elongación a 72 °C, y 10 minutos a 72 °C para la elongación final. Los productos de las MSP fueron cargados para una corrida electroforética en un gel de agarosa 2.5% teñido con BrEt y el resultado fue visualizado por medio del transiluminador UV y documentándolos con GeneSnap de SynGene.

PCR de secuenciación dependiente de bisulfito (BSP) es necesaria para examinar el patrón global de metilación de las ICG estudiadas, dado que los patrones generales de metilación no necesariamente están reflejados en los resultados obtenidos de la MSP. Esta técnica se utiliza para la amplificación de la región promotora que queremos estudiar. El siguiente paso consiste en la clonación de nuestro ADN amplificado y su posterior secuenciación. Finalmente, al analizar las secuencias se podrá ver que las citosinas que estuviesen metiladas aparecerán como

tales, mientras que en las no metiladas serán sustituidas por una timina (Bock, 2012; Esteller, 2007).

El análisis por la técnica BSP se realizó para la *lamina A/C* en la línea celular SK-N-DZ y SK-N-SH. Con los cebadores 5'- GAG GAG GAT TTA TTA GAG TTT TT -3' (sentido) y 5'- ATC ATT AAA CTC CTA CAA ATC C -3' (antisentido), y con un ciclo de activación de 5 minutos a 95 °C seguido por 39 ciclos: 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, un minuto de *annealing* a 50 °C y 40 segundos de elongación a 72 °C, y 10 minutos a 72 °C para la elongación final.

Los productos de las BSP fueron cargados para una corrida electroforética en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las bandas de interés fueron extraídas y transferidas a su respectivo tubo eppendorf. Se prosiguió a la purificación del ADN del gel de agarosa con el *PureLink™ Quick Gel Extraction kit* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En todos las reacciones de PCR se realizó con una solución final de 25 µl conteniendo 2,5 µl de 10× PCR *buffer*, 0,75 µl de 25mM MgCl₂, 0,5 µl de 10 mM dNTP, 1,25 µl de cada primer (1 ηM/l) y 0,125 µl de 2 U FastStart Taq DNA polimerasa.

Protocolo de clonación

Se prosiguió a clonar las muestras de ADN obtenidas de la purificación a partir de las bandas extraídas. La técnica de clonación se realizó utilizando para la ligación el *p-GEM-T Easy Vector Systems* (Promega), prosiguiendo con el protocolo de ligación sugerido por el fabricante.

Al día siguiente se procedió a precipitar el DNA, donde a los 10 µl de la mezcla de ligaciones se le añadió 2 µl de ARNt (20 µg/ml), 1 µl de NaAc 3M pH 5.2 y 8 µl de isopropanol, dejándola incubar por 30 minutos a 4 °C. Después de una centrifuga por 30 minutos a 13000 rpm a 4 °C, se descarta el sobrenadante, seguido de un lavado de la fracción precipitada con EtoH 70%. Se realiza una última centrifugación por 5 minutos a 13000 rpm a 4 °C, para finalmente resuspender con TE, por agitación a 20 °C.

En la zona estéril para cultivo bacterial se inicia la transformación de las células JM109 electrocompetentes. Se extraen placas de cultivo LB con ampicilina, a las que se le añade uniformemente a cada una X-Gal/ IPTG. A cada vial de células JM109 se le añadió 5 µl del ADN de la reacciones de ligación de su respectiva muestra. Se trasfiere la mezcla de las células JM109 y el ADN a una cuba de electroporación fría, una vez en el electroporador se procede a dar 2 pulsos de 2500. Se añade a cada cuba una medio LB a temperatura ambiente, finalmente se plaquea cada muestra en sus respectivas placas de LB con ampicilina y X-Gal/ IPTG y se incuban toda la noche en la estufa de 37 °C.

Al día siguiente, en la zona estéril, se procede a la selección de colonias. Se preparan 5 tubos de 15 ml con 5 ml de LB con ampicilina para cada muestra. Se

pican las 5 colonias blancas individuales de las placas, pasándolas al medio líquido de su correspondiente tubo rotulado. Finalmente se deja incubar a 37 °C con agitación por una noche.

Obtención del ADN plasmídico

Se realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico con el *kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)*, donde se siguieron las especificaciones del fabricante. Las muestras fueron llevadas a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur de Montevideo.

Tratamiento con 5-Aza-2'-dedoxicitidina

La línea celular SK-N-DZ fue expuesta al tratamiento con el agente desmetilante 5-Aza-2'-dedoxicitidina (AZA) a diferentes concentraciones (10 µM, 20 µM, 30 µM, y 40µM). De este procedimiento se obtuvieron muestras para el análisis a nivel ARN y proteico. Para el análisis por inmunofluorescencia las células fueron cultivadas en portaobjetos. En el caso de la extracción de ARN, se cultivó nuestra línea celular de interés en placas de cultivo. Cuando los cultivos celulares presentaron aproximadamente un 50% de confluencia, se prosiguió a extraer el medio seguido por un lavado con PBS 1× y se le añadió medio nuevo. Posteriormente se prosiguió a elegir y rotular las placas que corresponderían al control negativo, estas placas no se les suministró ninguna dosis de AZA. A las placas de cultivo tratadas se les añadieron diferentes dosis de AZA al medio de cultivo, finalmente formando los grupos de muestra 10 µM, muestra 20 µM, muestra 30 µM y muestra 40µM. Después de la primera dosis se deja reposar en la estufa de cultivo por 24 horas.

Finalizado el primer día, se vuelve a añadir la misma dosis correspondiente a cada grupo de muestra y se lo deja reposar otras 48 horas en la estufa de cultivo. Al cumplirse las 48 horas se prosigue al procesamiento de las muestras.

Extracción de ARN total

El aislamiento del ARN total a partir de los controles y las muestras tratadas con diferentes concentraciones de AZA se realizó por medio del método de extracción fenólica con TRIzol (*Reagent® Invitrogen™ Life Technologies*) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante.

RT-PCR

La retrotranscripción se realizó utilizando el *OneTaq RT-PCR kit (New England Biolabs)*, donde se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante. Para el estudio de la lamina A (LMNA) se usaron los cebadores 5'- ATG GAG ACC CCG TCC CAG -3' y 5'- TTA CAT GAT GCT GCA GTT CTG G -3', y en el caso de la lamina C (LMNC) 5'- GAG ATG ATC CCT TGC TGA -3' y 5'- GTT CCA AAA CAT TCT TTA ATG -3'. Los cebadores de las RT-PCR fueron diseñados entre diferentes exones, que estaban separados por largos intrones para evitar la amplificación del ADN genómico. La PCR

de la LMNA consistió en un tiempo de activación de 5 minutos a 94 °C seguido por 30 ciclos: 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de *annealing* a 53 °C y un minuto y medio de elongación a 72 °C, y 10 minutos a 72 °C para la elongación final. En la PCR de la LMNC, la activación fue de 5 minutos a 94 °C seguido por 30 ciclos: 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de *annealing* a 53 °C y 30 segundos de elongación a 72 °C, y 10 minutos a 72 °C para la elongación final.

GAPDH fue usado como el control interno para asegurar la correcta carga y calidad del ADNc.

Los productos de la RT-PCR fueron cargados para una corrida electroforética en un gel de agarosa 3% teñido con BrEt. El resultado fue visualizado y documentándolo en GeneSnap de SynGene

Análisis con inmunofluorescencia

Las células cultivadas en los portaobjetos, después del tratamiento con AZA fueron lavadas con PBS 1× para limpiar todo el medio de cultivo. Luego, fueron fijadas usando PFA 4% por 10 minutos, seguido por un lavado de PBS 1×. Se prosiguió con la permeabilización de 5 minutos con *buffer* citrato, seguido por otro lavado con PBS 1×. Posteriormente, se protegió a incubar las células con 5% BSA en PBS-T por 30 minutos, para bloquear las señales de fondo. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario policlonal producido en conejo anti-lamina A/C (1/100, Sigma), durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente se realizan 2 lavados con PBS-T, seguido por una incubación de una hora con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 producido en cabra anti-IgG de ratón (1/500, Santa Cruz Biotechnology), temperatura ambiente. Se prosiguió con un lavado con PBS-T, seguido por una incubación por 5 minutos con DAPI en PBS-T (dilución 1/15), para finalmente lavar con PBS y montar con vectashield.

Resultados

Análisis del estado de metilación de las ICG en el promotor asociado al gen *BANF1* en un panel de diferentes líneas tumorales

BANF1 es un gen candidato para la inactivación por hipermetilación en cáncer humano dado que al observar la secuencia de su región promotora se puede ver que presenta ICG localizadas en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción del gen. Mediante la técnica MSP se analizó el estado del promotor del gen en 58 líneas de cáncer humano provenientes de 15 tipos de cánceres. En la figura 2 se puede observar que se encontró metilación en la región promotora del gen *BANF1* en nueve líneas de cáncer de pulmón (NCI-H1264, CRL-2170, NCI-H1437, NCI-H441, NCI-H157, NCI-H1975, NCI-H1299, Calu-3 y SHP-77). Mientras que en las líneas de cáncer de pulmón DMS-114 y NCI-H524 no se detectó metilación.

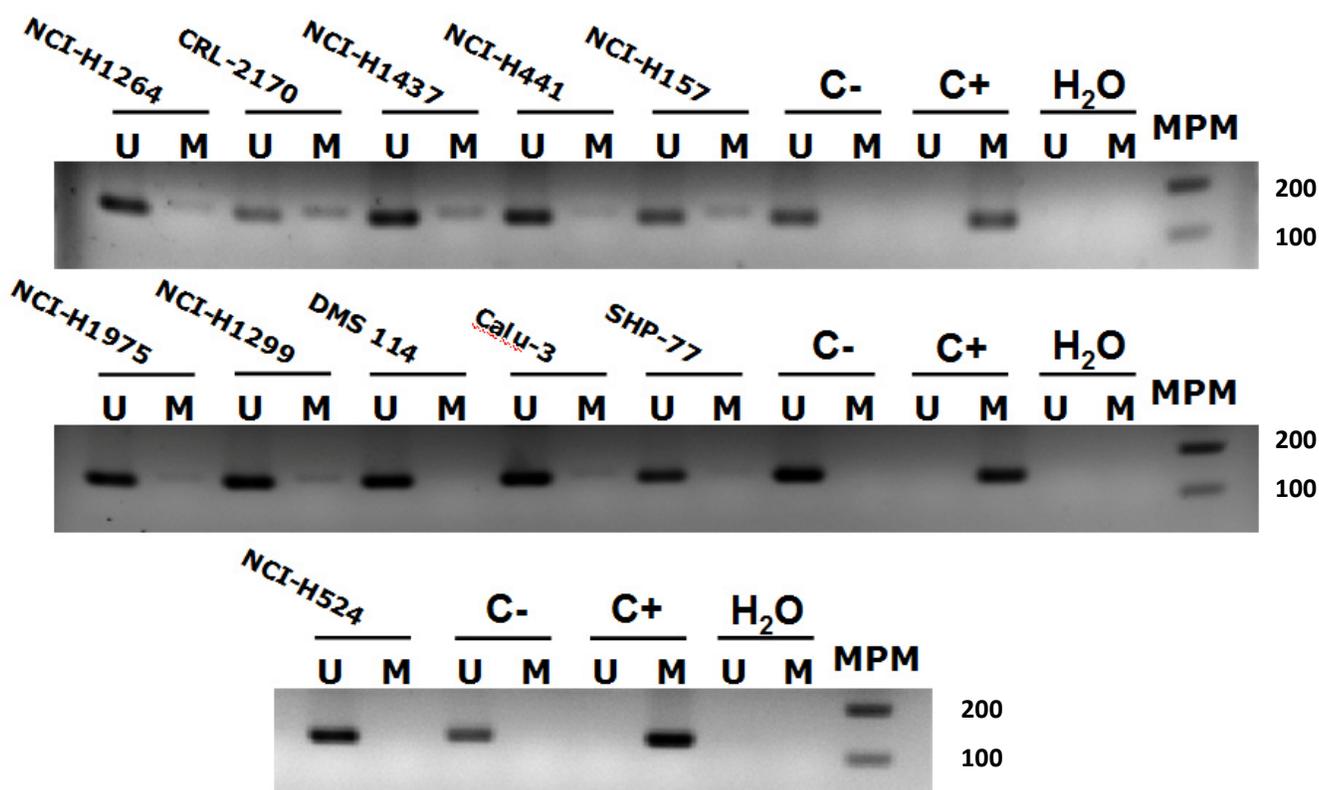


Figura 2. MSP para el gen de *BANF1* en líneas celulares de cáncer de pulmón humano. La columna de metilación esta representada con M y la columna de no metilación esta representado con U. El control negativo (C-) corresponde a ADN de linfocitos normales y el control positivo (C+) corresponde a ADN metilado *in vitro*. C- y C+ son utilizados como controles para la reacción de no metilación y metilación, respectivamente. Se observa metilación en las líneas celulares NCI-H1264, CRL-2170, NCI-H1437, NCI-H441, NCI-H157, NCI-H1975, NCI-H1299 y Calu-3. A la derecha se encuentra el marcado de peso molecular (MPM).

Análisis del estado de metilación de las ICG en el promotor asociado al gen *WRN* en líneas de mieloma

En estudios anteriores se analizó el estatus de metilación para *WRN* en un gran panel de diferentes tipos de líneas tumorales, encontrándose hipermetilación en diferentes líneas tumorales (Agrelo *et al.*, 2006). Sin embargo en ese estudio no fueron incluidas las líneas de mieloma. En este trabajo se estudió el estado de metilación para *WRN* en seis líneas de mieloma, donde se evidenció que las ICG, para este gen en estas líneas tumorales no están metiladas (no se muestran resultados).

Análisis del estado de metilación de las ICG en el promotor asociado al gen *Lamina A/C*

El estado de metilación para la ICG localizada en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción de la *lamina A/C* ha sido estudiado en un gran panel de diferentes tipos de líneas tumorales (Agrelo *et al.*, 2005), el cual no incluía líneas de neuroblastoma, glioblastoma y mieloma. Mediante la MSP se encontró hipermetilación en la línea de neuroblastoma SK-N-DZ. Sin embargo no encontramos hipermetilación en las ICG de la región promotora de la *lamina A/C* en las otras 4 líneas de neuroblastomas, ni en las 2 líneas de glioblastomas y 6 líneas de mielomas estudiadas (Figura 3A).

Por interés de la línea de investigación del laboratorio se prosiguió a la confirmación de la metilación observada en la MSP para SK-N-DZ por medio de la técnica BSP. Se examinó la ICG en el promotor de *lamina A/C* en las líneas celulares de neuroblastoma SK-N-DZ y SK-N-SH, utilizándose esta última como un control de no metilación. A través del cromatograma obtenido se confirmó el estado de hipermetilación para la línea SK-N-DZ y el estado de no metilación para SK-N-SH (Figura 3B).

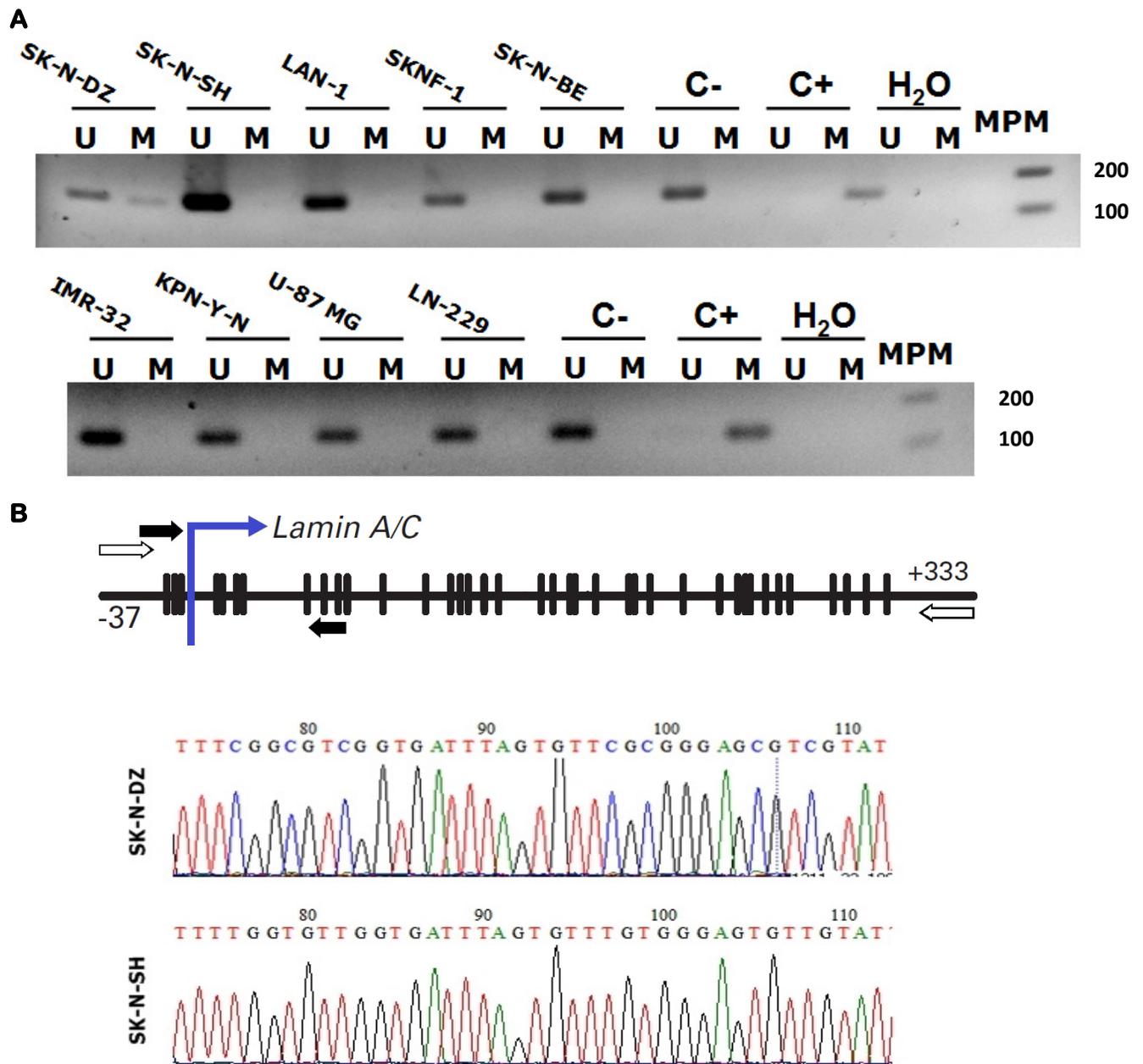


Figura 3. Análisis del estado de metilación de la isla CpG en el promotor de la *lamina A/C* en líneas celulares de neuroblastoma y glioblastoma humano A) MSP para el gen de *lamina A/C*. La columna de metilación esta representada con M y la columna de no metilación esta representado con U. El control negativo (C-) corresponde a ADN de linfocitos normales y el control positivo (C+) corresponde a ADN metilado *in vitro* son utilizados como controles para la reacción de no metilación y metilación, respectivamente. Se observa metilación en la línea celular SK-N-DZ. A la derecha se encuentra el marcado de peso molecular (MPM). (B) Descripción esquemática de la isla CpG próxima al sitio de inicio de la transcripción de la *lamina A/C* (flecha azul). Los dinucleótidos CpG están representados por líneas verticales. La localización de los cebadores de MSP están indicados con flecha negra y los cebadores de BSP están indicados con flecha blanca. Ejemplo representativo del cromatograma obtenido con la técnica BSP para las líneas de neuroblastoma SK-N-DZ y SK-N-SH.

Análisis de la expresión del gen *lamina A/C* en la línea de SK-N-DZ

Al descubrir el estado de hipermetilación en el promotor de la *lamina A/C* en la línea celular SK-N-DZ, se procedió a evaluar la asociación entre esta aberración epigenética y la posible inactivación transcripcional del gen *lamina A/C* a nivel del ARN y de las proteínas (Figura 4 A y B). Con la finalidad de determinar esta asociación, primero se realizó un tratamiento al cultivo celular con un agente desmetilante (AZA), como se describió en materiales y métodos, donde cada muestra que se sustrajo fue preparada para un análisis RT-PCR, con cebadores específicos. Observamos que la línea celular SK-N-DZ sin tratar con el agente desmetilante, no expresa el transcrito de la lamina, mientras que la misma línea expuesta al tratamiento con AZA reactiva la expresión del gen de la lamina con el incremento de la dosis (Figura 4A).

El análisis de la expresión proteica se hizo por medio de inmunofluorescencia. Conformándose la relación entre la pérdida de expresión de las isoformas de la lamina A/C con la hipermetilación en la ICG del promotor del gen *lamina A/C*. En la línea celular SK-N-DZ sin el tratamiento con AZA no muestra tinción para lamina A/C, mientras que la misma línea celular expuesta al tratamiento de AZA presenta la tinción característica para la lamina A/C (Figura 4B).

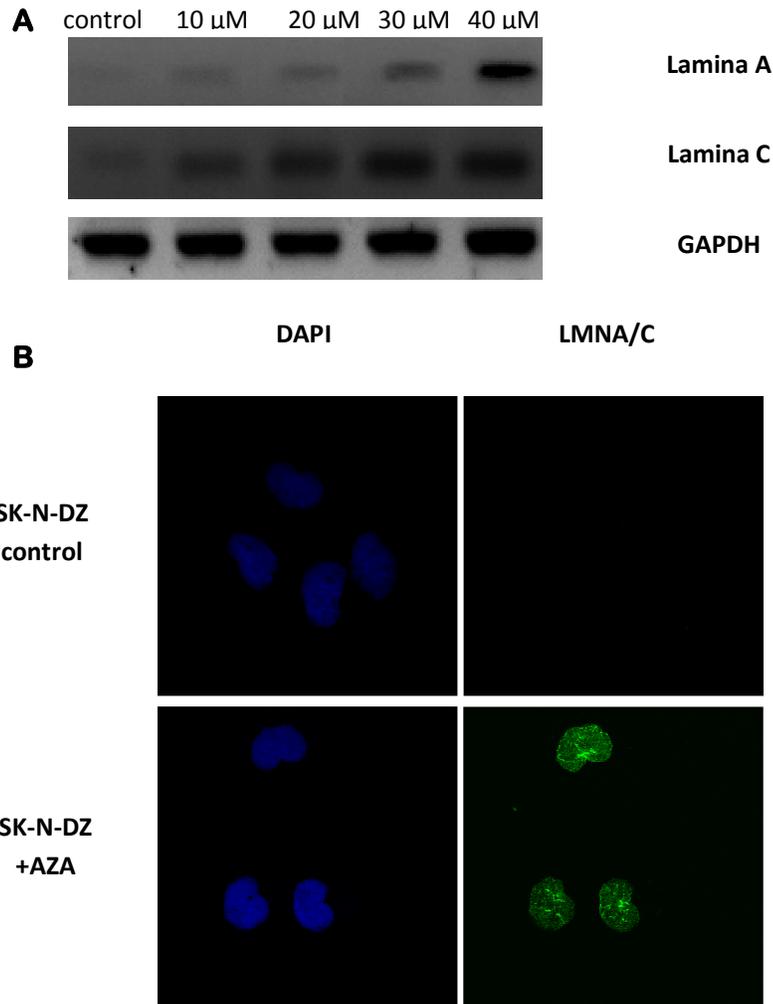


Figura 4. Correlación entre la metilación de la ICG del gen lamina A/C en la línea celular SK-N-DZ con la expresión del gen. (A) Análisis de la expresión de la lamina A/C por RT-PCR. La línea celular SK-N-DZ sin el tratamiento con el agente desmetilante (AZA) no expresa los transcritos de la lamina A y C. Sin embargo con el tratamiento de AZA se produce una reactivación de la expresión del transcritos de la lamina A y C en la línea celular SK-N-D-Z. Como control de carga se muestra la expresión de GAPDH. (B) Análisis de la expresión de la lamina A/C por inmunofluorescencia. La línea celular SK-N-DZ sin el tratamiento no muestra ninguna tinción para las proteínas de LMNA/C. Sin embargo, con el tratamiento se visualiza la característica tinción de la LMNA/C. DAPI es utiliza como marcador del ADN nuclear.

Discusión

BANF1 codifica la proteína BAF, esta proteína altamente conservada está mayoritariamente concentrada en la envoltura nuclear (Margalit *et al.*, 2007). La mutación en el gen *BANF1*, en estado de homocigosis, es responsable de NGPS (Cabanillas *et al.*, 2011). BAF se encuentra involucrada en la regulación en la infección de retrovirus, el ensamblaje nuclear, la progresión del ciclo celular, procesos en el desarrollo e incluso la expresión génica (Margalit *et al.*, 2007). La interacción de BAF con proteínas LEM, permite la regulación de la expresión de genes específicos, muchos de los cuales interactúan directamente con reguladores transcripcionales, lo cual puede contribuir a la represión génica a través de su actividad de puente al ADN. Se ha observado que mutaciones *en BANF1* genera una BAF incapaz de unirse al ADN, bloqueando el reclutamiento de proteínas LEM e inhibiendo el ensamblaje de estas proteínas y lamina A en la envoltura nuclear (Margalit *et al.*, 2007).

Al analizar la secuencia localizadas en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción del gen *BANF1*, se lo consideró como un posible candidato para la inactivación por hipermetilación en cáncer humano, por la presencia de ICG en su promotor. En el presente trabajo analizamos el estado de metilación, no descrito previamente para este gen, en 58 líneas de cáncer humano provenientes de 13 tipos tumorales. Identificamos metilación aberrante en la región promotora del gen de *BANF1* en ocho líneas de cáncer de pulmón (Figura 2).

En futuros estudios, este descubrimiento tendría que ser confirmado por la técnica de BSP, además de analizar una posible correlación entre la expresión de *BANF1* y la hipermetilación aberrante en su promotor. Asimismo, si se llegará a comprobar dicha correlación sería interesante indagar la agresividad del cáncer de pulmón en relación a la expresión de *BANF1*.

Las laminas tipo A y laminas tipo B son los principales filamentos intermedios que constituyen la delgada red ortogonal de filamentos que subyacen en la cara interna de la membrana nuclear, proveyendo un soporte estructural a la envoltura nuclear. Laminas tipo B se encuentran mayoritariamente representadas por laminas B₁ y B₂, las cuales derivan de dos genes separados (Davies *et al.*, 2011). Entre las laminas tipo A están incluidas laminas A, C, C₂ y AΔ10, siendo lamina A y C las más abundantes. Estas dos isoformas son el resultado del empalme alternativo del ARN del gen *lamina A/C* (Davies *et al.*, 2011). Estudios previos han evaluado la correlación de metilación de la *lamina A/C* con la expresión al nivel proteico y ARN en varios tipos de cáncer humano, confirmándose hipermetilación aberrante en la el promotor de la *lamina A/C* en neoplasias hematológicas (Agrelo *et al.*, 2005).

En este trabajo se analizó el estatus de metilación de la *lamina A/C* en 6 líneas de mielomas, 2 líneas de glioblastoma y 5 líneas de neuroblastoma, estos tipos

tumorales no habían sido incluidos en el artículo de Agrelo et al (2005). A partir de estas 11 líneas tumorales estudiadas para el gen *lamina A/C*, solamente identificamos hipermetilación en la línea de neuroblastoma SK-N-DZ (Figura 3A). Por medio de la técnica BSP se confirmó este caso de hipermetilación aberrante (Figura 3B). La hipermetilación de la ICG del gen *lamina A/C* resulta en la pérdida de la expresión, tanto a nivel ARN (Figura 4A) como proteico (Figura 4B). Este silenciamiento se puede revertir por medio del suministro del agente desmetilante AZA, restableciendo la expresión (Figura 4).

Las laminas tipo A son consideradas como los “guardianes del soma” por 2 funciones esenciales. Primero, su rol de soporte estructural a la envoltura nuclear que protege a la cromatina y segundo, por su papel en la regulación de la transcripción genética (Hutchison & Worman, 2004). La pérdida funcional de las laminas tipo A compromete ambas funciones, generando en varios tejidos degeneración y pérdida de posibilidad de una regeneración normal, que puede llegar en algunos casos hasta la muerte (Butin-Israeli *et al.*, 2012).

En futuras investigaciones sería indispensable evaluar la relación entre el silenciamiento por hipermetilación aberrante de la *lamina A/C* y la agresividad de la línea de neuroblastoma SK-N-DZ. Además de evaluar como responde la tasa de crecimiento e invasión de este neuroblastoma al restaurar la expresión de las laminas tipo A.

La metilación del ADN induce inactivación de genes supresores tumorales en varios tipos de cáncer, siendo éste uno de los factores contribuyentes al desarrollo y la progresión del cáncer. Es importante estudiar la relevancia de la metilación de estos genes en la oncogénesis y su potencial utilización como diana terapéuticas.

En conclusión, este trabajo demuestra la presencia de metilación aberrante en el gen *BANF1* en líneas de cáncer de pulmón. La línea de neuroblastoma SK-N-DZ presenta hipermetilación en el promotor del gen *lamina A/C*, lo que implica el silenciamiento de éste a nivel ARN y proteico. Restableciéndose la expresión tanto a nivel ARN como proteico con el tratamiento con el agente desmetilante AZA.

Bibliografía

Agrelo, R., Cheng, W.-H., Setien, F., Ropero, S., Espada, J., Fraga, M. F., Herranz, M., Paz, M. F., Sanchez-Cespedes, M., Artiga, M. J., Guerrero, D., Castells, A., Kobbe, C. Von, Bohr, V. A., & Esteller, M. (2006). Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(23), 8822–8827.

Agrelo, R., Setien, F., Espada, J., Artiga, M. J., Rodriguez, M., Pérez-Rosado, A., Sanchez-Aguilera, A., Fraga, M. F., Piris, M. A., & Esteller, M. (2005). Inactivation of the Lamin A/C Gene by CpG Island Promoter Hypermethylation in Hematologic Malignancies, and Its Association With Poor Survival in Nodal Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(17), 3940–3947.

Bertrand, A. T., Chikhaoui, K., Yaou, R. Ben, & Bonne, G. (2011). Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochemical Society Transactions*, *39*(6), 1687–92.

Bock, C. (2012). Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nature Reviews Genetics*, *13*(10), 705–719.

Butin-Israeli, V., Adam, S. a., Goldman, A. E., & Goldman, R. D. (2012). Nuclear lamin functions and disease. *Trends in Genetics*, *28*(9), 464–471.

Cabanillas, R., Cadiñanos, J., Villameytide, J. a F., Pérez, M., Longo, J., Richard, J. M., Álvarez, R., Durán, N.S., Illán, R., González, D.J. & López-Otín C. (2011). Néstor-Guillermo progeria syndrome: A novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *155*(11), 2617–2625.

Davies, B. S. J., Coffinier, C., Yang, S. H., Jung, H.-J., Fong, L. G., & Young, S. G. (2011). Posttranslational Processing of Nuclear Lamins. In *The enzymes. Protein Prenylation, Part 1* (Vol. XXIX, pp. 21–41).

Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, *21*(35), 5427–5440.

Esteller, M. (2005). Aberrant Dna Methylation As a Cancer-Inducingmechanism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *45*, 629–56.

Esteller, M. (2007). Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *British Journal of Cancer*, *96 Suppl*, R26–R30.

Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, *358*(11), 1148-1159.

Furukawa, K., Sugiyama, S., Osouda, S., Goto, H., Inagaki, M., Horigome, T., Omata, S., McConnell, M., Fisher, P. A. & Nishida, Y. (2003). Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in Drosophila. *Journal of Cell Science*, *116*(18), 3811–3823.

- Gorjánác, M., Klerkx, E. P. F., Galy, V., Santarella, R., López-Iglesias, C., Askjaer, P., & Mattaj, I. W. (2007). Caenorhabditis elegans BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *The EMBO Journal*, 26(1), 132–43.
- Hutchison, C. J., & Worman, H. J. (2004). A-type lamins: guardians of the soma? *Nature Cell Biology*, 6(11), 1062–7.
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 13(7), 484–92.
- Kulis, M. & Esteller, M. (2010). DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics*, 70(2), 27-56.
- Margalit, A., Brachner, A., Gotzmann, J., Foisner, R., & Gruenbaum, Y. (2007). Barrier-to-autointegration factor - a BAffling little protein. *Trends in Cell Biology*, 17(4), 202–208.
- Margalit, A., Segura-Totten, M., Gruenbaum, Y., & Wilson, K. L. (2005). Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(9), 3290–3295.
- McCabe, M. T., Brandes, J. C. & Vertino, P. M. (2009). Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research*, 15(12), 3927-3937.
- Montes de Oca, R., Lee, K. K., & Wilson, K. L. (2005). Binding of barrier to autointegration factor (BAF) to histone H3 and selected linker histones including H1.1. *J. Biol. Chem.*, 280(51), 42252–62.
- Pichierri, P., Ammazalorso, F., Bignami, M., & Franchitto, A. (2011). The Werner syndrome protein: linking the replication checkpoint response to genome stability. *Aging*, 3(3), 311–8.
- Rossi, M. L., Ghosh, A. K. & Bohr, V. A. (2010). Roles of Werner Syndrome Protein in Protection of Genome Integrity. *DNA Repair*, 9(3), 331-344.
- Shen, J. C., & Loeb, L. a. (2001). Unwinding the molecular basis of the Werner syndrome. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(9), 921–944.
- Musich, P. R., & Zou, Y. (2011). DNA-damage accumulation and replicative arrest in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Biochemical Society Transactions*, 39, 1764–1769.
- Tost, J. (2010). DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker. *Molecular Biotechnology*, 44(1), 71–81.
- Worman, H. J. (2012). Nuclear lamins and laminopathies. *Journal of Pathology*, 226(2), 316–325.

Apéndice

Búferes

Buffer de lisis

1M Tris (pH = 8.0)

0,5 EDTA (pH = 8.0)

5M NaCl

20% SDS

Llevar hasta 1 litro con H₂O

Buffer citrato

0.1% Na-citrato (0.5 g)

0.5 % Triton X100 (2.5 ml)

llevar a H₂O

EDTA (0.5M, pH=8.0)

186.1 g de EDTA disódico

800 ml de H₂O

ajustar pH=8.0 con NaOH

autoclavar y esterilizar por autoclave

LB medio

10 g tryptone

5 g yest extract

10 g de NaCl

1 ml de 1M NaCOH

Llevar a 1 litro y autoclavar

Dejar llegar ambiente antes de adicionar la ampicilina

LB cultivo

10 g tryptone

5 g yest extract

10 g de NaCl

15 g agar

1 ml de 1M NaCOH

Llevar a 1 litro y autoclavar

Adicionar la ampicilina y repartir en la planas de petri

Dejar solidificar y guardar en camara de 4 °C

Medio de congelación

FBS (suero fetal bovino)

10% de DMSO

PBS 10X

80 g NaCl

2g KCl

14.4 g NaHPO₄

2.4 g KH₂PO₄

800 ml de H₂O

ajustar PH con HCL

llevar hasta 1 litro con H₂O

filtrar

PBS-Tween (PBS-T)

PBS 1X

0.1% Tween

PFA 4%

40 g Paraformaldehyde

100 ml de PBS 10X

800 ml de H₂O

ajustar a pH=7.8 con NaOH

llevar hasta 1 litro con H₂O

TAE 50X

242 g de Tris base

57.1 ml de acido acético glacial

100 ml de 0.5 EDTA (pH=8.0)

TE 10X (Tris-EDTA), pH= 8.0

100 mM Tris-Cl (pH= 8.0)

10 mM EDTA (pH = 8.0)

Tris-Cl (1M)

121.1 g de Tris base

800 ml de H₂O

ajustar el pH por adicionar HCl concentrado

llevar hasta 1 litro

Lista de líneas celulares

Tabla 1. Listado de las líneas tumorales utilizadas en este trabajo, con los tratamientos realizados

Línea celular	Tipo tumoral	Tratamiento realizado
U266B1	mieloma	Cultivo en RPMI, extracción de ADN, modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> , <i>WRN</i> y <i>Lamina A/C</i>
GMO1312	mieloma	Cultivo en RPMI, extracción de ADN, modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> , <i>WRN</i> y <i>Lamina A/C</i>
GMO1500	mieloma	Cultivo en RPMI, extracción de ADN, modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> , <i>WRN</i> y <i>Lamina A/C</i>
GMO2132	mieloma	Cultivo en RPMI, extracción de ADN, modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> , <i>WRN</i> y <i>Lamina A/C</i>
GMO6923	mieloma	Cultivo en RPMI, extracción de ADN, modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> , <i>WRN</i> y <i>Lamina A/C</i>
GMO4672	mieloma	Cultivo en RPMI, extracción de ADN, modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> , <i>WRN</i> y <i>Lamina A/C</i>
SK-N-DZ	neuroblastoma	Cultivo en DMEM, extracción de ADN, modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> y <i>Lamina A/C</i> , BSP para el gen <i>Lamina A/C</i>
SK-N-SH	neuroblastoma	Cultivo en DMEM, extracción de ADN, modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> y <i>Lamina A/C</i> , BSP para el gen <i>Lamina A/C</i>
LAN-1	neuroblastoma	Cultivo en DMEM, extracción de ADN, modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> y <i>Lamina A/C</i>
SKNBE	neuroblastoma	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> y <i>Lamina A/C</i>
IMR32	neuroblastoma	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> y <i>Lamina A/C</i>
KPNYN	neuroblastoma	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> y <i>Lamina A/C</i>
U87MG	neuroblastoma	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> y <i>Lamina A/C</i>
LM229	neuroblastoma	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> y <i>Lamina A/C</i>
SKNF1	neuroblastoma	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los genes <i>BANF1</i> y <i>Lamina A/C</i>
H1264	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
H1299	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
DMS114	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
CALU3	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>

SHP77P1	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
H524	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
TERA2	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
H1975	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
H157	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
NCIH441	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
H1437	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
H2170	pulmón	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
HCC38	cáncer de mama	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
UACC3199	cáncer de mama	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
T47D	cáncer de mama	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
HDA-MB436	cáncer de mama	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
MCF10A	cáncer de mama	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
UACC812	cáncer de mama	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
MCF-7	cáncer de mama	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
468PT	cáncer de mama	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
HMEC	leucemia	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
MOLT16	leucemia	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
MOLT4	leucemia	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
RHO	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
SW48	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
COCO205	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
HCT116	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
LOVO	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
SW62C	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
SW480	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
COCO 824	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
CACO2	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
CO115	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
KM12C	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
DCD-1	cáncer de colon	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
C4I	cáncer de cérvix	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
HELA	cáncer de cérvix	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
SKUT1B	cáncer de útero	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
HepG2	cáncer de hígado	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
NU354	cáncer de hígado	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
DU145	próstata	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
A43INS	piel	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>
KatolIII	carcinoma gástrico	muestra de ADN; modificación con bisulfito, MSP para los gen <i>BANF1</i>