



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

cabimer
CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA MOLECULAR
& MEDICINA REGENERATIVA



Caracterización y función de *TDRD9* en carcinogénesis

Trabajo realizado en el Departamento de Biología del Genoma, CABIMER, para optar al grado de Doctora en Biología por la Licenciada Macarena Guijo Molero, siguiendo el programa de doctorado BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOMEDICINA E INVESTIGACIÓN CLÍNICA de la Universidad de Sevilla, y bajo la dirección del Doctor José Carlos Reyes Rosa.

Sevilla, Noviembre 2016

El director de la Tesis

Tutora de la Tesis

José Carlos Reyes Rosa

Rosa M^a Luna Varo

La Doctoranda

Macarena Guijo Molero

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	11
INTRODUCCIÓN	12
1. CROMATINA Y EPIGENÉTICA	15
2. METILACIÓN DEL DNA	16
2.1. Control de la metilación en el desarrollo	20
2.1.1. Reprogramación en la línea germinal	20
2.1.2. Reprogramación de la metilación en el embrión temprano	22
3. FUNCIONES Y ELEMENTOS REGULADOS POR METILACIÓN	23
3.1. Islas CpG (CGIs)	23
3.2. Repeticiones pericentroméricas	25
3.3. Elementos transponibles (TEs)	26
3.3.1. <i>LINE-1</i>	26
4. IMPLICACIÓN DE LA METILACIÓN DE DNA EN CÁNCER	27
4.1. Hipometilación en cáncer	27
4.2. Hipermetilación en cáncer	28
5. PIRNAS Y PROTEÍNAS PIWIS	29
6. TDRD9	33
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	45
1.1. Organismos	45
1.2. Condiciones de cultivo bacteriano	46
1.3. Condiciones de cultivo de levadura	46
1.4. Condiciones de cultivo de líneas celulares animales	46
2. OLIGONUCLEÓTIDOS Y PLÁSMIDOS	47
3. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA	48

Índice

3.1. Aislamiento de DNA plasmídico bacteriano	48
3.2. Aislamiento de DNA plasmídico de levaduras	49
3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	50
3.4. Purificación, cuantificación y secuenciación de DNA	50
3.5. Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa	50
3.6. Transformación de bacterias	51
3.7. Transformación de levaduras	51
3.8. Transfección transitoria de líneas celulares animales con DNA plasmídico	52
3.9. Aislamiento de DNA genómico de células animales	52
3.10. Manipulación enzimática	53
4. MANIPULACIÓN DEL RNA	53
4.1. Aislamiento y cuantificación del RNA de líneas celulares animales	53
4.2. Aislamiento y cuantificación del RNA de tejidos humanos	53
4.3. Reacción de retrotranscripción a partir de RNA seguido de amplificación de cDNA mediante PCR	54
4.4. Transfección de RNA de interferencia	54
5. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	55
5.1. Obtención de extractos proteicos de líneas celulares animales	55
5.2. Obtención de extractos de proteínas insolubles de líneas celulares animales	55
5.3. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida	56
5.4. Cuantificación de proteínas	56
5.5. Sistema de doble híbrido en levaduras	57
6. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS	58
6.1. Anticuerpos	58
6.2. Ensayo de Western Blot	59
6.2.1. Detección por quimioluminiscencia	59
6.2.2. Detección por fluorescencia	60
6.3. Inmunofluorescencia	60
7. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	61
8. ANÁLISIS DE CICLO CELULAR	62
8.1. Curvas de crecimiento	62
8.2. Análisis del ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo	62
9. INDUCCIÓN DEL DAÑO CELULAR MEDIANTE IRRADIACIÓN	63
10. ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA	63

11. ANÁLISIS DE METILACIÓN DE DNA MEDIANTE LA CONVERSION DE CITOSINAS CON BISULFITO	64
12. TRATAMIENTOS CON 5´AZA-2-DEOXYCITIDINA (5-Aza)	66
13. DETERMINACIÓN DE FOCOS DE γ-H2A.X: IF Y CONTEO	67
14. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROMATRICES (MICROARRAY)	67
15. ANÁLISIS DE DATOS DE TUMORES Y ESTADÍSTICA	68
RESULTADOS	69
1. TDRD9 EN CÁNCER	71
1.1. <i>TDRD9</i> se expresa en adenocarcinomas de pulmón y en melanomas	71
1.2. La Isla CpG de <i>TDRD9</i> está hipometilada en cáncer	75
1.3. La depleción de <i>TDRD9</i> afecta a la proliferación de células que expresan <i>TDRD9</i>	80
1.4. <i>TDRD9</i> no controla la expresión de <i>LINE-1</i>	82
1.5. Caracterización de cambios transcripcionales producidos por la bajada de expresión de <i>TDRD9</i>	86
1.6. La depleción de <i>TDRD9</i> provoca una acumulación de daño en el DNA	87
2. BÚSQUEDA DE INTERACTORES DE TDRD9 MEDIANTE ESCRUTINIO DE DOBLE HÍBRIDO	90
2.1. Análisis de los positivos obtenidos en el escrutinio de doble Híbrido	91
2.2. Localización celular de TDRD9 y ensayos de coexpresión con interactores positivos del ensayo de doble híbrido	93
DISCUSIÓN.....	101
1. TDRD9 EN CÁNCER	103
1.1. <i>TDRD9</i> como diana terapéutica	107
2. LOCALIZACIÓN E INTERACTORES PROTEICOS DE TDRD9	108
CONCLUSIONES.....	113

Índice

ANEXO.....	117
1. Genes en común que cambian significativamente su expresión tras silenciar <i>TDRD9</i>	119
BIBLIOGRAFÍA.....	123

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
BER	Reparación por escisión de bases
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina de suero bovino
BP-GO	GO de procesos biológicos
°C	Grado centígrado
CB	Cuerpos cromatoides
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CGI	Isla CpG
cm	Centímetro
CTs	Cancer testis
DAPI	4',6-Diamino-2-fenilindol diclorhidrato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	Transferasa de DNA de grupos metilos
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
D.O	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGTA	Ácido etilenglicol-bis [-aminoetil éter]N,N',N',N' tetraacético.
FBS	Suero fetal bovino
g	Aceleración gravitatoria terrestre
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GO	Procesos Ontológicos
h	Hora
HEPES	Ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)) etanosulfónico.
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	litro
LA	Adenocarcinoma de pulmón
LB	Medio Luria-Bertani
LINE-1	Long Interspersed nuclear elements
M	Molar
MF-GO	GOs de procesos funcionales
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mol	Moles
mRNA	RNA mensajero
NSCLC	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
nt	nucleótidos
PB	P-Body like granules
PBS	Solución salina fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGC	Células germinales primordiales
piPB	PBs enriquecidos en piRNAs
piRNAs	PIWI interacting RNA
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTM	Modificaciones post traduccionales
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT	Temperatura ambiente

Abreviaturas

RT-PCR	Reacción de la retrotranscriptasa seguida de amplificación de cDNA mediante PCR
s	Segundos
SDS	Sodio dodecil sulfato
SG	Gránulo de estrés
TBE	Tampón Tris-borato/EDTA
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TDG	Tiamina DNA glicosilasa
TE	Tampón Tris/EDTA
TEs	Elementos transponibles
TET	Dioxigenasa Ten-eleven translocation
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-metiletilendiamina
Tris	Tris-(hidroximetil) amino metano
Tritón X-100	t-Octilfenoxipolietoxietanol
Tween 20	Monolaurato de polioxietilensorbitano
V	Voltios
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosido
%	Porcentaje
5-AZA	5-aza-2'-deoxycytidine
5-caC	5-carboxilcitosina
5-fc	5-formilcitosina
5-hmC	5-Hidroximetilcitosina
5-mC	5-metilcitosina

Bases nitrogenadas

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla M1. Características genotípicas más importantes de la estirpe <i>E. coli</i> utilizada	45
Tabla M2. Características genotípicas más importantes de la estirpe <i>S. cerevisiae</i> Utilizada	45
Tabla M3. Características más importantes de las líneas celulares utilizadas	45
Tabla M4. Oligonucleótidos utilizados para la biología molecular del DNA	47
Tabla M5. Plásmidos utilizados no construídos en este trabajo	48
Tabla M6. Plásmidos construídos en este trabajo.....	48
Tabla M7. siRNAs utilizados.....	48
Tabla M8. Anticuerpos primarios utilizados	58
Tabla M9. Anticuerpos secundarios utilizados	58
Tabla M10. Filtros del microscopio Axio-IMAGER APOTOME.2	61
Tabla R1. Genes sobreexpresados tras la depleción de <i>TDRD9</i> en células H1993	88
Tabla R2. Análisis de los positivos obtenidos en el análisis de doble híbrido	94
Tabla D1. Genes <i>spn</i> de <i>Drosophila</i> y sus homólogos en ratón y humanos	107
Tabla A1. Genes en común que cambian significativamente su expresión tras silenciar <i>TDRD9</i>	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I1. Representación esquemática del nucleosoma de mamíferos.....	15
Figura I2. Representación de la CGI del promotor asociado a un gen.....	17
Figura I3. Mantenimiento de la metilación del DNA.....	18
Figura I4. Mecanismos de metilación/desmetilación.....	19
Figura I5. Reprogramación de la metilación del DNA en el ciclo de vida de mamíferos ...	23
Figura I6. Posible mecanismo para mantener las CGIs hipometiladas	24
Figura I7. Línea germinal masculina de ratón.....	30
Figura I8. Rutas de biogénesis para generar piRNAs.....	33
Figura M1. Procedimiento para el análisis de los clones	65
Figura R1. Expresión de <i>TDRD9</i> en adenocarcinoma de pulmón y en melanoma de piel.....	72
Figura R2. <i>TDRD9</i> se expresa en un subconjunto de líneas de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y adenocarcinoma de pulmón (LA)	74

Figura R3. La expresión de <i>TDRD9</i> no se correlaciona con el número de copias del gen en tumores TCGA-LUAD y TCGA-SKCM	75
Figura R4. <i>TDRD9</i> tiene una CGI asociada a su promotor.....	76
Figura R5. La expresión de <i>TDRD9</i> en líneas celulares de LA y NSCLC está controlada por el estado de metilación de la CGI asociada al promotor	78
Figura R6. La expresión de <i>TDRD9</i> en tumores TCGA-LUAD y TCGA-SKCM está relacionada con el nivel de metilación del promotor	79
Figura R7. Estado de metilación de los genes vecinos a <i>TDRD9</i>	
Figura R8. La depleción de <i>TDRD9</i> en células que expresan <i>TDRD9</i> , ocasiona una pérdida de proliferación y un cúmulo de células en fase S	82
Figura R9. No existe correlación entre la expresión de los genes <i>PIWI</i> y <i>TDRD9</i>	83
Figura R10. <i>TDRD9</i> no controla la expresión de <i>LINE-1</i> en células de cáncer de pulmón	84
Figura R11. Caracterización de cambios en el transcriptoma por depleción de <i>TDRD9</i> en células H1993	85
Figura R12. La depleción de <i>TDRD9</i> causa acumulación de daño en el DNA.....	88
Figura R13. Curvas de supervivencia con afidicolina y radiación gamma	89
Figura R14. Interacción entre <i>TDRD9</i> y los positivos encontrados en el Escrutinio mediante ensayo de doble híbrido	92
Figura R15. <i>TDRD9</i> se localiza en el citoplasma de células HeLa, formando agregados insolubles	94
Figura R16. La sobreexpresión de <i>TDRD9</i> en células HeLa, forma gránulos en el citoplasma.....	95
Figura R17. <i>TDRD9</i> sobreexpresado no colocaliza con <i>G3BP</i> ni <i>CAPRIN1</i> sobreexpresados en células Cos7	97
Figura D1. Conexión entre proteínas con motivos RG/RGG y enfermedades	104
Figura D2. Gránulos de RNA y microambiente tumoral	110

INTRODUCCIÓN

1.-CROMATINA Y EPIGENÉTICA

La información genética está codificada por el DNA, el cual se encuentra empaquetado en el núcleo eucariótico formando una estructura altamente organizada y dinámica denominada cromatina. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma (Kornberg 1974), formado por un octámero de histonas, constituido por dos subunidades de cada una de las cuatro histonas nucleosómicas H2A, H2B, H3 y H4, y alrededor del cual se enrollan 147 pb de DNA en forma de super-hélice levógira (Figura I1) (Richmond et al. 1984, Luger et al. 1997). Las histonas son pequeñas proteínas básicas que se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución. Cada una de ellas presenta una región amino terminal desestructurada, comúnmente denominada cola amino terminal, y un dominio central que presenta un plegamiento globular característico. En el caso de las histonas H2A y H2B, tras el dominio globular aparece otra cola corta desestructurada que se denomina cola carboxilo terminal. Ambas colas se proyectan hacia el exterior de los nucleosomas, proporcionando estabilidad y mediando la interacción con otras proteínas o con los nucleosomas adyacentes (Arents et al. 1995, Luger et al. 1997). Los nucleosomas se encuentran separados entre sí por un fragmento de DNA denominado DNA espaciador al que se une un quinto tipo de histona, denominada histona H1, en el punto de entrada y salida del DNA.

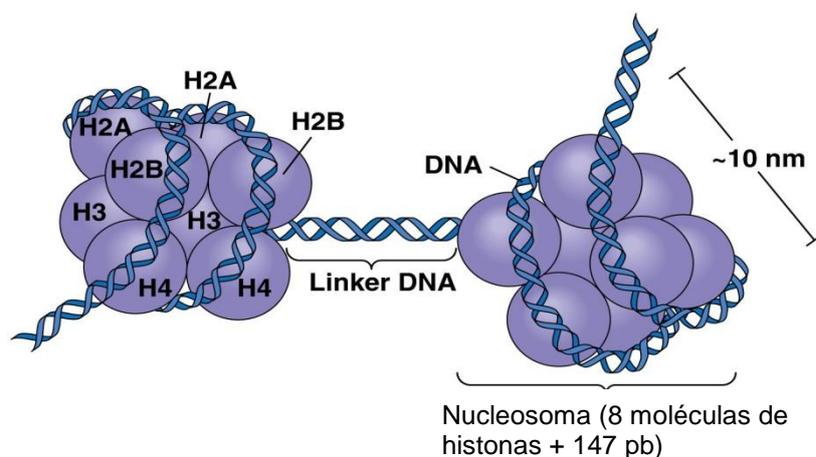


Figura I1. Representación esquemática del nucleosoma de mamíferos. El nucleosoma es la unidad básica de la cromatina y está formado por un octámero de histonas (H2A-H2B) \times 2 y (H3-H4) \times 2. La doble hélice de DNA rodea al octámero de histona 1,7 veces. Imagen adaptada de http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-18/18_21.jpg

Introducción

El término "epigenética", el cual literalmente significa "fuera de la genética convencional", hace referencia a cambios heredables en la función génica que ocurren sin alterar la secuencia de DNA (Goldberg et al. 2007, Kietrys et al. 2016). Los procesos epigenéticos son esenciales para el desarrollo y la diferenciación y pueden estar influenciados por el ambiente (nutrición, estrés, toxinas y los antecedentes médicos) (Skinner et al. 2010). Los tres mecanismos epigenéticos más importantes son: i) Las modificaciones postraduccionales de histonas (PTMs), capaces de cambiar la estructura de la cromatina, están asociadas a activaciones y represiones transcripcionales. En general, las modificaciones de histonas incluyen principalmente la acetilación, la metilación, fosforilación y ubiquitinación (Jenuwein et al. 2001, Gelato et al. 2008). ii) RNAs no codificantes, capaces de regular la expresión de un gen diana por múltiples vías moleculares. La más estudiada es la degradación de mRNA, muy importante en procesos como apoptosis, proliferación celular, diferenciación y metabolismo (He et al. 2004, Bandiera et al. 2010) y iii) la metilación del DNA (Goldberg et al. 2007).

2.-METILACIÓN DEL DNA

Una de las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas es la metilación del DNA. Ésta, está presente en la mayoría de plantas y animales (Feng et al. 2010). En bacterias también se dan procesos de metilación, en adenosinas o citosinas (Arber et al. 1962, Wion et al. 2006). En mamíferos, la metilación del DNA ocurre mayoritariamente en pares CpG simétricos y se estima que están metilados alrededor del 70-80% de ellos. El resto de pares CpG que no están metilados se concentran en regiones ricas en C+G cercanas a promotores denominados Islas CpG (CGIs) (Suzuki et al. 2008, Cedar et al. 2009). La metilación de las CGIs reprime la transcripción de los genes asociados (Figura I2) e interviene en la regulación de promotores alternativos. Se ha descrito también que la metilación del DNA desarrolla un papel en la actividad de los enhancers (Ehrlich et al. 2013, Kulis et al. 2013). La metilación del DNA también está implicada en la modificación de grandes estructuras génicas, tales como inactivación del cromosoma X, el control de las

regiones de impronta (ICR), compactación de la heterocromatina y el mantenimiento de la estabilidad genética (Alberti et al. 1994, Nasr et al. 2003).

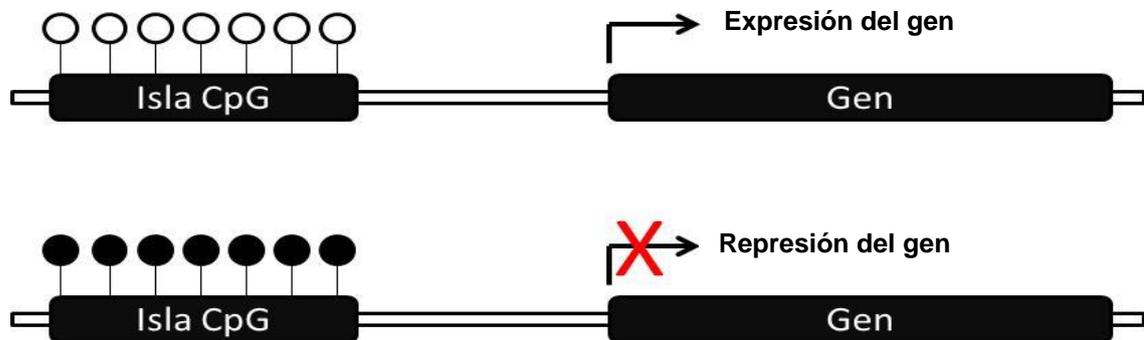


Figura I2. Representación de la CGI del promotor asociado a un gen. Como representa la imagen, la metilación de los pares CpG de la CGI de un promotor, está asociada con la represión de la expresión del gen asociado a dicho promotor. Los círculos en blanco representan pares CpG desmetilados, mientras que los negros son pares CpG metilados.

El proceso de metilación consiste en la unión covalente de un grupo metilo (CH_3) al carbón 5 del anillo de la citosina, dando como resultado 5-metilcitosina (5-mC). Este proceso está controlado por una familia de enzimas denominadas DNA metiltransferasas (DNMTs). Se requieren tres DNMTs para establecer o mantener los patrones de metilación (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B) y otra enzima adicional con idénticas funciones (DNMTL) (Okano et al. 1999, Suetake et al. 2004, Chen et al. 2005). El mantenimiento de la metilación del DNA ocurre durante el proceso de replicación y es dependiente, principalmente, de la DNMT1. Esta metiltransferasa está asociada con los lugares de replicación para restaurar la metilación completa en la hebra naciente que no está metilada (Kim et al. 2009). La DNMT1 se recluta al lugar de replicación mediante una interacción con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) que es un componente de la maquinaria de replicación (Chuang et al. 1997) y con la proteína UHRF1 (ubiquitin-like plant homeodomain and RING finger domain 1), la cual se requiere para la asociación de la DNMT1 con la cromatina (Figura I3) (Bostick et al. 2007, Sharif et al. 2007, Arita et al. 2008, Avvakumov et al. 2008, Hashimoto et al. 2008, Qian et al. 2008, Law and Jacobsen 2010). Por otro lado, la metilación de novo es llevada a cabo esencialmente por las DNMT3A, DNMT3B y DNMTL en pares CpG.

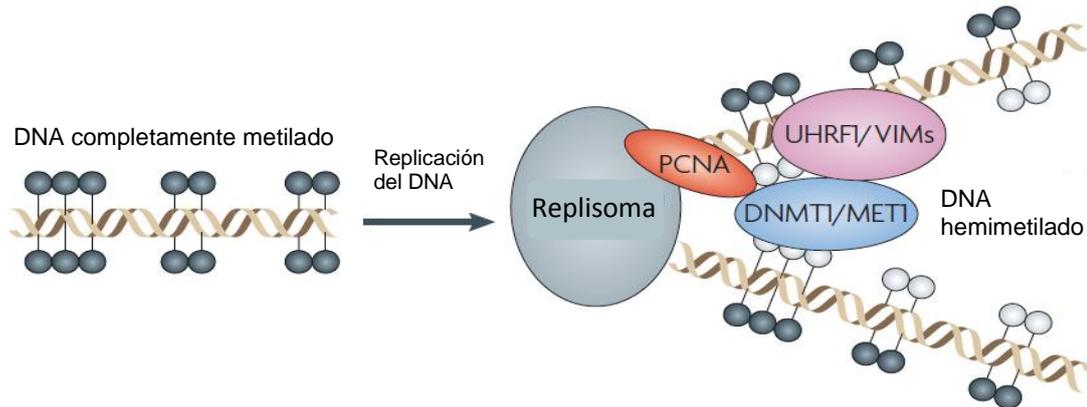


Figura I3. Mantenimiento de la metilación del DNA. Modelo que representa el mantenimiento de la metilación de CGs durante la replicación. La DNMT1 (DNA metiltransferasa 1) es reclutada al lugar de la replicación a través de las interacciones con UHRF1 (RING finger domain 1) y con PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Tras el reclutamiento, la DNMT1 metila completamente las cadenas hemimetiladas nacientes. Los círculos grises y blancos, representan citosinas metiladas y desmetiladas respectivamente. Adaptado de (Law et al. 2010).

Los procesos de metilación y desmetilación son igualmente importantes ya que están acoplados, requiriéndose una acción balanceada entre ambos para un control correcto de la expresión génica. La desmetilación del DNA consiste en la eliminación del grupo metilo de la base nitrogenada metilada y puede ser activa o pasiva, o incluso ser una mezcla de ambas.

Desmetilación activa: es el proceso por el que se elimina el grupo metilo de la citosina metilada (5-mC) de forma independiente a la replicación. Ocurre en varios pasos: la 5-mC se procesa a 5-hidroximetilcitosina (5-hmC). La 5-hmC es convertida a 5-formilcitosina (5-fC) y posteriormente a 5-carboxilcitosina (5-caC). Todas estas conversiones están mediadas por la dioxigenasa ten-eleven translocation (TET) (Tahiliani et al. 2009, Ficz et al. 2011). Es ahora cuando la timina DNA glicosidasa (TDG) escinde la 5-fC y la 5-caC originando un sitio abásico que es posteriormente corregido mediante la ruta BER (base excision repair). A veces, la 5-mC experimenta desaminaciones. Las enzimas AID y APOBEC catalizan el procesamiento de la citosina que la lleva a ser desaminada. Esto ocurre predominantemente en los residuos de 5-hmC y 5-mC, convirtiéndolos en 5-hidroximetiluracilo (5-hmU) y timina (T) respectivamente. Consecuentemente, se generan desapareamientos U:G y T:G que son eficientemente reparados por la ruta TDG/BER (Figura I4-A) (He et al. 2011, Song et al. 2013, Trerotola et al. 2015).

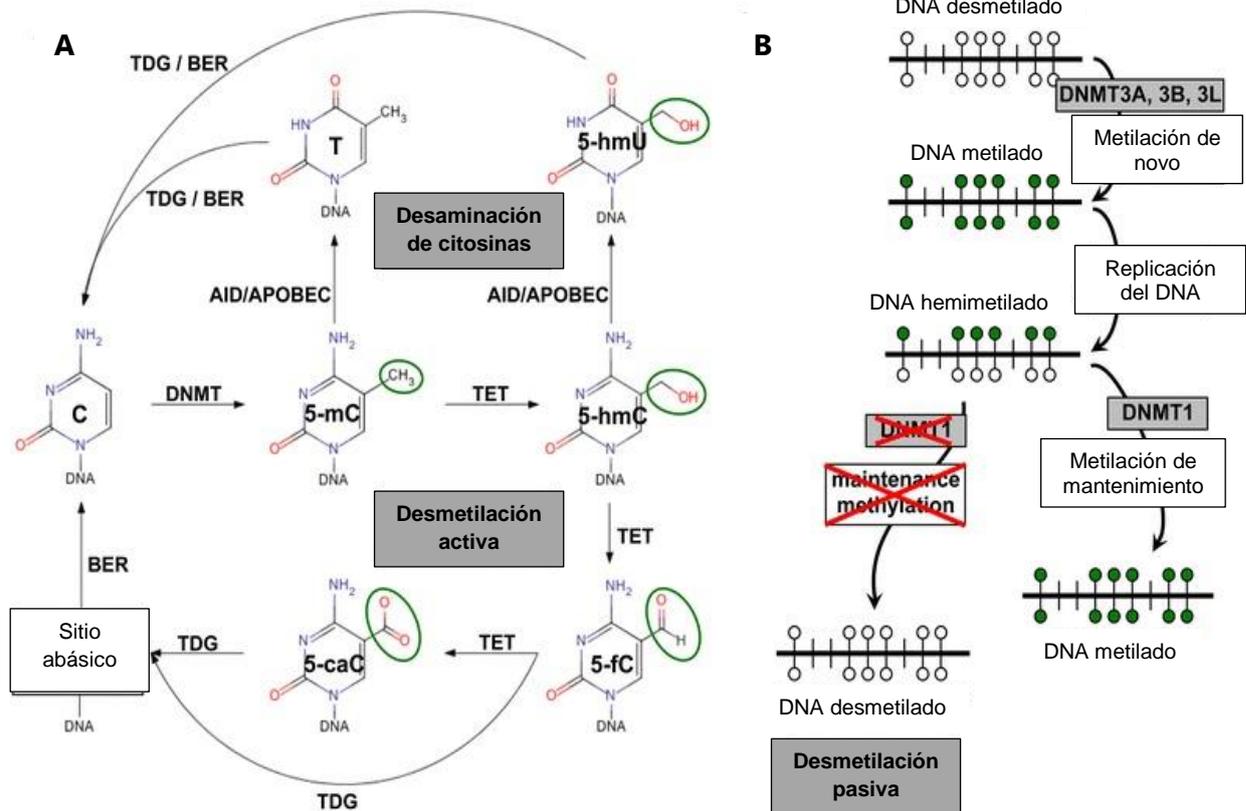


Figura I4. Mecanismos de metilación/desmetilación. A) Los grupos metilos (CH₃) son transferidos al carbono 5 de la citosina para originar la 5-mC, proceso catalizado por la DNMT. En la desmetilación activa, TET, desmetilasa de DNA, convierte la 5-mC en 5-hmC, la cual es totalmente procesada a 5-fC y posteriormente a 5-caC. Estos lugares son dianas para TDG/BER que escinden la 5-fC y la 5-caC dando lugar a un sitio abásico. La desmetilación del DNA también puede ocurrir a través de una desaminación espontánea de la citosina, lo cual es catalizado por las enzimas AID/APOBEC. Los desapareamientos U:G y T:G son reparados por la ruta TDG/BER. **B)** La metilación de novo y mantenimiento ocurre usando DNA completamente desmetilado y la cadena naciente hemimetilada tras la replicación respectivamente, por acción de las enzimas DNMT. En ausencia de metilación de mantenimiento, se origina una desmetilación pasiva por dilución de la 5-mC en sucesivos ciclos de replicación. Adaptado de (Trerotola et al. 2015).

Desmetilación pasiva: esta desmetilación también puede darse por el procesamiento de la 5-mC en 5-hmC (Tahiliani et al. 2009, Ficz et al. 2011). La metilasa de mantenimiento DNMT1, a diferencia de DNMT3A y DNMT3B, no reconoce la 5-hmC. Por el momento no se ha descrito ningún mantenimiento de la 5-hmC tras ciclos de replicación. Por tanto la 5-hmC se va perdiendo en cada replicación, diluyéndose así la metilación del DNA (Figura I4-B) (Sarkar 2016). Por otro lado, se han descrito procesos de desestabilización de la DNMT1, así como de exclusión de la DNMT1 del núcleo (Petrucci et al. 2014)

2.1 Control de la metilación en el desarrollo (Figura I5)

El desarrollo de mamíferos comienza con el cigoto totipotente, el cual posee un potencial capaz de generar un organismo completo. Este estado totipotente no es generado exclusivamente por las características genéticas ya que, salvo alguna excepción, todas las células que forman el cigoto presentan la misma secuencia de DNA. Las características epigenéticas (o la falta de ellas) puede definir el potencial de desarrollo del cigoto y promueve la diferenciación de las células en futuras generaciones (Hemberger et al. 2009). La metilación es una de las características epigenéticas más importantes, implicadas en el desarrollo.

En la línea germinal existen dos oleadas de desmetilaciones del DNA: i) inmediatamente después de la fertilización en el cigoto, y ii) durante el establecimiento de las células germinales primordiales (PGC), que son los precursores directos de ovocitos y espermatozoides. Estos cambios dramáticos en el estado epigenético conducen al borrado de las marcas epigenéticas que provienen desde los gametos (con la excepción de la impronta). De la misma manera, la reprogramación epigenética de PGCs está asociada con la restauración de la totipotencialidad y el borrado de las marcas de impronta parentales (Seisenberger et al. 2013).

La metilación puede ir perdiéndose de manera pasiva por dilución, o activamente por eliminación de las 5-mC.

2.1.1 Reprogramación en la línea germinal

En ratón, las células germinales primordiales (PGC) son confinadas en el embrión en los días 6,5 (E.6,5) en el epiblasto proximal, donde se silencian genes somáticos. En los días 7,5 (E.7,5) las PGCs migran para formar las gónadas. En estos estadios tempranos hay establecidas marcas epigenéticas que están presentes en las células del epiblasto, incluyendo niveles significativos de metilación del DNA. Como consecuencia de ello, las PGCs necesitan reprogramar sus patrones epigenéticos ya que estos darán lugar a los gametos que tendrán la capacidad de originar un cigoto totipotente en la siguiente generación (Ginsburg et al. 1990, Seki et al. 2005, Ohinata

et al. 2009). A partir de los días E10,5-11,5 ocurre una oleada de desmetilaciones que puede suponer una situación muy delicada en relación con el salto de elementos transponibles, (TEs) que son controlados por metilación. (Hajkova et al. 2010). Inmediatamente después de la desmetilación, ocurre una metilación de novo para controlar los TEs, establecer la impronta y controlar regiones pericentroméricas. La metilación de novo en PGCs masculinas tiene lugar unos días después de que el borrado se haya completado, entre los días E14,5 y E16,5 y continúa hasta prospermatogonia (Ueda et al. 2000, Kato et al. 2007). En la línea germinal femenina, el establecimiento de la metilación del DNA tiene lugar después del nacimiento en el ovocito en crecimiento (Lucifero et al. 2004, Hiura et al. 2006, Smallwood et al. 2011). El resultado de la metilación de novo es un patrón de metilación de DNA que refleja las características del sexo del embrión. Las responsables de la metilación de novo en PGCs de embriones masculinos y femeninos son Dnmt3a, Dnmt3b y la Dnmt3l. Un fallo en el restablecimiento de la metilación del DNA en gametos masculinos provoca defectos en espermatogénesis y esterilidad. En los gametos femeninos no ocurre esto, pero si ocurren aberraciones por el defecto en la impronta. Ovocitos y espermatoцитos tienen grandes diferencias en sus estados de metilación sobre todo en los TEs. Por ejemplo, los elementos *LINE-1* están hipermetilados generalmente en espermatozoides, mientras en ovocitos la regulación de este retrotransposón ocurre probablemente por otra vía (Bourc'his et al. 2001, Kobayashi et al. 2012). En esta metilación originada en TEs, intervienen los Piwi-interacting RNAs (piRNAs) (descritos más adelante). El restablecimiento de la metilación global para células germinales masculinas y femeninas son diferentes: el esperma se remetila casi por completo (85% de CGs) mientras que los ovocitos presentan una remetilación moderada (alrededor del 30%) (Popp et al. 2010, Smallwood et al. 2011, Smith et al. 2012).

2.1.2 Reprogramación de la metilación en el embrión temprano

Los patrones de metilación del DNA establecidos en espermatozoides y ovocitos son reprogramados una vez más cuando las dos células germinales se unen para formar el cigoto tras la fertilización. Entre los pronúcleos, femenino y

Introducción

masculino, se observa una asimetría en la dinámica de desmetilación del DNA. El genoma paterno es despojado de la gran parte de su metilación mediante un proceso activo que ocurre en dos fases, antes y durante la replicación del DNA y es completada tras la primera división celular (Santos et al. 2002, Wossidlo et al. 2010). El genoma materno es pasivamente desmetilado tras las siguientes divisiones celulares debido a la exclusión del núcleo de la DNA metiltransferasa de mantenimiento DNMT1o (Howell et al. 2001). Se ha demostrado que en el pronúcleo paterno se eliminan las 5-mC de lugares como los retrotransposones *LINE-1* y algunos LTRs, aunque otros lugares escapan de la oleada de desmetilación, como los genes de impronta paternos y algunos retrotransposones IAP.

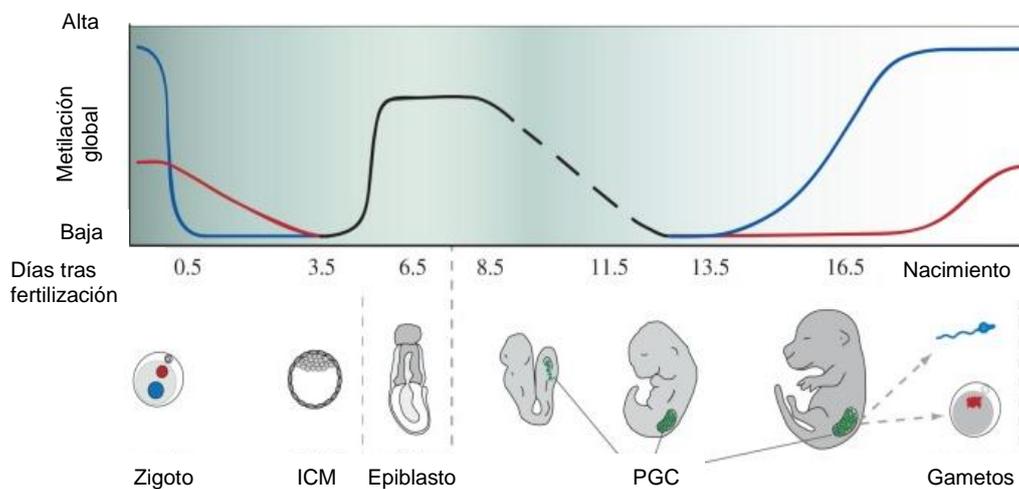


Figura 15. Reprogramación de la metilación del DNA en el ciclo de vida de mamíferos. La metilación del DNA representa una barrera epigenética en el desarrollo de mamíferos que es demolida cuando el potencial del desarrollo comienza y posteriormente reconstruida para generar las características particulares de cada célula. En primer lugar, esto ocurre inmediatamente después de la fertilización, cuando la metilación del DNA de los gametos parentales es borrada en dos oleadas de desmetilaciones. En la primera oleada, el pronúcleo paterno (azul) experimenta una rápida desmetilación en el cigoto, la cual es seguida por una pérdida pasiva de la metilación del DNA en el genoma materno (rojo). El restablecimiento de la metilación del DNA comienza en la ICM del embrión. Las PGCs (verde) heredan las características epigenéticas desde el epiblasto, volviendo a ocurrir otra oleada de desmetilaciones que restaura el potencial del desarrollo. Adaptado de (Seisenberger et al. 2013)

Una progresión exitosa del desarrollo temprano depende del mantenimiento de la metilación en estos lugares (Howlett et al. 1991, Oswald et al. 2000, Smith et al. 2012). Esta desmetilación global llega a mínimos tras convertirse el embrión en blastocito, momento en el cual podemos diferenciar dos grupos celulares: i) las células del trofodermo, que muestran bajos niveles de metilación del DNA; y ii) las células de la masa interna (ICM) que dará lugar al embrión propiamente dicho y

donde comienza a darse la metilación de novo (Wossidlo et al. 2010). Los patrones de metilación vuelven a ser restaurados por DNMT3A junto con UHRF1. En comparación con las PGCs, en el embrión temprano se muestra una mayor estabilidad en la metilación del DNA lo cual proporciona características específicas para la expresión de genes del desarrollo y diferenciación celular (Lane et al. 2003).

3.- FUNCIONES Y ELEMENTOS REGULADOS POR METILACIÓN

3.1 Islas CpG (CGIs)

Ya ha sido comentado en el apartado de la metilación que la mayoría de pares CpGs en mamíferos están químicamente modificados por metilación, sin embargo aproximadamente un 10% de pares CpG se agrupan en regiones de aproximadamente 1 Kb denominadas Islas CpG (CGIs). Estas agrupaciones se encuentran en muchos promotores de genes constitutivos o en genes de desarrollo y están permanentemente hipometiladas. Cerca de la mitad de CGIs desmetiladas identificadas en el genoma de mamíferos no están en promotores conocidos, son las CGIs huérfanas. También encontramos CGIs intragénicas las cuales están normalmente hipermetiladas durante el desarrollo y se han asociado a promotores alternativos (Illingworth et al. 2010).

Para mantener el estado hipometilado de una CGI asociada a promotor, se necesita que las DNA metiltransferasas estén excluidas. Según estudios publicados, el estado de desmetilación de las CGIs de promotores está fuertemente influenciado por la unión de factores de transcripción. De hecho, si se eliminan estos factores de transcripción del lugar de unión, la CGI podría adquirir un estado hipermetilado y heredable (Figura I6) (Brandeis et al. 1994, Macleod et al. 1994, Illingworth and Bird 2009). La transferencia de un lugar de unión del factor de transcripción SP1 en un lugar endógeno metilado conduce a una desmetilación parcial del locus, confirmando así la dominancia de la unión de los factores de transcripción sobre la metilación del DNA en este contexto (Brandeis, Frank et al. 1994).

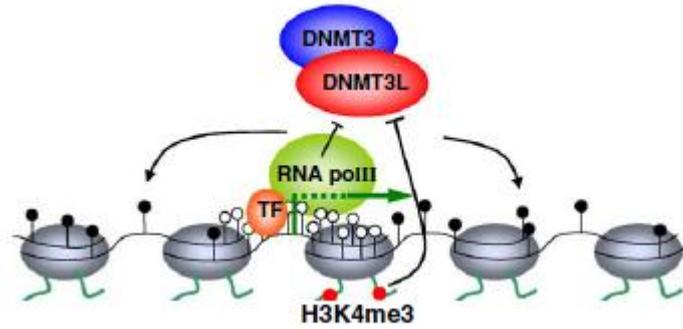


Figura I6. Posible mecanismo para mantener las CGIs hipometiladas. La maquinaria de transcripción (RNA-polII y los factores de transcripción [TF]) junto con la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3), excluyen a las DNMTs del lugar de inicio de la transcripción. CpG metilado se muestra como un círculo negro y en blanco desmetilado. Adaptado de (Illingworth et al. 2009)

Se ha visto que la modificación de las histonas y sus variantes son también muy importantes para la regulación de la metilación del DNA. Los lugares ricos en pares CGs desmetilados están unidos a CFP1 (CXXC finger protein 1, también conocida como CXXC1), la cual recluta H3K4 metiltransferasas. La unión de H3K4 metiltransferasas, como MLL, protege a los promotores de genes del desarrollo de la metilación del DNA, aparentemente mediante su dominio CXXC (Erfurth et al. 2008). Las enzimas DNMT3 que reconocen H3 no modificada, son alostéricamente inhibidas por la metilación de H3K4 (Ooi et al. 2007, Otani et al. 2009).

La diferencia de metilación de CGIs en tejidos y tipos celulares puede proporcionar grandes diferencias y marcar la función celular en algunos casos (Laddy et al. 2007, Irizarry et al. 2009). Por ejemplo, en la línea germinal masculina se expresa una familia de genes denominada *MAGE* (Melanoma-associated antigen) cuyos promotores poseen sus CGIs desmetiladas, siendo por tanto, expresados en estas células. Sin embargo, están silenciados en todas las células somáticas. En células somáticas, la desmetilación de las CGIs del promotor de estos genes, puede dar origen a la aparición de varios tipos de cáncer. Este y otros diversos estudios han determinado que la metilación de CGIs es el principal mecanismo de silenciamiento de genes específicos de la línea germinal en células somáticas (De Smet et al. 1999, Honda et al. 2004, Straussman et al. 2009)

Células de tejidos somáticos, también presentan una metilación de DNA específica. Generalmente son genes implicados en procesos de desarrollo los que son principalmente controlados por la metilación de las CGIs de sus promotores. Un

ejemplo de ello lo tenemos con los miembros de la familia HOX, cuya función es dictar el posicionamiento celular dentro del embrión (Kleinjan et al. 2004, Straussman et al. 2009)

3.2 Repeticiones pericentroméricas

En mamíferos, la mayoría de la secuencia genómica no es codificante, sin embargo tienen un potencial transcripcional latente que hay que controlar. Entre estas secuencias están las repeticiones pericentroméricas y elementos parásitos repetidos (que veremos en el siguiente apartado). La metilación del DNA tiene un papel muy importante en el control, mediante represión, de estos elementos.

Los satélites menor y mayor pericentroméricos están repartidos por todo el centrosoma en decenas de miles de copias en tándem (Lehnertz et al. 2003). Como decíamos con anterioridad estos elementos tienen un potencial transcripcional latente cuya represión es esencial para el alineamiento de los cromosomas, la segregación y la integridad durante la mitosis, lo cual es esencial para el correcto desarrollo del ciclo celular. Un ejemplo de la importancia de la regulación de estos elementos lo tenemos en el síndrome de inestabilidad centromérica y anomalía facial (ICF) el cual es causado por una mutación sin sentido en la DNMT3B (Xie et al. 1999, Xu et al. 1999).

3.3 Elementos transponibles (TEs)

Cerca del 40% del genoma de mamíferos está constituido por elementos transponibles. Estos tienen la capacidad de integrarse por sí mismos en el genoma. Se han identificado en las células eucariotas dos tipos principales de elementos transponibles: los retrotransposones (clase I), que utiliza un intermediario de RNA; y los transposones de DNA (clase II) que se transpocionan directamente sin necesidad de un intermediario de RNA. Los retrotransposones se clasifican, mayoritariamente, en tres grupos: Long interspersed nuclear elements (LINEs), short interspersed nuclear elements (SINEs) y long terminal repeat (LTR) provenientes de

retrovirus endógenos (Waterston et al. 2002). En esta tesis vamos a describir los *LINE-1* con más profundidad ya que serán objeto de estudio.

3.3.1 *LINE-1*

El genoma humano contiene más de 500000 secuencias de *LINE-1*, de las cuales unas 80-100 copias están activas en el individuo (el conjunto de *LINEs* activos es diferente en cada individuo). Miden alrededor de 6 Kb de longitud y contienen un extremo 5' y otro 3'-*UTR*, además de dos pautas abiertas de lectura (*ORFs*) que codifican para dos proteínas.

El transcrito de *LINE-1*, el cual es el único retrotransposón autónomo activo en humanos, contiene dos *ORFs* que son esenciales para su retrotransposición *in cis*. La *ORF1* codifica para una proteína de unión a RNA con actividad chaperona y consta de unos 40 kDa; y la *ORF2* para una proteína con actividad transcriptasa reversa y endonucleasa de unos 150 kDa. (Ostertag et al. 2001, Krutter et al. 2009, Beck et al. 2011).

La transposición de estos elementos tienen una potencial capacidad mutagénica capaz de dar origen a múltiples enfermedades. Se han descrito unas 100 enfermedades relacionadas con inserciones de TEs en la línea germinal. En tejidos somáticos, aunque no son heredables, también tienen capacidad de dar lugar a enfermedades. Estos elementos están potencialmente reprimidos por metilación, así que el hecho de la desmetilación ocurrida en estadios tempranos de la formación del embrión y durante la gametogénesis, origina un momento crítico para el control de los TEs. Un fallo en el silenciamiento de estos elementos mediante la metilación es característico en diversos procesos tumorales y desórdenes neurológicos, incluyendo la esquizofrenia y el síndrome de Rhatt (Belancio et al. 2010, Muotri et al. 2010, Bundo et al. 2014). Por otro lado, se ha descrito un papel de *LINE-1* en cáncer, por transposición en células somáticas, denominadas inserciones *de novo*. Un claro ejemplo de ello lo tenemos en la inactivación del gen supresor de tumores retinoblastoma 1 (*RBI*), donde se produce la inserción de un retrotransposón *LINE-1* en el intrón 14 del gen. La inserción ocasiona un corte y empalme (splicing) del

transcrito de manera aberrante ya que se introduce en el lugar aceptor de splicing (Hancks et al. 2016, Rodriguez-Martin et al. 2016).

Los organismos han desarrollado varios mecanismos de defensa para proteger sus genomas de los efectos deletéreos ocasionados por la inserción de los transposones. El silenciamiento de la transcripción de los TEs por metilación de DNA es el mecanismo más importante de defensa descrito en mamíferos. Las células de mamíferos han desarrollado un mecanismo de defensa específica mediada por proteínas PIWI y piRNAs que conduce a la represión epigenética de *LINE-1* a través de la metilación del DNA. De alguna manera los piRNAs que operan en el núcleo son capaces de guiar la maquinaria de metilación de *novo* al transposón transcrito con el que presenta complementariedad de secuencia (Aravin et al. 2008, Kuramochi-Miyagawa et al. 2008, Smith et al. 2013).

4.- IMPLICACIÓN DE LA METILACIÓN DE DNA EN CÁNCER

4.1 Hipometilación en cáncer

La pérdida de metilación de DNA, fue la primera anomalía epigenética identificada asociada a cáncer (Feinberg et al. 1983). En primer lugar, la hipometilación puede llevar a la activación génica. Por ejemplo, existen genes con CGIs en su promotor que están hipermetiladas en tejidos sanos e hipometiladas en tejidos cancerosos. Esto suele ocurrir en oncogenes y un claro ejemplo de ello lo tenemos con *HRAS* y con los genes Cancer Testis (CTs). Estos últimos son genes que se expresan normalmente en la línea germinal y de forma aberrante en tumores. Su hipometilación conlleva la expresión en distintos tipos de tumores. Por ejemplo, los genes *MAGE* (Melanoma associated antigen) se expresan en algunos melanomas y carcinomas de pulmón. Se han identificado una gran proporción de tumores de distintos orígenes que presentan hipometilación de genes: cáncer de estómago, de piel, colon, páncreas, hígado, útero, pulmón y cérvix entre otros (Feinberg et al. 1983, De Smet et al. 1996, Nakamura et al. 1998, Cho et al. 2001, Akiyama et al. 2003, Badal et al. 2003, de Capoa et al. 2003, Oshimo et al. 2003, Piyathilake et al. 2003, Sato et al. 2003).

Otros estudios han relacionado una hipometilación generalizada en cáncer con la inestabilidad cromosómica. La hipometilación es especialmente severa en regiones pericentroméricas y muchos tumores, carcinomas de mama y ovario, poseen una translocación no balanceada con puntos de rotura en esta región de los cromosomas 1 y 16 (Qu et al. 1999). Otra conexión potencial entre hipometilación e inestabilidad cromosómica radica en la activación de los TEs *LINE-1*, por ejemplo en cáncer de colon, lo cual induce reordenaciones cromosómicas (Suter et al. 2004). Muchas de estas hipometilaciones vienen originadas por la exposición a ciertas toxinas debido al ambiente o a la dieta (Okoji et al. 2002)

4.2 Hipermetilación en cáncer

Los primeros datos de hipermetilación en cáncer fueron obtenidos a partir del estudio del estado de metilación del gen supresor de tumores retinoblastoma (*RB*), encontrándose que este gen tiene la CGI de su promotor hipermetilado en algunos retinoblastomas hereditarios (Greger et al. 1989, Sakai et al. 1991).

Posteriormente se ha observado que en múltiples genes involucrados en cáncer, las CGI de las regiones promotoras que deberían permanecer desmetiladas, se encuentran hipermetiladas. Esta hipermetilación da lugar a la represión transcripcional génica (Baylin et al. 1998). Generalmente, las células malignas poseen hipermetilación de genes supresores de tumores (Singh et al. 2016). En algunos tipos de cáncer esta hipermetilación puede ser debida a que la DNA metiltransferasa tiene aumentada su expresión.

5.-piRNAs Y PROTEÍNAS PIWIs

Los RNAs de interferencia (RNAi) y los sistemas relacionados representan un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional que está mediado por pequeños RNAs no codificantes que guían a proteínas de la familia Argonauta a la diana de RNA para degradarlo o silenciarlo transcripcionalmente. Las proteínas de la familia Argonauta comprenden los dominios PIWI (endonucleasas), PAZ (de unión a RNA de cadena simple) y MID (de unión a nucleótidos en el 5') y son clasificadas en

los clados Ago o Piwi. Los miembros del clado Argonauta están ubicuamente expresados en organismos multicelulares y unen pequeños RNAs de entre 21-24 nt como miRNAs y siRNAs (Tolia et al. 2007, Hutvagner et al. 2008, Carthew et al. 2009). El clado comprendido por proteínas Piwi sólo se expresa en animales y de forma específica en células de la línea germinal. Las proteínas Piwi se unen a unos pequeños RNAs, denominados piwi-interacting RNAs (piRNAs), que son de cadena simple y miden alrededor de 24-30 nt de longitud. En el genoma humano se expresan cuatro miembros de la familia PIWI: HIWI/PIWIL1, HILI/PIWIL2, PIWIL3 Y HIWI2/PIWIL4. Mientras que en ratón existen tres proteínas PIWI: Miwi/Piwil1, Mili /Piwil2 y Miwi2/Piwil4.

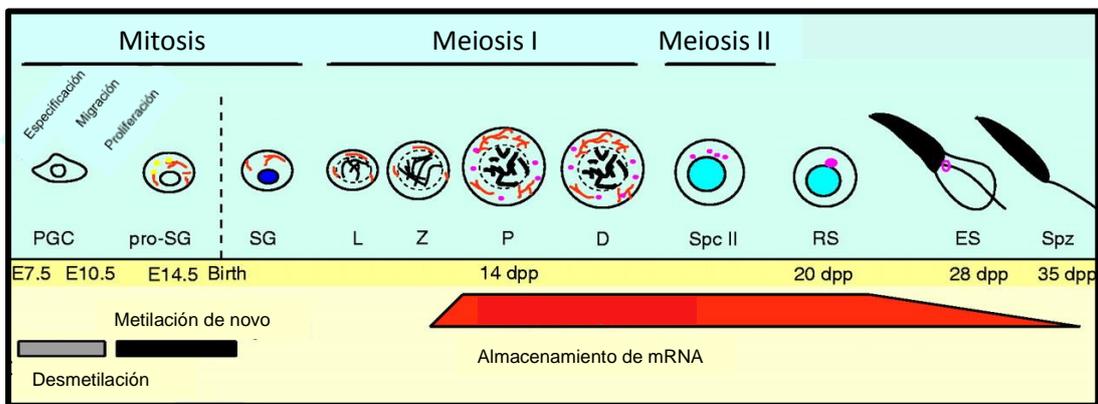


Figura 17. Línea germinal masculina de ratón. Durante el desarrollo del ratón, las células primordiales germinales (PGC) son las primeras que se identifican y se van especializando formando un grupo de unas 40 células localizadas en la región extraembrionaria. Estas proliferan y migran a las gónadas en desarrollo. En la línea germinal masculina, las PGCs se arrestan en G1 como proespermatogonia (pro-SG) hasta que comienza el desarrollo de las gónadas juveniles. La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos en testículos. Las espermatogonias mitóticas (SG) se dividen y generan más células madre o se diferencian a espermatocito primario que puede entrar en meiosis. A través de la primera división meiótica cada espermatocito primario pasa por los estadios de leptonema (L), zigonema (Z), paquonema (P) y finalmente diplotonema (D), originando el espermatocito secundario (Spc II). Éste completa la segunda división meiótica, formando células haploides llamadas espermatidas). A través de la espermiogénesis las espermatidas redondeadas (RS) dan lugar a espermatidas elongadas (ES) que se diferencian a espermatozoides (Spz) que son los que entran al lumen del túbulo. Adaptado de (Nguyen-Chi et al. 2011)

Estas proteínas están expresadas, principalmente, en células de la línea germinal masculina (aunque Mili también se encuentra en ovocitos) y muestran un patrón de expresión secuencial y solapado a lo largo de la diferenciación de células espermáticas. En primer lugar, Mili se expresa en células germinales fetales masculinas, alrededor del momento de la diferenciación del sexo y después continúa

Introducción

su expresión en prospermatogonia, espermatogonia postnatal, espermatocito paquiteno y espermátidas tempranas. *Miwi2* se expresa en prospermatogonia pero muestra una disminución, unos días después del nacimiento. A diferencia de las ya descritas, la expresión de *Miwi* comienza tras el nacimiento y se expresa en espermatocito paquiteno y en las etapas posteriores de la espermiogénesis.

En mamíferos, los piRNAs se clasifican en tres categorías (fetal/prenatal, postnatal prepaquiteno y piRNA paquiteno) de acuerdo con el estadio del desarrollo en que se expresen. En prospermatogonia, *Mili* y *Miwi2* son cargados con piRNA fetales, cuya biogénesis está ligada al control epigenético de los transposones. *Mili* se expresa principalmente en espermatogonia postnatal, donde los piRNAs son menos abundantes y están menos caracterizados. Durante la meiosis, la cantidad de piRNAs aumentan. Además la secuencia de piRNAs va cambiando a lo largo del desarrollo, siendo cada población de piRNA diferente a la otra. Son los piRNAs fetales los que contienen un mayor porcentaje de secuencias de transposones (Cox et al. 1998, Kuramochi-Miyagawa et al. 2001, Deng et al. 2002, Kuramochi-Miyagawa et al. 2004, Aravin et al. 2006, Girard et al. 2006, Grivna et al. 2006, Watanabe et al. 2006, Carmell et al. 2007, Aravin et al. 2008, Breunig et al. 2008, Pillai et al. 2012).

El mecanismo de biogénesis de piRNAs fue principalmente descrito en *Drosophila* aunque posteriormente también ha sido descrito en mamíferos. Existen dos rutas principales de generación de piRNAs: la ruta primaria (Figura I8-A) que opera en células de la línea germinal y en las células somáticas anejas, en *Drosophila*; y la secundaria, que también se denomina ciclo ping-pong (Figura I8-B), descrita sólo en la línea germinal.

La mayoría de los piRNAs son originados por la RNA polimerasa II a partir de grupos de unidades transcripcionales (clusters). Estos clusters poseen un gran número de secuencias de transposones truncados, muchos de los cuales están orientados antisentido a la secuencia codificante del transposón. Estos se transcriben como precursores poliadenilados con caperuza 5', que van de 50-100 Kb de longitud. Los precursores son exportados al citoplasma para su procesamiento por los factores de biogénesis de piRNAs, que son proteínas citoplásmicas que se encuentran en diversos gránulos perinucleares, que en conjunto se denominan *nuage* (Houwing et al. 2007, Ghildiyal et al. 2009, Li et al. 2013, Yang et al. 2016). Los

precursores transcritos son procesados por nucleasas que dan lugar a extremos 5' con un grupo fosfato. Estos son cargados en las proteínas PIWI. Entonces el extremo 3' es cortado por otra nucleasa dejando libre un extremo OH, originando así el tamaño de piRNA determinado para cada PIWI (26 nt para Mili, 28 nt para Miwi2 y 29-30 nt para Miwi). Este mecanismo sería el procesamiento primario. Aparte de servir para degradar postranscripcionalmente a *LINE-1*, el mecanismo secundario, denominado ping-pong, también se ocupa de amplificar la población de piRNAs, lo cual es sumamente importante en el control de los retrotransposones. Cuando se examina la población de piRNAs por complementariedad de secuencia, una proporción bastante significativa, tienen en común que son solapantes en los primeros 10 nucleótidos del extremo 5', y que están enriquecidos con una uridina y en la posición 10 con adenina. En esta ruta ping-pong, las proteínas PIWI son cargadas con el piRNA primario, complementario al RNA diana (generalmente transcritos sentido de elementos transponibles), entonces utilizando la actividad de corte (slicer) del dominio PIWI, el RNA diana es cortado en el nucleótido complementario al décimo nucleótido del extremo 5' del piRNA primario, dando lugar al precursor secundario de piRNA. El extremo 3' del precursor secundario es probablemente procesado de la misma manera que el primario. De esta manera PIWI, cargado con el piRNA secundario (antisentido), es dirigido al mRNA procedente de los clusters de piRNAs que contenga secuencias complementarias de transposones antisentido. PIWI corta el mRNA en fragmentos, originando así piRNAs sentido (iguales a los primarios). Así se amplifica rápidamente la población de piRNAs (Li et al. 2009, Malone et al. 2009)

La maquinaria PIWI, no sólo opera a nivel post-transcripcional. En ausencia de genes PIWI o piRNAs fetales, la metilación CpG en retrotransposones de espermatogonias no se da correctamente. Esta metilación desencadena una situación que termina con la activación transcripcional de dichos retrotransposones en espermatoцитos postnatales, lo cual conlleva a la muerte celular. Estos fenotipos, desmetilación de retrotransposones y catástrofe meiótica que conducen a la esterilidad, son similares en mutantes en la *Dnmt3L*, sugiriendo que la metilación del DNA podría ser la principal causa de los fenotipos mutantes en *Mili* y *Miwi2*. Los mecanismos que relacionan la metilación de DNA de novo con la maquinaria Piwi no

Introducción

están aún bien descritos. Sin embargo la hipometilación de DNA en los mutantes *Piwi* es específica de retrotransposones, indicando que debe haber algún mecanismo para su discriminación como diana (Bourc'his et al. 2004, Aravin et al. 2007, Aravin et al. 2007, Carmell et al. 2007, Aravin et al. 2008, Kuramochi-Miyagawa et al. 2008)

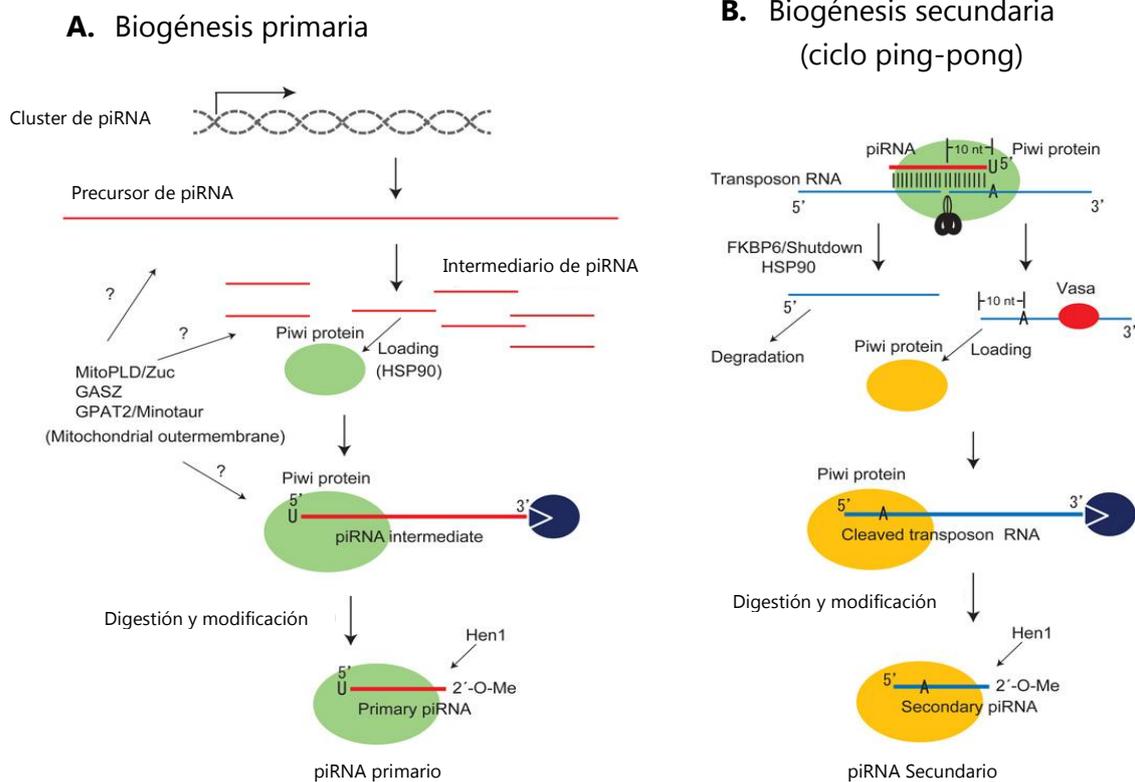


Figura 18. Rutas de biogénesis para generar piRNAs. **A)** Modelo de biogénesis primaria de piRNAs. Los precursores de piRNAs son transcritos desde clusters de piRNAs y son procesados como intermediarios de piRNAs. El intermediario de piRNA con una uridina en el extremo 5' es cargado en la proteína PIWI. La parte 3' del intermediario del piRNA digerido por una nucleasa desconocida. Tras esto, el extremo 3' es 2'-O metilado por una metiltransferasa (Hen1). **B)** Modelo de biogénesis secundaria de piRNAs. El complejo PIWI/piRNA corta el RNA del retrotransposón entre la posición 10 y 11 del piRNA. La región 3' del RNA cortado es incorporado a las proteínas PIWI. La región 5' es expulsada de la proteína PIWI gracias a chaperonas y es posteriormente degradada. La décima posición del RNA incorporado está enriquecida en adenina, que es complementaria a la primera posición del piRNA enriquecido en uridina. El RNA incorporado es entonces procesado a piRNA secundario maduro, de forma similar a como lo es el primario. Adaptado de (Watanabe et al. 2014).

Las proteínas PIWI y los piRNAs son los componentes efectores de la maquinaria piwi-RNA, pero ellos no actúan solos. Estos forman parte de un gran complejo ribonucleoproteico (RNP) con otros componentes funcionales localizados en gránulos, que están en contacto directo con los poros de la envuelta nuclear. Las primeras proteínas que se identificaron que interaccionaban con las proteínas PIWI,

fueron las de la familia Tudor. Más concretamente, Mili interacciona con Tdrd1, Miwi2 se acompleja con Tdrd9 y Miwi con Tdrd6 (Pillai and Chuma 2012).

6.- TDRD9

TDRD9 (Tudor domain containing 9) posee ortólogos en ratón, humanos y otros vertebrados, y en varios invertebrados como *Drosophila*. TDRD9 en *Drosophila* se denomina *spindle-E/homeless (spn-E/hls)*. Este gen fue identificado en dos escrutinios diferentes de mutaciones en *Drosophila*. Pronto se puso de manifiesto que las mutaciones *spn-E* y *hls*, estaban en el mismo gen. Como el mutante *spn-E* se describió con anterioridad al *hls* se ha adoptado *spn-E* como nombre del gen. En 1995 Gillespie y colaboradores, obtuvieron una línea de hembras estériles que ponían muy pocos huevos y que además no estaban fertilizados. En una disección del ovario, observaron que el ovocito no se encontraba, como debía ser habitual, en la parte posterior del huevo. Además un 95% de las cámaras de huevos fueron ventralizadas (frente a la posición dorsal normal) y se encontraban, la mayoría de ellas, en estado de degeneración. Denominaron al gen responsable de esta mutación como *homeless (hls)*, en parte por la deslocalización del ovocito y en parte por la deslocalización de la expresión de los RNAs mensajeros responsables de la formación de los ejes antero-posterior y dorso-ventral. La identificación del gen donde estaba la mutación demostró que *hls* codificaba para una proteína similar a una helicasa de unión a RNA con dominio DEx-H. (Gillespie et al. 1995).

Anteriormente se habían identificado cinco genes *spindle: spn-A, spn-B, spn-C, spn-D, spn-E* haciendo un rastreo de genes del cromosoma 3 con efecto materno (Tearle and Nüsslein-Volhard, 1987). Las mutaciones en este gen ocasionan un patrón de formación aberrante de los ejes antero/posterior y dorso/ventral en los huevos de *Drosophila*. Además Spn-E y la proteína Aubergine (Aub) (PiwiL1 en ratón) colocalizan en unos gránulos, denominados *nuage* que están en la periferia de las células germinales de los huevos. Esta colocalización se ve interrumpida en los mutantes *spn-E*, siendo más drástico el fenotipo cuanto más severa es la modificación de los ejes de distribución del huevo. Por otro lado, una delección de *spn-E* ocasiona una disminución muy severa de los niveles de piRNAs, siendo

Introducción

imposible generar el mecanismo ping-pong de biogénesis de piRNAs. Por este motivo, los retrotransposones, escapan de la regulación originando daños en las células. Algunos autores sostienen que al tratarse de una helicasa de RNA, es posible que Spn-E cambie la estructura haciendo que el RNA quede más accesible a otras proteínas de la ruta de los piRNAs, como por ejemplo a chaperonas o nucleasas (Gonzalez-Reyes et al. 1994, Gillespie and Berg 1995, Ott et al. 2014).

Hay pocos estudios de TDRD9 en mamíferos hasta la fecha. Estudios en ratón han descrito que *Tdrd9* codifica para una proteína de unos 150 kDa perteneciente a la superfamilia de las helicasas de RNA, que contiene un dominio helicasa/ATPasa DExH-box altamente conservado entre especies; y un dominio TUDOR. El dominio TUDOR tiene unos 60 aminoácidos de longitud y forma una estructura de 4 cadenas β -antiparalelas. Este dominio tiene propiedades de unión a grupos metilos y contiene un anillo aromático que facilita la interacción proteína-proteína dependiente de metilo. Las proteínas con dominios TUDOR pueden unir proteínas con motivos de lisinas metiladas o de argininas metiladas. *Tdrd9* es una de las proteínas que contiene un dominio TUDOR que reconoce motivos de argininas metiladas. Por ejemplo, el dominio TUDOR de *Tdrd9* une motivos RG/RGG (repeticiones de argininas que se dimetilan simétricamente). Estos motivos están presentes en la proteína *Miwi2*, con la que interacciona. La mayor parte de las proteínas que poseen estos dominios tienen capacidad de unión a RNA (Thandapani et al. 2013).

Por estudios inmunohistológicos en ratón, se sabe que *Tdrd9* se localiza en espermatogonia mitótica, espermatocitos meióticos (en estadio paquiteno), espermátidas haploides en testículos y en ovocitos en crecimiento en el ovario. La expresión de *Tdrd9* es localizada en el núcleo y en el citoplasma de espermátidas, más concretamente en *nuage*. *Nuage*, es una denominación genérica, la cual, engloba varios subtipos de gránulos de RNA: i) P-body like granules (PBs), ii) pi-Body (piBs) y iii) Cuerpos cromatoides (CBs). En ovocitos, *Tdrd9* fue también observada en el núcleo y citoplasma, pero no se observó una localización restringida en ningún dominio subcelular concreto (Liu et al. 2005, Shoji et al. 2009).

Tdrd9, *Miwi2* y *Mael* (*Maelstron* en *Drosophila*) colocalizan en gránulos que están enriquecidos en marcadores de PBs somáticos (DDX6 y GW182) y que se

denominan piP-bodies (piPBs) que indican la presencia simultánea de la ruta de procesamiento de piRNAs y de los componentes de los PB. (Aravin et al. 2009). Por otro lado, Mili (PIWIL2), Tdrd1 y Gasz también están formando agregados citoplásmicos denominados pi-bodies (piBs) que son distintos de los piPBs. Estos gránulos desaparecen si alguna de las tres proteínas está ausente. Mili, Gasz y Tdrd1, no sólo controlan su localización sino que también regula la localización de Miwi2-Mael-Tdrd9 en piPBs (Kuramochi-Miyagawa et al. 2010, Tanaka et al. 2011). A veces colindan ambos gránulos sugiriendo que estos dos compartimentos que poseen dos complejos distintos de proteínas TDRD-PIWI cooperan próximamente en prospermatogonia fetal (Shoji et al. 2009).

En 2009, el grupo de Shoji y colaboradores, originaron una línea de ratón mutante en Tdrd9 (*Tdrd9*^{-/-}). Vieron que los espermatocitos de ratones *Tdrd9*^{-/-} son capaces de iniciar la recombinación de DNA y formar estructuras en leptoteno, sin embargo la sinapsis de cromosomas homólogos falla y la espermatogénesis se bloquea originando ratones machos estériles. En estos mutantes, es muy característico el aumento de fosforilación de la histona H2A.X, que es un marcador de roturas de doble cadena (DSBs). Además, se da una degeneración de los espermatocitos, con vacuolización y desorganización intracelular formando agregados citoplásmicos. En testículos de *Tdrd9*^{-/-} postnatales (P12 y P25) existe un claro aumento de los transcritos de retrotransposones *LINE-1*. Tdrd9 genera un silenciamiento preferencial de este retrotransposón ya que otros retrotransposones estudiados no cambian y a diferencia de otros represores de retrotransposones (*Dnmt3L*, *Mili*, *Miwi2*) que tienen un perfil de silenciamiento más amplio (Bourc'his and Bestor 2004, Aravin et al. 2007, Carmell et al. 2007, Kuramochi-Miyagawa et al. 2008). Se ha identificado una mayor abundancia de ORF1p de *LINE-1* en espermatocitos de *Tdrd9*^{-/-} que en los controles, acumulándose mucho más en el núcleo en comparación con los controles cuya localización preferente es el citoplasma. Esta acumulación en el núcleo, origina una mayor fosforilación de la histona H2A.X indicando que la integridad del genoma es severamente perturbada. Por tanto, existe una correlación directa entre un exceso de activación de retrotransposones y la integridad nuclear de espermatocitos meióticos. Sin embargo, en los ovocitos de hembras silvestres y mutantes de *Tdrd9*, el nivel de

Introducción

ORF1p de *LINE-1* es el mismo y no se muestra ninguna diferencia en la progresión de la meiosis ni defectos celulares. Además las hembras mutantes en *Tdrd9* desarrollan una fertilidad normal.

En el análisis de expresión de piRNAs específicos de *LINE-1* se observa una disminución de piRNAs en los mutantes de *Tdrd9* respecto del control. Los testículos de fetos y los postnatales de ratones mutantes, están enriquecidos en piRNAs de *LINE-1* sentido respecto de los ratones silvestres. La disminución de los piRNAs de *LINE-1* antisentido no es una consecuencia directa del aumento del mRNA del retrotransposón. Lo que está ocurriendo es que la mutación de *Tdrd9* afecta a la producción de piRNAs secundarios por la falta de interacción con Miwi2, que carga preferentemente piRNAs secundarios para amplificar el silenciamiento mediante el mecanismo ping-pong (Aravin et al. 2008).

La localización de Mili y Tdrd1 no se ve afectada en los mutantes de *Tdrd9* y tampoco en los mutantes *Miwi2*, sin embargo la mutación de *Mili* y *Tdrd1* sí deslocaliza claramente a Tdrd9 y Miwi2. Todas las observaciones corroboran que Mili-Tdrd1 tienen un papel esencial y central en la biogénesis primaria de piRNAs, siendo complementaria y necesaria la biogénesis secundaria de piRNAs originados por el mecanismo ping-pong donde toma un papel principal el complejo formado por Miwi2-Tdrd9 (Reuter et al. 2009, Shoji et al. 2009, Vagin et al. 2009).

Durante el estadio de pro-espermatogonia, ocurre una de las metilaciones de novo del DNA y la pérdida de *Mili* o *Miwi2* afecta a las marcas epigenéticas de los retrotransposones, probablemente, debido al impacto ocasionado en el perfil de piRNAs. Las células germinales fetales de los mutantes de *Tdrd9* no muestran diferencias en la metilación del DNA en *LINE-1* en comparación con el control. En este momento la metilación está aún siendo establecida. Sin embargo en testículos postnatales, los mutantes de *Tdrd9* presentan una clara desmetilación de *LINE-1* antes y después de que el defecto meiótico comience. Esta desmetilación de *LINE-1* no se debe a cambios globales en la metilación del DNA o por la desregulación de las DNMTs ya que la metilación de otros TEs no se afecta en los mutantes *Tdrd9*. Por análisis de metilación por bisulfito y secuenciación se sabe que los mutantes en *Tdrd9* poseen la región promotora de *LINE-1* altamente desmetilada en comparación con los controles. Además, esta diferencia de metilación no se observa

en los promotores de otros TEs, lo cual indica que el control de *Tdrd9* sobre *LINE-1* es muy específico. La pérdida de función de *Tdrd9* afecta al estado epigenético del genoma de la línea germinal, lo cual podría imponer a largo plazo un desilenciamiento de *LINE-1* (Tanaka et al. 1997, Morison et al. 2001, Shoji et al. 2009).

En resumen, *Tdrd9* es una molécula esencial, que está muy conservada y que actúa contra los retrotransposones, *LINE-1*, en la línea germinal. Durante el desarrollo de la línea germinal masculina, *Tdrd9* participa, junto a otros complejos ribonucleoproteicos, en el control del perfil de piRNAs y en el establecimiento correcto de la metilación (represión) de *LINE-1*.

OBJETIVOS

Estudios recientes han puesto de manifiesto un posible papel de los piRNAs y proteínas implicadas en su biogénesis en cáncer. Así mismo, resultados preliminares de nuestro laboratorio sugerían que *TDRD9* podía estar expresándose en algunas líneas celulares tumorales, lo cual era sorprendente conociendo que *TDRD9* tiene una expresión mayoritariamente restringida en la línea germinal. En el momento de comenzar esta tesis, nada se conocía del papel de *TDRD9* en cáncer. Con estos precedentes propusimos los siguientes objetivos:

1.- Investigar y caracterizar la función de *TDRD9* en líneas celulares y tumores.

2.-Búsqueda de interactores proteicos de *TDRD9*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

1.1 Organismos

En esta tesis se han utilizado bacterias, levaduras y líneas celulares de origen animal. La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) se utilizó como herramienta para la técnicas de DNA recombinante y la obtención de proteínas recombinantes (Tabla M1). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se utilizó para llevar a cabo el escrutinio del doble híbrido y la caracterización de la interacción entre las proteínas halladas y TDRD9 (Tabla M2). El uso de las líneas celulares de origen animal (Tabla M3) permitió conocer la localización celular de las proteínas en estudio y llevar a cabo ensayos proteómicos y funcionales.

Tabla M1. Características genotípicas más importantes de la estirpe *E. coli*

Estirpe	Genotipo
DH5 α	<i>F-endA1 gyrA96 hsdR17 ΔlacU16 9 (f80lacZΔM15) recA1 relA1 supE44 thi-1</i> (Hanahan 1983)

Tabla M2. Características genotípicas más importantes de la estirpe *S. cerevisiae*

Estirpe	Genotipo
MaV203	<i>MATα leu2-3 112 trp1-901 his3Δ200 ade2-101 gal4Δ gal80Δ SP AL10::URA3 GAL1::lacZ HIS3_{UAS} GAL1::HIS3@LYS2 can1^R cyh2^R</i> (ProQuest Two-Hybrid System, GibcoBRL)

Tabla M3. Características más importantes de las líneas celulares utilizadas.

LÍNEA CELULAR	ESPECIE	ORIGEN/CARACTERÍSTICA	MEDIO CULTIVO	PROCEDENCIA
NCI-H1299	Homo sapiens	Carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC)	RPMI	ATCC, (Estados Unidos)
NCI-H441	Homo sapiens	Adenocarcinoma de pulmón papilar	RPMI	Dr. M.Esteller IDIBELL, Barcelona
NCI-H1993	Homo sapiens	Adenocarcinoma de pulmón	RPMI	Dr. M.Esteller IDIBELL, Barcelona
NCI-H1975	Homo sapiens	Adenocarcinoma de pulmón	RPMI	Dr. M.Esteller IDIBELL, Barcelona
NCI-H23	Homo sapiens	Adenocarcinoma de pulmón	RPMI	Dr. M.Esteller IDIBELL, Barcelona
NCI-H522	Homo sapiens	Adenocarcinoma de pulmón	RPMI	Dr. M.Esteller IDIBELL, Barcelona
A427	Homo sapiens	Carcinoma de pulmón	DMEM/F12	Dr. M.Esteller IDIBELL, Barcelona
A549	Homo sapiens	Carcinoma de pulmón de células escamosas	DMEM/F12	Dr. M.Esteller IDIBELL, Barcelona
H1264	Homo sapiens	Carcinoma de pulmón	RPMI	Dr. M.Esteller IDIBELL, Barcelona
HeLa	Homo sapiens	Adenocarcinoma de cérvix	DMEM	Dr A. Aguilera, CABIMER, Sevilla
Cos7	Cercopithecus aethiops	Epitelio de riñón	DMEM	Dr R.Rios CABIMER, Sevilla

1.2 Condiciones de cultivo bacteriano

Las estirpes bacterianas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (Shubeita et al. 1987) esterilizado mediante autoclave y suplementado, en el caso en que fuera necesario, con ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 25 µg/ml. El cultivo sólido de estas cepas se llevó a cabo en estufas a 37 °C. El cultivo líquido, además requirió agitación orbital continua.

LB: NaCl 10 g/l; bactotripton 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l. Añadir 15 g/l de bacto agar para la obtención de medio sólido.

1.3 Condiciones de cultivo de levaduras

La estirpe MaV203 se cultivó habitualmente en medio rico YPAD, con el objetivo de obtener biomasa para llevar a cabo los ensayos experimentales, o en medio mínimo SC, necesario para testar fenotipos específicos en ensayos de transformación. En este caso, el medio mínimo SC sin Leucina (Leu), Triptófano (Trp) ni Histidina (His), se complementó con los aminoácidos necesarios para cada condición experimental. El cultivo sólido se llevó a cabo en estufas a 30 °C. El cultivo líquido requirió agitación orbital continua.

YPAD: Extracto de levadura 10 g/l; tripton 20 g/l; glucosa 20 g/l; adenina sulfato 0,1 g/l. Añadir bacto agar 20 g/l para obtener medio sólido. Esterilizar a 121 °C, 15 min.

SC: Añadir al contenido de cada sobre (Q-BIOgene) 1 litro de agua destilada. Añadir bacto agar 20 g/l para obtener medio sólido. Esterilizar a 121 °C, 15 min. Tras su enfriamiento parcial añadir los requerimientos de aminoácidos necesarios (0,8 mM Leu; 0,32 mM Trp y/o 0,8 mM His) procedentes de las soluciones previamente filtradas

1.4 Condiciones de cultivo de líneas celulares animales

Las células **HeLa** y **Cos7** se cultivaron en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) provisto comercialmente de 4,5 g/l de D-glucosa; 0,584 g/l de L-Glutamina y 0,110 g/l de piruvato sódico (SIGMA) y suplementado con suero fetal bovino al 10 % (PAA Laboratories), estreptomycin 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml

(Sigma). Las **NCI-H1299**, **NCI-H441**, **NCI-H1993**, **NCI-H1975**, **NCI-H23**, **NCI-H522** y **NCI-H1264** en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) provisto de L-Glutamina, Glucosa y NaHCO₃ (SIGMA) y suplementado con suero fetal bovino al 10 %, estreptomina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml. Las líneas celulares **A549** y **A427** fueron cultivadas en DMEM/F12 (Dubelcco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient mixture F12 Ham) provisto comercialmente de D-glucosa 3,15 g/l; HEPES 15 mM; NaHCO₃ 1,2 g/l; piridoxina 2,031 mg/l; piruvato 55 mg/l y L-Glutamina 0,365 g/l (SIGMA) y suplementado con suero fetal bovino al 10 %, estreptomina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml.

Todos los cultivos se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37 °C y con una concentración de CO₂ del 5 %.

2.- OLIGONUCLEÓTIDOS Y PLÁSMIDOS

Los oligonucleótidos utilizados para la biología molecular del DNA se muestran en la Tabla M4, los plásmidos usados en las tablas M5 y M6 y los oligonucleótidos usados en la biología molecular del RNA (siRNAs) en la tabla M7.

Tabla M4. Oligonucleótidos utilizados para la biología molecular del DNA

LOCI	FORWARD 5'-3'	REVERSE 5'-3'	USO
TDRD9	TCAAGAGAATTAGAGAGG	GGAATGTGTTTCAACACG	PCR
PIWIL1	TGGTTATATTCAGCCTAGGC	CTTCTGGCTCCATCAGTGG	PCR
PIWIL2	CACTCCTGGAAGTGTGGTAC	CTCACCAGCCCATCTCCAAG	PCR
PIWIL3	GTTCAGAGGGTACAGTGGTAC	CGGTATAACTGAATGGCCTTC	PCR
PIWIL4	CTTGGGAACAAGCAGGATCTC	GGATGGCACCGTCGAATGC	PCR
TDRD9	TGAGGTTTTAGAAAGGTTATTTTG	CCAACAACCCACATTAATCAC	Bi-S
TDRD9	TGCTTGGGCCAGAGAGAGT	TAGGGCTTTTCATGCCACTT	qPCR
GAPDH	GAGTCAACGGATTGGTCGT	AATGAAGGGGTCATTGATGG	qPCR
UTR-LINE1	GAATGATTTTGACGAGCTGAGAGAA	GTCCTCCCGTAGCTCAGAGTAATT	qPCR
CCND2	GCCACCGACTTTAAGTTTGC	GCTCACTTCCTCATCTGCT	qPCR
AXL	CCAGCACCTGTGGTCATCT	CATCTGAGTGGCAGGTACA	qPCR
CTGF	GCAGGCTAGAGAAGCAGAGC	TGGAGATTTTGGGAGTACGG	qPCR
28S	CTGGAGAGCCTCGGGATCC	TACCCACCCGACCCGTCTTG	qPCR
Linker pET	TATGGCTAGCGAATTCGAG	TCGACTCGAATTCGCTAGCCA	PCR
Hls-DH	ATTTCCGCGGTCGACGATGTTGCGGAAGCTACC	TGGGCCAGAGCCCGAGCCTGGGCCGCGGACC	PCR

PCR: convencional; **qPCR:** PCR cuantitativa relativa. **Bi-S:** cebadores utilizados para amplificar DNA genómico previamente tratado con Bisulfito.

Tabla M5. Plásmidos utilizados no construídos en este trabajo

PLÁSMIDO	ANTIBIÓTICO SELECCIÓN	PROMOTOR	APLICACIÓN EN LA TESIS	REFERENCIA
pDBLeu	Kanamicina	ADH1	Expresión de proteínas de fusión al dominio de unión al DNA de GAL4 en la estirpe de levadura MaV203	Invitrogen
pPC86	Ampicilina	ADH1	Expresión de proteínas al dominio de transactivación de GAL4 en la estirpe de levadura MaV203	Invitrogen
pN-Flag-mTDRD9	Ampicilina	CMV	Expresión de <i>TDRD9</i> en las líneas celulares HeLa o Cos7	Dr. Alexei Aravin, California
pRNG105-mRFP1 (CAPRIN1)	Kanamicina	CMV	Expresión de CAPRIN1 en líneas celulares HeLa o Cos7	Nobuyuki Shiina, Japón.
pG3BP-GFP	Kanamicina	CMV	Expresión de G3BP en líneas celulares HeLa o Cos7	Nobuyuki Shiina, Japón.
pGEM-T	Ampicilina	-	Análisis de metilación	Promega
IMAGp998G0610753 Q	Ampicilina	-	Contiene el cDNA de <i>TDRD9</i>	RZPD

Tabla M6: plásmidos construídos en este trabajo

PLÁSMIDO	INSERTO	VECTOR (Digestión)
IMAGp998G0610753Q-Sall	Utilizando los oligos Hls-DH se ha sustituido el fragmento original SacII-SacII de p998, dejando así dianas nuevas Sall-StuI con las que extraer <i>TDRD9</i> y ser clonado en pDBLeu en fase.	IMAGp998G0610753Q
pDBLeu-TDRD9	Fragmento obtenido por digestión del plásmido IMAGp998G0610753Q-Sall con Sall/StuI	pDBLeu

Tabla M7. siRNAs utilizados

GEN	siRNA	SECUENCIA (5'-3')
<i>Luciferasa</i>	siControl	CGUACGCGGAUACUUCGAUU
<i>TDRD9</i>	siTDRD9-1	GCAACUUGGUAACUCAUA
<i>TDRD9</i>	siTDRD9-2	AGCGCACCAUCCUUCUACUA

3.- MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA

3.1 Aislamiento de DNA plasmídico bacteriano

El aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se llevó a cabo mediante lisis alcalina. Las células contenidas en 2 ml de cultivo se recogieron por centrifugación a 9000 g durante 5 min. El precipitado se resuspendió en 100 ml de la

solución 1 y tras 5 min a temperatura ambiente (RT) se añadieron 200 ml de la solución 2, invirtiendo la mezcla varias veces e incubando posteriormente 5 min en hielo. Tras la adición de 150 ml de la solución 3, la mezcla resultante se invirtió varias veces y posteriormente se incubó 5 min en hielo. Las proteínas, el DNA cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13000 g durante 5 min. La precipitación del DNA plasmídico se llevó a cabo añadiendo dos volúmenes de etanol puro, incubando 10 min a -20 °C y centrifugando posteriormente a 13000 g durante 5 min. Al precipitado obtenido se añadió etanol al 70 % para eliminar las sales. Se volvió a centrifugar y finalmente el precipitado resultante se resuspendió en TE. Para la obtención de DNA plasmídico más puro a mediana y gran escala, se utilizaron los sistemas comerciales Favorgene y JET Star (Genomed) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Solución 1: 50 mM de Glucosa; 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 10 mM de EDTA pH 8,0.

Solución 2: 0,2 M NaOH; 1 % SDS.

Solución 3: 3 M KAc; 11,5 % ácido acético glacial.

TE: 10 mM tris-HCl; pH 8,0 y 1 mM EDTA pH 8,0.

3.2 Aislamiento de DNA plasmídico de levaduras

Las células cultivadas en 2 ml de medio selectivo a 30°C durante 12-14 h se recogieron por centrifugación a 3000 g durante 5 min y se resuspendieron en 100 µl de tampón STET. Se añadió 0,2 g de perlas de vidrio de 0,45 mm y la mezcla se agitó vigorosamente durante 5 min. Tras añadir otros 100 µl de STET, se hirvió a 100 °C durante 3 min y posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 10 min a 4 °C. A 150 µl del sobrenadante obtenido se le añadió 75 µl de acetato de amonio 7,5 M y tras incubar 1 h a -20 °C, se centrifugó a 13000 g durante 10 min a 4 °C. La precipitación del DNA plasmídico presente en la fase acuosa se llevó a cabo utilizando dos volúmenes de etanol puro, incubando 10 min a -20 °C y centrifugando posteriormente. Al precipitado obtenido se añadió etanol al 70 % y se resuspendió en agua Milli Q. Debido a que los vectores aislados eran de bajo número de copias, el DNA extraído necesitó ser amplificado en *E. coli*.

STET: 8 % de sacarosa; 50 mM tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 5 % Tritón X-100.

3.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos se hizo según el método de Sambrook (Sambrook, 1989). Los geles de agarosa se prepararon en tampón TBE 0,5X a una concentración del 1,5 %. A los geles se les añadió bromuro de etidio (5 µg/ml) que permitió visualizar el DNA exponiéndolo a la luz ultravioleta. A las muestras se les añadió 1/10 volumen de tampón de carga. Para determinar el tamaño de los fragmentos, se empleó un patrón comercial. La electroforesis se realizó en sistemas horizontales Wide Mini-Sub Cell GT (Biorad).

TBE 1X: tris 18,78 g/l; ácido bórico 5,5 g/l; EDTA disodium·2H₂O 0,74 g/l.

Tampón de carga de DNA: 0,25 % azul de bromofenol; 0,25 % xileno-cianol; 30 % glicerol

3.4 Purificación, cuantificación y secuenciación de DNA

Para la extracción de DNA de la agarosa se usó el sistema comercial Favorgene siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de DNA en solución se estimó por espectrofotometría (ND-1000; nanodrop). La secuenciación de fragmentos de DNA la realizó la empresa Secugen (Madrid, España).

3.5 Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el termociclador T-personal (Biometra). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la reacción (Tabla M4) fueron sintetizados por SIGMA. Para cada reacción se utilizaron las siguientes condiciones estándar: 5 µl de tampón comercial 10X, 2 µl de MgCl₂, 1 µl de una mezcla de dNTP, 1 µl de cada oligonucleótido concentrados a 10 µM, 2,5 U de la polimerasa de DNA (EcoTaq), entre 20-50 ng de DNA molde y agua hasta un vol final de 50 µl. Para alcanzar una elevada fiabilidad en la síntesis se utilizó la polimerasa del sistema comercial Expand High Fidelity PCR System (Roche). La reacción tipo constó de 1

ciclo de 5 min a 95 °C; 20-30 ciclos de 1 min a 94 °C seguido de 1 min a la temperatura de apareamiento de los oligonucleótidos al DNA molde y posteriormente 1 min/Kb de DNA a amplificar a 72 °C para finalizar, 1 ciclo de 10 min a 72 °C.

3.6 Transformación de bacterias

La transformación de *E.coli* (estirpe DH5 α) se llevó a cabo mediante transformación por choque térmico. En este proceso, 100 μ l de solución de células competentes preparadas en la unidad "Servicio de Organismos Modelo" de CABIMER utilizando el protocolo descrito por Hanahan (Hanahan 1983). se mezclaron con 50 ng de DNA. Dicha mezcla se incubó en hielo 30 min y a continuación se sometió a un choque térmico 45 s a 42 °C. Posteriormente se añadió 1 ml de LB a la mezcla que se incubó entre 60-90 min a 37 °C en agitación. Transcurrido este tiempo se recogieron las células por centrifugación y se sembraron en medio LB sólido con su correspondiente antibiótico para seleccionar aquellas bacterias portadoras del plásmido que contenga el gen de la resistencia.

3.7 Transformación de levaduras

La transformación de levaduras se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Ito (Ito et al. 1983) y posteriormente modificado por Gietz (Gietz et al. 1992). Dicho método se utilizó en el escrutinio de doble híbrido y en la posterior verificación y análisis de las interacciones. Para transformaciones rutinarias se cultivó biomasa de la estirpe Mav203 en medio YPAD líquido durante 16 h a 30 °C. Tras medir su densidad óptica a 600 nm (DO_{600}), se inoculó un cultivo del mismo medio a una DO_{600} de 0,4. Una vez alcanzada la DO_{600} deseada, el cultivo se centrifugó a 3000 g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en agua Milli Q (1/5 del volumen del cultivo inicial). Tras centrifugar a 3000 g durante 5 min, el precipitado se resuspendió en 1/100 del vol de TE/LiAc obteniendo así células competentes. Por transformación se mezclaron 100 μ l de células competentes con 0,5 μ g de DNA de esperma de salmón y 600 μ l de PEG/TE/LiAc. Tras una incubación de 30 min a 30 °C,

la mezcla se sometió a choque térmico durante 15 min a 42 °C, se centrifugó a 15000 g durante 30 s y finalmente el precipitado resultante se resuspendió en 100 µl de agua Milli Q estéril procediendo a su siembra en placas de medio selectivo. Las placas se incubaron 48-72 a 30 °C.

TE/LiAc: 10 mM tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 7,5; 0,1 M LiAc

PEG/TE/LiAc: 10 mM tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 7,5; 0,1 M LiAc; 40 % PEG-3350 al 50 %.

3.8 Transfección transitoria de líneas celulares animales con DNA plasmídico

Las células se transfectaron utilizando FuGENE[®] 6 Transfection Reagent. Este reactivo es una mezcla de lípidos y otros componentes diluídos en etanol al 80 %, que permite transfectar DNA en una gran variedad de líneas celulares con una alta eficiencia y baja toxicidad. El día previo a la transfección, se cultivó la cantidad de células necesarias para que al día siguiente éstas estuvieran al 70-80 % de confluencia. Se procedió a realizar la mezcla de la transfección, como indica el fabricante. Se añadió la mezcla de la transfección sobre las células con medio renovado. Al día siguiente se volvió a refrescar el medio para eliminar la mezcla de transfección y se cultivó otras 24 h más. Posteriormente se procedió al análisis de las muestras.

3.9 Aislamiento de DNA genómico de células animales

Las células previamente cultivadas y con un porcentaje de confluencia del 80 % aproximadamente, se recogieron mecánicamente en 1 ml de PBS frío. Se centrifugaron un minuto a máxima velocidad a temperatura ambiente y se resuspendió el pellet en 600 µl del Buffer 2X de la Proteínasa K. Se añadió 12 µl de proteínasa K a 10 mg/ml y se incubó 12 h a 55 °C. Se le añadió 2 µl de RNAsa A 10 mg/ml y se incubó durante 1 h a 37°C, fenolizando posteriormente. El DNA se precipitó con 3 ml de etanol al 96 % y 1/10 vol de AcNa 3 M a -20 °C toda la noche. Al día siguiente se lavó el pellet con etanol 70 %. Una vez seco el pellet se

resuspendió en agua Milli Q. La concentración de DNA en solución se estimó por espectrofotometría (ND-1000; nanodrop)

Buffer 2X proteinasa K: 100 mM Tris pH 7,5; 200 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % SDS.

3.10 Manipulación enzimática

Las diferentes enzimas empleadas en la manipulación del DNA tales como endonucleasas de restricción (Takara; GE Healthcare, New England Biolabs), polimerasa de DNA, Klenow, fosfatasa alcalina (Roche) y la ligasa T4 (Invitrogen) se utilizaron según las instrucciones del fabricante.

4.- MANIPULACIÓN DEL RNA

4.1 Aislamiento y cuantificación del RNA de líneas celulares animales

El aislamiento de RNA se llevó a cabo con el sistema RNAeasy mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA en solución se estimó por espectrofotometría (ND-1000; nanodrop). La visualización de RNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 0,8 % en tampón TBE 0,5X teñidos con Bromuro de etidio (5 µg/ml).

4.2 Aislamiento y cuantificación del RNA de tejidos humanos

Los tejidos usados para esta tesis fueron, testículo y pulmón humanos. Los cuales se homogeneizaron con un disgregador de tejidos de 3 ml "Potter-elvehjem PTFE pestle and glass tube" de Sigma-aldrich para su posterior extracción de RNA con el kit *RNeasy mini Kit* (QIAGEN) siguiendo el protocolo de extracción de RNA desde tejidos.

4.3 Reacción de retrotranscripción a partir de RNA seguido de amplificación de cDNA mediante PCR

Este protocolo se llevó a cabo en dos etapas. La primera consistió en obtener cDNA total a partir de RNA (1 µg/ reacción) mediante la acción de la enzima retrotranscriptasa utilizando el sistema Super-Script™ First Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Como control, una de las reacciones careció de la enzima. La segunda etapa consistió en una reacción de PCR utilizando 5 µl la reacción obtenida en el paso anterior y previamente diluída en agua hasta llegar a un volumen final de 50 µl. Las reacciones de PCR cuantitativas (qPCR) se realizaron con un termociclador de PCR en tiempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystem, 7500 System software V1.4.0). Los oligonucleótidos empleados (diseñados en el programa primer3plus) presentan eficiencias de amplificación prácticamente idénticas (Tabla M4). Para testarlos se realizó una recta patrón a partir de diluciones seriadas de una muestra de cDNA por cada par de oligonucleótido y se comprobó si las pendientes de las rectas eran paralelas y si tenían un valor cercano a -3.3 y 3.4. Para cada reacción de PCR cuantitativa relativa se utilizaron las siguientes condiciones estándar: 1,5 µl de una mix de primers a 10 µM (Forward y reverse), 3,5 µl de agua Milli Q, 5 µl de la solución de cDNA y 10 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) que contiene el fluorocromo SYBR® Green, la ampliTaQ Gold DNA polimerasa, la DNA polimerasa LD, dNTPs con mezcla de dUTP/dTTP, el fluorocromo ROX como referencia pasiva y un tampón optimizado para la reacción. La reacción tipo constó de 1 ciclo de 10 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 s a 95 °C seguido de 1 min a 65 °C; 1 ciclo de disociación que consiste en 15 s a 95 °C; 1 min a 65 °C; 15 s a 95 °C y 15 s a 60 °C. Los valores fueron normalizados respecto a la expresión del gen humano *GAPDH*.

4.4 Transfección de RNA de interferencia

Para inhibir la síntesis de *TDRD9* se utilizó "Small Interfering RNA" (siRNA) suministrados por SIGMA. La transfección transitoria en líneas celulares se llevó a cabo utilizando Lipofectamine™ RNAiMAX de Invitrogen. El día previo a la

transfección se plaqueó el número de células correspondientes al diámetro de placa usado y que especifica las instrucciones del fabricante, alcanzando un 20-30 % de confluencia al momento de transfectar. Así pues, para placas multi pocillos de 6 se cultivó 150000 células. Para transfectar las células se hicieron dos mezclas. A) Se mezcló 0,5 μ l de siRNA a 100 μ M junto con 250 μ l de optimem, la mezcla B) 5 μ l de RNAiMAX junto con 245 μ l de optimem. Se mezcló A+B y se incubó 20 min a temperatura ambiente. Se cambió el medio de cultivo de las células a Optimem (500 μ l por pocillo). Transcurridos los 20 min la mezcla A+B se depositó gota a gota sobre las células. Entre 4-6 horas más tarde, se sustituyó el medio de transfección por medio de cultivo completo y 72 horas más tarde se procesaron las muestras.

5.-SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

5.1 Obtención de extractos de proteínas solubles de líneas celulares animales

Para la obtención de un extracto proteico, formado por proteínas nucleares y citoplásmicas, las células en cultivo se recogieron mecánicamente en PBS 1X y se centrifugaron a 3000 g durante 5 min. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en Tampón IP (10⁶ células/ 50 μ l de tampón) y se incubaron 10 min en agitación suave. El sobrenadante obtenido tras centrifugar el lisado a 16000 g durante 15 min correspondió al extracto de proteínas solubles.

5.2 Obtención de extractos de proteínas insolubles de líneas celulares animales

Para la obtención de extractos enriquecidos en proteínas no solubles o agregados se añadió al pellet, resultante del paso anterior, 200 μ l de Laemmli 4X con β -Mercaptoetanol y DTT en concentración final de 7 mM y 2 mM respectivamente.

Tampón IP: 50 mM tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1,5 mM EDTA; 1 % Tritón X-100; 1 mM PMSF; inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche).

PMSF: 17,42 g/l disuelto en isopropanol.

Laemmli Buffer 4X: 0,5 M tris-HCl pH 6,8; 16 % glicerol; SDS 10 %; 1,28 mM β -Mercaptoetanol y azul de bromofenol (0,05 %).

5.3 Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo según el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli 1970) para geles discontinuos de poliacrilamida, utilizando el sistema Mini-Potest IITM (BioRad). Los geles constaban de dos partes: la de empaquetamiento, que favorecía la correcta migración de las muestras; y la de separación, donde las proteínas migraban según su peso molecular. En este trabajo se usaron geles en los que su zona de separación contenía poliacrilamida al 6 % o 12 % según el peso molecular de las proteínas a estudiar. Una vez cargados los geles, migraron a 200 V a temperatura ambiente y durante 50-60 min.

Las muestras se prepararon en laemmli buffer 1X, se hirvieron durante 5 min a 95 °C y se cargaron en el gel. Como patrón de masas moleculares se usó una mezcla de proteínas comerciales, PageRulerTM prestained protein ladder, que son de bajo peso molecular (hasta 170 KDa) o bien Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, para proteínas con alto peso molecular (hasta 315 KDa). Ambas de Thermo Scientific.

Tras finalizar la electroforesis las proteínas presentes en los geles de poliacrilamida fueron transferidas a filtros de PVDF (si se quería revelar con quimioluminiscencia) o a Immobilon[®] FL (si el análisis iba a ser por fluorescencia usando el sistema Odyssey).

5.4 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas en extractos libres de membrana se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford 1976), usando el reactivo de Bradford (BioRad) y utilizando como recta patrón cantidades crecientes conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

5.5 Sistema de doble híbrido en levaduras

El sistema de doble híbrido en levaduras se llevó a cabo con el objetivo de identificar proteínas que interaccionen con TDRD9 que ayuden a esclarecer su posible función en células cancerosas.

Para ello se utilizó el sistema ProQuest Two-Hybrid System (Invitrogen) basado en la reconstrucción del factor transcripcional GAL4 al interaccionar la proteína de estudio fusionada al dominio de unión al DNA (GBD) de GAL4 (cebo) con la proteína desconocida fusionada al dominio de transactivación (GAD) de GAL4 (presa). Esta reconstrucción activa la transcripción de los genes reporteros *HIS3* y *LacZ* integrados en copia única en el genoma de la estirpe MaV203 de *S. cerevisiae*. El primero codifica una enzima implicada en la síntesis de His, cuya inhibición dependiente de la dosis por el 3-Amino-1,2,4-Triazol (3AT) impide la biosíntesis de dicho aminoácido, mientras que el segundo codifica la enzima β -galactosidasa capaz de metabolizar el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -galactopiranosido (X-Gal) formando un precipitado azul. Antes de comenzar el escrutinio se determinaron las concentraciones de 3AT requeridas para anular el nivel de activación basal del gen *HIS3* en la estirpe MaV203, previamente transformada con pDBLeu-*TDRD9* y pPC86, que fueron de 25 mM y 50 mM.

Para llevar a cabo este ensayo se clonó el cDNA de *TDRD9* en el plásmido pDBLeu de forma que quedara en fase con la secuencia que codifica el dominio de unión al DNA de GAL4 presente en este vector. El plásmido pDBLeu contiene también el gen *LEU2*, cuya expresión permite el crecimiento de la levadura en medio sin leucina. El escrutinio se llevó a cabo por transformación de la construcción pDBLeu-*TDRD9* (GBD-*TDRD9*) y una genoteca de cDNA de embrión de ratón de 8,5 días de desarrollo clonada en el vector pPC86 (GAD-Y), en la estirpe MaV203. El plásmido pPC86 contiene también el gen *TRP1* cuya expresión permite el crecimiento de la levadura en medio sin triptófano. La reconstrucción del factor de activación GAL4, gracias a la interacción GBD-*TDRD9*/GAD-Y, permitió la selección de los clones positivos mediante crecimiento en medio selectivo (SC-Leu-Trp-His+3AT). El DNA plasmídico de los clones positivos crecidos en medio selectivo fue aislado, amplificado en *E. coli* DH5 α y analizado mediante secuenciación.

Posteriormente se verificó la interacción entre los candidatos mediante ensayos de retransformación en la estirpe MaV203 y crecimiento posterior en medio selectivo.

Por otro lado, se hizo otra construcción igual a la anterior pero con el dominio TUDOR de TDRD9 delec ionado, pDBLeu- Δ TDRD9. Se procedió de la misma manera que lo descrito anteriormente pero sólo con las proteínas que resultaron positivas en el escrutinio. Así queríamos ver si era este el dominio responsable de la interacción entre las proteínas y TDRD9.

6.- MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

6.1 Anticuerpos

A continuación se detallan los anticuerpos primarios (Tabla M8) y secundarios (Tabla M9) utilizados indicando el antígeno que reconocen, su origen, procedencia y las diluciones usadas para Inmunofluorescencia (IF) y Western-Blot (WB).

Tabla M8. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo contra	Antígeno	Origen	Procedencia	IF	WB
Flag M2	DYKDDDDK	Ratón monoclonal	Sigma Ref: F1804	1:200	1:1000
Anti-phospho H2A.X (ser139)	aa 134-142 (humana)	Ratón monoclonal	Millipore Ref: #05-636	1:200	1:1000
Phospho-DNA-PK (Ser2056)	Péptido alrededor de la Ser2056	Conejo Policlonal	Cell Signaling Ref: #4215	-	1:1000
α-Tubulina	α -Tubulina	Ratón monoclonal	Sigma Ref: 9026	-	1:10000

Tabla M9. Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo contra	Origen	Conjugado	Procedencia	IF	WB
Ratón IgG	Cabra	Peroxidasa de rábano	Sigma Ref: A-4416	-	1:10000
Ratón IgG	Cabra	IRDye 800cw	Li-Cor 926-32211	-	1:10000
Conejo IgG	Cabra	IRDye 680cw	Li-Cor 926-68070	-	1:10000
Ratón IgG (H+L)	cabra	Alexa Fluor 488	Life technologies Ref: A11001	1:1000	-
conejo IgG (H+L)	cabra	Alexa Fluor 568	Life technologies Ref: A11011	1:1000	-
Ratón IgG (H+L)	Burro	Cy3	Jackson Immunoresearch Ref: 715-165-150	1:400	-

6.2 Ensayo de Western Blot (WB)

Los WBs realizados en este trabajo se llevaron a cabo con dos técnicas diferentes. Por un lado con membranas de PVDF y detección por quimioluminiscencia; y por otro lado con membranas Immobilon[®] FL para el análisis y cuantificación de fluorescencia en el infrarrojo mediante el sistema ODYSSEY.

6.2.1 Detección por quimioluminiscencia

Las proteínas separadas en geles de SDS-poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF Immun-Blot[®] (BioRad) mediante el sistema de transferencia húmeda Mini-PROTEAN[®] 3 CELL (BioRad). La electrotransferencia se realizó en tampón de transferencia durante 12 h aplicando una diferencia de potencial de 35V. Tras finalizar el proceso las membranas se sumergieron en solución de bloqueo durante 90 min en agitación. La incubación con el anticuerpo primario (Tabla M8) se realizó durante 3 h a temperatura ambiente en la misma solución. A continuación se procedió a lavar la membrana con solución de lavado, 3 veces (5 min cada lavado) con agitación constante moderada. Tras los lavados, la incubación con el anticuerpo secundario, conjugado con peroxidasa de rábano (Tabla M9), se realizó en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a lavar las membranas de la misma forma ya descrita. A continuación se llevó a cabo el revelado de la actividad peroxidasa con un sistema de inmunodetección quimioluminiscente de gran sensibilidad (ECL Plus Western Blotting Detection System; GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de la señal luminosa se utilizaron películas autorradiográficas HyperFilm[™] MP (GE Healthcare).

Tampón de transferencia: 48 mM tris-HCl; 0,037 % SDS; 39 mM glicina; 20 % metanol.

Solución de bloqueo para PVDF: leche desnatada en polvo 50 g/l en solución de lavado.

Solución de lavado para PVDF: 0,1 % Tween-20 en PBS 1X

6.2.2 Detección por Fluorescencia

Las proteínas separadas en geles de SDS-poliacrilamida se transfirieron a una membrana Immobilon[®] FL Transfer Membranes (Millipore) mediante el sistema de transferencia húmeda Mini-PROTEAN[®] 3 CELL (BioRad). La electrotransferencia se realizó en tampón de transferencia durante 12 h aplicando una diferencia de potencial de 35 V. Tras finalizar el proceso las membranas se sumergieron en solución de bloqueo durante 90 min en agitación. La incubación con el anticuerpo primario (Tabla M8) se realizó durante 3 h a temperatura ambiente en la misma solución. A continuación se procedió a lavar la membrana 3 veces con la solución de lavado I, (5 min cada lavado) con agitación constante moderada. Seguidamente el anticuerpo secundario se incubó en solución de lavado I durante 1 h. Tras esto, se procedió a lavar la membrana como ya se ha descrito. Se finaliza con un lavado en solución de lavado II y se deja secar, al menos 1 h, para su posterior análisis en ODYSSEY[®] CLX Imaging system.

Solución de bloqueo para Immobilon[®] FL: Oddysey[®] Blocking Buffer (TBS) (Li-COR).

Solución de lavado I para Immobilon[®] FL: 0,1 % Tween-20 en TBS 1X.

Solución de lavado II para Immobilon[®] FL: TBS 1X.

6.3 Inmunofluorescencia (IF)

Las células cultivadas en monocapas y adheridas a lamelas de vidrio, se fijaron en PBS-PFA 4 % durante 10 min, permeabilizándose después con PBS-T 0,5 % durante 15 min. Tras la fijación se realizaron 2 lavados de 5 min cada uno con PBS-T 0,1 % y posteriormente se sumergieron las lamelas en solución de bloqueo durante 1 h. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario durante 3 h. Transcurrido este tiempo se lavaron 3 veces con PBS-T 0,1 % y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla M9) disueltos también en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron 3 veces más con PBS-T 0,1 %, añadiendo en el último lavado de 10 min 4'-6-Diamino-2-

fenilinol (DAPI) a 0,1 µg/ml como fluorocromo marcador de DNA, seguido de dos lavados con agua Milli Q. Finalmente las muestras se deshidrataron durante 2 min en etanol puro y se montaron en portaobjetos sobre medio de montaje Vectashield (Vector).

PBS-PFA 4 %: ChemCruz™ (Santa Cruz Biotechnology, Inc)

PBS-T 0,5 %: 0,5 % Tween en PBS 1X

PBS-T 0,1 %: 0,1 % tween en PBS 1X

Solución de bloqueo: PBS-Tween 0,1 %- BSA 3 %

7. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las preparaciones se observaron usando el microscopio Axio-IMAGER APOTOME.2 Zeiss. Es un microscopio estativo vertical que está configurado con la lámpara HXP120W tanto para luz transmitida (campo claro y contraste interdiferencial o Nomarski) como para fluorescencia. Para controlar el sistema utiliza el software Zen 2 blue. Una de las principales características de este equipo es que permite incorporar un dispositivo de iluminación estructurada, **ApoTome.2**, en la ruta de iluminación.

El microscopio posee los siguientes objetivos:

- ✚ EC plan Neofluar 40x /0.75 M27 dry,
- ✚ Plan-Apochromat 63x /1.40 oil
- ✚ Plan-Apochromat 100x /1.40 oil

Y filtros:

Tabla M10. Filtros del microscopio Axio-IMAGER APOTOME.2

49DAPI	52He488	43DsRed	50Cy5
Ex BP: 365	Ex BP: 488/20	Ex BP: 545/25	Ex BP: 640/30
DM:395	DM: 505	DM: 570	DM: 660
Em BP: 455/50	Em BP: 530/50	Em BP: 605/70	Em BP: 690/50
DAPI, Hoechst	GFP, Alexa 488, FITC	Cy3, Alexa 555, TRITC	Cy5, Alexa 633 y 647

Los valores se indican en nm. BP: filtro pasa banda, que permite el paso de una banda determinada del espectro de luz. La barra lateral (/) separa el valor máximo de la banda de su anchura.

En las adquisiciones que se hicieron para esta tesis, se utilizaron los objetivos de inmersión Plan-Apochromat 63x /1.40 oil y Plan-Apochromat 100x /1.40 oil.

8.-ANÁLISIS DE CICLO CELULAR

8.1 Curvas de crecimiento

Para evaluar el efecto de la inhibición de la expresión de *TDRD9* en la evolución de un cultivo a lo largo del tiempo, se hizo un ensayo de proliferación celular consistente en cuantificar el número de células en la placa de cultivo 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de transfectar los siControl, siTDRD9-1 y si TDRD9-2 con RNAiMAX. Se utilizó como control, cultivos transfectados con siControl. Para las transfecciones se usaron placas multipocillos con una superficie de cultivo de 9,6 cm² por pocillo (Multidish 6 wells. Nunc). En cada pocillo se cultivaron 50000 células que 24 h después se transfectaron según el protocolo habitual, y se recogieron para su conteo a las horas indicadas. Para contar las células se usaron cámaras Neubauer. Cada conteo se realizó como mínimo 3 veces y se calculó la media y la desviación estándar de los valores obtenidos.

8.2 Análisis del ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo

Para realizar este experimento las células se tripsinizaron, se recogieron y se centrifugaron a 900 g durante 5 min a 4 °C. Posteriormente se hizo un lavado en PBS y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Después se eliminó el PBS y se añadió 1 ml de etanol al 70 % frío gota a gota y en agitación constante con el vortex a mínima velocidad. Las células se dejaron a 4 °C al menos 18 h hasta su marcaje con PI. Para realizar el marcaje las células se centrifugaron 10 min a 900 g, se retiró el etanol y se resuspendió el pellet de células obtenido en 100 µl de tampón FACS. A continuación las células se incubaron 30 min a 37 °C en oscuridad. Después se añadió 400 µl de PBS para evitar la agregación de células y por último, las muestras se analizaron en el citómetro.

Este análisis se hizo en una población de células control (transfectadas con siControl) con una población de células carentes de *TDRD9* (transfectadas con siTDRD9-1). Las transfecciones se hicieron con RNAiMAX siguiendo el protocolo habitual y las células se fijaron 72 h después de la transfección.

Tampón FACS: PI 10 mg/ml; RNAsa A 10 mg/ml en PBS.

9.- INDUCCIÓN DEL DAÑO CELULAR MEDIANTE IRRADIACIÓN

Para la inducción de daño en las células se empleó un dispositivo irradiador emisor de rayos gamma, BIOBEAM GM 8000 (Gamma-Service Medical GmbH), basado en la exposición de las muestras a una fuente radioactiva encapsulada (Cs-137). Las células fueron irradiadas en las placas de cultivo en medio de cultivo. El irradiador está ajustado de tal modo que la tasa de dosis en la superficie de la carcasa no sobrepasa 3 μ Sv/h. Las dosis de irradiación que se utilizaron fueron de 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy y 10 Gy para elaborar una curva.

10.- ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA

Para el estudio de la supervivencia celular en células con o sin *TDRD9*, se hicieron dos tipos de tratamientos. Uno con afidicolina y otro con irradiación gamma. Para ello se cultivaron inicialmente 125000 células en placas de 60 mm de diámetro (nunc). Al día siguiente, unas se transfectaron con siTDRD9-1 y las control con siControl. Tras 4 h con el medio de transfección se tripsinizaron las células, se contaron y se plaquearon en tandas de 1000 y 2000 células. A las que llevaban el tratamiento con afidicolina se les aplicaron a concentraciones de 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M y DMSO (como control) cambiándose a medio normal al día siguiente.

A las que iban a ser irradiadas se les aplicaron 2 Gy, 4 Gy, 10 Gy o ninguna radiación en el caso del control. En ambos tratamientos las células estuvieron en condiciones de cultivo normales, refrescando el medio cada tres días hasta que se visualizaron colonias de un tamaño apto para ser enumeradas. Tras la formación de colonias, se procedió a su visualización mediante tinción con cristal violeta. Para ello,

se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se tiñeron las células con una solución que contenía 0,5 % de cristal violeta y 20 % de etanol. Unos 30 min después se lavaron las placas con agua y se contaron las colonias una vez estaban secas referenciándose el número de colonias a las obtenidas con las no irradiadas o con las del tratamiento con DMSO (100 %). Se hicieron tres réplicas por ensayo.

11.- ANÁLISIS DE METILACIÓN DE DNA MEDIANTE LA CONVERSIÓN DE CITOSINAS CON BISULFITO

Esta técnica es también conocida en inglés como "bisulfito mapping", mediante la cual hemos estudiado el estado de metilación de la isla CpG que contiene *TDRD9* en la región promotora.

El bisulfito actúa desaminando las citosinas del DNA convirtiéndolas en uracilo. La base del método es que el bisulfito por sus propiedades físico-químicas es incapaz de actuar sobre las citosinas que se encuentren metiladas, que son conocidas como 5-metilcitosina.

Para la realización de esta técnica se usó el kit "EZ DNA Methylation-Gold™ Kit" de ZYMO RESEARCH.

En primer lugar se extrajo el DNA genómico de las líneas celulares mediante la técnica descrita en el punto 3.9. El DNA obtenido se trató con el *CT conversión Reagent* que contiene bisulfito, con el cual las citosinas no metiladas se convierten a uracilos, mientras que las metiladas no cambian.

A continuación se hizo una PCR utilizando la polimerasa Hot start "My Taq™HS DNA polymerase" de Bioneer. Se tomó como molde el DNA ya tratado con bisulfito para amplificar un fragmento concreto de la isla CpG del promotor de *TDRD9* con los oligonucleótidos de *TDRD9* Bi-S descritos en la Tabla M4. Estos cebadores se diseñaron con el programa "Meth Primer DB" con los siguientes requisitos: debían ser oligonucleótidos de entre 24 y 32 bases, que no incluyeran pares CpGs. Todas las citosinas debían considerarse timinas, ya que tras el proceso de conversión las citosinas aisladas se convertirán en uracilos.

Por ejemplo para la secuencia 5'-AACCTTACAGGCAC-3 el correspondiente primer ha de ser 5'-AATTTTATAGGTAT-3

El resultado de la PCR se cargó en un gel de agarosa. El fragmento amplificado, de 343 pb, se extrajo y se purificó (según protocolo indicado en el punto 3.4). Este fragmento se insertó en pGEM-T, plásmido linearizado que interrumpe el gen *lacZ*. En el extremo 3' contiene una Timina que facilita la inserción del fragmento, el cual, posee una cola de poli Adeninas aportada por la Hot Start.

Con esta construcción se transformó a *E. coli* DH5α (como se detalla en el punto 3.6). La transformación se cultivó en medio solido con LB-ampicilina, X-GAL e IPTG y se incubó a 37°C durante toda la noche.

Las colonias que internalizaron el inserto fueron blancas por interrupción del gen *lacZ* contenido. Mientras que las que no lo tenían fueron azules por hidrólisis del X-GAL resultado del gen *lacZ* operativo por religación del plásmido. Se eligieron 20 colonias blancas por cada línea celular problema y se cultivaron en 2 ml de medio LB con ampicilina. Se incubó a 37°C toda la noche y se extrajo DNA plasmídico como se detalla en el punto 3.1.

Este DNA plasmídico se digirió con la enzima PvuII liberando un fragmento de 773 pb en el caso de ser correcta la inserción. Estas preparaciones positivas se purificaron según el protocolo del punto 3.4 y se enviaron a secuenciar a SECUGEN.

El análisis se hizo mediante alineación de las secuencias de cada uno de los clones de cada línea. En la figura M1 se muestra un ejemplo de alineación con los clones de la línea H1299.

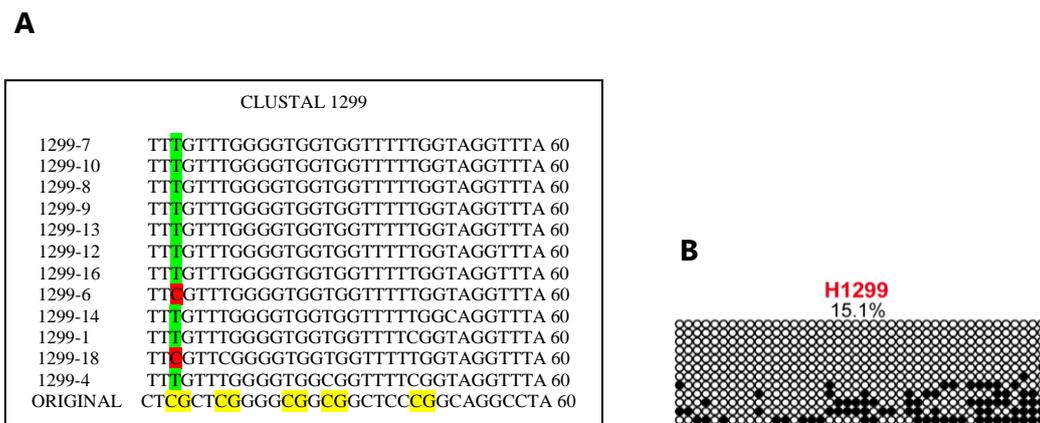


Figura M1. Procedimiento para el análisis de los clones. A) Alineación de las secuencias de los clones. **B)** Ordenación de pares CpG metilados (negros) y no metilados (blanco).

Se eligieron los pares CpG en el fragmento original, que no está sometido a conversión (señalados en amarillo) y se analizaron las citosinas de los clones, observándose si habían cambiado a Timina (citosina no metilada) o habían permanecido como Citosina (citosina metilada)

Para calcular el porcentaje de metilación de la isla en cada línea, se contaron los pares CpG que había en el fragmento amplificado, se multiplicaron por el número de clones. De ellos vimos cuántos están metilados.

Así elaboramos una gráfica (figura M1-B) en la que un círculo negro denota un par CpG metilado y uno blanco un par CpG no metilado. Cada línea corresponde a un clon.

12.- TRATAMIENTOS CON 5´AZA-2-DEOXYCITIDINA (5-Aza)

Hicimos este ensayo para ver si la expresión de *TDRD9* es, posiblemente, controlada por la metilación de la isla CpG de su promotor. Se trataron dos líneas de adenocarcinoma de pulmón que no expresaban *TDRD9* (A549 y H1264) y otras dos que sí lo hacían (H1299 y H1993) con 5´Aza-2-deoxycitidina que es un agente bloqueante de la enzima DNMT1, principal metiltransferasa en células de mamíferos. Esta enzima metila las cadenas de DNA nacientes en la replicación, por tanto su bloqueo conlleva a una desmetilación generalizada en sucesivas divisiones celulares. Para ello se cultivaron a baja confluencia las líneas de adenocarcinoma de pulmón que no expresan *TDRD9*, A549 y H1264; y H1299 y H1993 que si expresan *TDRD9*, como control, y se trataron durante 72 h con 5´Aza-2-deoxycitidina a una concentración de 0,5 μ M. Como control de tratamiento se añadió el mismo volumen del vehículo (agua). Pasado este tiempo se recogieron las células y se analizó la expresión de *TDRD9* por qPCR.

Por otro lado, quisimos ver qué ocurría con la expresión de *TDRD9* a lo largo del tiempo una vez que eliminamos el tratamiento con 5´Aza-2-deoxycitidina. Para ello, elegimos la línea H1264 que no expresa *TDRD9* y se cultivó a baja confluencia. Cada tres días se hicieron diluciones 1/10 recogiendo el pellet sobrante y guardándolo a -80 °C. Así hasta 5 pases. Una vez se tuvieron todas las muestras se procesaron para analizar la expresión de *TDRD9* por qPCR.

13.- DETERMINACIÓN DE FOCOS DE γ -H2A.X: IF y conteo

Para realizar este experimento se cultivaron 100000 células de H1993 y H1299 en placas multipocillos de 6 con lamelas de vidrio. Al día siguiente se procedió a la transfección transitoria del siTDRD9-1 y el siControl con RNAiMAX. 72 h después se hicieron las IF utilizando como anticuerpo primario anti γ -H2A.X (ser139) y como secundario Alexa Fluóor 488 (verde). Las muestras se analizaron en el microscopio Axio-IMAGER APOTOME.2 y posteriormente fueron procesadas con el software Zen 2 blue.

El conteo se llevó a cabo contando células con más de 10 focos de γ -H2A.X frente a células que carecían de ellos. Representándose en tanto por ciento (%). El experimento fue realizado tres veces, contando en cada análisis 1600 células por cada condición.

14.- ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROMATRICES (MICROARRAY)

Para hacer este experimento se llevó a cabo el silenciamiento de *TDRD9* en la línea de adenocarcinoma de pulmón H1993 con los siTDRD9-1 y siTDRD9-2 usando como control células transfectadas con siControl. 72 h después se aisló RNA como se indica en el apartado 4.1 comprobándose la pureza y la calidad del mismo con el sistema RNA 6000 Nano assay on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se usó 100 ng de RNA para originar DNA de cadena sencilla marcado con biotina las cuales fueron utilizadas para hibridar con los oligonucleótidos del microarray usando el sistema GeneChip® PrimeView Gene Expression Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El array fue analizado utilizando el sistema GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). Los datos crudos fueron normalizados usando el método Robust Multichip Average (RMA). Los análisis estadísticos que comparan los resultados del control frente a los de los siTDRD9 fueron hechos con el paquete de programas LIMMA (Ritchie et al. 2015) a través de oneChannelGUI (Sanges et al. 2007). Tras estos análisis se

seleccionaron los genes que cambiaban más de 2 veces (Cambio lineal) y con FDR < 0,01. Para hacer el resto de estudios se seleccionaron los genes que cambiaban de manera similar con los dos siRNAs de *TDRD9*. Analizamos las categorías de los Gene Ontology (GOs) con los programas DAVID (<https://david-d.ncifcrf.gov/>) (Huang et al. 2009) o WebGestalt (<https://david-d.ncifcrf.gov/>) (Wang et al. 2013)

La significancia del enriquecimiento se hizo aplicando Bonferroni ajustado al P-valor del test hipergeométrico.

15.- ANÁLISIS DE DATOS DE TUMORES Y ESTADÍSTICA

Los datos de microarray de expresión de tumores, fueron obtenidos de la base de datos ONCOMINE (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>) (Rhodes et al. 2004). Los P-valor fueron calculados usando una t-Student de doble cola con un intervalo de confianza del 95 % usando el programa GraphPad *Prism* versión 5.0. Usando la siguiente aplicación (<http://scistatcalc.blogspot.com.es/2013/10/shapiro-wilk-test-calculator.html>) se hizo un test Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos.

Los datos de expresión de RNA-seq fueron obtenidos de la base de datos The Cancer Genome Atlas (TCGA) y los datos médicos acerca de pacientes con adenocarcinoma de pulmón y de piel se obtuvieron de cBioPortal (Gao et al. 2013).

Las gráficas de regresión y la determinación del coeficiente de Pearson se hicieron utilizando el programa Excel. Las gráficas de supervivencia y los test Log-rank se hicieron con el programa GraphPad *Prism* versión 5.0.

RESULTADOS

1.- *TDRD9* EN CÁNCER

En los últimos años ha sido descrita la expresión aberrante de genes específicos de la línea germinal masculina en diferentes tipos de tumores. Por su localización original en testículos y de forma patológica en tumores, han sido nombrados como Cancer Testis (CTs) (Loriot et al. 2003). Estos genes están generalmente regulados por la metilación del DNA, confirmado por el efecto ocasionado al tratar con el agente desmetilante 5-aza-2'-deoxycytidine. Muchos de los CTs descritos se han relacionado con el metabolismo de los RNAs, como *TDRD1*, que se expresa en tumores de próstata o mama (Loriot et al. 2003). Además otras proteínas relacionadas con el metabolismo de los piRNAs en la línea germinal (proteínas PIWI) así como los propios piRNAs, se han relacionado con algunos tumores como el de mama, próstata o melanomas (Krishnan et al. 2016). Debido a que estos genes tienen una localización específica y muy restringida se hacen ideales como diana terapéutica en cáncer (Gjerstorff et al. 2015).

Antes de comenzar este estudio, no sabíamos nada del papel que *TDRD9* pudiera tener en cáncer, pero debido a la relación que guarda con los CTs y con la interacción con proteínas implicadas en diversos tumores, decidimos investigar su papel en carcinogénesis.

1.1 *TDRD9* se expresa en adenocarcinomas de pulmón y en melanomas

El primer paso que dimos para investigar un posible papel de *TDRD9* en cáncer fue explorar la base de datos UniGene, donde pudimos ver que en humanos *TDRD9* tiene una localización en tejidos sanos restringida mayoritariamente a testículos. Sin embargo, cuando analizamos las bases de datos de expresión en tumores, como por ejemplo ONCOMINE observamos que *TDRD9* aparece sobreexpresado en algunos tipos de cáncer, entre ellos pulmón y piel. Analizamos datos de expresión de *TDRD9* procedentes de dos estudios de adenocarcinomas de pulmón (Okayama et al. 2012, Selamat et al. 2012) y dos de melanomas de piel (Haqq et al. 2005, Riker et al. 2008), encontrando que los valores no siguen una distribución normal (Gausiana) (Shapiro-Wilk $P < 0,00001$), sugiriendo que los

Resultados

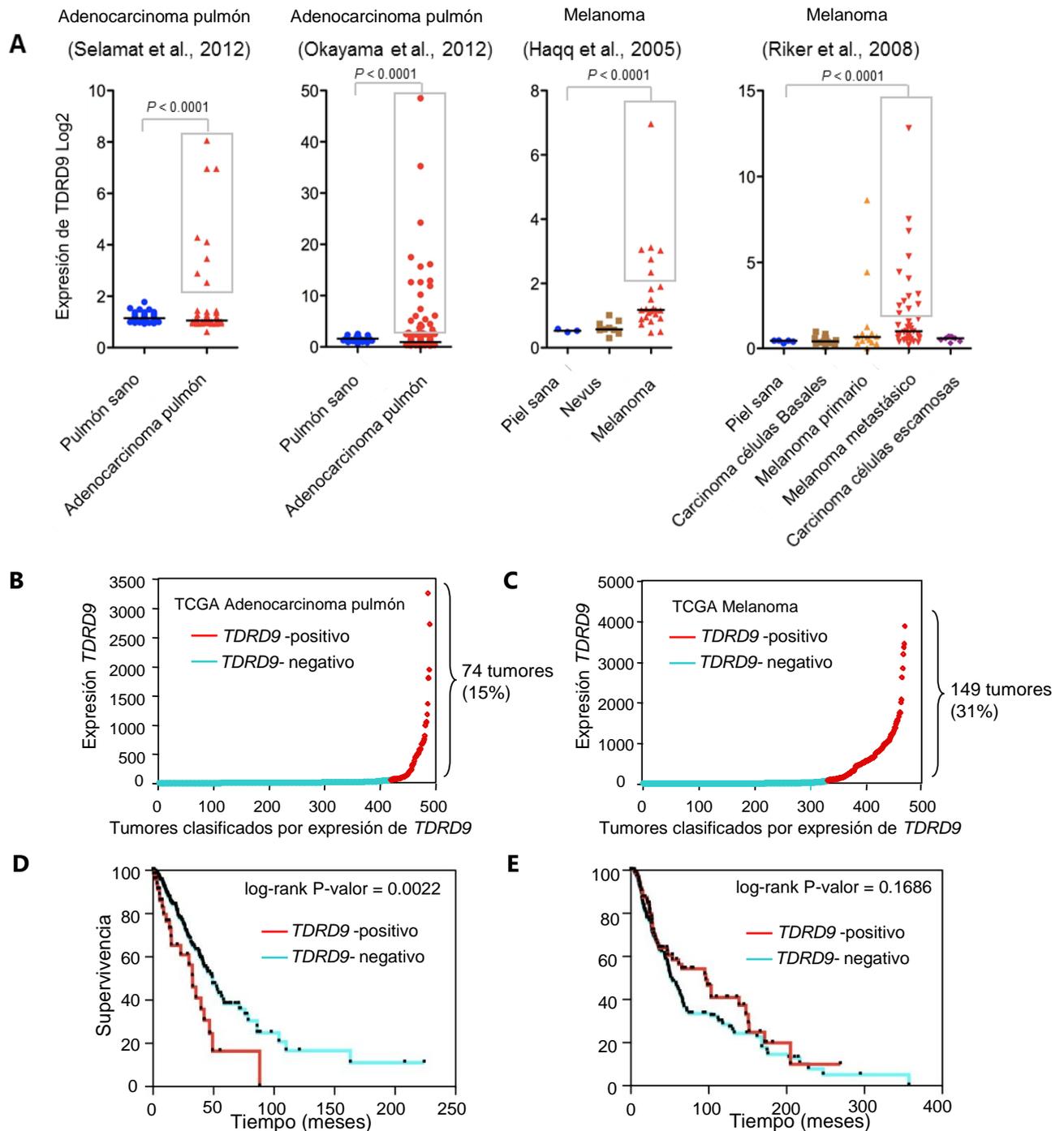


Figura R1. Expresión de *TDRD9* en adenocarcinoma de pulmón y en melanoma de piel. A) análisis de la expresión de *TDRD9* en adenocarcinoma de pulmón y en melanoma de piel. Se ha realizado una t-Student de los valores 2 veces por encima de la mediana para comparar con el nivel de expresión de *TDRD9* en tejidos sanos (P -valor $< 0,0001$). **B)** Análisis de datos de expresión de RNA-seq normalizados de cohortes de adenocarcinoma de pulmón (TCGA-LUAD) (Cancer Genome Atlas Research, 2014) y **C)** de melanoma de piel (TCGA-SKCM) (Cancer Genome Atlas, 2015); ambos provenientes de The Cancer Genome Atlas a través de c-BioPortal. En rojo se observan los tumores con expresión de *TDRD9* (*TDRD9*-positivos), en contraste con los puntos azules que indican tumores sin expresión de *TDRD9* (*TDRD9*-negativa). **D)** Curva de supervivencia Kaplan-Meier en pacientes TCGA-LUAD. En rojo podemos observar la supervivencia de los pacientes con tumores *TDRD9*-positivos. Mientras en azul se muestra la supervivencia en pacientes con tumores *TDRD9*-negativos. **E)** En esta figura se muestra un estudio idéntico al realizado en la figura 2R.D pero con pacientes TCGA-SKCM. El P-valor, mostrado en la figura, se realizó según el test log-rank.

valores elevados encontrados no son el resultado de una varianza aleatoria. El 13-15 % de las muestras de adenocarcinoma de pulmón analizadas y el 25-30 % de las muestras analizadas de melanoma de piel presentan un nivel de *TDRD9* mayor de dos veces la mediana. Cuando estos tumores se comparan con el tejido normal, encontramos que la expresión de *TDRD9* está significativamente aumentada, con un valor de significación estadística para una t-Student de $P < 0.0001$ (Figura R1-A).

Por otro lado, también analizamos datos de expresión de RNA-seq de dos cohortes de la base de datos TCGA (The Cancer Genome Atlas) a través de cBioPortal (Gao et al. 2013). Uno de los grupos analizados fue de adenocarcinoma de pulmón (TCGA-LUAD) (Cancer Genome Atlas Research, 2014) y el otro de melanoma de piel (TCGA-SKCM) (Cancer Genome Atlas Research, 2015). La figura R1-B muestra que la mayoría de los tumores TCGA-LUAD no expresan o expresan un bajo nivel de *TDRD9* (tumores *TDRD9*-negativo). Sin embargo, 74 de los 491 tumores estudiados (15%) poseen altos niveles de expresión de *TDRD9* (más de 5 veces respecto de la mediana) (tumores *TDRD9*-positivo). De la misma manera, la mayoría de las muestras analizadas de tumores TCGA-SKCM, no expresan o expresan poco *TDRD9*. Pero 149 tumores de los 471 analizados (31%) expresan altos niveles de *TDRD9* (más de 5 veces respecto de la mediana) (Figura R1-C). Por tanto, nuestros análisis indican que *TDRD9* está sobreexpresado en un conjunto de adenocarcinomas de pulmón y en melanomas de piel.

Para ver el impacto sobre la supervivencia de los pacientes con adenocarcinomas de pulmón positivo o negativo en expresión de *TDRD9*, hicimos una curva de Kaplan-Meier utilizando los datos de supervivencia obtenidos del TCGA. Los datos revelaron que los pacientes con tumores positivos en *TDRD9* tienen una esperanza de vida más corta (32 meses) en comparación con los pacientes que poseen tumores negativos en *TDRD9* (49,2 meses), (log-rank P-valor = 0,0022) (Figura R1-D). Sin embargo, no se encontraron diferencias de supervivencia entre pacientes con tumores TCGA-SKCM positivos o negativos en expresión de *TDRD9* (Log-rank P-valor = 0,1686) (Figura R1-E). Estos datos indican que la expresión de *TDRD9* podría considerarse un marcador para evaluar la prognosis del adenocarcinoma de pulmón.

Resultados

Lo siguiente que hicimos fue analizar la expresión de *TDRD9* por RT-PCR convencional y cuantitativa en líneas celulares de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y de adenocarcinomas de pulmón (LA). Cuatro de las líneas analizadas: NCI-H1299 (NSCLC), NCI-H1975 (NSCLC), NCI-H1993 (LA) Y H441 (LA) mostraron niveles de mRNA de *TDRD9* similares o mayor que el tejido de testículo humano, utilizado como control positivo de expresión de *TDRD9*. HeLa también fue analizada como control positivo de expresión. Sin embargo otras cinco líneas: A549 (LA), NCI-H23 (NSCLC), A427 (LA), NCI-H522 (NSCLC), NCI-H1264 (LA) no mostraron una expresión significativa de *TDRD9*. Además el tejido de pulmón sano tampoco mostró una expresión significativa (Figura R2-A y R2-B).

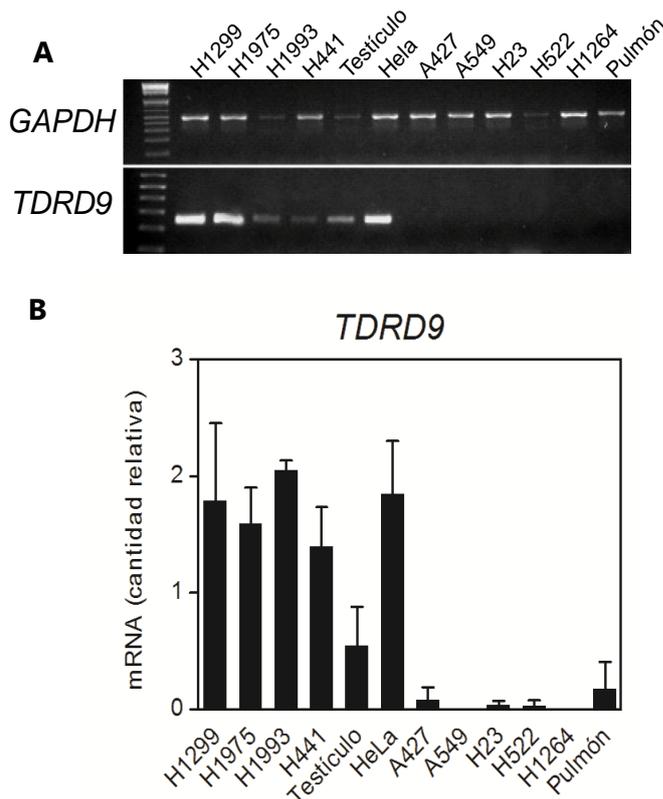


Figura R2. *TDRD9* se expresa en un subconjunto de líneas de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y adenocarcinoma de pulmón (LA). **A)** expresión de *TDRD9* en líneas NSCLC y LA analizadas mediante PCR convencional. **B)** Análisis de la expresión de *TDRD9* en líneas NSCLC y LA mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos representados corresponden al promedio \pm la desviación estándar resultante de tres experimentos independientes.

Después de varios intentos, no hemos encontrado ningún anticuerpo comercial anti-TDRD9 que identificara la proteína TDRD9 endógena, por lo tanto, no hemos podido completar los estudios de expresión con la detección de la proteína.

1.2 La isla CpG de *TDRD9* está hipometilada en cáncer

Como ya hemos comentado en la introducción, la hipometilación y la hipermetilación del DNA es un proceso que ocurre normalmente en cáncer. Si la desmetilación ocurre en Islas CpGs (CGIs) podría conllevar a la activación de genes cercanos a ella (Hon et al. 2012, Hovestadt et al. 2014). Es el caso de los genes *MAGE* (Melanoma-associated antigen), que son un tipo de CTs cuya hipometilación origina una expresión aberrante en melanomas y tumores de pulmón (Mountzios et al. 2016). Mientras, la hipermetilación del DNA podría llevar a una represión de la transcripción de algunos genes, como supresores tumorales. Por otro lado, es muy típico en cáncer encontrar una sobreexpresión génica debido a la amplificación en el número de copias o por el contrario una menor expresión debido a la delección de los mismos (De Smet et al. 1996, Feinberg et al. 2004).

Teniendo en cuenta esto, nos dispusimos a investigar el origen de la expresión de *TDRD9* en tumores. En primer lugar, verificamos que no había correlación entre la expresión de *TDRD9* y el número de copias del gen en tumores TCGA-LUAD y TCGA-SKCM, indicando que la razón de la alta expresión de *TDRD9* no es debida a la amplificación del gen (Figura R3).

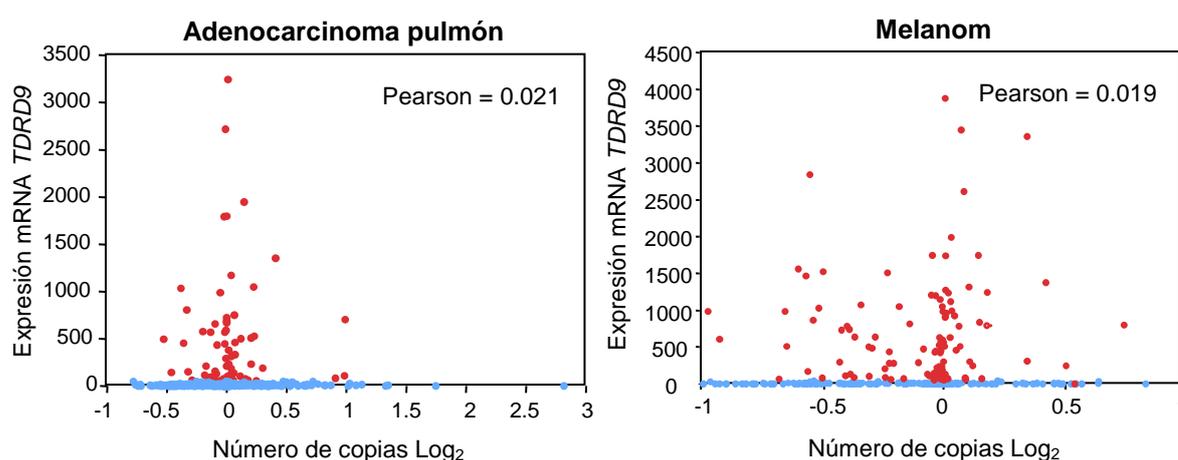


Figura R3. La expresión de *TDRD9* no se correlaciona con el número de copias del gen en tumores TCGA-LUAD y TCGA-SKCM. En rojo se representan los tumores con alto nivel de expresión de *TDRD9* y en azul tumores con bajo nivel de *TDRD9*. En el eje de abscisas el número de copias en unidades relativas indica que 0 corresponde a 2 copias por gen. Los valores mayores que 1 corresponden a amplificaciones y menores que -1 corresponden a delecciones. En el eje de ordenadas se indica la expresión (mRNA) de *TDRD9*. Los datos de RNA-seq proceden de la TCGA.

Resultados

TDRD9 tiene una CGI asociada al promotor que se extiende desde el nucleótido -287 al +417 respecto al lugar de transcripción (Figura R4-A). El análisis de los datos del Roadmap Consortium (Bernstein et al. 2010) y mediante el uso del UCSC Genome Browser, demostró que la CGI de *TDRD9* está hipermetilada en la mayoría de los órganos humanos, incluyendo pulmón, lo cual concuerda con la falta de expresión de *TDRD9* en esos órganos. Sin embargo, la región se encontró hipometilada en espermatozoides, donde *TDRD9* sí se expresa (Figura R4-B).

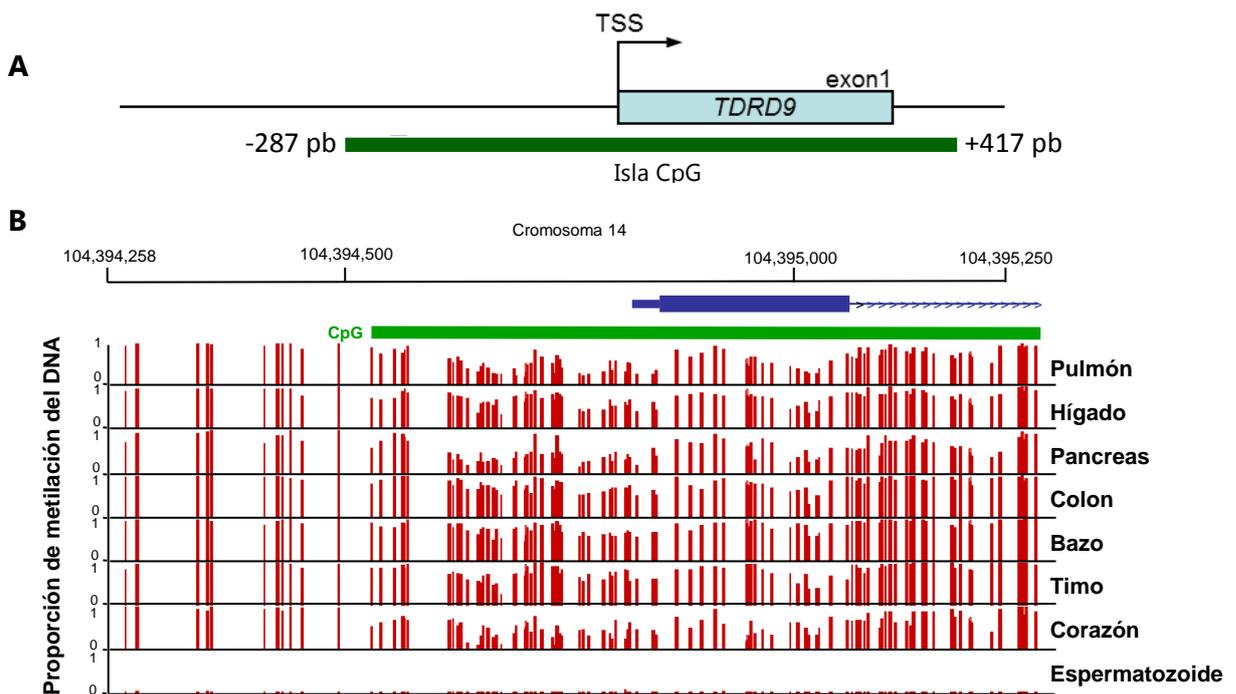


Figura R4. *TDRD9* tiene una CGI asociada a su promotor. A) Representación de la Isla CpG (CGIs) asociada al promotor de *TDRD9*, que se expande desde el nucleótido -287 hasta el +417 (704 nucleótidos) respecto al inicio de la transcripción. **B)** Representación de la metilación de la CGI de *TDRD9* en diversos órganos y espermatozoides. Imagen obtenida utilizando los datos de Roadmap Consortium (Bernstein et al. 2010) mediante UCSC Genome Browser.

Con todo lo visto hasta el momento, decidimos investigar el patrón de metilación en la CGI de *TDRD9* de las líneas celulares de cáncer de pulmón con diferentes niveles de expresión del gen. Este experimento se llevó a cabo mediante la técnica del Bisulfito y secuenciación de múltiples clones (ver apartado 11 de materiales y métodos). El resultado de este experimento arrojó que la CGI de *TDRD9* de las líneas que no expresan *TDRD9* (A549, A427, H522, H1264 Y H23) están hipermetiladas. Mientras que la CGI de las que sí expresan *TDRD9* (H1299, H1993, H1975 Y H441) se encuentran fuertemente hipometiladas. Estos datos indican que la

expresión de *TDRD9* en LA y NSCLC está asociada a la hipometilación de la CGI del promotor (Figura R5-A y B). Para apoyar este resultado, tratamos dos de las líneas celulares que no expresan *TDRD9* (H1264 y A549) y que muestran una CGI hipermetilada, y otras dos líneas como control (H1299 y H1993) que sí expresan *TDRD9* y presentan las CGI's hipometilada, con un agente desmetilante 5-aza-2'-deoxycytidine (apartado 12 de materiales y métodos) . Para ello tratamos las células durante 72 h con el reactivo a una concentración de 0,5 μ M. Como se observa en la figura R5-C, el tratamiento provocó la expresión de *TDRD9* en las líneas H1264 y A549; mientras que la expresión de *TDRD9* en H1299 y H1993, como cabía esperar, no cambia. Además, quisimos ver qué ocurría con la expresión de *TDRD9* tras el tratamiento con 5-AZA y posterior eliminación del agente a largo tiempo (ver materiales y métodos, punto 12). Para ello, tratamos células durante 72 h a una concentración final de 0,5 μ M de 5-AZA y fuimos haciendo pases sucesivos de las células con medio sin 5-AZA cada tres días, tomando muestras tras cada pase celular. La expresión de *TDRD9* fue progresivamente perdiéndose en la población celular de H1264, tras la eliminación del agente. Esto sugiere que la señal que determina la metilación de la CGI de *TDRD9* está aún presente (Figura R5-D) o que en este tipo celular, la expresión de *TDRD9* no está confiriéndole ninguna ventaja selectiva.

Con la intención de averiguar si el patrón de metilación de las líneas celulares se repetía en tumores TCGA-LUAD, analizamos el estado de metilación de los mismos. Como se muestra en la Figura R6-A, la hipometilación de *TDRD9* fue asociada a la sobreexpresión de *TDRD9* (Test de correlación de Spearman, rho, -0,44, $P < 0,00001$). El 98 % de los tumores que no expresan *TDRD9*, presentaron altos niveles de metilación en *TDRD9* (fracción de metilación de citosinas $> 0,5$). El 83 % de los tumores que tenían expresión de *TDRD9* presentaron un bajo nivel de metilación de *TDRD9* (fracción de metilación de citosinas $< 0,5$). En la figura R6-B, se muestran los resultados de los tumores TCGA-SKCM (rho=-0,44, $P < 0,00001$) donde se aprecia un perfil parecido al anterior. En estos, el 87% de las muestras que expresan *TDRD9* mostraron bajos niveles de metilación (fracción de metilación de citosinas $< 0,5$).

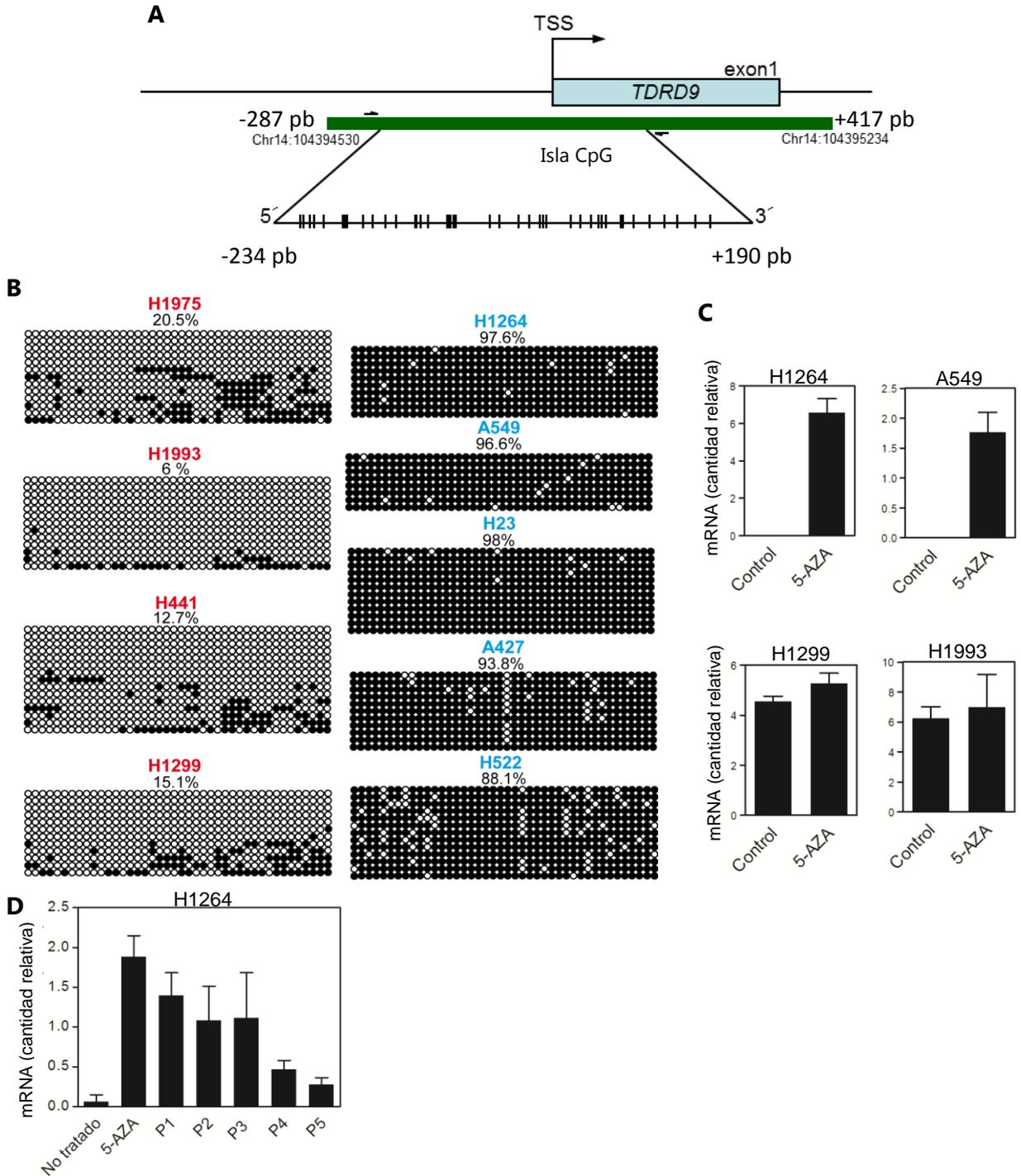


Figura R5. La expresión de *TDRD9* en líneas celulares de LA y NSCLC está controlada por el estado de metilación de la CGIs asociada al promotor. A) Representación del fragmento amplificado (del nucleótido -234 al +109 respecto del inicio de la transcripción) de la Isla CpG de *TDRD9*, para el análisis del patrón de metilación por la técnica del bisulfito y secuenciación. **B)** Análisis del patrón de metilación del fragmento seleccionado de la CGIs asociada al promotor de *TDRD9* mediante la técnica de bisulfito y secuenciación de clones. En rojo se muestran las líneas que expresan *TDRD9* y en azul las que no expresan. Cada línea representa un clon y cada círculo un par CpG, en negro si está metilado y vacío si no lo está. Bajo el nombre de cada línea se indica el porcentaje de metilación del fragmento analizado. **C)** Expresión de *TDRD9* en H1264 y A549 (dos líneas que no expresan *TDRD9*); y de H1299 y H1993 (que si expresan *TDRD9*) tras el tratamiento con el agente desmetilante 5-aza-2-deoxycytidine (5-AZA), a una concentración de 0,5 μ M durante 72h. **D)** Recuperación del silenciamiento de *TDRD9* tras el tratamiento con 5-AZA en la línea celular H1264. En el eje de abcisas se indican los pases de células con diluciones 1/10 sucesivas con medio completo sin 5-AZA cada tres días, tras el tratamiento con 5-AZA (concentración final de 0,5 μ M durante 72h). Ver punto 12 de materiales y métodos. Los datos representados en **C** y **D** corresponden al promedio \pm la desviación estándar obtenida a partir de tres experimentos independientes.

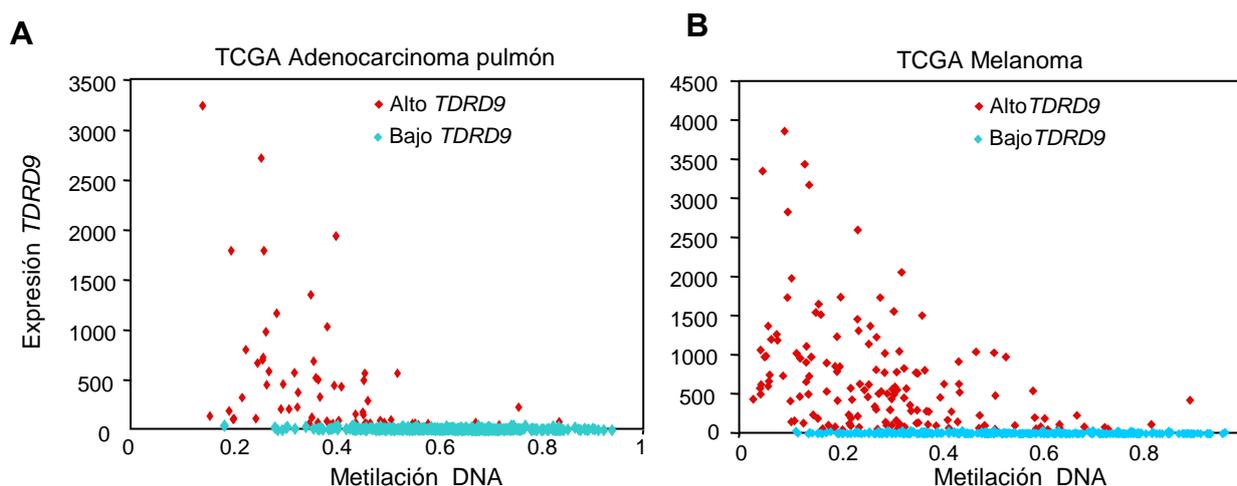


Figura R6. La expresión de *TDRD9* en tumores TCGA-LUAD y TCGA-SKCM está relacionada con el nivel de metilación del promotor. Los datos de metilación a partir de datos del TCGA fueron obtenidos mediante una micromatriz 450K Infinium chip (Illumina). En ella se observa el estado de metilación del promotor de *TDRD9* en los tumores TCGA-LUAD (adenocarcinoma de pulmón) (**A**) y en tumores TCGA-SKCM (melanoma) (**B**). En rojo se representan tumores con alto *TDRD9* y en azul los tumores con bajo *TDRD9*. Los datos de RNA-seq proceden de la TCGA.

Para ver si en el proceso de activación de *TDRD9*, la hipometilación afectaba a regiones cercanas a *TDRD9* o era algo exclusivo de este gen, analizamos bioinformáticamente el estado de metilación de los promotores de los genes adyacentes a *TDRD9* (Figura R7-A) en tumores TCGA-LUAD y TCGA-SKCM (Figura R7-B y C) utilizando datos del TCGA. Para ello, dividimos las muestras en dos categorías: tumores alto-*TDRD9* (cajetillas rojas) y bajo-*TDRD9* (cajetillas azules). Las figuras R7-B y C muestran que los niveles de metilación de *TDRD9* están disminuidos en tumores con alto-*TDRD9* respecto de los tumores con bajo-*TDRD9* ($P < 0,001$) como ya hemos comentado anteriormente. Mientras tanto, en los genes vecinos a *TDRD9*, el estado de metilación en tumores con alto o bajo *TDRD9* no varía. Es decir, que el estado de metilación de los genes vecinos es independiente de la expresión de *TDRD9*. Todos estos datos indican que la hipometilación de *TDRD9* no está ligada a una alteración generalizada de la metilación en la región genómica adyacente a *TDRD9*.

Resultados

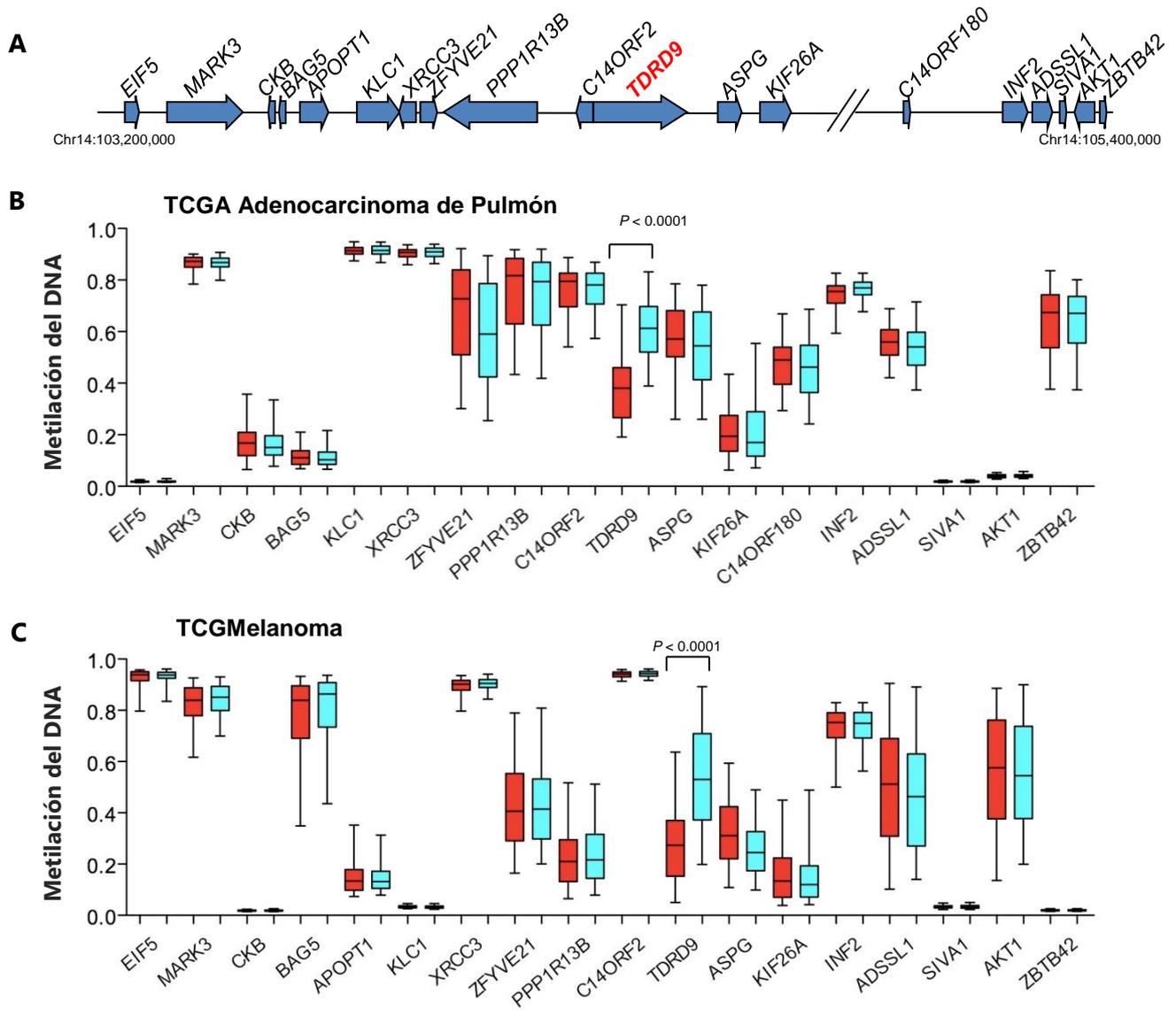


Figura R7. Estado de metilación de los genes vecinos a *TDRD9*. **A)** Contexto génico en el que se localiza *TDRD9*. Nivel de metilación de los genes vecinos de *TDRD9* en tumores TCGA-LUAD (**B**) y TCGA-SKCM (**C**), *TDRD9*-positivos (rojo) o *TDRD9*-negativo (azul). Se observa una diferencia significativa de metilación del DNA entre tumores que expresan *TDRD9* (rojo) y los que no (azul), no siendo significativa en ninguno de los otros casos; con un P-valor < 0,0001.

1.3 La depleción de *TDRD9* afecta a la proliferación de células que expresan *TDRD9*

Ya hemos observado que la desmetilación de la CGI de *TDRD9* está asociada a la expresión del gen en algunas líneas de cáncer de pulmón. Así que decidimos ver cuál era el papel de *TDRD9* en la proliferación de estas líneas celulares. Para ello diseñamos dos siRNAs que bajaran la expresión de *TDRD9* (siTDRD9-1 y siTDRD9-2) y que se localizan en las posiciones de nucleótidos 1845-1864 y 1718-1738

respectivamente, del cDNA de *TDRD9*. En la Figura R8-A, podemos ver el efecto de los siTDRD9-1 y siTDRD9-2 en la expresión de *TDRD9* en líneas H1299 y H1993, que expresan *TDRD9*. Para hacer las curvas de crecimiento (ver materiales y métodos, punto 8.3) sembramos 50000 células que fueron transfectadas 24h después (tiempo 0). Posteriormente a la transfección, las células se contaron cada 24h hasta llegar a 120h. La depleción de *TDRD9*, generó un defecto en la proliferación celular en líneas que expresan *TDRD9*, en comparación con las células transfectadas con el siControl (Figura R8-B). Como control del experimento, hicimos lo mismo con H1264, una línea celular que no expresa *TDRD9*. Observamos que la transfección con los siTDRD9-1 y siTDRD9-2, no ocasionaba ningún efecto deletéreo en la modificación de estas células. Tras estos resultados, decidimos investigar el ciclo celular en células transfectadas con siTDRD9-1 cultivadas durante 72h, mediante citometría de flujo (materiales y métodos, punto 8.2). La depleción de *TDRD9* en líneas que expresan (H1299, H1993 y H441) ocasionó un aumento del porcentaje de células detenidas en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en H1264 transfectadas con siTDRD9-1 (no expresa *TDRD9*), cuyo ciclo celular permaneció igual al control. Esto nos sugiere que la disminución en la proliferación puede ser debida a una parada parcial o un enlentecimiento de la fase S del ciclo celular (Figura R8-C). Además, en células H1299 y H1993 que expresan *TDRD9*, hemos observado un aumento (de 3 a 4 veces) del porcentaje de apoptosis (medido como la población de células con contenido de DNA sub G1) 72 horas después de transfectar con el siTDRD9-1. Esto no ocurrió en H1264, que no expresa *TDRD9* (Figura R8-D).

1.4 *TDRD9* no controla la expresión de *LINE-1*

En ratón, *Tdrd9* interacciona con la proteína Miwi2, una de las proteínas de la familia PIWI (Vagin et al. 2009). Se ha propuesto que el complejo formado por *Tdrd9* y Miwi2 está involucrado en el control de la expresión del retrotransposón *LINE-1* a través de la hipermetilación mediada por piRNAs en células de la línea germinal (Shoji et al. 2009). Se ha relacionado el salto e inserción de retrotransposones en el

Resultados

DNA en una gran cantidad de enfermedades, entre ellas el cáncer (Belancio et al. 2010).

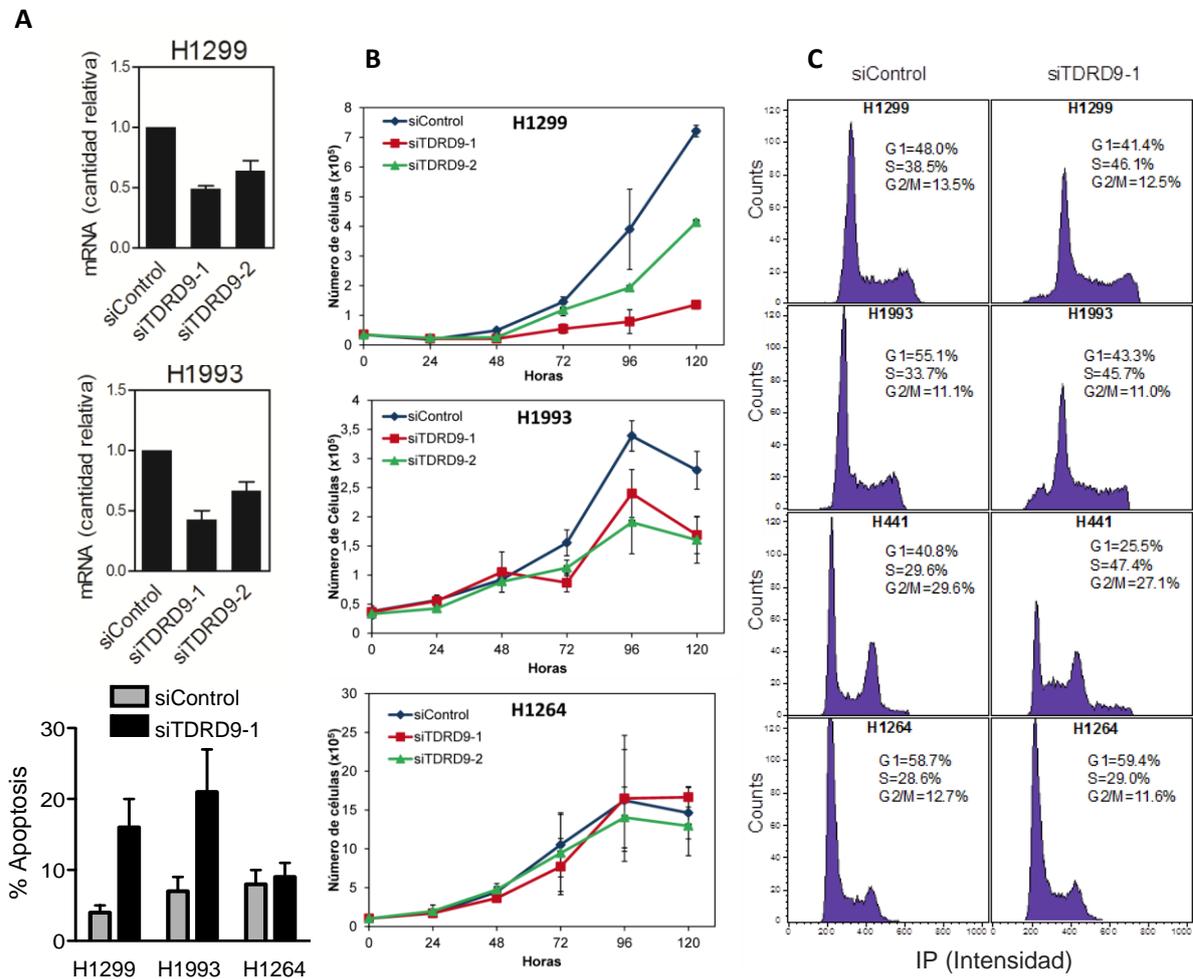


Figura R8. La depleción de *TDRD9* en células que expresan *TDRD9*, ocasiona una pérdida de proliferación y un cúmulo de células en fase S. A) Expresión de *TDRD9* en H1299 y H1993 tras ser transfectadas con dos siRNAs diferentes contra *TDRD9* (siTDRD9-1 y siTDRD9-2) o con un siRNA control (siControl). **B)** Curvas de crecimiento de tres líneas celulares de cáncer de pulmón transfectadas con los tres siRNAs por separado. Se contaron las células cada 24 h durante 5 días. H1299 y H1993 son células que expresan *TDRD9*. Como control se usó H1264 que no expresa *TDRD9*. **C)** Ciclo celular de líneas de cáncer de pulmón transfectadas con siControl o con siTDRD9-1 y cultivadas durante 72h. Se visualiza la intensidad emitida por el Ioduro de Propidio (IP). De nuevo como control se utilizó H1264. **D)** Inducción de apoptosis, analizada por citometría de flujo, en células transfectadas con siControl y con siTDRD9-1 y cultivadas durante 72 h. En **A**, **B** y **D** se representan valores promedios \pm la desviación estándar obtenidas de tres experimentos diferentes.

En una primera aproximación para analizar el posible papel de *TDRD9* en el control de la expresión de *LINE-1* en células cancerosas, analizamos el nivel de expresión de las proteínas PIWI en líneas celulares de cáncer de pulmón y en tejidos control mediante RT-PCR convencional (Figura R9-A). Los cuatro tipos de proteínas PIWI fueron fuertemente expresadas en testículos, como ya esperábamos. *PIWIL1*,

no se expresó en ninguna otra línea o tejido analizado. *PIWIL2*, fue levemente expresada en algunas líneas celulares, incluyendo aquellas que no tienen expresión de *TDRD9*. *PIWIL3*, se expresó en HeLa además de testículos. Y finalmente *PIWIL4* (el homólogo de Miwi2), se expresó en la mayoría de las muestras a excepción de H441 y HeLa (ambas expresan *TDRD9*). En conclusión, no existe una perfecta correlación entre las líneas que expresan *TDRD9* y la expresión de las proteínas PIWIL. Para completar el estudio, analizamos la correlación de expresión de *TDRD9* y las proteínas PIWIL en tumores TCGA-LUAD, observando la misma falta de correlación de expresión que en líneas (Figura R9-B).

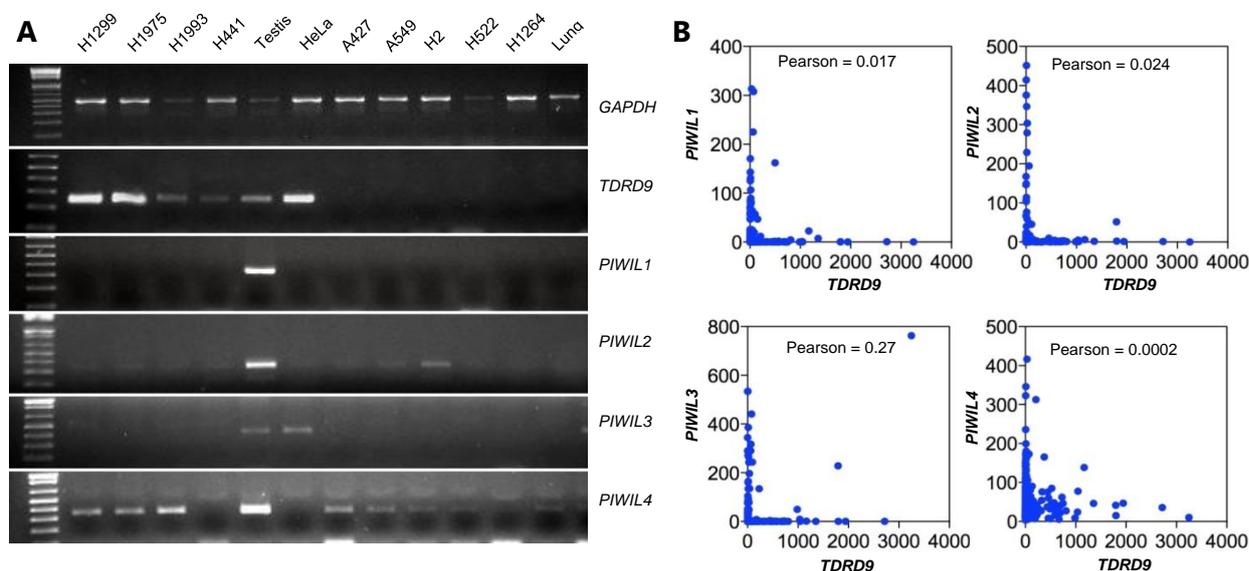


Figura R9. No existe correlación entre la expresión de los genes PIWI y TDRD9. A) Nivel de expresión de los genes *PIWI* en líneas celulares de cáncer de pulmón y en tejidos control mediante RT-PCR convencional. Los paneles correspondientes a la *GAPDH* y a *TDRD9*, son los mismos que se representan en la figura R2. B) Correlación entre la expresión de *TDRD9* y genes *PIWILs* en tumores TCGA-LUAD. Datos de RNA-seq normalizados obtenidos de TCGA.

Posteriormente, determinamos el nivel de expresión de *LINE-1* en las líneas que expresan y que no expresan *TDRD9*. Para ello diseñamos unos oligonucleótidos con los que amplificamos mediante RT-PCR cuantitativa, un fragmento del 5'UTR del retrotransposón *LINE-1* (Figura R10-A). Quisimos investigar si existía una expresión diferencial de *LINE-1* entre líneas que expresan o que no expresan *TDRD9*. Como se observa en la figura R10-B, no existe ninguna correlación entre la expresión de *TDRD9* y el nivel de expresión del transcrito de *LINE-1*. Finalmente, también

Resultados

mostramos que la depleción de *TDRD9* en líneas celulares que expresan *TDRD9*, no afecta al nivel de transcripción de *LINE-1* (Figura R10-C). En conclusión, estos datos sugieren que *TDRD9* no controla la expresión de *LINE-1* en células de cáncer de pulmón.

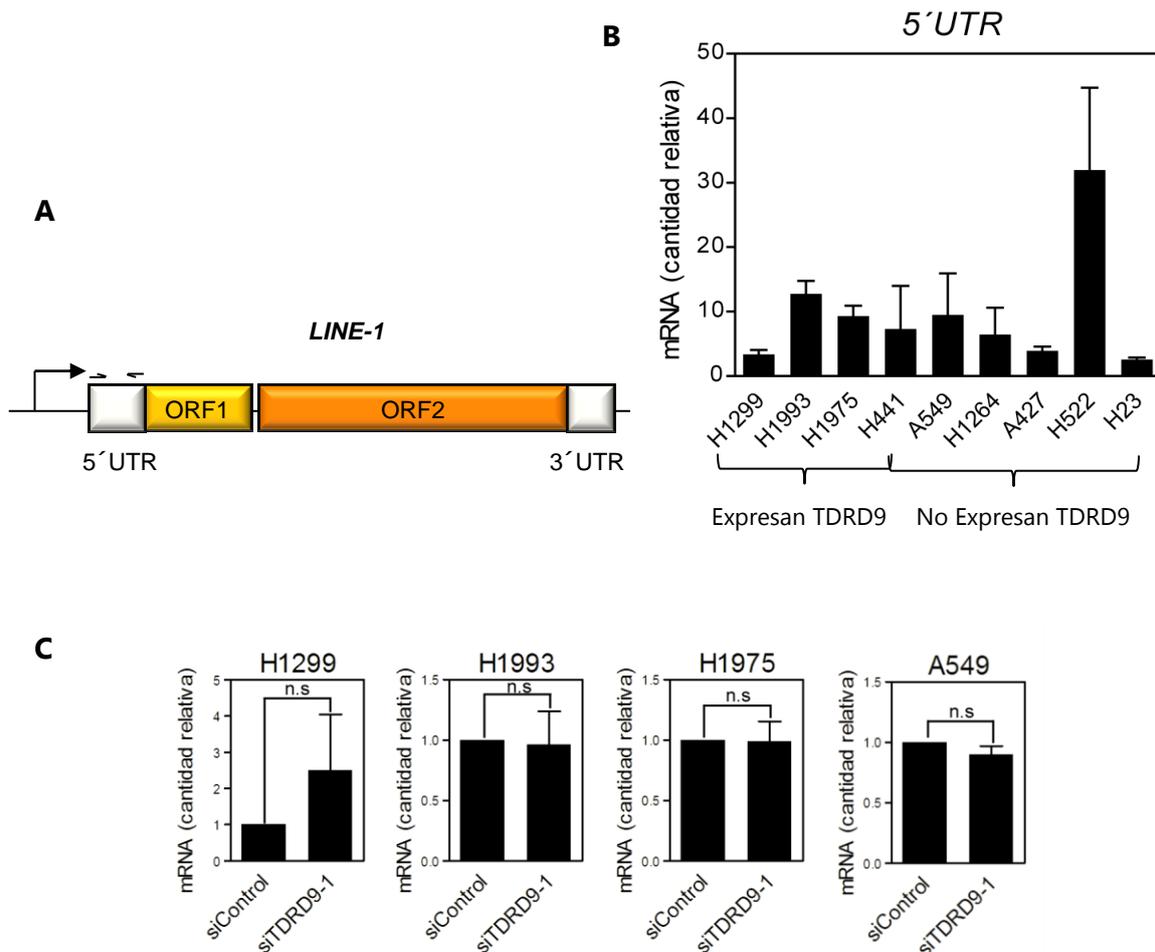


Figura R10. *TDRD9* no controla la expresión de *LINE-1* en células de cáncer de pulmón. A)

Esquema del retrotransposón *LINE-1*. Se indican los cebadores utilizados para realizar las PCRs cuantitativas (qPCR). **B)** qPCR para ver la expresión de *LINE-1* en células que expresan y que no expresan *TDRD9*. **C)** Cada gráfica muestra la expresión de *LINE-1* cuando deplecionamos *TDRD9* mediante siTDRD9-1. H1993, H1299 y H1975 son líneas celulares que expresan *TDRD9*; frente a A549 que no expresa. Hemos comparado los datos de expresión entre la situación control y la de depleción de *TDRD9* en cada línea, con un t-Student, siendo no significativo en todos los casos. Los valores se encuentran relativizados al control, siendo éste 1. Los datos representados en **B** y **C** corresponden al promedio \pm la desviación estándar obtenida a partir de tres experimentos independientes.

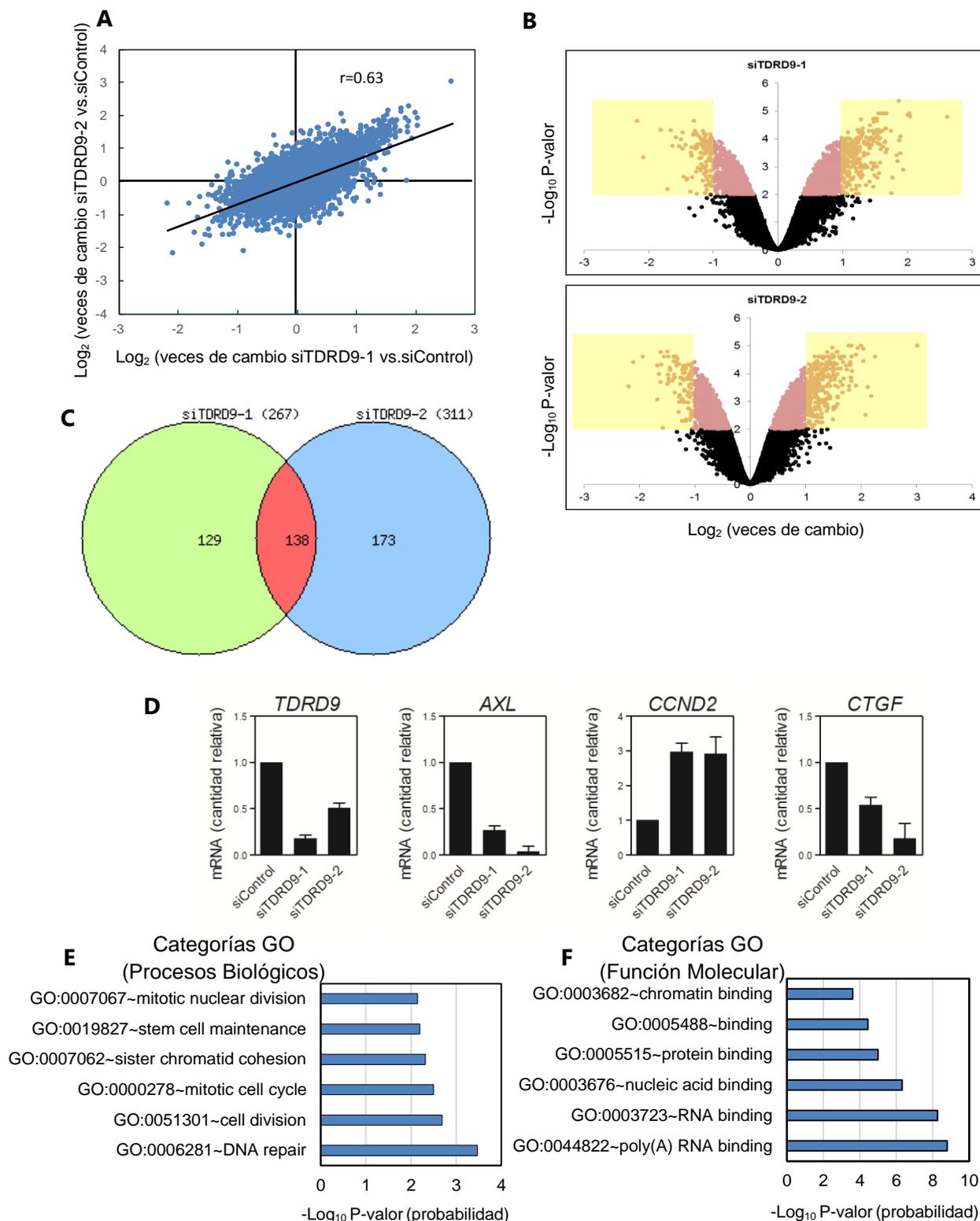


Figura R11. Caracterización de cambios en el transcriptoma por depleción de *TDRD9* en células H1993. A) Diagrama de correlación entre cambios en los niveles de expresión debidos a los siRNAs siTDRD9-1 y siTDRD9-2 respecto del control. **B)** Ordenamiento de genes mediante el diagrama Volcano. Selección de genes que cambian más de 2 veces ($\text{Log}_2(2)=1$) con un P-valor $< 0,01$ ($-\text{Log}_{10} 0,01=2$). Esta selección de genes está localizada dentro del cuadro amarillo. **C)** Diagrama de Venn de dos conjuntos formados por los cambios transcripcionales originados por el siTDRD9-1 (267 genes) y por el siTDRD9-2 (311 genes). En la intersección de ambos podemos observar los genes en común que cambian cuando se depleciona *TDRD9* con ambos siRNAs (138 genes). **D)** Comprobación de los genes *TDRD9*, *AXL*, *CCND2* y *CTGF*, pertenecientes a los 138 genes desregulados de la intersección del diagrama de Venn, mediante RT-qPCR. Se representan valores promedios \pm la desviación estándar proveniente de tres experimentos diferentes. **E)** y **F)** Análisis de significación biológica mediante Ontología de Genes (GO). Se utilizaron los 138 genes desregulados comunes y fueron ordenados por categorías: E) procesos biológicos y F) por función molecular. Se representan los P-valores ajustados por Bonferroni.

1.5 Caracterización de cambios transcripcionales producidos por la bajada de expresión de *TDRD9*

Para esclarecer las consecuencias transcripcionales de la depleción de *TDRD9* en células que expresan *TDRD9*, llevamos a cabo un perfil de expresión de RNA de células H1993 transfectadas con siTDRD9-1, siTDRD9-2 o siControl durante 72h. Para ello utilizamos micromatrices de DNA de Affymetrix que se hibridaron y procesaron en la unidad de Genómica de CABIMER. Los dos siRNAs contra *TDRD9* produjeron cambios transcripcionales similares respecto al siControl con un coeficiente de Pearson, $r=0,634$ (Figura R11-A). En la representación Volcano se muestra la distribución de los valores de cambio de expresión respecto a su significación estadística. Se consideran significativos, cambios de más de 2 veces al alza o a la baja con un $FDR \leq 0,01$ (área amarilla de la figura R11-B). En la figura R11-C, vemos los cambios transcripcionales generados por el siTDRD9-1 (267 genes), los originados por el siTDRD9-2 (311) y en la intersección, los comunes a los dos siRNAs (138 genes). Este estudio fue realizado para genes que cambian al menos 2 veces respecto del control. De los genes elegidos, 122 fueron sobreexpresados, mientras que 16 fueron desregulados a la baja (tabla A1). Comprobamos mediante RT-qPCR, la desregulación de la expresión de tres genes (*AXL*, *CCND2* y *CTGF*) afectados por la depleción de *TDRD9*. Los niveles de expresión de *TDRD9* fueron determinados como control del experimento (Figura R11-D).

Por otro lado, investigamos en bases de datos de anotación funcional e hicimos análisis de Ontología de Genes (GOs) con los genes seleccionados para ver si éstos tenían funciones similares o si están involucrados en procesos parecidos. El análisis de los GO de procesos biológicos (BP-GO), muestra que los genes sobreexpresados tras la depleción de *TDRD9* se agrupaban en categorías funcionales relacionadas con reparación de DNA, ciclo celular y división celular mitótica (Figura R11-E). Cuando analizamos las funciones moleculares (MF-GO) encontramos que estaba enriquecida la categoría de unión a RNA (Figura R11-F). Por otra parte analizamos las rutas metabólicas enriquecidas en este conjunto de genes usando la base de datos Pathway Commons. Rutas como la Fase M (Ajuste por Bonferroni P -valor=0,0005), replicación de DNA (P -valor=0,0008), metabolismo

de RNA (P-valor= 0,0013) y ciclo celular mitótico (P-valor=0,0029) fueron también enriquecidas en los genes sobreexpresados. La tabla R1, muestra algunos genes de reparación de DNA y de ciclo celular cuyos niveles de transcrito aumenta tras la depleción de *TDRD9*. Como ejemplo de algunos genes sobreexpresados tras la depleción de *TDRD9* tenemos aquellos que codifican subunidades de los complejos de la condensina o cohesinas (*SMC1A*, *SMC2*, *SMC3* y *ESCO1*), componentes estructurales de los centrosomas (*CEP250*, *CEP290*, *CEP350*), reguladores del ciclo celular (*CCND2*, *CDC27*, *CDCA2*) y marcadores de proliferación como Ki-67 (MKI67), los cuales están normalmente aumentados en las fases del ciclo S o G2/M. En resumen, los análisis transcriptómicos, junto con los datos descritos de ciclo celular y proliferación indican que una disminución de los niveles de *TDRD9* provoca una parada en las fases S

1.6 La depleción de *TDRD9* provoca una acumulación de daño en el DNA

Muchos de los genes sobreexpresados tras la depleción de *TDRD9*, son genes involucrados en respuesta a daño en el DNA. Por ejemplo *PRKDC*, que codifica para la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PKcs), aumentó su expresión más de 4 veces en la línea H1993 con *TDRD9* silenciado. La proteína DNA-PK es un regulador central de la respuesta a rotura de doble cadena (DSB) que cataliza la fosforilación de la histona H2A.X en la Serina 139 (γ -H2A.X). γ -H2A.X se requiere para la acumulación de numerosas proteínas de reparación de daño en el DNA y de complejos remodeladores de cromatina alrededor de las DSBs (Paull et al. 2000, Marechal et al. 2013, Davis et al. 2014). Además, coordina la cascada de transducción de señales para una eficiente reparación (Lukas et al. 2004). Decidimos investigar si la reducción de los niveles de *TDRD9* produce un aumento de DSBs manifestado por el aumento del nivel de DNA-PKcs fosforilada (activada) y de γ -H2A.X.

Lo primero que hicimos fue estimar la cantidad de proteína mediante Western Blot. Para ello cultivamos 300000 células de las líneas H1993 y H1299, las cuales fueron transfectadas con los siControl y siTDRD9-1. 72h después se recogieron las células para hacer los extractos proteicos. El Western Blot fue

Tabla R1. Genes sobreexpresados tras la depleción de *TDRD9* en células H1993

Gen	Nombre completo	Cambios FC siTDRD9-1	Cambios FC siTDRD9-2
CEP250	Centrosomal protein 250kda	4.12	3.75
MKI67	Marker of proliferation Ki-67	4.10	3.18
PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide, DNA-PKcs	4.02	4.13
ESCO1	Establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1	3.23	3.54
CEP350	Centrosomal protein 350kda	2.98	2.84
CDK11A	Cyclin-dependent kinase 11A	2.91	3.21
SMC1A	Structural maintenance of chromosomes 1A	2.89	3.00
BOD1L1	Biorientation of chromosomes in cell division 1-like 1	2.79	3.56
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked	2.76	3.18
SMC3	Structural maintenance of chromosomes 3	2.74	2.95
CDC27	Cell division cycle 27	2.67	2.76
SMC2	Structural maintenance of chromosomes 2	2.54	2.39
ERCC6L2	Excision repair cross-complementation group 6-like 2	2.26	2.49
RIF1	Replication timing regulatory factor 1	2.15	2.28
CCND2	Cyclin D2	2.12	3.16
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1	2.11	2.47
CDCA2	Cell division cycle associated 2	2.05	2.15
CEP290	Centrosomal protein 290kda	2.05	2.15
MAP4	Microtubule-associated protein 4	2.03	2.01

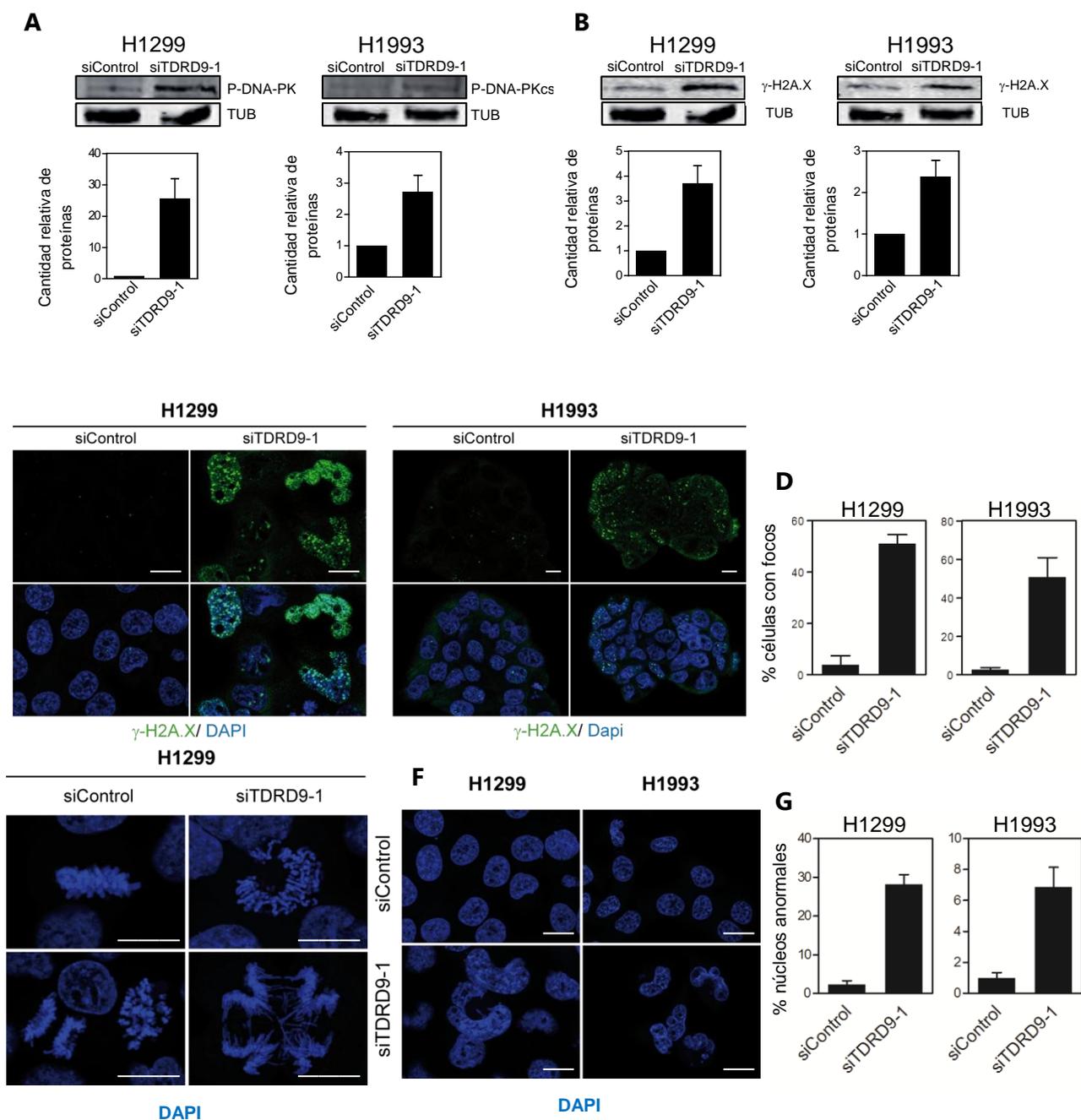


Figura R12. La depleción de *TDRD9* causa acumulación de daño en el DNA. Se hicieron extractos totales obtenidos a partir de células H1299 y H1993 se analizaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos contra P-DNA-PKcs y α -Tubulina como control (**A**), o bien con γ -H2A.X y α -Tubulina (**B**). Tanto el análisis como la cuantificación de fluorescencia fue realizado utilizando el sistema ODYSSEY. Se analizaron 40 μ g de proteínas. **C**) Focos de γ -H2A.X en células H1299 y H1993 transfectadas con siTDRD9-1 y siControl. Para el análisis se usó el anticuerpo primario anti γ -H2A.X hecho en ratón, y el secundario Alexa Fluor 488 (verde). **D**) Cuantificación de los focos en condiciones control y de depleción de *TDRD9*. Se toma como células con focos aquellas con más de 3. **E**) Comparación de mitosis normales en células control vs mitosis aberrantes en células H1299 en ausencia de *TDRD9*. **F**) Comparativa de la morfología nuclear, en células H1299 y H1993, en condiciones control y de depleción de *TDRD9*. **G**) Cuantificación de núcleos anormales multilobulados en células H1299 y H1993 transfectadas con siTDRD9-1, comparadas con las control. En todos los casos el DNA fue teñido con DAPI. En las figuras **A** y **B**, se representan valores promedios \pm la desviación estándar obtenidas de tres experimentos diferentes, mientras que las figuras **D** y **G** son provenientes de dos experimentos diferentes. Escalas 10 μ m.

Resultados

analizado con el anticuerpo anti fosfo-DNA-PKcs (Figura R12-A) y con anti γ -H2A.X (Figura R12-B), usando anti-tubulina como control de carga. Con todo ello, detectamos que en las células de las líneas H1993 y H1299 transfectadas con el siTDRD9-1 existen niveles elevados de DNA-PKcs fosforilada respecto de las transfectadas con siControl (Figura R12-A). Además, también hemos observado un aumento en la señal de γ -H2A.X en Western Blot (Figura R12-B). También hemos detectado los cambios en γ -H2A.X por inmunofluorescencia (Figura R12-C). Tras ser fijadas las células, las lamelas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti γ -H2A.X y con un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. En ambas líneas se observó un aumento de células con focos de γ -H2A.X en las condiciones de depleción de *TDRD9*. En la Figura R12-D, se muestran las gráficas correspondientes a la cuantificación de células con focos de γ -H2A.X (positivas si tienen más de 10 focos). También observamos que las células con depleción de *TDRD9* presentan frecuentes mitosis aberrantes y puentes de DNA durante la anafase (Figura R12-E), fenotipos característicos de una segregación cromosómica aberrantes por defectos en la reparación de DSBs (Aguilera et al. 2013, Marechal and Zou 2013). Finalmente, también observamos, que en células que tienen una bajada de los niveles de *TDRD9*, se originan núcleos con formas anormales (medias lunas multilobuladas, donuts, etc...) (Figura R12-F) lo cual, también es un marcador de una segregación cromosómica aberrante (Jagannathan et al. 2012). Todo ello, sugiere que *TDRD9* puede estar protegiendo del daño en el DNA a las células de cáncer de pulmón que lo expresan.

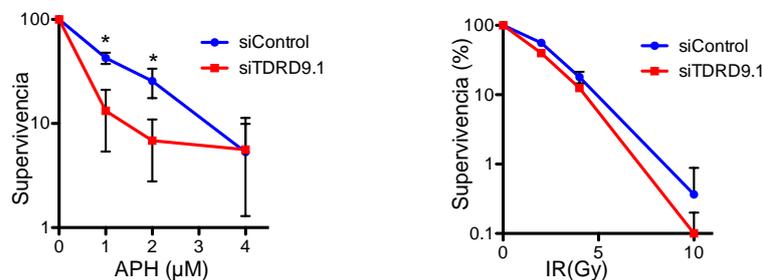


Figura R13. Curvas de supervivencia de células H1299, transfectadas con siTDRD9-1 y siControl, tratadas con diferentes concentraciones de afidicolina (A) y con distintas dosis de radiación ionizante (B). Se representan valores promedios \pm la desviación estándar obtenidas de tres experimentos diferentes. *t-Student con P-valor <0,01.

El proceso de estrés replicativo, se caracteriza por una baja estabilidad en el mantenimiento de la horquilla de replicación y conlleva a un aumento de inestabilidad genómica. El punto de control en la fase S del ciclo celular es crucial para asegurar la correcta replicación y coordinar la respuesta a daño en el DNA. Es interesante destacar que las células cancerosas tienen un alto nivel de estrés replicativo (Gaillard et al. 2015). La afidicolina, es un inhibidor de la DNA polimerasa ampliamente utilizado para generar estrés replicativo. Las células con *TDRD9* silenciado, muestran una hipersensibilidad al tratamiento con afidicolina respecto de las células control (Figura R13-A). Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando son sometidas a radiación ionizante (Figura R13-B), sugiriendo que *TDRD9* juega un papel en la protección frente a estrés replicativo. La no linealidad de los datos en la gráfica de supervivencia de clonogénicos con afidicolina, es indicativo de la existencia de una mezcla de poblaciones celulares de células transfectadas y no transfectadas con el siTDRD9-1.

2.- BÚSQUEDA DE INTERACTORES DE TDRD9 MEDIANTE ESCRUTINIO DE DOBLE HÍBRIDO

Paralelamente a los estudios descritos, hicimos un ensayo para identificar proteínas que interaccionaran con TDRD9. Se llevó a cabo el escrutinio de una genoteca de cDNA de embrión de ratón de 8,5 días de desarrollo mediante ensayo de doble híbrido en *S. cerevisiae* (apartado 5.5 de materiales y métodos). Como "cebo" se utilizó la proteína G4BD-TDRD9, resultante de la clonación del cDNA que codifica *TDRD9* en el vector pDBLeu, en fase con la secuencia del dominio de unión al DNA del factor transcripcional GAL4 (G4BD). Como proteínas "presas" se utilizaron las expresadas a partir de la genoteca de cDNA de ratón, clonadas en el vector pPC86, fusionadas al dominio de activación de GAL4 (G4AD). La existencia de la interacción, activa el gen *HIS3*, permitiendo a la levadura crecer en medio selectivo.

2.1 Análisis de los positivos obtenidos en el escrutinio de doble híbrido

De los 3×10^6 clones analizados en el escrutinio se aislaron 29 clones capaces de crecer en medio selectivo suplementado con 25 mM y 50 mM de 3AT, que es un inhibidor competitivo del producto del gen *HIS3*. La secuenciación de los fragmentos de cDNA que portaban los clones obtenidos en el escrutinio de doble híbrido reveló 18 cDNAs correspondientes a 18 proteínas distintas. Se recomprobó todos los cDNAs, revelando que 6 de los 18 eran falsos positivos. Es posible que algunos de los considerados falsos positivos, sean realmente verdaderos. Los consideramos negativos por establecer un límite de crecimiento y asegurar la rotundidad de los datos (Tabla R2). El crecimiento en medio selectivo reveló que las interacciones más fuertes ocurrían entre G4BD-TDRD9 y las proteínas Coil, Ewsr1, Sorbs1, Caprin1 (RNG 105), Ilf3 y C1qtnf1 (Figura R14-A).

El análisis de los interactores con TDRD9 hallados en el estudio del doble híbrido demostró que la mayoría son proteínas de unión a RNA. Además, algunas tienen una localización en estructuras que contienen complejos ribonucleoproteicos como gránulos de estrés (Ews, Ilf3, Caprin 1) (Shiina et al. 2014, Kedersha et al. 2016), otras forman parte de los Cuerpos de Cajal (Coil) involucrados también en procesos metabólicos de RNA (Yoon et al. 2010). Una de las características más significativas que tienen en común la mayor parte de ellas, es la presencia de motivos RG/RGG (Tabla R2). Estos, son motivos que acumulan argininas dimetiladas simétricamente y que son comunes en proteínas implicadas en el metabolismo del RNA. Las proteínas con dominios TUDOR unen proteínas con argininas dimetiladas y entre ellas proteínas que contienen motivos RG/RGG (Thandapani et al. 2013).

Para investigar si las interacciones con TDRD9 ocurrían a través del dominio TUDOR de TDRD9, se procedió a repetir el ensayo de doble híbrido pero esta vez utilizando como cebo una versión de TDRD9 con el dominio TUDOR deletado (G4BD- Δ TUDOR) (Figura R14-A y B). La interacción se perdió en todos los casos excepto en C1qtnf1 (que sigue interactuando débilmente) (Figura R14-A). Esto sugiere, que el dominio TUDOR de TDRD9 es el responsable de la mayoría de las interacciones identificadas en el ensayo del doble híbrido, algunas probablemente mediante los motivos RG/RGG.

A



B

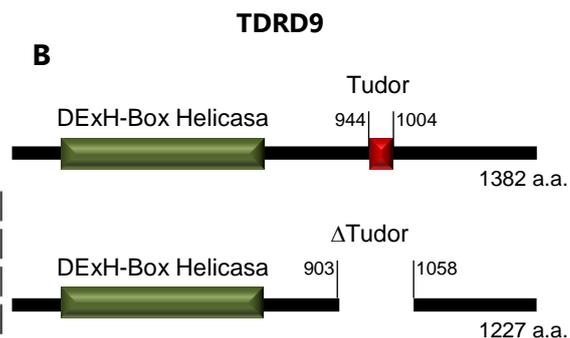


Figura R14. Interacción entre TDRD9 y los positivos encontrados en el escrutinio mediante ensayo de doble híbrido.

A) El cDNA que codifica para la proteína TDRD9 se clonó en fase con el dominio de unión al DNA del factor transcripcional GAL4 (G4BD), utilizándose la construcción resultante como "Cebo". Los cDNAs de los positivos, obtenidos en la genoteca, fusionados al dominio de activación del DNA del factor transcripcional G4AD se utilizaron como "presas". Las levaduras cotransformadas se diluyeron en agua estéril hasta alcanzar una DO_{600} 0,4 y se cultivaron diluciones seriadas con factor de dilución de 10. La activación del gen *HIS3* se detectó mediante el ensayo de crecimiento en medio no selectivo (SC-Leu (L)-Trp (T)) o selectivo (SC-L-T-His (H) + 25 ó 50 mM 3AT) de la estirpe MaV203 coexpresando las construcciones indicadas en la figura. Bajo cada interacción se muestra el ensayo de interacción con TDRD9 pero con el dominio TUDOR deletado. Con ello queríamos ver si era este el dominio responsable de la interacción con las proteínas positivas. **B)** Representación esquemática a escala de la proteína TDRD9 y de sus dominios. En la imagen superior se muestra la proteína completa de 1382 aminoácidos (a.a.) con los dominios DExH-Box Helicasa que va desde el a.a. 130 al 665 y el dominio TUDOR que va desde el 944 al 1004. En el dibujo inferior se representa la proteína, con una delección que va desde los aa 903 al 1058, que incluye al dominio TUDOR.

Tabla R2. Análisis de los positivos obtenidos en el análisis de doble híbrido.

Poteína	Nº Acceso Humanos	Nº Acceso Ratón	Dominios	Motivos RG/RGG	Nº Clones
Coil	NP_004636	NP_057915	Coilin_N	SI	2
Ewsr1	NP_005234	AAH68226	RRM, zf-RanBP	SI	1
Sorbs1	NP_001030126	BAC28980.1	Sorb,SH3_Sorbs1_3, SH3_Sorbs1_1, SH3_Sorb1_2	SI	5
Caprin1	NP_005889	AAI27031	Caprin-1_C	SI	2
ILF3	NP_036350.2	EDL25186.1	DZF, DSRM	SI	2
C1qtnf1	NP_112230	NP_064343.1	Collagen, C1q	NO	1
Paics	NP_001072992	NP_080215	SAICAR_synt_Ade5, purE	NO	1
Fam120a	NP_001273651.1	NP_001028440.2	Med15	SI	1
Ppp1r10	NP_002705	AAH52059.1	TFIIS_I, zf-CCCH	SI	3
Rint1	NP_068749.3	NP_796297	RINT1_TIP1	NO	2
Tes	NP-056456	NP_997059	LIM1_Testin, LIM2_Testin, LIM3_Testin, PET_Testin	NO	1
1110037F 02Rik	NP_056311	NP_001074652.1	MPLKIP	SI	1
Exosc3	NP_057126.2	NP_079789.1	Rrp4	NO	1
Dgcr14	NP_073210	EDK97493.1	Es2	NO	1
Fus	NP_004951.1	NP_631888.1	RRM, zf-RanBP	SI	2
Nedd4	NP_001271267.1	NP_035020.2	C2_NEDD4_NEDD4, HECTc, WW	NO	1
Sorbs2	NP_066547	NP_766340	Sorb,SH3_Sorbs2_3, SH3_Sorbs2_2, SH3	SI	1
Eif2b2	NP_055054.1	NP_663420.1	GCD2	NO	1

2.2 Localización celular de TDRD9 y ensayos de coexpresión con interactores positivos del ensayo de doble híbrido

Debido a la falta de anticuerpos contra TDRD9 que nos permitiera identificar la proteína endógena, decidimos investigar la localización de la proteína sobreexpresada mediante la transfección de un plásmido que la expresa. El plásmido pN-Flag-TDRD9, contiene el cDNA de *TDRD9* y una etiqueta (Flag) que nos ayudaría a detectar la expresión del mismo con anticuerpos contra Flag. Para este experimento, cultivamos $1,5 \times 10^6$ células HeLa en placas de 10 cm, las cuales transfectamos con el plásmido pN-Flag-TDRD9 que contiene un promotor CMV o con un plásmido vacío con promotor CMV (pDEST), como control de transfección. 48 horas después realizamos una inmunofluorescencia usando como anticuerpo primario un anti Flag M2, seguido del secundario Alexa Fluor 488. En la figura R15-A, vemos que TDRD9 expresado, tiene una localización citoplásmica, formando en ocasiones unos gránulos o corpúsculos citoplásmicos. Estos mismos experimentos se hicieron en células Cos7, obteniéndose idénticos resultados. Por otro lado, la inmunodetección de la proteína Flag-TDRD9 exógena mediante Western Blot, evidenció que la proteína presentaba una migración aberrante en los geles de poliacrilamida. La señal de Flag-TDRD9 se distingue en una fracción superior a los 170 KDa, sugiriendo que la proteína forma agregados de difícil solubilización (Figura R15-B). Con el fin de aclarar la naturaleza de estos agregados, hicimos extractos proteicos, separando las fracciones solubles e insolubles de células transfectadas con pDEST vacío y en células transfectadas con el plásmido pN-Flag-TDRD9. En la figura R15-C podemos ver que la banda que debe corresponder al tamaño de TDRD9 se encuentra en la fracción insoluble de células transfectadas con pN-Flag-TDRD9. No es de obviar las manchas (smear) por encima de esta señal y en la parte superior del carril de la fracción soluble donde se da un cúmulo de señal, indicando que pese a las técnicas usadas para hacer el extracto, TDRD9 aún sigue estando en grandes agregados. Estos experimentos nos llevaron a pensar que TDRD9 pudiera estar formando agregados insolubles en el citoplasma. En la línea germinal TDRD9 forma complejos ribonucleoproteicos citoplásmicos formando distintos tipos de gránulos de RNA denominados en conjunto *nuage* (Shoji et al. 2009).

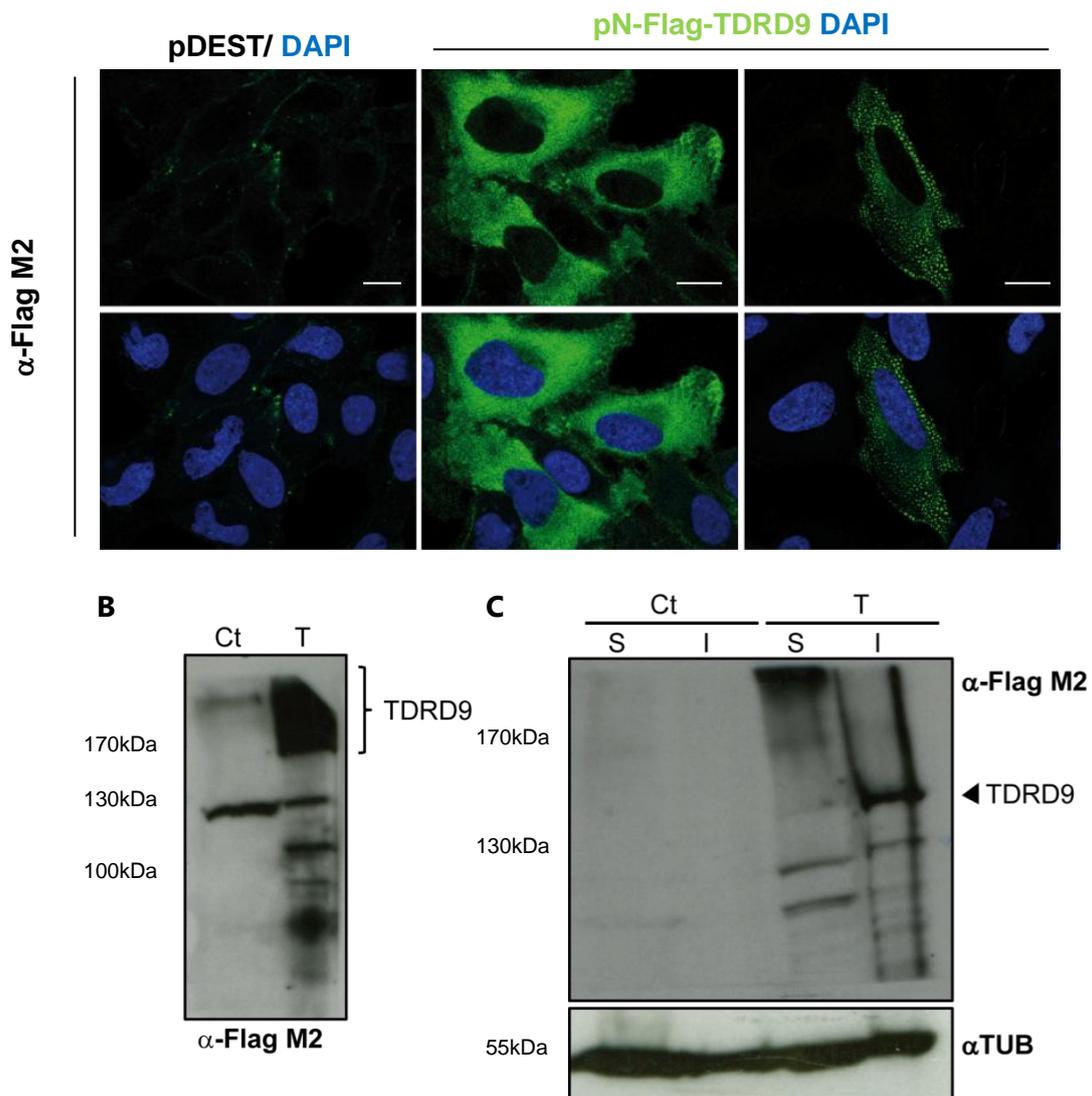


Figura R15. TDRD9 se localiza en el citoplasma de células HeLa, formando agregados insolubles.

A) Inmunofluorescencia de la sobreexpresión de TDRD9 mediante la transfección del plásmido pN-Flag-TDRD9 en células HeLa. Localización citoplásmica del mismo. Como anticuerpo primario se utilizó α -Flag M2 y como secundario Alexa flúor 488 (verde). El plásmido pDEST (esqueleto de pN-Flag-TDRD9) se utilizó como control negativo. **B)** Ensayo de Western Blot utilizando los extractos de células HeLa transfectadas con los plásmidos pDEST (Ct) o pN-Flag-TDRD9 (T). **C)** Fraccionamiento de extractos proteicos en fracción soluble e insoluble de células transfectadas con pDEST (Ct) o pN-Flag-TDRD9 (T). Para este experimento se usó células HeLa. En ambos Westerns se cargaron 40 μ g de extracto total de proteínas. Ambos Western Blots fueron analizados utilizando el anticuerpo α -Flag M2 como primario y como secundario un anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano. Como control de carga usamos la tubulina. Barra de escala 10 μ m.

Es conocido que múltiples proteínas que forman parte de gránulos de RNA son altamente insolubles. Un ejemplo de estas estructuras son los gránulos de estrés. Es interesante resaltar que en el ensayo de doble híbrido hemos identificado algunos interactores de TDRD9 que forman parte de estos gránulos de estrés, como por ejemplo Ews, Ilf3 y Caprin 1 (Shiina and Nakayama 2014, Kedersha et al. 2016).

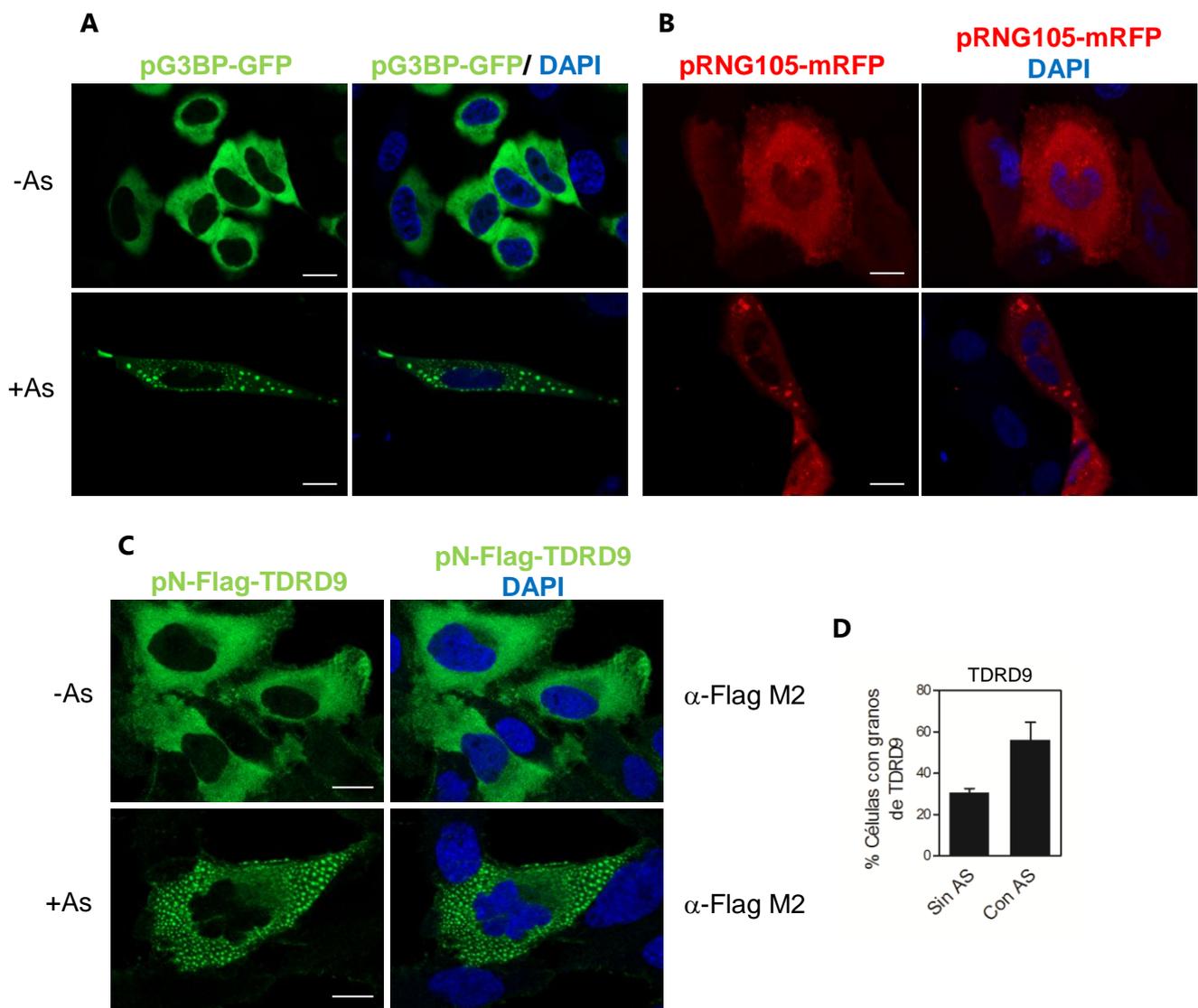


Figura R16. La sobreexpresión de TDRD9 en células HeLa, forma gránulos en el citoplasma. A) Distribución de G3BP sobreexpresado mediante transfección del plásmido pG3BP-GFP (verde). En el panel de arriba se observa la distribución citoplásmica y homogénea de G3BP en ausencia de arsenito (-As). En el panel inferior vemos gránulos de estrés originados por una sobreexpresión de G3BP en presencia de arsenito (+As). **B)** Distribución de CAPRIN1 sobreexpresada mediante la transfección del plásmido pRNG105-mRFP (rojo) en ausencia (-As) o presencia (+As) de arsenito. Las imágenes superiores muestran la distribución homogénea de CAPRIN1 en ausencia de estrés, mientras que las inferiores muestran gránulos de estrés de CAPRIN1 por la presencia de arsenito. **C)** Localización de TDRD9 sobreexpresado por la transfección del plásmido pN-Flag-TDRD9 en ausencia (-As) o presencia (+As) de arsenito mediante inmunofluorescencia. En el panel superior se muestra una distribución homogénea en el citoplasma, de TDRD9 transfectado, en ausencia de estrés. En el panel inferior, la presencia de arsenito desencadena una señal granulada en el citoplasma en una gran proporción de células. Como anticuerpo primario se usó un α -Flag M2 y como secundario Alexa Flúor (488) (verde). **D)** Se contaron alrededor de 1600 células de cada condición en dos experimentos independientes. Tratamiento con arsenito: 500 μ M durante 1 hora. Barra de escala 10 μ m.

Así que, lo siguiente que hicimos fue investigar si TDRD9 se encuentra formando parte de estructuras similares colocalizando con algunos de los interactores hallados en el doble híbrido. Elegimos para este experimento a

Resultados

CAPRIN1, la cual se ha descrito que forma gránulos de estrés típicos y G3BP como marcador canónico de gránulos de estrés (Shiina and Nakayama 2014). Se ha descrito que la asociación G3BP-CAPRIN1, es necesaria para formar gránulo de estrés. Sin embargo, una sobreexpresión de CAPRIN1 es suficiente para la nucleación del gránulo (Kedersha et al. 2016). Lo primero que hicimos fue ver la estructura de los gránulos en cada caso. En la figura R16, podemos ver gránulos de estrés típicos de G3BP y de CAPRIN1, en presencia de 500 μ M de arsenito, agente inductor de estrés oxidativo. De la misma manera hicimos el ensayo sobreexpresando TDRD9 (Figura R16-C), observando un aumento de células con gránulos cuando éstas son sometidas a estrés por arsenito (Figura R16-D), esto podría indicar una posible función en la célula frente a estrés. Se muestran imágenes del experimento realizado con células HeLa. También se utilizó la línea celular Cos7, con las que se obtuvieron los mismos resultados.

El experimento de coexpresión (Figuras R17-A y B) se llevó a cabo utilizando la línea celular Cos7, pero en HeLa obtuvimos similares resultados. En la figura R17-A, podemos ver en el panel superior la coexpresión de TDRD9 con G3BP en ausencia de arsenito. En este caso vemos que G3BP-GFP y Flag-TDRD9, no están nucleados en gránulos y presentan una distribución homogénea similar. Sin embargo, al tratar las células con arsenito podemos ver que G3BP-GFP, no sólo no está colocalizando con Flag-TDRD9, sino que TDRD9 está siendo excluido del lugar donde está el gránulo formado por G3BP. Por otro lado, Flag-TDRD9 y mRFP-CAPRIN1, en ausencia de arsenito, también tienen una distribución muy parecida (Figura R17-B) sin embargo, cuando sometemos las células a estrés por arsenito, de nuevo mRFP-CAPRIN1 nuclea en gránulos excluyendo a Flag-TDRD9 del lugar donde se localiza. En muy baja proporción, vemos Flag-TDRD9 formando gránulos cuando cotransfectamos. La función, etiología o composición de los complejos o gránulos que TDRD9 forma en el citoplasma, es desconocida por el momento. No podemos descartar que los corpúsculos citoplásmicos en los que aparece TDRD9 exógeno sea simplemente efecto de la sobreexpresión. Lo que sí sabemos es que en presencia de arsenito, el número de células que los presentan aumentan. Igual que ocurre con los gránulos de estrés canónicos.

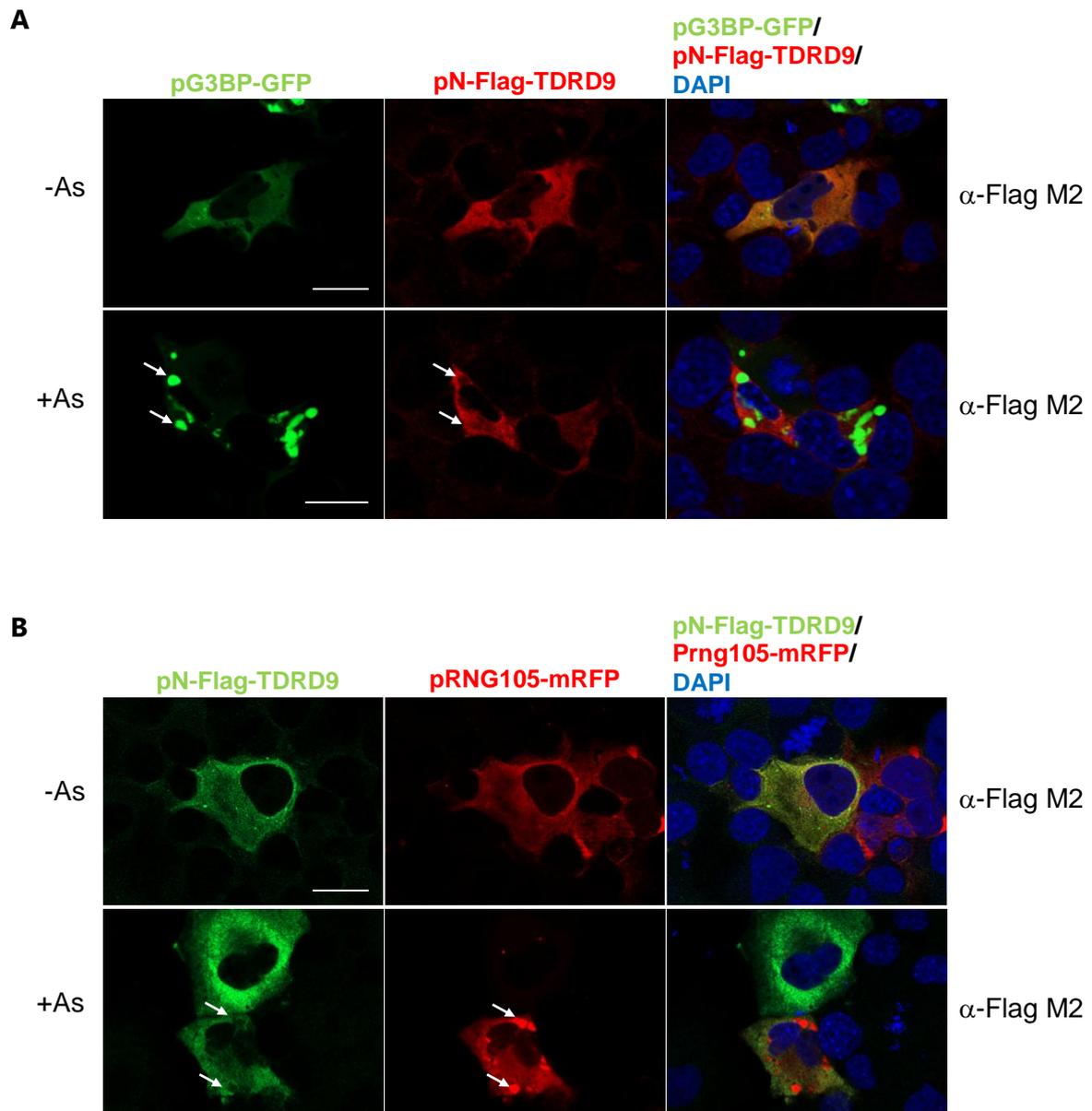


Figura R17. TDRD9 sobreexpresado no colocaliza con G3BP ni CAPRIN1 sobreexpresados en células Cos7. A) Experimento de cotransfección de los plásmidos pG3BP-GFP (verde) y pN-Flag-TDRD9 (rojo) en ausencia (-As) o presencia (+As) de arsenito (500 μ M, durante 1 hora). Las flechas marcan gránulos de estrés de G3BP y los huecos que se originan en la localización de TDRD9. **B)** Cotransfección de los plásmidos pN-Flag-TDRD9 (verde) y pRNG105 mRFP (CAPRIN1) (rojo) en ausencia (-As) o presencia (+As) de arsenito (500 μ M, durante 1 hora). Las flechas marcan gránulos de estrés de CAPRIN1 y los huecos que se originan en la localización de TDRD9. Para visualizar la expresión de TDRD9 mediante el plásmido pN-Flag-TDRD9, utilizamos un anticuerpo primario α -Flag M2 y como secundario, Alexa Fluor 568 (rojo) en el experimento de coexpresión con G3BP y Alexa Fluor 488 (verde) en la coexpresión con RNG105 (CAPRIN1). Barra de escala 10 μ m.

DISCUSIÓN

1.- TDRD9 EN CÁNCER

Hemos descrito en esta tesis que *TDRD9* se expresa en un conjunto de tumores de pulmón y que la esperanza de vida de los pacientes que padecen estos tumores, se ve significativamente disminuída. Por otro lado, hemos visto una sobreexpresión de *TDRD9* en un subconjunto de líneas de adenocarcinoma de pulmón (LA) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) debido a la hipometilación de la CGI asociada al promotor de *TDRD9*. Todo esto, junto con datos previos, nos sitúa a *TDRD9* como un posible gen Cancer Testis (CTs). Estos genes se caracterizan por presentar una expresión normal restringida a la línea germinal masculina, pero que pueden activarse de forma aberrante en algunos tumores como resultado de la desmetilación de su promotor (De Smet et al. 1999, Old 2001, Coulie et al. 2002). Otros genes relacionados con el metabolismo de los piRNAs, han sido catalogados como CTs. Por ejemplo, *TDRD1* que está involucrado en el silenciamiento de *LINE-1* en la línea germinal, junto con *TDRD9* y las proteínas de la familia PIWI, es frecuentemente expresado en tumores de próstata y de mama (Loriot et al. 2003). En ratón, *Mael* es otro claro ejemplo de gen CT. Este se localiza en los *nuage* en células germinales y también es esencial para el mantenimiento de la línea germinal silenciando *LINE-1* mediante piRNAs junto con *Miw2* y *Tdrd9* en piPBs (Aravin et al. 2009). En humanos, se restringe también la expresión de *MAEL* a la línea germinal masculina. Sin embargo, se ha encontrado expresado de manera aberrante en varios tipos de tumores como el de mama o en cáncer colorectal, activándose por hipometilación de su CGI (Hofmann et al. 2008, Janic et al. 2010, Xiao et al. 2010, De Smet et al. 2013, Kim et al. 2013). Además, *TDRD9* ha sido propuesto como un posible gen CTs en un análisis transcriptómico de tumores colorectales (Yokoe et al. 2008). Todos estos datos apoyan nuestra hipótesis sobre que *TDRD9* es un posible gen CTs que puede encontrarse expresado de forma aberrante en cáncer de pulmón por desmetilación de su CGI.

La expresión de genes específicos de la línea germinal en cáncer, a veces es explicado por procesos de desdiferenciación que pueden ocurrir durante la transformación celular (Whitehurst 2014). Sería por lo tanto posible que *TDRD9* se sobreexpresara como parte de un proceso general de desdiferenciación que

involucrara a muchos genes del grupo CTs. Sin embargo, observamos mediante análisis informático, que el nivel de expresión de *TDRD9* y los genes *MAGE* (A1, A2, A3 y A4), que son CTs que se expresan en adenocarcinoma de pulmón y en melanomas, no correlacionan entre sí (datos no mostrados). Es decir, la activación de *TDRD9* no ocurre por una activación generalizada de genes CTs.

Los patrones de metilación en cáncer, a menudo, son modificados en las células tumorales. Una hipometilación de ciertas zonas del genoma, podría contribuir al origen y progresión del tumor por activación de oncogenes. A veces, estas desmetilaciones ocurren englobando amplias regiones génicas (De Smet et al. 1999, Weiser et al. 2001, Coral et al. 2002). Sabiendo esto investigamos si *TDRD9* se encuentra en una de esas regiones hipometiladas. Observamos que *TDRD9* es el único gen de una amplia región génica que sufre una hipometilación en tumores con expresión de *TDRD9*. Por tanto, todos estos datos nos indican que la hipometilación y desrepresión de *TDRD9* no es consecuencia de una hipometilación generalizada, sino de una activación específica que puede aportar una ventaja selectiva a las células tumorales. Además, vimos que al tratar con 5-aza-2'-deoxycytidine (un agente desmetilante) células de la línea H1264 (que no expresa *TDRD9*), se activa la expresión de *TDRD9*. Sin embargo, esta desrepresión no es estable. Esto nos sugiere que la expresión de *TDRD9* no aporta ventaja selectiva a todas las células tumorales de pulmón. Es posible que la ventaja funcional, aportada por la expresión de *TDRD9*, sea salvada mediante otros cambios de expresión o mutaciones en los tumores que no expresan *TDRD9*.

Es interesante destacar que *spn-E* (homólogo a *TDRD9* en *Drosophila*) y otros factores implicados en el metabolismo de los piRNAs, como *piwi* y *aub*, se han encontrado aberrantemente expresados en tumores malignos de cerebro en *Drosophila* (Janic et al. 2010). Se han publicado muchos trabajos acerca de la expresión aberrante de las proteínas PIWIL en tumores humanos de diferentes orígenes, sin embargo, se conoce muy poco sobre los mecanismos por los cuales las proteínas PIWIL contribuyen a la proliferación celular en tumores. Los genes *PIWILs* se han propuesto también como genes CTs por su localización en la línea germinal y de forma ectópica en diversos tumores (Costa et al. 2007, Cheng et al. 2011). Por ejemplo, en el trabajo publicado por Xiaohan en 2015, se ha descrito que

Discusión

PIWIL2 está involucrada en la progresión del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) actuando como oncogén (Qu et al. 2015). Algo parecido a lo que puede estar ocurriendo con *TDRD9* en este tipo de tumores. Una posibilidad obvia es que las proteínas PIWI estén controlando el metabolismo de los piRNA y silenciando transposones en células tumorales. Sin embargo, no hay evidencias de que esto ocurra. En el reciente trabajo publicado por Wang y colaboradores, se describe que la expresión ectópica de *PIWIL4* en cáncer de mama no afecta significativamente a la biosíntesis de piRNAs (Wang et al. 2016). La fuerte activación de *LINE-1* observada en mutantes en *Tdrd9*, nos hizo pensar que *TDRD9* junto con los piRNAs, podían estar controlando la activación de *LINE-1* en tumores, los cuales pueden derivar en inestabilidad genómica y afectar los niveles de expresión de oncogenes o supresores de tumores. Sin embargo, cuando observamos el patrón de expresión de *LINE-1* en las líneas celulares de cáncer de pulmón, LA y NSCLC, no se observó ninguna correlación entre la expresión de *TDRD9* y de *LINE-1*. Tampoco la depleción de *TDRD9* afectó al transcrito de *LINE-1*. Todos estos datos nos indican que la función de *TDRD9* en células tumorales no está relacionada con el control de la expresión de *LINE-1*.

Según nuestros datos, una depleción de *TDRD9* en células tumorales de pulmón que lo expresan, ocasiona una pérdida de proliferación de las mismas, un acúmulo en la fase S del ciclo celular y un aumento de la apoptosis. Entonces si no es mediante el control de *LINE-1* ¿cómo puede favorecer la expresión de *TDRD9* al mantenimiento de la célula tumoral?

Hemos encontrado que la depleción de *TDRD9* en líneas celulares que lo expresan, provoca un gran aumento de γ -H2A.X, que es un marcador de roturas de cadena sencilla (SSBs) pero sobre todo de roturas de cadena doble (DSBs). También identificamos un aumento de la proteína DNA-PKcs, que es una kinasa que junto con ATM y ATR, fosforilan a H2A.X y son responsables de generar la respuesta a daño en el DNA. (Gaillard et al. 2015). Debido a las lesiones en el DNA, acumuladas por la depleción de *TDRD9*, podrían estar dándose enlaces intercatenarios (ICLs), que suelen bloquear la horquilla de replicación conduciendo a la incapacidad completa del cromosoma para duplicarse, originando una catástrofe mitótica (Deans et al. 2011). Además la presencia de loci no replicados completamente o no

reparados pueden resultar en una mitosis con no disyunción de cromosomas y puentes de anafase (Gisselsson et al. 2000). De acuerdo con esto, al deplecionar *TDRD9* en células de cáncer de pulmón *TDRD9* positivas origina, se produce un aumento considerable del número de núcleos celulares anómalos y mitosis aberrantes, con la presencia de puentes de anafase típicos originados por fallos replicativos (Hewett et al. 1998, Sofueva et al. 2011).

La proteína DNA-PKcs, está implicada mayoritariamente en la ruta de reparación de NHEJ (unión de extremos no homólogos). Dicha ruta es minoritaria en fase S, en la que actúa principalmente la ruta de reparación por recombinación homóloga. En células con bajos niveles de *TDRD9*, observamos que existen altos niveles de DNA-PKcs activo, sin embargo las células están bloqueadas en S, lo cual resulta paradójico. Podría ocurrir que por algún motivo desconocido, la depleción de *TDRD9* provoque un aumento de la ruta NHEJ en condiciones en las que no debería estar activa, lo cual resultaría deletéreo para las células (Gaillard et al. 2015).

Por otro lado, las células con *TDRD9* deplecionado, no presentan hipersensibilidad a radiación- γ , lo cual puede sugerir que *TDRD9* no está implicado de manera general en la reparación de DSBs. Sin embargo, sí muestran hipersensibilidad al tratamiento con afidicolina, un inductor de estrés replicativo. La afidicolina es un inhibidor de la replicación que causa parada de la horquilla de replicación (Levenson et al. 1993), activa el *checkpoint* en fase S y aumenta las DSBs (Brown et al. 2003). El estrés replicativo se caracteriza por presentar una replicación defectuosa del DNA que podría desencadenar mutaciones o bloqueos de la replicación que pueden originar roturas, reordenaciones y una segregación anómala de los cromosomas. El daño en el DNA es uno de los motivos por los que la horquilla de replicación puede pararse o bloquearse desencadenando la activación del *checkpoint* en la fase S. Ha sido ampliamente descrito en la bibliografía que el estrés replicativo es una de las principales causas que conduce a la inestabilidad genómica, una clara característica encontrada en las células tumorales (Gaillard et al. 2015). Teniendo en cuenta que una depleción de *TDRD9* ocasiona una parada en fase S, hipersensibilidad a afidicolina y catástrofes mitóticas, proponemos que *TDRD9* está protegiendo a la célula de cáncer de pulmón del estrés replicativo, de alguna manera que desconocemos por el momento. Sabemos que *TDRD9*, es una

Discusión

helicasa de RNA que contiene dominios de unión a RNA y un dominio TUDOR. Proteínas relacionadas con el metabolismo de RNA están implicadas en la estabilidad genómica (Aguilera et al. 2014). Muchos genes relacionados con el metabolismo del RNA fueron sobreexpresados en condiciones de depleción de *TDRD9*, incluyendo *DDX6*, *PAPOLA*, *DHX9*, *XRN1*, *SF3B1*, *FMR1* e *ILF3*, estando muchos de ellos afectados en la estabilidad genómica. Una manera en la que el metabolismo del RNA afecta la estabilidad genómica es a través de los llamados R-loops. Estos son híbridos de DNA-RNA que forman lazos al unirse el RNA al DNA. Así deja expuesta las cadenas de DNA simples, las cuales son una diana perfecta para ser atacadas por diversos agentes, que originan DSBs (Aguilera and Garcia-Muse 2013). Es interesante destacar que *TDRD3*, que es una proteína con dominio TUDOR, como *TDRD9*, actúa de puente molecular entre *TOP3B* y las histonas metiladas en argininas. Una bajada de *TDRD3* en las células aumenta la formación de R-loops en *c-MYC*. El complejo formado por *TOP3B* y *TDRD3* es capaz de reducir el superenrollamiento negativo del DNA disolviendo los R-loops, protegiendo, así, del daño en el DNA y reduciendo la frecuencia de translocaciones cromosómicas (Yang et al. 2014). De forma análoga sería posible que *TDRD9* reclutara proteínas de la cromatina que ayudaran a reparar el estrés replicativo que las células tumorales poseen *per se*.

Tabla D1. Genes *spn* de *Drosophila* y sus homólogos en ratón y humanos.

<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>	FUNCIÓN
<i>spn-A</i>	<i>Rad51</i>	<i>RAD51</i>	Está involucrado en recombinación homóloga y reparación de DNA.
<i>spn-B</i>	<i>Xrcc3</i>	<i>XRCC3</i>	Codifica para una proteína relacionada con RecA/Rad51 que participa en recombinación homóloga para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica y reparación del DNA.
<i>spn-C</i>	<i>Helq</i>	<i>HELQ</i>	Codifica para una ATPasa y helicasa de DNA que está implicada en la reparación del DNA durante la replicación. Su mutación confiere el mismo fenotipo que las mutaciones de los otros genes <i>spn</i> , en <i>Drosophila</i> (Adelman et al. 2013).
<i>spn-D</i>	<i>Rad51C</i>	<i>RAD51C</i>	Es una proteína implicada en reparación del DNA requerida en recombinación meiótica.

Datos obtenidos de la base de datos HomoloGene y Flybase.org.

Es interesante destacar que los genes de la familia *spindle* (*spn*) de *Drosophila*, tienen homología con genes que están implicados en reparación del DNA en ratón y humanos (tabla D1). Teniendo en cuenta que todos los mutantes

spn tienen un fenotipo común en *Drosophila*, no resulta extraño que *TDRD9* tenga también un papel en daño al DNA.

1.1 TDRD9 como diana terapéutica.

Los tumores de pulmón son uno de los cánceres con mayor tasa de mortalidad en humanos. Muchas de las estrategias terapéuticas más comúnmente utilizadas para el tratamiento de los tumores NSCLC, que incluyen exéresis, quimioterapia y radioterapia, están asociadas a una alta mortalidad y baja tasa de supervivencia a largo plazo (Wroblewski et al. 2001, Rivera 2004, Chang 2011). Actualmente se están realizando investigaciones epigenéticas con el fin de conocer si los mecanismos epigenéticos relacionados con la progresión de NSCLC podrían contribuir a la diagnosis, a la predicción de la prognosis y a la exploración de nuevas estrategias terapéuticas (Risch et al. 2008, Juergens et al. 2011). Aunque aún queda mucho por investigar sobre el papel de *TDRD9* en cáncer de pulmón, no es aventurado decir que una terapia basada en la inhibición de *TDRD9* en pacientes con cáncer de pulmón *TDRD9* positivos, se trataría de una excelente estrategia. Debido a su restringida ubicación en la línea germinal, pensamos que uno de los peores efectos secundarios podría ser la esterilidad del individuo tras aplicar el tratamiento de inhibición de *TDRD9*. Algo que podría considerarse casi vanal teniendo en cuenta la agresividad de las terapias aplicadas en el tratamiento de esta enfermedad.

Es interesante apuntar, que se están llevando a cabo estrategias inmunoterapéuticas, siendo los genes CTs algunas de las principales dianas. Los genes de la familia *MAGE* codifican para antígenos que están siendo probados en vacunas, como dianas frente a diversos tipos de tumores, sobre todo de pulmón y melanomas (Li et al. 2016).

2.- LOCALIZACIÓN E INTERACTORES PROTEICOS DE TDRD9

Hemos visto mediante el ensayo de doble híbrido que *TDRD9* interactúa con varias proteínas y que muchas de ellas tienen en común la presencia de motivos

RG/RGG mediante los que, potencialmente, pueden estar interaccionando con el dominio TUDOR de *TDRD9*. Se ha descrito que el dominio TUDOR reconoce argininas metiladas. La identificación de varias proteínas con motivos metilables RG/RGG en el ensayo de doble híbrido, sugería que estas argininas de mamíferos pueden ser metiladas en la levadura. Es conocida la existencia de una metiltransferasa de *Saccharomyces* (Hmt1) que reconoce y metila proteínas no histonas con motivos RGG, RGR, RXR Y RXG (Low et al. 2016), por lo tanto es muy posible que las proteínas que interaccionan con TDRD9 en la levadura estén siendo metiladas por Hmt1. Muchas de estas proteínas están asociadas con diversos procesos fisiológicos, como el metabolismo del RNA, la represión traduccional, la regulación de la apoptosis, la regulación transcripcional y señalización de daño en el DNA. Algunas de estas proteínas con motivos RG/RGG, están involucradas en diversas enfermedades (Figura D1), entre ellas el cáncer. Un ejemplo de ello lo tenemos con la proteína EWS, interactor de TDRD9 en el ensayo de doble híbrido, que está implicada en el origen del Ewing Sarcoma (Thandapani et al. 2013).

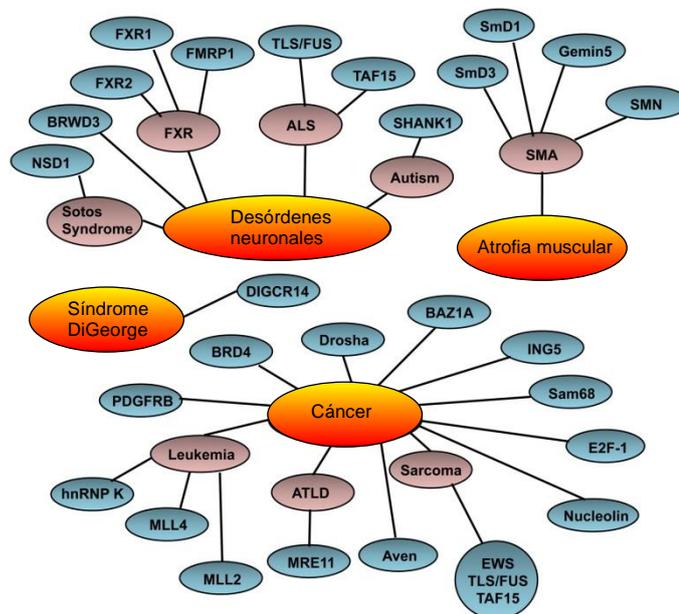


Figura 1D. Conexión entre proteínas con motivos RG/RGG y enfermedades. Las proteínas que contienen dominios RG/RGG, han sido implicadas en diversas enfermedades humanas, como cáncer y desórdenes neuronales. Adaptado de (Thandapani et al. 2013)

Nos parece interesante mencionar la proteína Ppp1r10 (PNUTS), otro de los interactores hallado en el estudio del doble híbrido de TDRD9. Esta proteína actúa como un potencial oncogén regulando positivamente la ruta Akt, promoviendo el crecimiento celular y la proliferación, y suprimiendo el potencial apoptótico de la

célula. Una depleción de *PNUTS* aumenta el índice apoptótico de células cancerosas, fenotipo también encontrado en células con *TDRD9* deplecionado (Kavela et al. 2013). Además se ha publicado un papel de *PNUTS* en la reparación del DNA y en la señalización del *checkpoint* (Landsverk et al. 2010).

Conocemos que *TDRD9* se encuentra en la línea germinal en gránulos de RNA denominados PBs, que están enriquecidos en piRNAs (piPBs). También sabemos que la proteína *TDRD9* exógena origina gránulos citoplásmicos cuya formación se encuentra exacerbada cuando aplicamos estrés oxidativo mediante arsenito. Pensamos que los gránulos observados pueden tratarse de gránulos de estrés (SGs) aunque no canónicos, a diferencia de los que forman *G3BP* o *CAPRIN1*, ya que *TDRD9* es excluida de su entorno. Sabemos, además, que algunas de las proteínas identificadas en el doble híbrido están presentes en SGs, como *ILF3*, *CAPRIN1* y *EWS*. Y que algunos de los genes sobreexpresados al deplecionar *TDRD9* como *FMR1*, *ILF3*, *XRN1* y *DHX9*, se encuentran también en SG (Shiina and Nakayama 2014, Kedersha et al. 2016). PBs y SGs están estrechamente asociados con una gran variedad de enfermedades, incluida el cáncer. La clasificación de los gránulos de RNA está basada en su composición, en la localización subcelular (nuclear, citoplásmica, axonal, etc...), origen celular (línea germinal, neuronas...), respuesta a estímulos (estrés, infecciones virales...), comportamiento dinámico y función (sitios de almacenamiento de mRNA o de destrucción del mismo, respuesta a estrés...) (Anderson et al. 2009, Buchan 2014).

Los gránulos de RNA tienen un papel directo en el metabolismo del cáncer, a través de la regulación de la expresión en células cancerosas. La respuesta integrada a estrés (ISR) es un programa que recibe información desde diferentes sensores de estrés y coordinan la adaptación celular a estrés (Anderson et al. 2008, Baird et al. 2012). La formación del SGs es parte del ISR que promueve la adaptación y supervivencia durante los cambios en el entorno, donde debido a la falta de vascularización, se dan situaciones de hipoxia, hiperosmolaridad, falta de nutrientes, estrés oxidativo y otros (Figura D2) (Ackerman et al. 2014). Esto desencadena un microambiente hostil para la célula. La respuesta ISR se convierte en algo esencial para el desarrollo del tumor. Aunque no se sabe mucho de cómo los SGs están involucrados en el desarrollo y progresión del tumor, lo que sí está claro es que los

mecanismos postranscripcionales mediados por las proteínas asociadas a los gránulos juegan un papel esencial en la adaptación de la célula tumoral a estrés, a la proliferación celular y al crecimiento tumoral a través de varias rutas de señalización (Figura D2). Algunas drogas promueven el ensamblaje de SGs no canónicos cuya composición es diferente a los SGs clásicos. El conocimiento de drogas que ensamblan o desensamblan SGs no canónicos como los posiblemente formados por *TDRD9*, podrían identificar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de cáncer de pulmón TDRD9 positivo (Anderson et al. 2015)

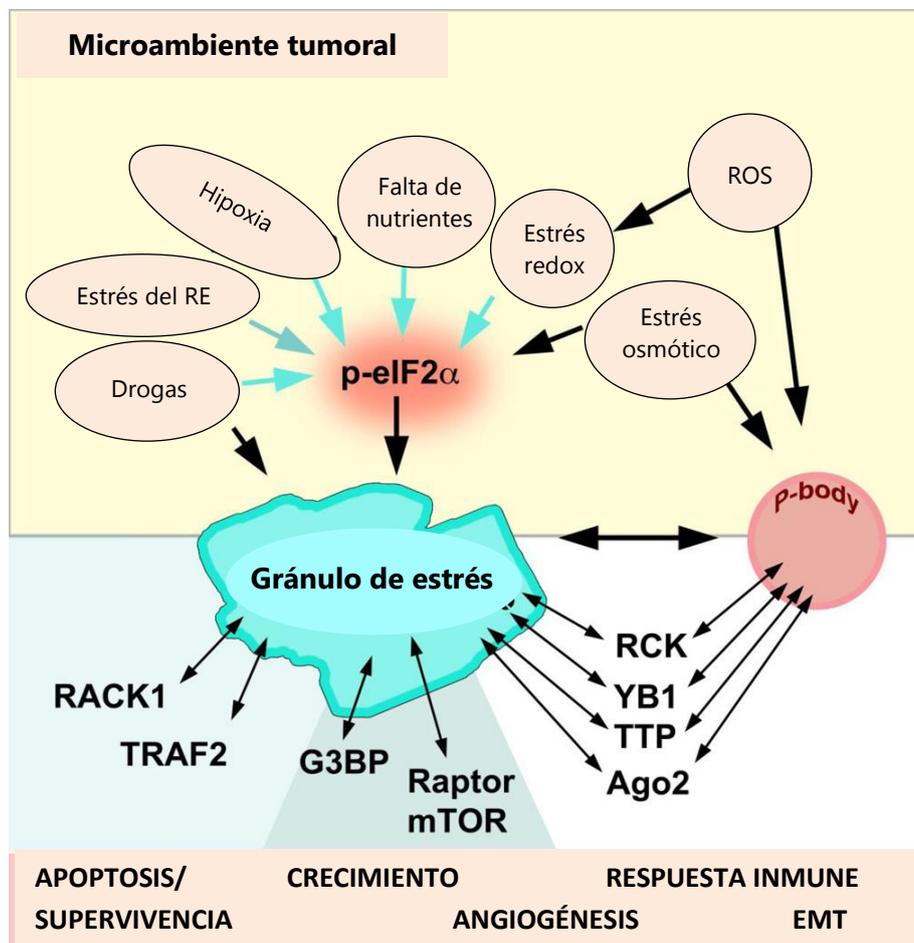


Figura 2D. Gránulos de RNA y microambiente tumoral. El microambiente donde se desarrolla la célula tumoral se caracteriza por una contribución colectiva de diferentes estreses que rodean a la célula creando un nicho (amarillo). El microambiente puede ir cambiando durante la progresión del tumor, así que la célula debe ir adaptándose constantemente a estos cambios. Estos estreses, desencadenan la formación de SGs/PBs que son una manifestación de la ISR (Integrative Stress Response) cuya responsabilidad es la de adaptación de las células a los cambios. A través de SGs/PBs se establecen diferentes respuestas fisiológicas (panel inferior). Adaptado de (Anderson et al. 2015).

CONCLUSIONES

- 1.- En humanos, el gen *TDRD9* tiene una expresión mayoritariamente restringida a testículos, sin embargo de forma aberrante lo encontramos sobreexpresado en un grupo de tumores de pulmón y en melanomas de piel; así como en un subconjunto de líneas de adenocarcinoma de pulmón y de carcinoma de pulmón de células no pequeñas.
- 2.- En adenocarcinoma de pulmón, la supervivencia de los pacientes que presentan tumores con expresión de *TDRD9* es menor que los que presentan tumores sin expresión del mismo.
- 3.- La razón por la que *TDRD9* se sobreexpresa en tumores y en líneas celulares de cáncer de pulmón, no es debida a amplificaciones génicas, sino por una hipometilación de la Isla CpG (CGI) asociada a su promotor, que conlleva a una activación de la expresión del gen. Además encontramos que esta hipometilación es exclusiva de *TDRD9*, ya que los genes adyacentes a éste no presentan diferencias de metilación en tumores positivos o negativos para la expresión de *TDRD9*.
- 4.- La depleción de *TDRD9* en líneas celulares de cáncer de pulmón que lo expresan (H1299 y H1993), afecta negativamente a la proliferación de las mismas, posiblemente por una parada parcial en la fase S del ciclo celular. Además, una bajada de los niveles de expresión de *TDRD9* genera un aumento de la apoptosis en dichas líneas.
- 5.- No encontramos ninguna relación entre la expresión de *TDRD9* y el transcrito de *LINE-1* en células de cáncer de pulmón. Además, la abundancia del transcrito de *LINE-1* no se ve afectada por la depleción de *TDRD9*.
- 6.- La depleción de *TDRD9* provoca una acumulación de daño en el DNA que se pone de manifiesto por un aumento de focos de γ -H2A.X, una sobreexpresión de la proteína DNA-PKcs y la presencia de núcleos y mitosis aberrantes con numerosos puentes de anafase.

Conclusiones

7.- Las células de cáncer de pulmón con *TDRD9* silenciado, presentan una hipersensibilidad a afidicolina, pero no a radiación gamma. Lo cual nos sugiere que las células a las que se les depleciona *TDRD9*, presentan un cúmulo de estrés replicativo. Todo esto nos sugiere que *TDRD9* alivia el estrés replicativo de células de cáncer de pulmón que lo expresan.

8.- Mediante ensayos de doble híbrido hemos visto que *TDRD9* interacciona con las proteínas Coil, Ewsr1, Sorbs1, Caprin1, Ilf3, Paics, Fam120a, Ppp1r10, Rinr1, Tes y 1110037F02Rik mediante el dominio TUDOR y con C1qtnf1 mediante un dominio desconocido. La mayor parte de los interactores identificados de *TDRD9* presentan RG/RGG.

9.- *TDRD9*-Flag, se localiza en el citoplasma homogéneamente y en determinadas ocasiones formando gránulos en el citoplasma. Esta localización granular se ve aumentada cuando tratamos a las células con arsenito. Al no colocalizar con CAPRIN1-mRFP ni G3BP-GFP que codifican para proteínas de gránulos de estrés (SG) canónicos, *TDRD9*-Flag podría estar formando gránulos pero de naturaleza desconocida.

ANEXO

Tabla A1. Genes en común que cambian significativamente su expresión tras silenciar *TDRD9*

Gen	Fold Change lineal siTDRD9-1	FDR siTDRD9-1	Fold Change lineal siTDRD9-2	FDR siTDRD9-2
HIST1H1E	6,137037	0,000016	8,092675	0,000010
CEP250	4,123602	0,000016	3,753805	0,000021
MKI67	4,104273	0,000012	3,178555	0,000025
PRKDC	4,018385	0,000014	4,128275	0,000013
PPFIBP1	3,716059	0,000327	3,460815	0,000401
DHX9	3,713348	0,000081	4,769726	0,000025
CCDC186	3,678924	0,000115	3,080763	0,000195
ZNF480	3,665226	0,000004	2,794001	0,000012
HIST1H1D	3,564621	0,000393	3,748467	0,000275
BDP1	3,419956	0,002566	4,533129	0,000659
RASSF8	3,388318	0,008930	4,245262	0,003149
EIF4G1	3,363923	0,000052	2,810413	0,000083
ESCO1	3,227598	0,000239	3,538456	0,000140
DCAF16	3,209233	0,000012	2,490618	0,000030
AFF4	3,187563	0,000311	2,706667	0,000652
SAFB2	3,182146	0,000043	3,113412	0,000030
CENPF	3,151546	0,000012	2,972437	0,000016
MIS18BP1	3,142988	0,000134	3,360121	0,000073
SETD2	3,104407	0,000012	3,434487	0,000010
PHLDB2	3,090040	0,000194	3,573388	0,000082
TPR	3,068202	0,000052	3,540176	0,000025
DIO2	3,011904	0,000012	2,615816	0,000017
ZKSCAN1	3,010654	0,000239	2,569947	0,000522
CLSTN1	2,988485	0,000098	3,503457	0,000040
CEP350	2,984088	0,000058	2,835914	0,000052
DDX6	2,975762	0,000156	2,659110	0,000248
MDN1	2,958562	0,000102	3,014026	0,000069
SPAG9	2,953673	0,001768	2,916261	0,001617
RBAK	2,941415	0,000047	3,190971	0,000025
NCEH1	2,938313	0,000012	2,308193	0,000036
CDK11A	2,911368	0,000076	2,373561	0,000275
NBPF10	2,905483	0,000052	2,762820	0,000046
PPARGC1A	2,904933	0,002491	4,359782	0,000317
SMC1A	2,888978	0,001009	2,995331	0,000729
ALG11	2,885799	0,000047	2,579984	0,000051
BCLAF1	2,880999	0,000019	2,785873	0,000021
ABLIM1	2,867801	0,000052	2,851999	0,000025
ARHGAP21	2,858023	0,000052	2,611025	0,000060
HIST2H2AC	2,828874	0,000097	2,821218	0,000070
MBNL1	2,815370	0,002036	2,451492	0,003865
TMTC3	2,809596	0,000940	2,602600	0,001296
BOD1L1	2,794557	0,000025	3,561783	0,000010
GNG12	2,778197	0,000019	2,524505	0,000025
NSD1	2,767886	0,000052	3,846242	0,000012
ATRX	2,758749	0,001229	3,179563	0,000498
SMC3	2,742036	0,000092	2,949086	0,000047
KIAA0430	2,732432	0,000167	2,390707	0,000317
INPP4B	2,722216	0,000087	2,449907	0,000111
PAPOLA	2,717324	0,000746	2,592825	0,000852
FMRL	2,698689	0,000168	3,301495	0,000052
PSME4	2,688513	0,000215	3,513606	0,000051
LMAN1	2,678235	0,000225	2,983866	0,000108
CDC27	2,669280	0,000115	2,755328	0,000070
AGGF1	2,616101	0,000148	2,878406	0,000070
ATF7IP	2,611648	0,001076	3,555546	0,000187
MBTD1	2,588423	0,001048	2,550020	0,001026
BAZ1B	2,586348	0,000163	2,666626	0,000112
SMC2	2,540893	0,000872	2,394674	0,001119

Anexo

PI4K2A	2,521928	0,000124	2,590079	0,000077
PRRC2C	2,518765	0,000320	2,721543	0,000290
VAPB	2,515897	0,000148	2,321261	0,000206
SF3B1	2,508589	0,001096	2,323103	0,001617
TCERG1	2,443081	0,000062	2,437341	0,000046
NOL8	2,442451	0,000090	2,607832	0,000046
UFL1	2,437804	0,000901	2,145739	0,001948
ASXL1	2,435216	0,001557	2,717309	0,000680
ILF3	2,435062	0,002562	2,973529	0,000669
MLEC	2,429584	0,001583	2,651994	0,000787
H2AFV	2,394201	0,004856	2,428052	0,003886
MYO5C	2,382100	0,000618	2,893570	0,000128
ZCCHC6	2,374932	0,001972	2,147318	0,003325
MOB1A	2,373134	0,000090	2,301539	0,000073
MGEA5	2,371677	0,000135	2,516809	0,000072
WNK1	2,328344	0,000212	2,366919	0,000168
GOLIM4	2,323337	0,001566	2,150697	0,002362
NUFIP2	2,316398	0,006450	2,239149	0,007236
CDC42SE2	2,310569	0,000135	2,322785	0,000335
CBL	2,308368	0,000101	2,278418	0,000074
FYB	2,294524	0,000226	2,501807	0,000111
CCPG1	2,294155	0,000162	2,757716	0,000047
RHOV	2,272442	0,000202	2,007550	0,000463
ERCC6L2	2,260668	0,000149	2,486703	0,000068
PDE4DIP	2,258734	0,000517	3,113382	0,000068
IQGAP1	2,254701	0,000193	2,086389	0,000301
AGAP10	2,230499	0,002900	2,515465	0,001127
CDC42BPA	2,218959	0,000434	2,174438	0,000447
ZBTB7A	2,193982	0,000391	2,124801	0,000438
PUS7L	2,191387	0,000437	2,355782	0,000234
MYO6	2,173894	0,000389	2,494224	0,000133
SUCO	2,173891	0,000342	2,063357	0,000447
SLMAP	2,162071	0,004696	2,080040	0,005539
SPTBN1	2,160406	0,000168	2,043112	0,000222
RIF1	2,150271	0,000325	2,277366	0,000187
CADM2	2,138113	0,002251	2,109220	0,002153
TBC1D14	2,125100	0,000325	2,341349	0,000142
CCND2	2,121948	0,003629	3,164530	0,000264
TPM4	2,117626	0,000058	2,082605	0,000047
ZNF644	2,115918	0,000853	2,274073	0,000436
BCOR	2,115220	0,000543	2,285993	0,000269
PARP1	2,113304	0,000148	2,467614	0,000046
IFNGR1	2,105463	0,000685	2,160697	0,000485
HECTD3	2,101275	0,000203	2,079952	0,000195
CNNM1	2,095617	0,001992	2,105489	0,001625
ND1	2,094361	0,009373	2,344034	0,003902
KIAA1033	2,084294	0,000105	2,333222	0,000040
XRN1	2,078785	0,000234	2,095888	0,000195
PPP1R3B	2,071202	0,005545	2,720434	0,000790
U2SURP	2,070873	0,000793	2,196765	0,000438
PPFIA1	2,059080	0,000681	2,074194	0,000544
MIER1	2,054042	0,000354	2,257453	0,000151
CDCA2	2,053806	0,000817	2,146648	0,000496
ZC3H11A	2,052134	0,000157	2,089051	0,006355
CEP290	2,048745	0,001375	2,149407	0,000820
SCLT1	2,045186	0,003880	2,250147	0,001644
PRDM2	2,040283	0,008578	2,311335	0,003149
MTG2	2,034363	0,001288	2,245622	0,000522
SLC38A1	2,031828	0,000225	2,342332	0,000070
CCDC132	2,026323	0,000676	2,044500	0,000527

MAP4	2,026165	0,000124	2,011356	0,000098
BOLA2	2,022929	0,000123	2,272761	0,000044
EHMT1	2,022477	0,000283	2,188235	0,000137
TMEM45B	2,016873	0,003095	2,053516	0,002333
UACA	0,492046	0,000101	2,008550	0,000299
MATN3	0,490494	0,000124	0,390922	0,000025
EIF5A2	0,482247	0,000604	0,367529	0,000077
CTSV	0,477250	0,000191	0,496991	0,000232
PPP3R1	0,465589	0,006747	0,408025	0,002459
QKI	0,456233	0,000105	0,325572	0,000017
ZFR	0,444196	0,000119	4,108997	0,000037
KAT2B	0,441423	0,000317	0,490407	0,000612
CTGF	0,423042	0,001100	0,326065	0,000210
ETV7	0,416413	0,001554	0,476165	0,003440
DLEU2	0,413770	0,000226	0,320155	0,000106
HOXB8	0,398110	0,002411	0,448174	0,004501
PBX2	0,377054	0,002784	0,425887	0,005087
ASPH	0,364570	0,002348	0,312949	0,000888
SHISA2	0,318156	0,000051	0,467912	0,000297
AXL	0,235947	0,000461	0,217931	0,000296

En rojo, se muestran los genes regulados a la alta y en verde los regulados a la baja en condiciones de depleción de *TDRD9*

BIBLIOGRAFÍA

- (2014). "Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma." *Nature* **511**(7511): 543-550.
- (2015). "Genomic Classification of Cutaneous Melanoma." *Cell* **161**(7): 1681-1696.
- Ackerman, D. and M. C. Simon (2014). "Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment." *Trends Cell Biol* **24**(8): 472-478.
- Adelman, C. A., R. L. Lolo, N. J. Birkbak, O. Murina, K. Matsuzaki, Z. Horejsi, K. Parmar, V. Borel, J. M. Skehel, G. Stamp, A. D'Andrea, A. A. Sartori, C. Swanton and S. J. Boulton (2013). "HELQ promotes RAD51 paralogue-dependent repair to avert germ cell loss and tumorigenesis." *Nature* **502**(7471): 381-384.
- Aguilera, A. and H. Gaillard (2014). "Transcription and recombination: when RNA meets DNA." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**(8).
- Aguilera, A. and T. Garcia-Muse (2013). "Causes of genome instability." *Annu Rev Genet* **47**: 1-32.
- Akiyama, Y., C. Maesawa, S. Ogasawara, M. Terashima and T. Masuda (2003). "Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells." *Am J Pathol* **163**(5): 1911-1919.
- Alberti, S., M. Nutini and L. A. Herzenberg (1994). "DNA methylation prevents the amplification of TROP1, a tumor-associated cell surface antigen gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13): 5833-5837.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2008). "Stress granules: the Tao of RNA triage." *Trends Biochem Sci* **33**(3): 141-150.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2009). "RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(6): 430-436.
- Anderson, P., N. Kedersha and P. Ivanov (2015). "Stress granules, P-bodies and cancer." *Biochim Biophys Acta* **1849**(7): 861-870.
- Aravin, A., D. Gaidatzis, S. Pfeffer, M. Lagos-Quintana, P. Landgraf, N. Iovino, P. Morris, M. J. Brownstein, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan and T. Tuschl (2006). "A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes." *Nature* **442**(7099): 203-207.
- Aravin, A. A., G. J. Hannon and J. Brennecke (2007). "The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race." *Science* **318**(5851): 761-764.
- Aravin, A. A., R. Sachidanandam, D. Bourc'his, C. Schaefer, D. Pezic, K. F. Toth, T. Bestor and G. J. Hannon (2008). "A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice." *Mol Cell* **31**(6): 785-799.
- Aravin, A. A., R. Sachidanandam, A. Girard, K. Fejes-Toth and G. J. Hannon (2007). "Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control." *Science* **316**(5825): 744-747.
- Aravin, A. A., G. W. van der Heijden, J. Castaneda, V. V. Vagin, G. J. Hannon and A. Bortvin (2009). "Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice." *PLoS Genet* **5**(12): e1000764.
- Arber, W. and D. Dussoix (1962). "Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda." *J Mol Biol* **5**: 18-36.
- Arents, G. and E. N. Moudrianakis (1995). "The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11170-11174.
- Arita, K., M. Ariyoshi, H. Tochio, Y. Nakamura and M. Shirakawa (2008). "Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism." *Nature* **455**(7214): 818-821.

- Avvakumov, G. V., J. R. Walker, S. Xue, Y. Li, S. Duan, C. Bronner, C. H. Arrowsmith and S. Dhe-Paganon (2008). "Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1." *Nature* **455**(7214): 822-825.
- Badal, V., L. S. Chuang, E. H. Tan, S. Badal, L. L. Villa, C. M. Wheeler, B. F. Li and H. U. Bernard (2003). "CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression." *J Virol* **77**(11): 6227-6234.
- Baird, T. D. and R. C. Wek (2012). "Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism." *Adv Nutr* **3**(3): 307-321.
- Bandiera, S., E. Hatem, S. Lyonnet and A. Henrion-Caude (2010). "microRNAs in diseases: from candidate to modifier genes." *Clin Genet* **77**(4): 306-313.
- Baylin, S. B., J. G. Herman, J. R. Graff, P. M. Vertino and J. P. Issa (1998). "Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia." *Adv Cancer Res* **72**: 141-196.
- Beck, C. R., J. L. Garcia-Perez, R. M. Badge and J. V. Moran (2011). "LINE-1 elements in structural variation and disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **12**: 187-215.
- Belancio, V. P., A. M. Roy-Engel and P. L. Deininger (2010). "All y'all need to know 'bout retroelements in cancer." *Semin Cancer Biol* **20**(4): 200-210.
- Bernstein, B. E., J. A. Stamatoyannopoulos, J. F. Costello, B. Ren, A. Milosavljevic, A. Meissner, M. Kellis, M. A. Marra, A. L. Beaudet, J. R. Ecker, P. J. Farnham, M. Hirst, E. S. Lander, T. S. Mikkelsen and J. A. Thomson (2010). "The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium." *Nat Biotechnol* **28**(10): 1045-1048.
- Bostick, M., J. K. Kim, P. O. Esteve, A. Clark, S. Pradhan and S. E. Jacobsen (2007). "UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells." *Science* **317**(5845): 1760-1764.
- Bourc'his, D. and T. H. Bestor (2004). "Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L." *Nature* **431**(7004): 96-99.
- Bourc'his, D., G. L. Xu, C. S. Lin, B. Bollman and T. H. Bestor (2001). "Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints." *Science* **294**(5551): 2536-2539.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brandeis, M., D. Frank, I. Keshet, Z. Siegfried, M. Mendelsohn, A. Nemes, V. Temper, A. Razin and H. Cedar (1994). "Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation." *Nature* **371**(6496): 435-438.
- Breunig, M., C. Hozsa, U. Lungwitz, K. Watanabe, I. Umeda, H. Kato and A. Goepferich (2008). "Mechanistic investigation of poly(ethylene imine)-based siRNA delivery: disulfide bonds boost intracellular release of the cargo." *J Control Release* **130**(1): 57-63.
- Brown, E. J. and D. Baltimore (2003). "Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance." *Genes Dev* **17**(5): 615-628.
- Buchan, J. R. (2014). "mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease." *RNA Biol* **11**(8): 1019-1030.
- Bundo, M., M. Toyoshima, Y. Okada, W. Akamatsu, J. Ueda, T. Nemoto-Miyauchi, F. Sunaga, M. Toritsuka, D. Ikawa, A. Kakita, M. Kato, K. Kasai, T. Kishimoto, H. Nawa, H. Okano, T. Yoshikawa, T. Kato and K. Iwamoto (2014). "Increased I1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia." *Neuron* **81**(2): 306-313.
- Carmell, M. A., A. Girard, H. J. van de Kant, D. Bourc'his, T. H. Bestor, D. G. de Rooij and G. J. Hannon (2007). "MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline." *Dev Cell* **12**(4): 503-514.
- Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* **136**(4): 642-655.
- Cedar, H. and Y. Bergman (2009). "Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms." *Nat Rev Genet* **10**(5): 295-304.

- Coral, S., L. Sigalotti, M. Altomonte, A. Engelsberg, F. Colizzi, I. Cattarossi, E. Maraskovsky, E. Jager, B. Seliger and M. Maio (2002). "5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma: immunotherapeutic implications." *Clin Cancer Res* **8**(8): 2690-2695.
- Costa, F. F., K. Le Blanc and B. Brodin (2007). "Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer." *Stem Cells* **25**(3): 707-711.
- Coulie, P. G., V. Karanikas, C. Lurquin, D. Colau, T. Connerotte, T. Hanagiri, A. Van Pel, S. Lucas, D. Godelaine, C. Lonchay, M. Marchand, N. Van Baren and T. Boon (2002). "Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen." *Immunol Rev* **188**: 33-42.
- Cox, D. N., A. Chao, J. Baker, L. Chang, D. Qiao and H. Lin (1998). "A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal." *Genes Dev* **12**(23): 3715-3727.
- Chang, A. (2011). "Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC." *Lung Cancer* **71**(1): 3-10.
- Chen, Z. X., J. R. Mann, C. L. Hsieh, A. D. Riggs and F. Chedin (2005). "Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family." *J Cell Biochem* **95**(5): 902-917.
- Cheng, Y. H., E. W. Wong and C. Y. Cheng (2011). "Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis." *Spermatogenesis* **1**(3): 209-220.
- Cho, M., H. Uemura, S. C. Kim, Y. Kawada, K. Yoshida, Y. Hirao, N. Konishi, S. Saga and K. Yoshikawa (2001). "Hypomethylation of the MN/CA9 promoter and upregulated MN/CA9 expression in human renal cell carcinoma." *Br J Cancer* **85**(4): 563-567.
- Chuang, L. S., H. I. Ian, T. W. Koh, H. H. Ng, G. Xu and B. F. Li (1997). "Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1." *Science* **277**(5334): 1996-2000.
- Davis, A. J., B. P. Chen and D. J. Chen (2014). "DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway." *DNA Repair (Amst)* **17**: 21-29.
- de Capoa, A., A. Musolino, S. Della Rosa, P. Caiafa, L. Mariani, F. Del Nonno, A. Vocaturo, R. P. Donnorso, A. Niveleau and C. Grappelli (2003). "DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples." *Oncol Rep* **10**(3): 545-549.
- De Smet, C., O. De Backer, I. Faraoni, C. Lurquin, F. Brasseur and T. Boon (1996). "The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7149-7153.
- De Smet, C. and A. Lorient (2013). "DNA hypomethylation and activation of germline-specific genes in cancer." *Adv Exp Med Biol* **754**: 149-166.
- De Smet, C., C. Lurquin, B. Lethe, V. Martelange and T. Boon (1999). "DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter." *Mol Cell Biol* **19**(11): 7327-7335.
- Deans, A. J. and S. C. West (2011). "DNA interstrand crosslink repair and cancer." *Nat Rev Cancer* **11**(7): 467-480.
- Deng, W. and H. Lin (2002). "miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis." *Dev Cell* **2**(6): 819-830.
- Ehrlich, M. and M. Lacey (2013). "DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression." *Epigenomics* **5**(5): 553-568.
- Erfurth, F. E., R. Popovic, J. Grembecka, T. Cierpicki, C. Theisler, Z. B. Xia, T. Stuart, M. O. Diaz, J. H. Bushweller and N. J. Zeleznik-Le (2008). "MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(21): 7517-7522.
- Feinberg, A. P. and B. Tycko (2004). "The history of cancer epigenetics." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 143-153.

- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts." *Nature* **301**(5895): 89-92.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers." *Biochem Biophys Res Commun* **111**(1): 47-54.
- Feng, S., S. E. Jacobsen and W. Reik (2010). "Epigenetic reprogramming in plant and animal development." *Science* **330**(6004): 622-627.
- Ficz, G., M. R. Branco, S. Seisenberger, F. Santos, F. Krueger, T. A. Hore, C. J. Marques, S. Andrews and W. Reik (2011). "Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation." *Nature* **473**(7347): 398-402.
- Gaillard, H., T. Garcia-Muse and A. Aguilera (2015). "Replication stress and cancer." *Nat Rev Cancer* **15**(5): 276-289.
- Gao, J., B. A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S. O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander and N. Schultz (2013). "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal." *Sci Signal* **6**(269): p1.
- Gelato, K. A. and W. Fischle (2008). "Role of histone modifications in defining chromatin structure and function." *Biol Chem* **389**(4): 353-363.
- Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." *Nat Rev Genet* **10**(2): 94-108.
- Gietz, D., A. St Jean, R. A. Woods and R. H. Schiestl (1992). "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." *Nucleic Acids Res* **20**(6): 1425.
- Gillespie, D. E. and C. A. Berg (1995). "Homeless is required for RNA localization in Drosophila oogenesis and encodes a new member of the DE-H family of RNA-dependent ATPases." *Genes Dev* **9**(20): 2495-2508.
- Ginsburg, M., M. H. Snow and A. McLaren (1990). "Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation." *Development* **110**(2): 521-528.
- Girard, A., R. Sachidanandam, G. J. Hannon and M. A. Carmell (2006). "A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins." *Nature* **442**(7099): 199-202.
- Gisselsson, D., L. Pettersson, M. Hoglund, M. Heidenblad, L. Gorunova, J. Wiegant, F. Mertens, P. Dal Cin, F. Mitelman and N. Mandahl (2000). "Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5357-5362.
- Gjerstorff, M. F., M. H. Andersen and H. J. Ditzel (2015). "Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy." *Oncotarget* **6**(18): 15772-15787.
- Goldberg, A. D., C. D. Allis and E. Bernstein (2007). "Epigenetics: a landscape takes shape." *Cell* **128**(4): 635-638.
- Gonzalez-Reyes, A. and D. St Johnston (1994). "Role of oocyte position in establishment of anterior-posterior polarity in Drosophila." *Science* **266**(5185): 639-642.
- Greger, V., E. Passarge, W. Hopping, E. Messmer and B. Horsthemke (1989). "Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma." *Hum Genet* **83**(2): 155-158.
- Grivna, S. T., E. Beyret, Z. Wang and H. Lin (2006). "A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells." *Genes Dev* **20**(13): 1709-1714.
- Hajkova, P., S. J. Jeffries, C. Lee, N. Miller, S. P. Jackson and M. A. Surani (2010). "Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway." *Science* **329**(5987): 78-82.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hancks, D. C. and H. H. Kazazian, Jr. (2016). "Roles for retrotransposon insertions in human disease." *Mob DNA* **7**: 9.
- Haqq, C., M. Nosrati, D. Sudilovsky, J. Crothers, D. Khodabakhsh, B. L. Pulliam, S. Federman, J. R. Miller, 3rd, R. E. Allen, M. I. Singer, S. P. Leong, B. M. Ljung, R. W. Sagebiel and M.

- Kashani-Sabet (2005). "The gene expression signatures of melanoma progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17): 6092-6097.
- Hashimoto, H., J. R. Horton, X. Zhang, M. Bostick, S. E. Jacobsen and X. Cheng (2008). "The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix." *Nature* **455**(7214): 826-829.
- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." *Nat Rev Genet* **5**(7): 522-531.
- He, Y. F., B. Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C. X. Song, K. Zhang, C. He and G. L. Xu (2011). "Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA." *Science* **333**(6047): 1303-1307.
- Hemberger, M., W. Dean and W. Reik (2009). "Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(8): 526-537.
- Hewett, D. R., O. Handt, L. Hobson, M. Mangelsdorf, H. J. Eyre, E. Baker, G. R. Sutherland, S. Schuffenhauer, J. I. Mao and R. I. Richards (1998). "FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis." *Mol Cell* **1**(6): 773-781.
- Hiura, H., Y. Obata, J. Komiyama, M. Shirai and T. Kono (2006). "Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice." *Genes Cells* **11**(4): 353-361.
- Hofmann, O., O. L. Caballero, B. J. Stevenson, Y. T. Chen, T. Cohen, R. Chua, C. A. Maher, S. Panji, U. Schaefer, A. Kruger, M. Lehvaslaiho, P. Carninci, Y. Hayashizaki, C. V. Jongeneel, A. J. Simpson, L. J. Old and W. Hide (2008). "Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(51): 20422-20427.
- Hon, G. C., R. D. Hawkins, O. L. Caballero, C. Lo, R. Lister, M. Pelizzola, A. Valsesia, Z. Ye, S. Kuan, L. E. Edsall, A. A. Camargo, B. J. Stevenson, J. R. Ecker, V. Bafna, R. L. Strausberg, A. J. Simpson and B. Ren (2012). "Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer." *Genome Res* **22**(2): 246-258.
- Honda, T., G. Tamura, T. Waki, S. Kawata, M. Terashima, S. Nishizuka and T. Motoyama (2004). "Demethylation of MAGE promoters during gastric cancer progression." *Br J Cancer* **90**(4): 838-843.
- Houwing, S., L. M. Kamminga, E. Berezikov, D. Cronembold, A. Girard, H. van den Elst, D. V. Filippov, H. Blaser, E. Raz, C. B. Moens, R. H. Plasterk, G. J. Hannon, B. W. Draper and R. F. Ketting (2007). "A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish." *Cell* **129**(1): 69-82.
- Hovestadt, V., D. T. Jones, S. Picelli, W. Wang, M. Kool, P. A. Northcott, M. Sultan, K. Stachurski, M. Ryzhova, H. J. Warnatz, M. Ralser, S. Brun, J. Bunt, N. Jager, K. Kleinheinz, S. Erkek, U. D. Weber, C. C. Bartholomae, C. von Kalle, C. Lawerenz, J. Eils, J. Koster, R. Versteeg, T. Milde, O. Witt, S. Schmidt, S. Wolf, T. Pietsch, S. Rutkowski, W. Scheurlen, M. D. Taylor, B. Brors, J. Felsberg, G. Reifenberger, A. Borkhardt, H. Lehrach, R. J. Wechsler-Reya, R. Eils, M. L. Yaspo, P. Landgraf, A. Korshunov, M. Zapatka, B. Radlwimmer, S. M. Pfister and P. Lichter (2014). "Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing." *Nature* **510**(7506): 537-541.
- Howell, C. Y., T. H. Bestor, F. Ding, K. E. Latham, C. Mertineit, J. M. Trasler and J. R. Chaillet (2001). "Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene." *Cell* **104**(6): 829-838.
- Howlett, S. K. and W. Reik (1991). "Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development." *Development* **113**(1): 119-127.
- Huang da, W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." *Nat Protoc* **4**(1): 44-57.
- Hutvagner, G. and M. J. Simard (2008). "Argonaute proteins: key players in RNA silencing." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 22-32.

- Illingworth, R. S. and A. P. Bird (2009). "CpG islands--'a rough guide'." *FEBS Lett* **583**(11): 1713-1720.
- Illingworth, R. S., U. Gruenewald-Schneider, S. Webb, A. R. Kerr, K. D. James, D. J. Turner, C. Smith, D. J. Harrison, R. Andrews and A. P. Bird (2010). "Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome." *PLoS Genet* **6**(9): e1001134.
- Irizarry, R. A., C. Ladd-Acosta, B. Wen, Z. Wu, C. Montano, P. Onyango, H. Cui, K. Gabo, M. Rongione, M. Webster, H. Ji, J. B. Potash, S. Sabunciyan and A. P. Feinberg (2009). "The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores." *Nat Genet* **41**(2): 178-186.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *J Bacteriol* **153**(1): 163-168.
- Jagannathan, M., A. M. Sakwe, T. Nguyen and L. Frappier (2012). "The MCM-associated protein MCM-BP is important for human nuclear morphology." *J Cell Sci* **125**(Pt 1): 133-143.
- Janic, A., L. Mendizabal, S. Llamazares, D. Rossell and C. Gonzalez (2010). "Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in *Drosophila*." *Science* **330**(6012): 1824-1827.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." *Science* **293**(5532): 1074-1080.
- Juergens, R. A., J. Wrangle, F. P. Vendetti, S. C. Murphy, M. Zhao, B. Coleman, R. Sebree, K. Rodgers, C. M. Hooker, N. Franco, B. Lee, S. Tsai, I. E. Delgado, M. A. Rudek, S. A. Belinsky, J. G. Herman, S. B. Baylin, M. V. Brock and C. M. Rudin (2011). "Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer." *Cancer Discov* **1**(7): 598-607.
- Kato, Y., M. Kaneda, K. Hata, K. Kumaki, M. Hisano, Y. Kohara, M. Okano, E. Li, M. Nozaki and H. Sasaki (2007). "Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse." *Hum Mol Genet* **16**(19): 2272-2280.
- Kavela, S., S. R. Shinde, R. Ratheesh, K. Viswakalyan, M. D. Bashyam, S. Gowrishankar, M. Vamsy, S. Pattnaik, S. Rao, R. A. Sastry, M. Srinivasulu, J. Chen and S. Maddika (2013). "PNUITS functions as a proto-oncogene by sequestering PTEN." *Cancer Res* **73**(1): 205-214.
- Kedersha, N., M. D. Panas, C. A. Achorn, S. Lyons, S. Tisdale, T. Hickman, M. Thomas, J. Lieberman, G. M. McInerney, P. Ivanov and P. Anderson (2016). "G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits." *J Cell Biol* **212**(7): 845-860.
- Kietrys, A. M. and E. T. Kool (2016). "Epigenetics: A new methyl mark on messengers." *Nature* **530**(7591): 423-424.
- Kim, J. K., M. Samaranayake and S. Pradhan (2009). "Epigenetic mechanisms in mammals." *Cell Mol Life Sci* **66**(4): 596-612.
- Kim, R., P. Kulkarni and S. Hannenhalli (2013). "Derepression of Cancer/testis antigens in cancer is associated with distinct patterns of DNA hypomethylation." *BMC Cancer* **13**: 144.
- Kleinjan, D. A., A. Seawright, A. J. Childs and V. van Heyningen (2004). "Conserved elements in Pax6 intron 7 involved in (auto)regulation and alternative transcription." *Dev Biol* **265**(2): 462-477.
- Kobayashi, H., T. Sakurai, M. Imai, N. Takahashi, A. Fukuda, O. Yayoi, S. Sato, K. Nakabayashi, K. Hata, Y. Sotomaru, Y. Suzuki and T. Kono (2012). "Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks." *PLoS Genet* **8**(1): e1002440.
- Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." *Science* **184**(4139): 868-871.
- Krishnan, P., S. Ghosh, K. Graham, J. R. Mackey, O. Kovalchuk and S. Damaraju (2016). "Piwi-interacting RNAs and PIWI genes as novel prognostic markers for breast cancer." *Oncotarget*.

- Kroutter, E. N., V. P. Belancio, B. J. Wagstaff and A. M. Roy-Engel (2009). "The RNA polymerase dictates ORF1 requirement and timing of LINE and SINE retrotransposition." *PLoS Genet* **5**(4): e1000458.
- Kulis, M., A. C. Queiros, R. Beekman and J. I. Martin-Subero (2013). "Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer." *Biochim Biophys Acta* **1829**(11): 1161-1174.
- Kuramochi-Miyagawa, S., T. Kimura, T. W. Ijiri, T. Isobe, N. Asada, Y. Fujita, M. Ikawa, N. Iwai, M. Okabe, W. Deng, H. Lin, Y. Matsuda and T. Nakano (2004). "Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis." *Development* **131**(4): 839-849.
- Kuramochi-Miyagawa, S., T. Kimura, K. Yomogida, A. Kuroiwa, Y. Tadokoro, Y. Fujita, M. Sato, Y. Matsuda and T. Nakano (2001). "Two mouse piwi-related genes: miwi and mili." *Mech Dev* **108**(1-2): 121-133.
- Kuramochi-Miyagawa, S., T. Watanabe, K. Gotoh, K. Takamatsu, S. Chuma, K. Kojima-Kita, Y. Shiromoto, N. Asada, A. Toyoda, A. Fujiyama, Y. Totoki, T. Shibata, T. Kimura, N. Nakatsuji, T. Noce, H. Sasaki and T. Nakano (2010). "MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons." *Genes Dev* **24**(9): 887-892.
- Kuramochi-Miyagawa, S., T. Watanabe, K. Gotoh, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Ikawa, N. Asada, K. Kojima, Y. Yamaguchi, T. W. Ijiri, K. Hata, E. Li, Y. Matsuda, T. Kimura, M. Okabe, Y. Sakaki, H. Sasaki and T. Nakano (2008). "DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes." *Genes Dev* **22**(7): 908-917.
- Laddy, D. J., J. Yan, N. Corbitt, D. Kobasa, G. P. Kobinger and D. B. Weiner (2007). "Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza." *Vaccine* **25**(16): 2984-2989.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Landsverk, H. B., F. Mora-Bermudez, O. J. Landsverk, G. Hasvold, S. Naderi, O. Bakke, J. Ellenberg, P. Collas, R. G. Syljuasen and T. Kuntziger (2010). "The protein phosphatase 1 regulator PNUTS is a new component of the DNA damage response." *EMBO Rep* **11**(11): 868-875.
- Lane, N., W. Dean, S. Erhardt, P. Hajkova, A. Surani, J. Walter and W. Reik (2003). "Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse." *Genesis* **35**(2): 88-93.
- Law, J. A. and S. E. Jacobsen (2010). "Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals." *Nat Rev Genet* **11**(3): 204-220.
- Lehnertz, B., Y. Ueda, A. A. Derijck, U. Braunschweig, L. Perez-Burgos, S. Kubicek, T. Chen, E. Li, T. Jenuwein and A. H. Peters (2003). "Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin." *Curr Biol* **13**(14): 1192-1200.
- Levenson, V. and J. L. Hamlin (1993). "A general protocol for evaluating the specific effects of DNA replication inhibitors." *Nucleic Acids Res* **21**(17): 3997-4004.
- Li, B., E. Severson, J. C. Pignon, H. Zhao, T. Li, J. Novak, P. Jiang, H. Shen, J. C. Aster, S. Rodig, S. Signoretti, J. S. Liu and X. S. Liu (2016). "Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy." *Genome Biol* **17**(1): 174.
- Li, C., V. V. Vagin, S. Lee, J. Xu, S. Ma, H. Xi, H. Seitz, M. D. Horwich, M. Syrzycka, B. M. Honda, E. L. Kittler, M. L. Zapp, C. Klattenhoff, N. Schulz, W. E. Theurkauf, Z. Weng and P. D. Zamore (2009). "Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies." *Cell* **137**(3): 509-521.
- Li, X. Z., C. K. Roy, X. Dong, E. Bolcun-Filas, J. Wang, B. W. Han, J. Xu, M. J. Moore, J. C. Schimenti, Z. Weng and P. D. Zamore (2013). "An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes." *Mol Cell* **50**(1): 67-81.

- Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon and R. Parker (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* **7**(7): 719-723.
- Loriot, A., T. Boon and C. De Smet (2003). "Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogonia." *Int J Cancer* **105**(3): 371-376.
- Low, J. K., H. Im, M. A. Erce, G. Hart-Smith, M. P. Snyder and M. R. Wilkins (2016). "Protein substrates of the arginine methyltransferase Hmt1 identified by proteome arrays." *Proteomics* **16**(3): 465-476.
- Lucifero, D., M. R. Mann, M. S. Bartolomei and J. M. Trasler (2004). "Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting." *Hum Mol Genet* **13**(8): 839-849.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-260.
- Lukas, C., F. Melander, M. Stucki, J. Falck, S. Bekker-Jensen, M. Goldberg, Y. Lerenthal, S. P. Jackson, J. Bartek and J. Lukas (2004). "Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention." *EMBO J* **23**(13): 2674-2683.
- Macleod, D., J. Charlton, J. Mullins and A. P. Bird (1994). "Sp1 sites in the mouse apt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island." *Genes Dev* **8**(19): 2282-2292.
- Malone, C. D., J. Brennecke, M. Dus, A. Stark, W. R. McCombie, R. Sachidanandam and G. J. Hannon (2009). "Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the Drosophila ovary." *Cell* **137**(3): 522-535.
- Marechal, A. and L. Zou (2013). "DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(9).
- Morison, I. M., C. J. Paton and S. D. Cleverley (2001). "The imprinted gene and parent-of-origin effect database." *Nucleic Acids Res* **29**(1): 275-276.
- Mountzios, G., H. Linardou and P. Kosmidis (2016). "Immunotherapy in non-small cell lung cancer: the clinical impact of immune response and targeting." *Ann Transl Med* **4**(14): 268.
- Muoti, A. R., M. C. Marchetto, N. G. Coufal, R. Oefner, G. Yeo, K. Nakashima and F. H. Gage (2010). "L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2." *Nature* **468**(7322): 443-446.
- Nakamura, N. and K. Takenaga (1998). "Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines." *Clin Exp Metastasis* **16**(5): 471-479.
- Nasr, A. F., M. Nutini, B. Palombo, E. Guerra and S. Alberti (2003). "Mutations of TP53 induce loss of DNA methylation and amplification of the TROP1 gene." *Oncogene* **22**(11): 1668-1677.
- Nguyen-Chi, M. and D. Morello (2011). "RNA-binding proteins, RNA granules, and gametes: is unity strength?" *Reproduction* **142**(6): 803-817.
- Ohinata, Y., H. Ohta, M. Shigeta, K. Yamanaka, T. Wakayama and M. Saitou (2009). "A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice." *Cell* **137**(3): 571-584.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* **99**(3): 247-257.
- Okayama, H., T. Kohno, Y. Ishii, Y. Shimada, K. Shiraishi, R. Iwakawa, K. Furuta, K. Tsuta, T. Shibata, S. Yamamoto, S. Watanabe, H. Sakamoto, K. Kumamoto, S. Takenoshita, N. Gotoh, H. Mizuno, A. Sarai, S. Kawano, R. Yamaguchi, S. Miyano and J. Yokota (2012). "Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas." *Cancer Res* **72**(1): 100-111.
- Okoji, R. S., R. C. Yu, R. R. Maronpot and J. R. Froines (2002). "Sodium arsenite administration via drinking water increases genome-wide and Ha-ras DNA hypomethylation in methyl-deficient C57BL/6J mice." *Carcinogenesis* **23**(5): 777-785.

- Old, L. J. (2001). "Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer." *Cancer Immun* **1**: 1.
- Ooi, S. K., C. Qiu, E. Bernstein, K. Li, D. Jia, Z. Yang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. P. Lin, C. D. Allis, X. Cheng and T. H. Bestor (2007). "DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA." *Nature* **448**(7154): 714-717.
- Oshimo, Y., H. Nakayama, R. Ito, Y. Kitadai, K. Yoshida, K. Chayama and W. Yasui (2003). "Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma." *Int J Oncol* **23**(6): 1663-1670.
- Ostertag, E. M. and H. H. Kazazian, Jr. (2001). "Biology of mammalian L1 retrotransposons." *Annu Rev Genet* **35**: 501-538.
- Oswald, J., S. Engemann, N. Lane, W. Mayer, A. Olek, R. Fundele, W. Dean, W. Reik and J. Walter (2000). "Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote." *Curr Biol* **10**(8): 475-478.
- Otani, J., T. Nankumo, K. Arita, S. Inamoto, M. Ariyoshi and M. Shirakawa (2009). "Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain." *EMBO Rep* **10**(11): 1235-1241.
- Ott, K. M., T. Nguyen and C. Navarro (2014). "The DExH box helicase domain of spindle-E is necessary for retrotransposon silencing and axial patterning during Drosophila oogenesis." *G3 (Bethesda)* **4**(11): 2247-2257.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert and W. M. Bonner (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." *Curr Biol* **10**(15): 886-895.
- Petrussa, L., H. Van de Velde and M. De Rycke (2014). "Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies." *Mol Hum Reprod* **20**(9): 861-874.
- Pillai, R. S. and S. Chuma (2012). "piRNAs and their involvement in male germline development in mice." *Dev Growth Differ* **54**(1): 78-92.
- Piyathilake, C. J., O. Henaoui, A. R. Frost, M. Macaluso, W. C. Bell, G. L. Johanning, D. C. Heimburger, A. Niveleau and W. E. Grizzle (2003). "Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung (United States)." *Cancer Causes Control* **14**(1): 37-42.
- Popp, C., W. Dean, S. Feng, S. J. Cokus, S. Andrews, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen and W. Reik (2010). "Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency." *Nature* **463**(7284): 1101-1105.
- Qian, C., S. Li, J. Jakoncic, L. Zeng, M. J. Walsh and M. M. Zhou (2008). "Structure and hemimethylated CpG binding of the SRA domain from human UHRF1." *J Biol Chem* **283**(50): 34490-34494.
- Qu, G. Z., P. E. Grundy, A. Narayan and M. Ehrlich (1999). "Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16." *Cancer Genet Cytogenet* **109**(1): 34-39.
- Qu, X., J. Liu, X. Zhong, X. Li and Q. Zhang (2015). "PIWIL2 promotes progression of non-small cell lung cancer by inducing CDK2 and Cyclin A expression." *J Transl Med* **13**: 301.
- Reuter, M., S. Chuma, T. Tanaka, T. Franz, A. Stark and R. S. Pillai (2009). "Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile." *Nat Struct Mol Biol* **16**(6): 639-646.
- Rhodes, D. R., J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, T. Barrette, A. Pandey and A. M. Chinnaiyan (2004). "ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform." *Neoplasia* **6**(1): 1-6.
- Richmond, T. J., J. T. Finch, B. Rushton, D. Rhodes and A. Klug (1984). "Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution." *Nature* **311**(5986): 532-537.
- Riker, A. I., S. A. Enkemann, O. Fodstad, S. Liu, S. Ren, C. Morris, Y. Xi, P. Howell, B. Metge, R. S. Samant, L. A. Shevde, W. Li, S. Eschrich, A. Daud, J. Ju and J. Matta (2008). "The gene

- expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis." *BMC Med Genomics* **1**: 13.
- Risch, A. and C. Plass (2008). "Lung cancer epigenetics and genetics." *Int J Cancer* **123**(1): 1-7.
- Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi and G. K. Smyth (2015). "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies." *Nucleic Acids Res* **43**(7): e47.
- Rivera, M. P. (2004). "Multimodality therapy in the treatment of lung cancer." *Semin Respir Crit Care Med* **25 Suppl 1**: 3-10.
- Rodriguez-Martin, C., F. Cidre, A. Fernandez-Teijeiro, G. Gomez-Mariano, L. de la Vega, P. Ramos, A. Zaballos, S. Monzon and J. Alonso (2016). "Familial retinoblastoma due to intronic LINE-1 insertion causes aberrant and noncanonical mRNA splicing of the RB1 gene." *J Hum Genet* **61**(5): 463-466.
- Sakai, T., J. Toguchida, N. Ohtani, D. W. Yandell, J. M. Rapaport and T. P. Dryja (1991). "Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene." *Am J Hum Genet* **48**(5): 880-888.
- Sanges, R., F. Cordero and R. A. Calogero (2007). "oneChannelGUI: a graphical interface to Bioconductor tools, designed for life scientists who are not familiar with R language." *Bioinformatics* **23**(24): 3406-3408.
- Santos, F., B. Hendrich, W. Reik and W. Dean (2002). "Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo." *Dev Biol* **241**(1): 172-182.
- Sarkar, D. K. (2016). "Male germline transmits fetal alcohol epigenetic marks for multiple generations: a review." *Addict Biol* **21**(1): 23-34.
- Sato, N., A. Maitra, N. Fukushima, N. T. van Heek, H. Matsubayashi, C. A. Iacobuzio-Donahue, C. Rosty and M. Goggins (2003). "Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer Res* **63**(14): 4158-4166.
- Seisenberger, S., J. R. Peat, T. A. Hore, F. Santos, W. Dean and W. Reik (2013). "Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**(1609): 20110330.
- Seki, Y., K. Hayashi, K. Itoh, M. Mizugaki, M. Saitou and Y. Matsui (2005). "Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice." *Dev Biol* **278**(2): 440-458.
- Selamat, S. A., B. S. Chung, L. Girard, W. Zhang, Y. Zhang, M. Campan, K. D. Siegmund, M. N. Koss, J. A. Hagen, W. L. Lam, S. Lam, A. F. Gazdar and I. A. Laird-Offringa (2012). "Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression." *Genome Res* **22**(7): 1197-1211.
- Sharif, J., M. Muto, S. Takebayashi, I. Suetake, A. Iwamatsu, T. A. Endo, J. Shinga, Y. Mizutani-Koseki, T. Toyoda, K. Okamura, S. Tajima, K. Mitsuya, M. Okano and H. Koseki (2007). "The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA." *Nature* **450**(7171): 908-912.
- Shiina, N. and K. Nakayama (2014). "RNA granule assembly and disassembly modulated by nuclear factor associated with double-stranded RNA 2 and nuclear factor 45." *J Biol Chem* **289**(30): 21163-21180.
- Shoji, M., T. Tanaka, M. Hosokawa, M. Reuter, A. Stark, Y. Kato, G. Kondoh, K. Okawa, T. Chujo, T. Suzuki, K. Hata, S. L. Martin, T. Noce, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, H. Sasaki, R. S. Pillai, N. Nakatsuji and S. Chuma (2009). "The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline." *Dev Cell* **17**(6): 775-787.
- Shubeita, H. E., J. F. Sambrook and A. M. McCormick (1987). "Molecular cloning and analysis of functional cDNA and genomic clones encoding bovine cellular retinoic acid-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(16): 5645-5649.

- Singh, U., M. A. Malik, S. Goswami, S. Shukla and J. Kaur (2016). "Epigenetic regulation of human retinoblastoma." Tumour Biol.
- Skinner, M. K., M. Manikkam and C. Guerrero-Bosagna (2010). "Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology." Trends Endocrinol Metab **21**(4): 214-222.
- Smallwood, S. A., S. Tomizawa, F. Krueger, N. Ruf, N. Carli, A. Segonds-Pichon, S. Sato, K. Hata, S. R. Andrews and G. Kelsey (2011). "Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos." Nat Genet **43**(8): 811-814.
- Smith, Z. D., M. M. Chan, T. S. Mikkelsen, H. Gu, A. Gnirke, A. Regev and A. Meissner (2012). "A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo." Nature **484**(7394): 339-344.
- Smith, Z. D. and A. Meissner (2013). "DNA methylation: roles in mammalian development." Nat Rev Genet **14**(3): 204-220.
- Sofueva, S., F. Osman, A. Lorenz, R. Steinacher, S. Castagnetti, J. Ledesma and M. C. Whitby (2011). "Ultrafine anaphase bridges, broken DNA and illegitimate recombination induced by a replication fork barrier." Nucleic Acids Res **39**(15): 6568-6584.
- Song, C. X., K. E. Szulwach, Q. Dai, Y. Fu, S. Q. Mao, L. Lin, C. Street, Y. Li, M. Poidevin, H. Wu, J. Gao, P. Liu, L. Li, G. L. Xu, P. Jin and C. He (2013). "Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming." Cell **153**(3): 678-691.
- Straussman, R., D. Nejman, D. Roberts, I. Steinfeld, B. Blum, N. Benvenisty, I. Simon, Z. Yakhini and H. Cedar (2009). "Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome." Nat Struct Mol Biol **16**(5): 564-571.
- Suetake, I., F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima and S. Tajima (2004). "DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction." J Biol Chem **279**(26): 27816-27823.
- Suter, C. M., D. I. Martin and R. L. Ward (2004). "Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue." Int J Colorectal Dis **19**(2): 95-101.
- Suzuki, Y. and Y. Tanimura (2008). "Exploring a free energy landscape by means of multidimensional infrared and terahertz spectroscopies." J Chem Phys **128**(16): 164501.
- Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind and A. Rao (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." Science **324**(5929): 930-935.
- Tanaka, H., L. A. Pereira, M. Nozaki, J. Tsuchida, K. Sawada, H. Mori and Y. Nishimune (1997). "A germ cell-specific nuclear antigen recognized by a monoclonal antibody raised against mouse testicular germ cells." Int J Androl **20**(6): 361-366.
- Tanaka, T., M. Hosokawa, V. V. Vagin, M. Reuter, E. Hayashi, A. L. Mochizuki, K. Kitamura, H. Yamanaka, G. Kondoh, K. Okawa, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, R. Sachidanandam, G. J. Hannon, R. S. Pillai, N. Nakatsuji and S. Chuma (2011). "Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(26): 10579-10584.
- Thandapani, P., T. R. O'Connor, T. L. Bailey and S. Richard (2013). "Defining the RGG/RG motif." Mol Cell **50**(5): 613-623.
- Tolia, N. H. and L. Joshua-Tor (2007). "Slicer and the argonauts." Nat Chem Biol **3**(1): 36-43.
- Trerotola, M., V. Relli, P. Simeone and S. Alberti (2015). "Epigenetic inheritance and the missing heritability." Hum Genomics **9**: 17.
- Ueda, T., K. Abe, A. Miura, M. Yuzuriha, M. Zubair, M. Noguchi, K. Niwa, Y. Kawase, T. Kono, Y. Matsuda, H. Fujimoto, H. Shibata, Y. Hayashizaki and H. Sasaki (2000). "The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development." Genes Cells **5**(8): 649-659.

- Vagin, V. V., J. Wohlschlegel, J. Qu, Z. Jonsson, X. Huang, S. Chuma, A. Girard, R. Sachidanandam, G. J. Hannon and A. A. Aravin (2009). "Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members." *Genes Dev* **23**(15): 1749-1762.
- Wang, J., D. Duncan, Z. Shi and B. Zhang (2013). "WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013." *Nucleic Acids Res* **41**(Web Server issue): W77-83.
- Wang, Z., N. Liu, S. Shi, S. Liu and H. Lin (2016). "The Role of PIWIL4, an Argonaute Family Protein, in Breast Cancer." *J Biol Chem* **291**(20): 10646-10658.
- Watanabe, T. and H. Lin (2014). "Posttranscriptional regulation of gene expression by Piwi proteins and piRNAs." *Mol Cell* **56**(1): 18-27.
- Watanabe, T., A. Takeda, T. Tsukiyama, K. Mise, T. Okuno, H. Sasaki, N. Minami and H. Imai (2006). "Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes." *Genes Dev* **20**(13): 1732-1743.
- Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, S. D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R. D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A. T. Chinwalla, D. M. Church, M. Clamp, C. Clee, F. S. Collins, L. L. Cook, R. R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K. D. Delehaunty, J. Deri, E. T. Dermitzakis, C. Dewey, N. J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D. M. Dunn, S. R. Eddy, L. Elnitski, R. D. Emes, P. Eswara, E. Eyas, A. Felsenfeld, G. A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W. N. Frankel, L. A. Fulton, R. S. Fulton, T. S. Furey, D. Gage, R. A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T. A. Graves, E. D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R. C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L. W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D. B. Jaffe, L. S. Johnson, M. Jones, T. A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E. K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W. J. Kent, A. Kirby, D. L. Kolbe, I. Korf, R. S. Kucherlapati, E. J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J. P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D. R. Maglott, E. R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J. H. Mayer, M. McCarthy, W. R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J. D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J. P. Mesirov, W. Miller, T. L. Miner, E. Mongin, K. T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J. C. Mullikin, D. M. Muzny, W. E. Nash, J. O. Nelson, M. N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M. J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E. Overton-Larty, L. Pachter, G. Parra, K. H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner, R. Plumb, C. S. Pohl, A. Poliakov, T. C. Ponce, C. P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B. A. Roe, K. M. Roskin, E. M. Rubin, A. G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M. S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J. B. Singer, G. Slater, A. Smit, D. R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N. Stange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D. Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A. Ureta-Vidal, J. P. Vinson, A. C. Von Niederhausern, C. M. Wade, M. Wall, R. J. Weber, R. B. Weiss, M. C. Wendl, A. P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R. K. Wilson, E. Winter, K. C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S. P. Yang, E. M. Zdobnov, M. C. Zody and E. S. Lander (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." *Nature* **420**(6915): 520-562.
- Weiser, T. S., Z. S. Guo, G. A. Ohnmacht, M. L. Parkhurst, P. Tong-On, F. M. Marincola, M. R. Fischette, X. Yu, G. A. Chen, J. A. Hong, J. H. Stewart, D. M. Nguyen, S. A. Rosenberg and D. S. Schrupp (2001). "Sequential 5-Aza-2 deoxycytidine-depsipeptide FR901228 treatment induces apoptosis preferentially in cancer cells and facilitates their recognition by cytolytic T lymphocytes specific for NY-ESO-1." *J Immunother* **24**(2): 151-161.
- Whitehurst, A. W. (2014). "Cause and consequence of cancer/testis antigen activation in cancer." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **54**: 251-272.

- Wion, D. and J. Casadesus (2006). "N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions." *Nat Rev Microbiol* **4**(3): 183-192.
- Wossidlo, M., J. Arand, V. Sebastiano, K. Lepikhov, M. Boiani, R. Reinhardt, H. Scholer and J. Walter (2010). "Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes." *EMBO J* **29**(11): 1877-1888.
- Wroblewski, J. M., D. L. Bixby, C. Borowski and J. R. Yannelli (2001). "Characterization of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines for expression of MHC, co-stimulatory molecules and tumor-associated antigens." *Lung Cancer* **33**(2-3): 181-194.
- Xiao, L., Y. Wang, Y. Zhou, Y. Sun, W. Sun, L. Wang, C. Zhou, J. Zhou and J. Zhang (2010). "Identification of a novel human cancer/testis gene MAEL that is regulated by DNA methylation." *Mol Biol Rep* **37**(5): 2355-2360.
- Xie, S., Z. Wang, M. Okano, M. Nogami, Y. Li, W. W. He, K. Okumura and E. Li (1999). "Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family." *Gene* **236**(1): 87-95.
- Xu, G. L., T. H. Bestor, D. Bourc'his, C. L. Hsieh, N. Tommerup, M. Bugge, M. Hulten, X. Qu, J. J. Russo and E. Viegas-Pequignot (1999). "Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene." *Nature* **402**(6758): 187-191.
- Yang, Y., K. M. McBride, S. Hensley, Y. Lu, F. Chedin and M. T. Bedford (2014). "Arginine methylation facilitates the recruitment of TOP3B to chromatin to prevent R loop accumulation." *Mol Cell* **53**(3): 484-497.
- Yang, Z., K. M. Chen, R. R. Pandey, D. Homolka, M. Reuter, B. K. Janeiro, R. Sachidanandam, M. O. Fauvarque, A. A. McCarthy and R. S. Pillai (2016). "PIWI Slicing and EXD1 Drive Biogenesis of Nuclear piRNAs from Cytosolic Targets of the Mouse piRNA Pathway." *Mol Cell* **61**(1): 138-152.
- Yokoe, T., F. Tanaka, K. Mimori, H. Inoue, T. Ohmachi, M. Kusunoki and M. Mori (2008). "Efficient identification of a novel cancer/testis antigen for immunotherapy using three-step microarray analysis." *Cancer Res* **68**(4): 1074-1082.
- Yoon, J. H. and R. Parker (2010). "Coil-in-to snRNP assembly and Cajal bodies." *Nat Struct Mol Biol* **17**(4): 391-393.