



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

INSTITUTO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA

Trabajo Fin de Máster

*Desarrollo de un sistema de detección para
analizar mecanismos de silenciamiento génico*

Macarena Dorado León

Departamento de Genética, Universidad de Córdoba

Directora: Teresa Morales Ruiz

Codirectora: M^a Victoria García Ortiz

Córdoba, Septiembre, 2016

Este trabajo ha sido realizado por **Macarena Dorado León** bajo la supervisión de sus directoras **Teresa Morales Ruiz** y **M^a Victoria García Ortiz**.

Fdo. Macarena Dorado León

Fdo. Teresa Morales Ruiz

Fdo. M^a Victoria García Ortiz

Teresa Morales Ruiz y M^a Victoria García Ortiz directoras del trabajo “*Desarrollo de un sistema de detección para analizar mecanismos de silenciamiento génico*” realizado por **Macarena Dorado León**, proponen como revisores de dicho trabajo a:

1. Ángeles Alonso Moraga
2. Encarnación Alejandre Durán
3. Manuel Ruiz Rubio

Fdo: Ángeles Alonso Moraga

Fdo:Encarna Alejandre Durán

Fdo:Manuel Ruiz Rubio

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN.....	4
OBJETIVOS	5
INTRODUCCIÓN	6
Epigenética	6
La cromatina	6
Metilación y desmetilación del DNA	9
Modificadores epigenéticos	10
Genes reporteros	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Línea celular	14
Construcciones	14
Metilación <i>in vitro</i>	14
Transfección de HEK293	15
Tratamiento con modificadores epigenéticos	15
RESULTADOS.....	16
Construcción y metilación del plásmido TK-EGFP	16
Optimización del ensayo de transfección	16
Efecto de la metilación sobre la expresión de TK-EGFP	18
Ensayos con compuestos que alteran el patrón epigenético.....	20
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niveles de empaquetamiento de la cromatina.	7
Figura 2. Modificaciones covalentes de histonas.....	8
Figura 3. La metilación del DNA en eucariotas tiene lugar en el carbono 5 de la citosina.	9
Figura 4. Mecanismos de represión de la transcripción mediados por la metilación del DNA.	10
Figura 5. Representación esquemática de los procesos de metilación y desmetilación.....	11
Figura 6: Modificador epigenético 5-aza-2'-deoxycitidina.....	12
Figura 7. Modificador epigenético Tricostatina A.	12
Figura 8. Obtención de la construcción TK-EGFP.	16
Figura 9. Expresión de la proteína EGFP.....	17
Figura 10. Expresión de EGFP.....	18
Figura 11. <i>Timecourse</i>	19
Figura 12. Ensayos con compuestos que alteran el patrón epigenético	21

LISTA DE ABREVIATURAS

5-Aza-dC: 5-Aza-2'-desoxicitidina

5-meC: 5-metilcitosina

CoA: Coenzima A

CTCF: Factor de crecimiento de tejido conectivo

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNMT: DNA metiltransferasas

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGFP: Proteína verde fluorescente *Enhanced*

GFP: Proteína verde fluorescente

H3K27: Lisina 27 de la histona H3

H3K4: Lisina 4 de la histona H3

H3K9: Lisina 9 de la histona H3

HATs: Acetil transferasas de histonas

HDACs: Acetil deacetilasas de histonas

HEK293: Células humanas embrionarias de riñón

M.SssI: DNA Metiltransferasa *SssI*

MBP: Proteína de unión a DNA metilado

RFP: Proteína roja fluorescente

RNA: Ácido ribonucleico

SAH: S-adenosilhomocisteína

SAM: S-adenosil-L-metionina

TF: Factor de transcripción

TK: Timidina Kinasa

TSA: Tricostatina A

UV: Ultravioleta

RESUMEN

El término epigenética se define como "los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA". Entre otras funciones, los mecanismos epigenéticos asignan un papel crucial a la organización de la cromatina en el establecimiento de patrones específicos de expresión génica. Entre las diferentes marcas epigenéticas se incluyen la metilación del DNA, que se asocia con silenciamiento génico, y las modificaciones post-traduccionales de las histonas, que producen estados de activación o de represión.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido determinar si la metilación de un DNA ectópico causa su silenciamiento génico en células humanas. Para ello, se ha llevado a cabo una metilación *in vitro* del gen reportero *EGFP* y ha sido transfectado en células HEK293, utilizando como control el correspondiente gen nativo sin metilar. A continuación, se analizó la capacidad de reactivación génica mediante el uso de modificadores epigenéticos tales como el 5-Aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-dC), que inhibe la acción de la DNA-metiltransferasa DNMT1, y la Tricostatina A (TSA), un compuesto que inhibe la acción de las histonas deacetilasas.

Los resultados de este trabajo indican que la metilación del gen ectópico promueve el silenciamiento génico y éste se incrementa en función del tiempo. Esta observación sugiere que la represión podría estar sucediendo mediante un mecanismo indirecto de silenciamiento en el que participan proteínas con afinidad por DNA metilado responsables de reclutar represores de la transcripción y/o factores remodeladores de la cromatina. Tras el tratamiento con TSA, se ha observado una reactivación del gen metilado sugiriendo que el plásmido ectópico una vez introducido en la célula se podría reorganizar dando lugar a una estructura de tipo nucleosómico. Por último, el tratamiento con 5-Aza-dC produce una reactivación indirecta del gen debido probablemente a la activación de nuevas vías de señalización celular.

Palabras clave: Epigenética, Metilación del DNA, Represión génica, 5-Aza-2'-desoxicitidina, Tricostatina A.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- » Desarrollo de un sistema de detección para analizar mecanismos de silenciamiento génico.

Objetivos específicos:

- » Determinar si la metilación de un DNA ectópico causa su silenciamiento génico en células humanas.
- » Analizar la capacidad de reactivación génica mediante el uso de modificadores epigenéticos.

INTRODUCCIÓN

Epigenética

La Epigenética, que se ha propuesto como el principal mecanismo regulador de la expresión diferencial, se define como "los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA" (Wolffe, 1999). De esta forma se puede explicar que todas las células somáticas de un organismo contengan la misma información genética, pero cada una de ellas exprese sólo los genes necesarios para su diferenciación.

En la actualidad las modificaciones epigenéticas incluyen la modificación covalente de histonas, la metilación del DNA y los mecanismos basados en RNA mediados por pequeños microRNAs no codificantes (Nakao, 2001; Wise & Charchar, 2016).

Las modificaciones epigenéticas pueden ser debidas a una gran variedad de factores, tales como factores medioambientales, fármacos, envejecimiento y hábitos alimenticios (Raftopoulos et al, 2015).

La cromatina

Estructura y composición de la cromatina

El DNA de las células eucarióticas se encuentra organizado y compactado junto con proteínas estructurales del tipo histona en el interior del núcleo para formar la cromatina. El DNA tiene carga negativa debido a la presencia de enlaces fosfodiéster a lo largo de toda su estructura, mientras que los extremos amino-terminales de las diferentes subunidades de las histonas tienen carga positiva por su abundancia en residuos de lisina, serina y arginina. Esto hace que entre el DNA y las histonas se creen fuerzas de atracción electrostática que los mantiene unidos.

La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, en el que aproximadamente 150 pb de DNA envuelven un octámero central constituido por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. La sucesión de nucleosomas forma un primer nivel de empaquetamiento y la interacción con otras proteínas proporciona niveles de compactación adicional. Este proceso se ve facilitado por una quinta histona, la histona H1, denominada también histona de enlace. Mediante su interacción con el DNA situado entre los nucleosomas, la histona H1 posibilita la formación de una estructura más compacta de cromatina, denominada fibra de 30 nm. Las evidencias disponibles sugieren que la incorporación del DNA a este tipo de estructura reduce de forma drástica su accesibilidad (Felsenfeld & Groudine, 2003).

La estructura y el grado de condensación de la cromatina se relacionan con el nivel de actividad transcripcional. Existen evidencias experimentales de que la cromatina que se haya en un estado descondensado (eucromatina), es transcripcionalmente activa,

mientras que la que se encuentra condensada (heterocromatina), está en forma transcripcionalmente reprimida (Figura 1) (Albert et al, 1992).

La interacción del DNA con las histonas es dinámica, y el grado de empaquetamiento de la cromatina sufre continuos cambios para permitir procesos que requieren la utilización del DNA como molde, tales como la replicación, transcripción, recombinación y reparación (Hsieh & Fischer, 2005)

Modificación covalente de histonas

Las distintas modificaciones covalentes que sufren las histonas juegan un papel esencial en los procesos de remodelación de la cromatina. Los extremos amino terminales de las diferentes subunidades que constituyen el octámero de histonas se dirigen hacia el exterior del nucleosoma y son susceptibles de diversas modificaciones post-traduccionales. Entre ellas destacan la acetilación y la metilación, pero también son frecuentes la fosforilación, ubiquitinación, glicosilación, ADP-ribosilación, carbonilación, biotinización y sumoilación (Figura 2). Puesto que cada una de estas modificaciones tiene efectos específicos en la activación o la represión de la actividad génica, se ha propuesto la existencia de un “código de histonas” que participaría en el control de la organización funcional de la cromatina (Jenuwein & Allis, 2001).

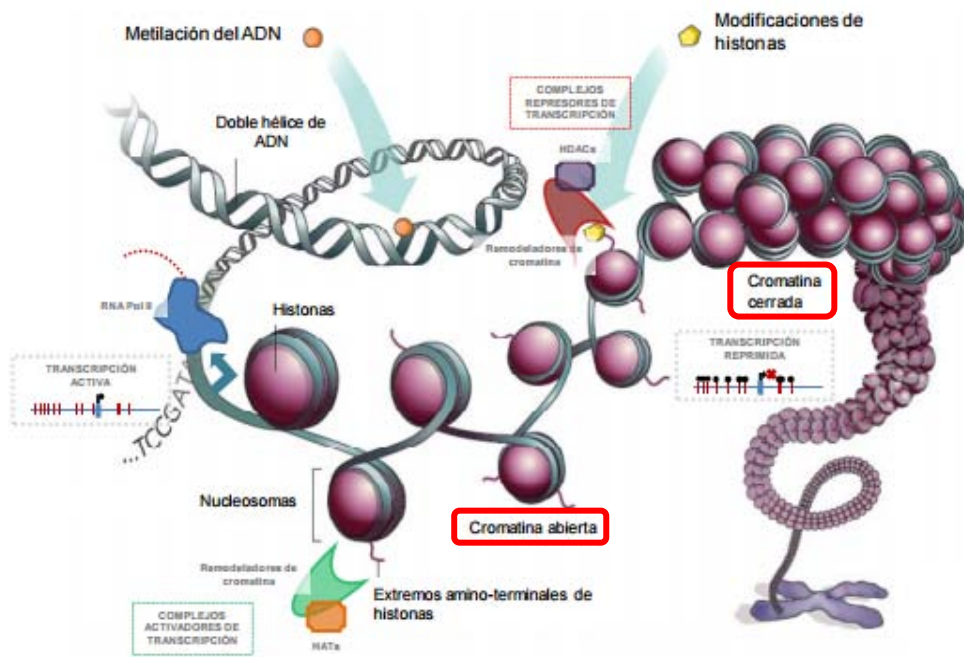


Figura 1. Niveles de empaquetamiento de la cromatina. La cromatina compactada se asocia con silenciamiento transcripcional y está marcada por modificaciones de histonas represivas y metilación del DNA, y se mantiene por acción de complejos multiproteicos. La cromatina abierta presenta marcas de histonas activadoras, ausencia de metilación del DNA en la región promotora y permite el acceso de factores de transcripción. (Adaptado de Marx V, 2012).



Figura 2. Modificaciones covalentes de histonas. Las modificaciones de histonas incluyen, entre otras, acetilación, metilación, ubiquitinación y fosforilación.

La acetilación de histonas afecta directamente a la estructura de la cromatina neutralizando la carga positiva intrínseca de los múltiples residuos de lisina que tienen las proteínas histónicas, lo que reduce la afinidad de éstas por el DNA. Este fenómeno provoca que la cromatina presente un estado de condensación más laxo que facilita el acceso de la maquinaria transcripcional que permite la expresión génica.

La acetilación de histonas es catalizada por histonas acetil-transferasas (HATs) utilizando Acetil-CoA como molécula donadora del grupo acetilo. Por el contrario, la desacetilación de histonas, es catalizada por las enzimas acetil-deacetilasas (HDACs) y se relaciona con la supresión y silenciamiento de la actividad génica (*Zhang et al, 2015*). En aquellas zonas en las que han actuado enzimas HDACs, la estructura de la cromatina se vuelve más compacta, impidiendo el acceso a la maquinaria transcripcional y, por tanto, anulando la expresión de dichos genes. Esto ocurre porque, al eliminarse los grupos acetilo, se restauran las cargas positivas originales de las lisinas de las histonas, con lo que aumentan las interacciones electrostáticas entre estas proteínas y el DNA, compactándose todo el conjunto de la cromatina.

La metilación de histonas se lleva a cabo por histonas metil-transferasas utilizando como donador el grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM). Esta metilación no neutraliza las cargas positivas de los residuos de Arginina y Lisina por lo que su efecto sobre la expresión génica no está tan bien definido. Se conoce que la metilación de H3K4 (histona 3, lisina 4) se correlaciona con una activación de la transcripción, mientras que las metilaciones de H3K9 (histona 3, lisina 9) y H3K27 (histona 3, lisina 27) son características de cromatina silenciada (*Zhang & Liu, 2015*).

Metilación y desmetilación del DNA

La metilación del DNA es una modificación epigenética estable pero reversible que promueve el silenciamiento génico en la mayoría de los casos (Ooi & Bestor, 2008). Consiste en la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) al carbono 5 del anillo pirimidínico de la citosina (Figura 3). Esta transferencia es llevada a cabo por la acción de las DNA metiltransferasas (DNMTasas) y da como producto final 5-metilcitosina (5-meC). Existen dos tipos de DNA metiltransferasas: las *de novo* y las de mantenimiento. Las DNA metiltransferasas *de novo* establecen los patrones de metilación del DNA y actúan sobre DNA bicatenario no metilado (Goll & Bestor, 2005), mientras que las DNA metiltransferasas de mantenimiento permiten la preservación de los patrones de metilación del DNA durante los sucesivos ciclos de replicación y actúan preferentemente sobre DNA hemimetilado (Finnegan et al, 1998; Kress et al, 2001).

La adición del grupo metilo tiene lugar preferentemente en secuencias dinucleotídicas 5'-CG-3' que se acumulan en ciertas regiones, conocidas como "islas CpG" localizadas cerca de los sitios de inicio de la transcripción génica o regiones promotoras (Deaton & Bird, 2011). En las células somáticas sanas, hasta el 90% de los sitios con dinucleótidos CpG están metilados, a excepción de los ubicados en muchas regiones promotoras, que suelen estar protegidas de dicha modificación (Miranda & Jones, 2007).

Durante años se han acumulado evidencias experimentales de que la metilación del DNA reprime la transcripción y participa en el silenciamiento estable de la expresión génica (Bird, 2002). El silenciamiento génico provocado por la metilación de la citosina puede ser ocasionado por dos mecanismos (Figura 4). El primero de ellos, directo, bloqueando la unión de activadores de transcripción a sus secuencias diana (Figura 4A). El segundo mecanismo, indirecto, se produce por la unión de proteínas que presentan afinidad por dinucleótidos CpG metilados (methyl-CpG-binding proteins, MBP), que a su vez incorporan represores de la transcripción y/o factores remodeladores de la cromatina (Figura 4B) (Klose and Bird, 2006).

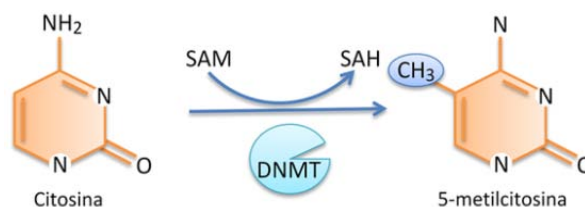


Figura 3. La metilación del DNA en eucariotas tiene lugar en el carbono 5 de la citosina. (SAM: S-adenosilmetionina, donador del grupo metilo; SAH: S-adenosilhomocisteína; DNMT: DNA metiltransferasa).

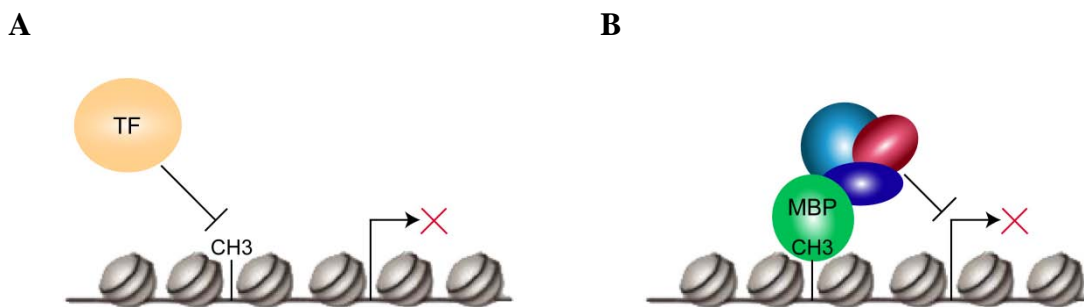


Figura 4. Mecanismos de represión de la transcripción mediados por la metilación del DNA. **(A) Mecanismo directo:** el factor de transcripción (TF) no se puede unir al DNA, puesto que no reconoce su secuencia de unión cuando el DNA se encuentra metilado. **(B) Mecanismo indirecto:** proteínas que se unen específicamente al DNA metilado (methyl binding proteins, MBP) reclutan correpresores, modificando el estado de la cromatina y silenciando la transcripción. Modificado a partir de (*Klose & Bird, 2006*).

Aunque la metilación del DNA es una marca epigenética estable, diversos estudios demuestran que se trata de una modificación reversible (*Ramchandani et al, 1999*). La desmetilación permite la eliminación de patrones de metilación previamente establecidos. Puede tener lugar de forma pasiva, por inhibición o ausencia de la DNA metiltransferasa DNMT1 durante las sucesivas rondas de replicación, con la consiguiente dilución progresiva de las citosinas metiladas o bien de forma activa e independiente a la replicación, gracias a la intervención de enzimas específicas que borran las 5-meC (*Figura 5*). Si bien la desmetilación pasiva es un proceso ampliamente aceptado, la naturaleza exacta de la desmetilación activa en mamíferos es muy controvertida, no habiéndose identificado con certeza aún las enzimas y rutas implicadas (*Roldan-Arjona & Ariza, 2009; Wu & Zhang, 2010*). Todo parece indicar que la desmetilación activa en mamíferos ocurre de forma indirecta, previa modificación de 5-meC a timina y/o 5-hidroximetilcitosina y su posterior eliminación por un mecanismo reparador de DNA (*Teperek-Tkacz et al, 2011*).

Modificadores epigenéticos

Ciertos compuestos orgánicos tienen un efecto directo sobre la regulación epigenética, alterando la expresión de genes. Estos compuestos pueden afectar a la metilación del DNA como es el caso de la 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-dC) o bien a la modificación covalente de histonas como la Tricostatina A (TSA).

La 5-Aza-dC fue sintetizada por primera vez por Piskala y Sorm (1964). Este agente antitumoral es un análogo de citidina que actúa como inhibidor de las DNA-metiltransferasas y causa desmetilación pasiva del DNA. La 5-Aza-dC se incorpora en

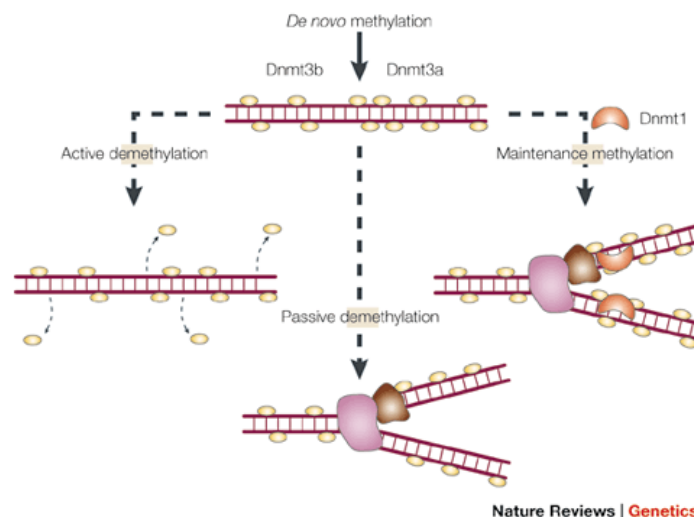


Figura 5. Representación esquemática de los procesos de metilación y desmetilación. Las enzimas DNMT3A y DNMT3B son responsables de la metilación *de novo*. Durante la replicación del DNA y la consiguiente división celular, la enzima DNMT1 es responsable de mantener los patrones de metilación. La inhibición o ausencia de esta enzima durante la división celular origina la desmetilación pasiva del DNA. Los mecanismos de la desmetilación activa en mamíferos no son conocidos con exactitud. *Adaptado de (Reik et al, 2001).*

el DNA durante la replicación de la célula e inhibe la metilación del mismo uniéndose a la subunidad catalítica de DNMT1 de manera covalente e irreversible. Además, se ha sugerido que el aducto 5-Aza-dC - DNMT1 induce la actividad ligasa de la ubiquitina-E3 sobre las moléculas DNMT1 libres, marcándolas para su posterior degradación por el proteosoma. Por tanto, este proceso impide que las enzimas DNMT1 incorporen el grupo metilo al carbono 5 de la citosina, lo que conduce a una menor metilación y por tanto una reactivación de la expresión génica (Figura 6) (Cowan et al, 2010; Christman, 2002; Sharma et al, 2010).

La Tricostatina A es un inhibidor específico de histona deacetilasas (HDACs) y un efectivo inhibidor del crecimiento celular e inductor de apoptosis en varios tipos de células cancerosas humanas (Du et al, 2016). Consiste en un ácido hidroxicinámico que actúa de forma activa a concentraciones nanomolares *in vitro* e inhibe la acción de las HDACs por contacto con sitios catalíticos que contienen Zinc, dando lugar a una hiperacetilación de la cromatina. Esto hace que se reduzca la interacción entre las proteínas histónicas y el DNA genómico y se abra la estructura de la cromatina dando lugar a la correspondiente activación de los genes diana (Figura 7) (Kim et al, 2009; Zych et al, 2013).

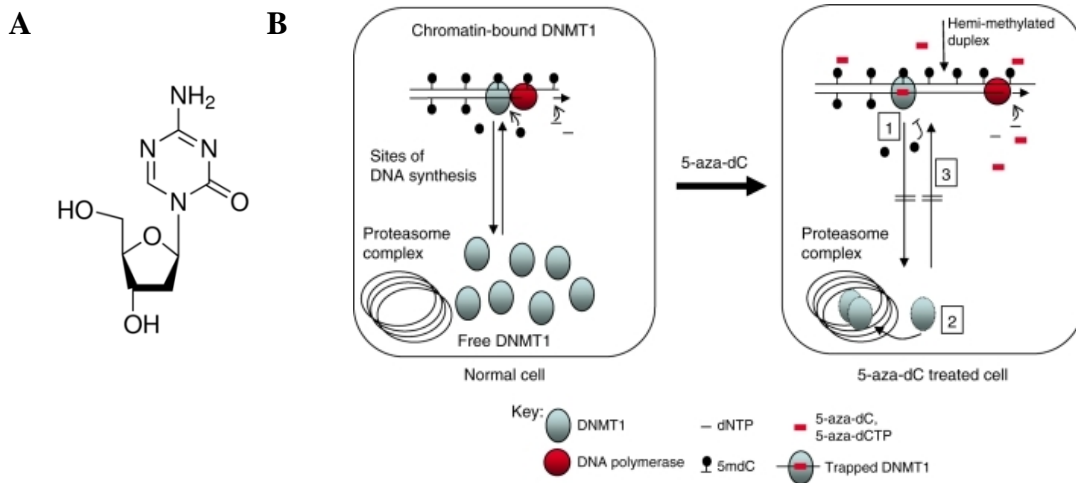


Figura 6: Modificador epigenético 5-aza-2'-desoxicitidina . (A) Estructura molecular de 5-aza-2'-desoxicitidina . (B) Modo de acción de 5-Aza-dC. 1, Incorporación de 5-aza-dC al DNA y captura de enzimas DNMT1 de forma dosis-dependiente. 2, 5-aza-dC induce degradación proteasomal de DNMT1 libre. 3, la degradación de DNMT1 libre impide la re-metilación del DNA hemi-metilado (*Patel et al, 2010*).

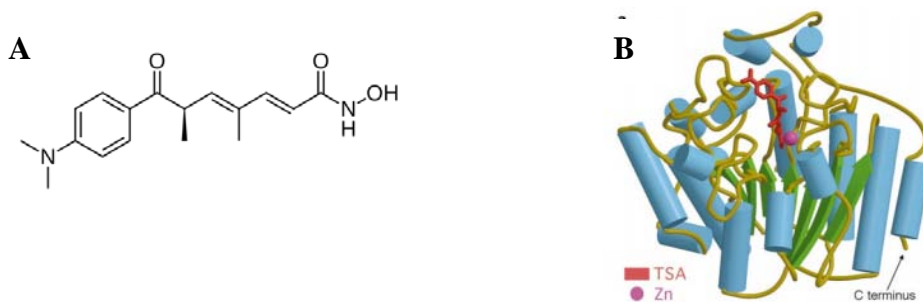


Figura 7. Modificador epigenético Tricostatina A. (A) Estructura molecular de TSA. (B) Sitio catalítico de la histona deacetilasa. Unión de la Tricostatina A al sitio catalítico de la enzima y formación del complejo HDACs- Zn^{2+} -TSA.

Genes reporteros

Los genes reporteros son una herramienta esencial en biología molecular que permiten llevar a cabo estudios de detección y regulación de la expresión génica así como de localización subcelular. Los genes reporteros permiten una medida indirecta de la actividad promotora y una estimación directa de la actividad transcripcional del DNA transfectado (*Stelzer et al, 2015*). Estos genes codifican, entre otras, proteínas luminiscentes o fluorescentes, cuya actividad enzimática es fácilmente detectable y cuantificable. Entre las proteínas fluorescentes más utilizadas, se encuentran la proteína verde (GFP) y la roja (tdTomato).

La proteína verde fluorescente es producida por la medusa *Aequorea victoria* que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. El gen que codifica esta proteína ha sido clonado y se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador. GFP contiene un cromóforo especial que permite la absorción y emisión de luz sin necesidad de otro cofactor o sustrato (*Robert M. Hoffman, 2015*). Cuando la luz UV o luz azul impacta sobre el cromóforo, éste absorbe la energía de la luz y se excita. Posteriormente, el cromóforo libera la energía emitiendo luz en longitud de onda verde. Sus picos de excitación están a 475nm y 395nm y su pico de emisión está a 509nm, en la zona verde del espectro (*Maria Inés Perez Millan et al., 2009*). De todas las variantes hasta ahora obtenidas, la de mayor uso es la EGFP (por sus iniciales en inglés, *enhanced green fluorescent protein*), la cual es una versión mejorada de la GFP nativa. Este fue el primer grupo de proteínas fluorescentes que combinaba un alto brillo con sólo un pico de excitación (*Tsien, 1998*). La mutación más común consiste en el remplazamiento de la serina 65 por treonina (S65T), que causa ionización del fenol en el fluoróforo. El pico de absorbancia ocurre a 489 nm y el de emisión a 509 nm, de ahí su fluorescencia verde (*Paterson et al., 1997*). Dentro de las ventajas que presenta la variante EGFP, se encuentran una oxidación cuatro veces más rápida que la de la GFP nativa y una formación del cromóforo y producción de fluorescencia con mayor estabilidad.

Las proteínas rojas de fluorescencia (RFP) se han desarrollado en la última década. Éstas se obtienen de otros organismos marinos como *Discosoma* (DsRed) o *Heteractis crispa* (HcRed). Las RFP pueden ser excitadas con un láser entre 488nm y 580nm y detectadas óptimamente con una emisión de fluorescencia en naranja, rojo y rojo lejano. La proteína tdTomato es la única variante de RFP formada por un dímero en tándem. Es uno de los reporteros más brillantes, y se caracteriza por su alta fotoestabilidad. TdTomato muestra un pico de excitación máximo en 554nm y de emisión en 581nm .

Además de las aplicaciones anteriormente mencionadas de los genes reporteros en biología molecular, hoy en día también se utilizan en ensayos epigenéticos con el fin de determinar cambios en las marcas epigenéticas que originan alteraciones en la expresión génica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular

La línea celular empleada en este trabajo fue HEK293 (células humanas embrionarias de riñón), donada por el Dr. Eduardo Muñoz (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica, Córdoba).

Se creció en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 4.5 g/L d-glucosa) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de solución de penicilina y estreptomicina. El crecimiento celular tuvo lugar en condiciones de 5% de CO₂ a 37°C. El medio se cambió dos veces por semana y los pases celulares se hicieron con 0.05% de tripsina/EDTA.

Construcciones

El vector TdTomato-N1 se obtuvo de la casa comercial *Addgene* (*Plasmid # 54642*). Para obtener la construcción TK-EGFP se partió de los vectores pcDNA3-EGFP (*Plasmid #13031*, *Addgene*) y pGL3-Luciferase (obtenido por trabajos previos en el laboratorio).

Tras su aislamiento y purificación, 2µg de los plásmidos pcDNA3-EGFP y pGL3-Luciferase fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI* (*New England Biolabs*) durante 2 horas a 37°C. Los fragmentos de interés (vector pGL3 sin luciferasa e inserto EGFP) se purificaron utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (*Qiagen*), siguiendo las indicaciones del fabricante. El DNA obtenido se cuantificó mediante *DS-11 Spectrophotometer* (*DeNovix*) y se ligaron empleando *T4-DNA-Ligase* (*Promega*) en una proporción 3:1 (inserto:vector). Tras comprobar mediante secuenciación, el plásmido TK-EGFP se aisló utilizando el kit *Nzytech genes & enzymes nzyMidiprep* de la estirpe bacteriana BL21 *dcm*⁻, la cual es deficiente en una DNA metiltransferasa que metila los residuos de citosina interna en la secuencia 5'CC(A,T)GG'.

Metilación in vitro

75 µg de plásmido TK-EGFP se incubaron con 0.8mM de S-adenosilmetionina (SAM) y 4U/mL de *CpG Methyltransferase* (*M.SssI*) (*New England Biolabs*) durante 16h a 37°C. La completa metilación del plásmido fue comprobada mediante digestión con *HpaII* (*New England BioLabs*), enzima de restricción sensible al estado de metilación que sólo actúa en DNA no metilado.

Transfección de HEK293

Se sembraron 1×10^5 células HEK293 por pocillo en placas de 24 pocillos. Tras una noche de adhesión celular y crecimiento en el incubador, las células fueron transfectadas.

Para las transfecciones se utilizó una mezcla de OPTI-MEN® (*Gibco® by life Technologies*), agente transfectante Lipofectamina LTX Reagent (*Invitrogen*) o GeneJuice® Transfection Reagent (*Novagen®*) y el DNA correspondiente en cada una de las condiciones (TK-EGFP, TK-EGFPmetilado y tdTomato-N1).

En las transfecciones realizadas con Lipofectamina LTX, se mezclaron 100µL de OPTI-MEN, 500ng de DNA según las proporciones requeridas (ver resultados) y distintas cantidades de Lipofectamina LTX. Las muestras se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y se añadieron a las células gota a gota.

En las transfecciones realizadas con GeneJuice, 100µL de OPTIMEN se mezclaron con 1µl y 1.5µl de agente transfectante y tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió 500ng de DNA según las proporciones requeridas (ver resultados). La mezcla de transfección se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadió gota a gota a las células.

En ambos casos, las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante el tiempo de estudio (ver resultados). Las células fueron visualizadas al microscopio de fluorescencia invertido Nikon ECLIPSE Ti. A continuación, se recogieron mediante centrifugación y se fijaron empleando paraformaldehído al 4%, para su posterior adquisición en el citómetro de flujo *LSRFortessa SORP (Becton Dickinson)*. Se midieron 10.000 células de cada muestra utilizando el programa *BD FacsDiva (Becton Dickinson)*.

La expresión de EGFP se calculó como % de células que coexpresan EGFP-Tomato dividido entre la suma de % de células que expresan Tomato y % de células que coexpresan EGFP-Tomato.

Tratamiento con modificadores epigenéticos

Transcurridas 24 horas de la transfección, unas células fueron mantenidas en medio completo (condición control) y el resto fueron tratadas durante 24 y 48h con 2.5µM de 5-Aza-2'-desoxicitidina (*Sigma-Aldrich*), ó 0.3 µM de Tricostatina A (*Sigma-Aldrich*) ó la combinación de ambas, respectivamente. Diariamente se reemplazó el medio por medio fresco conteniendo el correspondiente modificador epigenético. Los pellets celulares se recogieron mediante centrifugación y se fijaron empleando paraformaldehído al 4%, para su posterior análisis mediante citometría de flujo (*LSRFortessa SORP (Becton Dickinson)*). Se midieron 10.000 células de cada muestra utilizando el programa *BD FacsDiva (Becton Dickinson)*.

RESULTADOS

Construcción y metilación del plásmido TK-EGFP

Con el fin de obtener la proteína EGFP bajo el promotor TK (Timidina Kinasa), se partió de los vectores pcDNA3-EGFP y pGL3-Luciferase que se sometieron a una digestión con las enzimas de restricción adecuadas. Los fragmentos de interés fueron ligados (ver Materiales y Métodos) y la construcción resultante, TK-EGFP, fue confirmada por secuenciación (Figura 8A). El objetivo de tener EGFP bajo este promotor es facilitar posibles estudios epigenéticos posteriores.

A continuación, para conseguir la construcción TK-EGFP completamente desmetilada, se purificó a partir de la estirpe bacteriana BL21 *dcm*⁻, la cual es deficiente en una DNA metiltransferasa. Posteriormente, dicha construcción se metiló *in vitro* con la metilasa *SssI* (TK-EGFPmet) y la eficiencia de dicha reacción se comprobó mediante digestión con la enzima *HpaII*, una restrictasa sensible al estado de metilación que sólo actúa en DNA no metilado (Figura 8B).

Optimización del ensayo de transfección

Para determinar cuál era la condición de transfección más óptima en la estirpe HEK293, se usó la construcción TK-EGFP y el vector tdTomato-N1, utilizado como normalizador, y diferentes cantidades de dos agentes transfectantes: 0.75µL, 1µL y 1.5µL de Lipofectamina LTX (*Invitrogen*) y 1µL y 1.5µL de GeneJuice® Transfection Reagent (*Novagen*®); respectivamente, así como distintas proporciones de tdTomato-N1:TK-EGFP. Las proporciones utilizadas fueron 1:1; 1:2.5; 1:5 y 1:10. La proporción de células expresando EGFP y Tomato se determinó al cabo de 48 horas mediante citometría de flujo.

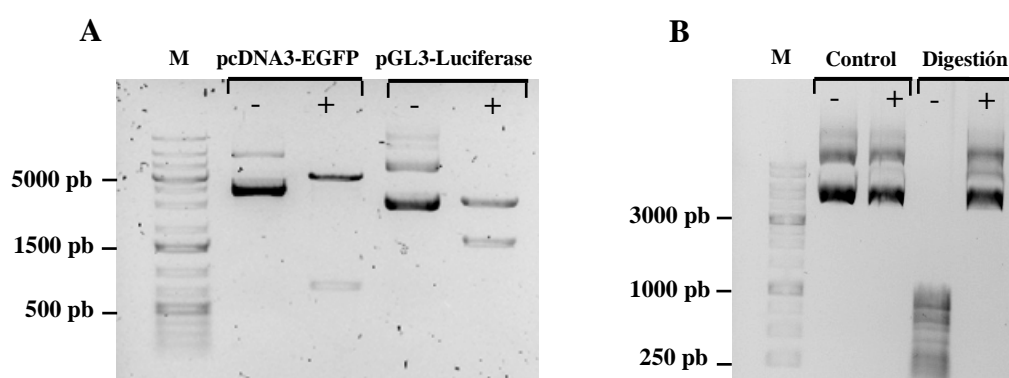


Figura 8. Obtención de la construcción TK-EGFP. (A) Digestión de los vectores pcDNA3-EGFP y pGL3-Luciferase. M, marcador de peso molecular; (-) vector sin digerir; (+) vector digerido con las enzimas de restricción correspondientes. Los fragmentos de interés fueron los correspondientes al gen *EGFP* (807pb) y al vector pGL3 con el promotor TK sin el gen *Luciferasa* (3269pb). (B) Comprobación de la metilación *in vitro* del vector TK-EGFP. Control, sin enzima *HpaII*; Digestión, con enzima *HpaII*, (-) vector TK-EGFP nativo, (+) vector TK-EGFPmet.

Como se muestra en los resultados (Figura 9), la mayor expresión de EGFP se consiguió con el agente transfectante GeneJuice® Transfection Reagent y la proporción tdTomato-N1: TK-EGFP 1:10. Las diferencias de expresión de EGFP obtenidas con 1µL ó 1.5µL de agente transfectante fueron mínimas, por lo que se decidió utilizar 1µL.

Con el fin de mejorar aún más las condiciones de transfección, se realizó un nuevo ensayo empleando 1µL del agente transfectante GeneJuice® Transfection Reagent y nuevas proporciones tdTomato-N1: TK-EGFP: 1:10, 1:20, 1:50 y 1:100.

Los resultados muestran que la mayor expresión de EGFP se vuelve a producir en la proporción tdTomato-N1: TK-EGFP 1:10 (Figura 10).

Así pues, se decidió que las condiciones de transfección óptimas en la estirpe HEK293 y por tanto, las utilizadas para nuestro estudio son tdTomato-N1: TK-EGFP 1:10 y 1 µL del agente transfectante GeneJuice® Transfection Reagent

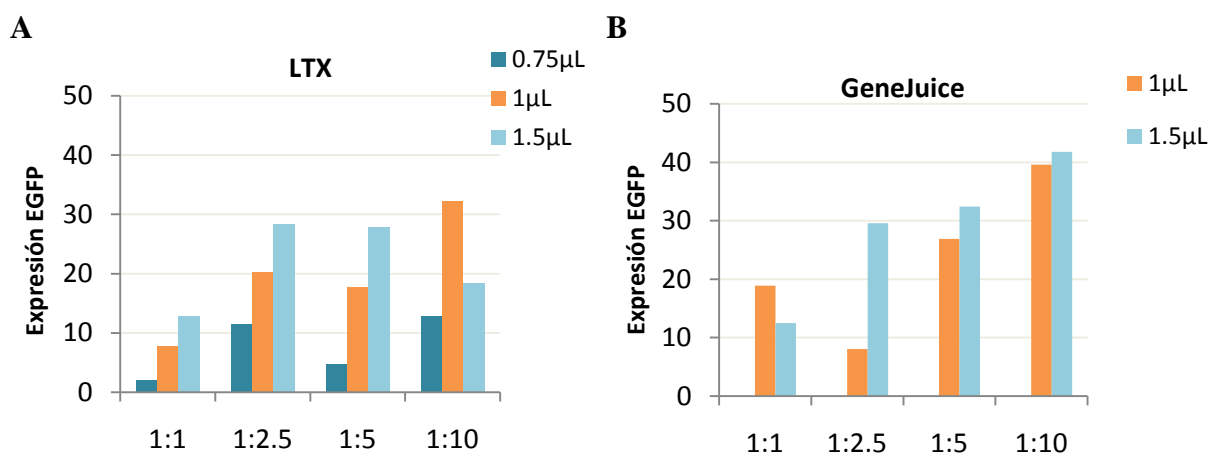


Figura 9. Expresión de la proteína EGFP. (A) Transfección de células HEK293 con el agente transfectante Lipofectamina LTX: se usaron distintas cantidades de Lipofectamina LTX: 0.75µL, 1µL y 1.5µL y diferentes proporciones de plásmido tdTomato-N1: TK-EGFP, 1:1; 1:2.5; 1:5 y 1:10. (B) Transfección de células HEK293 con el agente transfectante Lipofectamina GeneJuice: distintas cantidades de Lipofectamina GeneJuice se emplearon (1 µL y 1.5µL) y diferentes proporciones de plásmidos tdTomato-N1: TK-EGFP, 1:1; 1:2.5; 1:5 y 1:10.

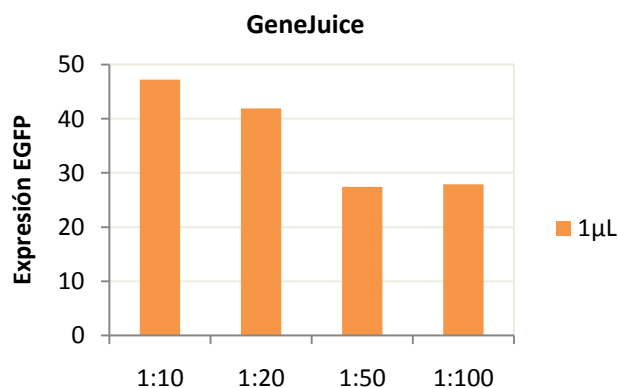


Figura 10. Expresión de EGFP. Se utilizó como agente transfectante 1 μL de Lipofectamina GeneJuice y proporciones de los plásmidos tdTomato-N1: TK-EGFP 1:10; 1:20; 1:50 y 1:100.

Efecto de la metilación sobre la expresión de TK-EGFP

Una vez establecidas las condiciones más óptimas para la transfección de HEK 293, el siguiente objetivo fue determinar el efecto de la metilación en la expresión de la proteína verde fluorescente. Para ello se realizó una nueva transfección utilizando las construcciones TK-EGFP o TK-EGFPmet a diferentes tiempos de incubación: 15h, 24h, 39h y 48h y el vector tdTomato-N1 como normalizador. La proporción celular expresando EGFP y tomate se determinó por microscopía de fluorescencia a las 48 horas de la transfección y mediante citometría de flujo en los diferentes tiempos ensayados.

Las imágenes obtenidas al microscopio muestran un alto nivel de expresión de EGFP cuando la transfección se realizó con tdTomato-N1: TK-EGFP (Figura 11A), mientras que cuando la transfección se llevó a cabo con tdTomato-N1: TK-EGFPmet, los niveles de expresión de la proteína verde fluorescente disminuyeron considerablemente (Figura 11A). Este mismo efecto se observa en los resultados obtenidos mediante citometría de flujo en todos los tiempos ensayados (Figura 11B). Además, tras la normalización de los datos, se observa una mayor represión génica en función del tiempo, alcanzando los niveles de expresión más bajos a las 48h de la transfección. (Figura 11C y D). Todos estos resultados correlacionan el estado de metilación del DNA con el silenciamiento de la expresión génica.

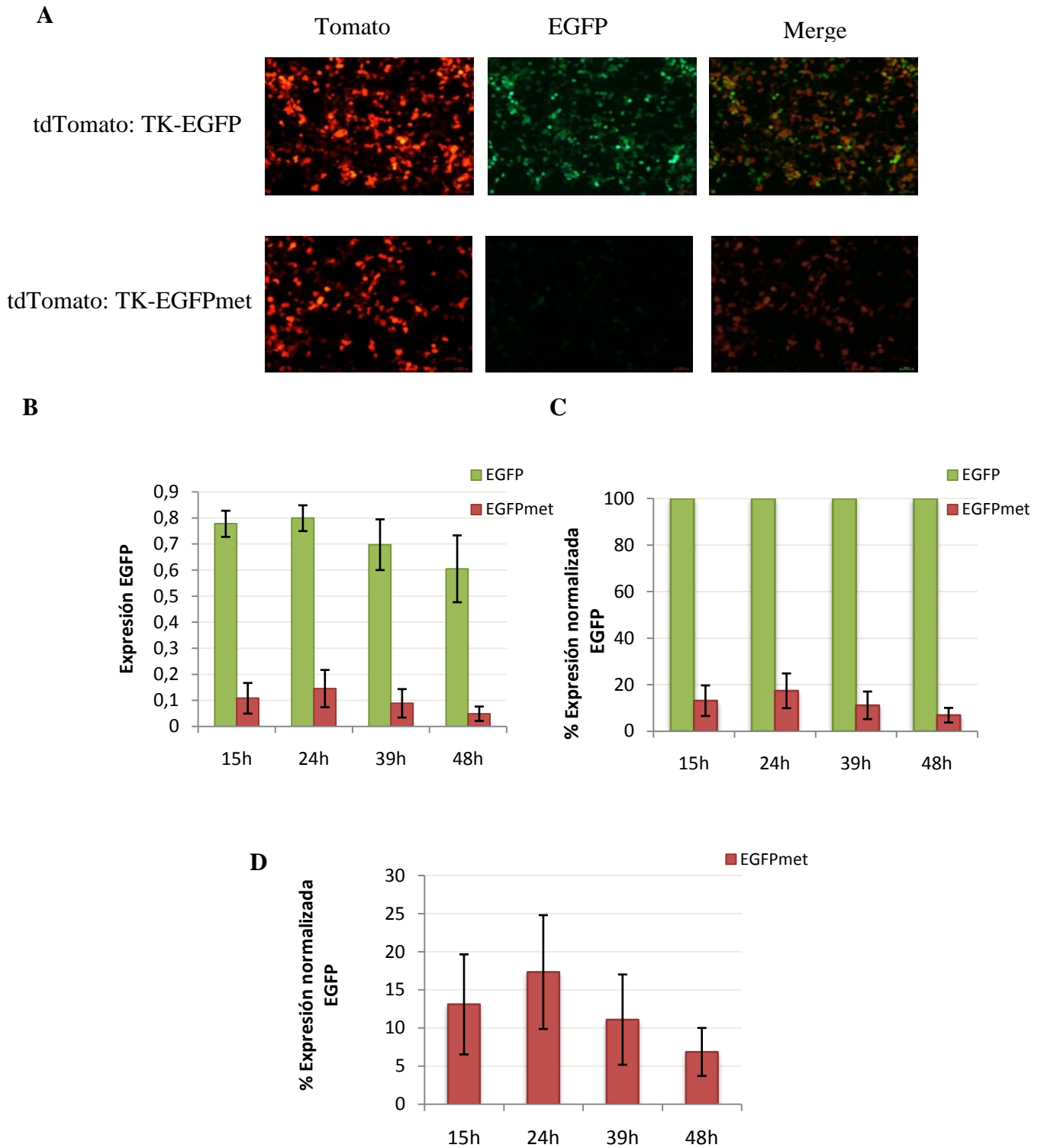


Figura 11. Timecourse . (A) Imágenes de las células HEK 293 a las 48horas de la transfección. (B) Expresión de EGFP en función del tiempo. Transfección de HEK293 a distintos tiempos de incubación: 15, 24, 39 y 48 horas. EGFP: transfección realizada con TdTomato-N1: TK-EGFP; EGFPmet: transfección realizada con TdTomato-N1: TK-EGFPmet (C y D). **Expresión normalizada de EGFP.** Se muestran los niveles de expresión de EGFP correspondientes a dos análisis independientes (media +/- error estándar de la media).

Ensayos con compuestos que alteran el patrón epigenético.

Una vez establecida la correlación del estado de metilación del DNA con el silenciamiento de la expresión génica, el siguiente objetivo fue analizar la posible capacidad de reactivación mediante el uso de modificadores epigenéticos, tales como 5-Aza-dC, un inhibidor de las DNA-metiltransferasas *de novo* que induce a una desmetilación pasiva, y TSA, un inhibidor de deacetilasas de histonas (HDACs) que induce la relajación de la cromatina y puede desencadenar un incremento en la expresión de genes. En este ensayo 5-Aza-dC ha sido utilizado como control negativo para determinar los posibles cambios celulares producidos tras la incubación con un compuesto externo. Para ejercer su función inhibitoria, este modificador epigenético debe incorporarse al DNA tras la replicación y TK-EGFP no se replica en las células de mamífero.

Para analizar los efectos de los modificadores epigenéticos, células HEK293 transfectadas con TK-EGFP ó TK-EGFPmet y el vector tdTomato-N1 como normalizador, tras 24h de la transfección, fueron incubadas con 5-Aza-dC, TSA, y la combinación de ambos durante 24 y 48h.

Tras la normalización de los datos, en las transfecciones realizadas con tdTomato-N1:TK-EGFPmet, se observa un aumento de la expresión de EGFP con respecto a la condición control sin tratamiento, siendo éste diferente según el modificador epigenético utilizado y tiempo de incubación empleado (Figura 12).

Tras el tratamiento con 5-Aza-dC, el incremento de la expresión de EGFP con respecto a la condición control, es del doble aproximadamente en ambos tiempos de incubación (Figura 12A y 12B). En el caso del TSA, el aumento de la expresión de la proteína verde fluorescente es de 5 veces a las 24h (Figura 12A) y de 2,5 veces a las 48h (Figura 12B) con respecto a la condición control sin tratamiento. Por último, el tratamiento con ambos modificadores epigenéticos, al cabo de 24h de incubación produjo un incremento intermedio de la expresión de EGFP entre el producido tras el tratamiento con TSA y 5-Aza-dC (Figura 12A). Éste es de aproximadamente 3 veces con respecto a la condición control. Cuando la incubación se prolongó a las 48h, el aumento de la expresión de EGFP es similar al obtenido tras el tratamiento con TSA (Figura 12B).

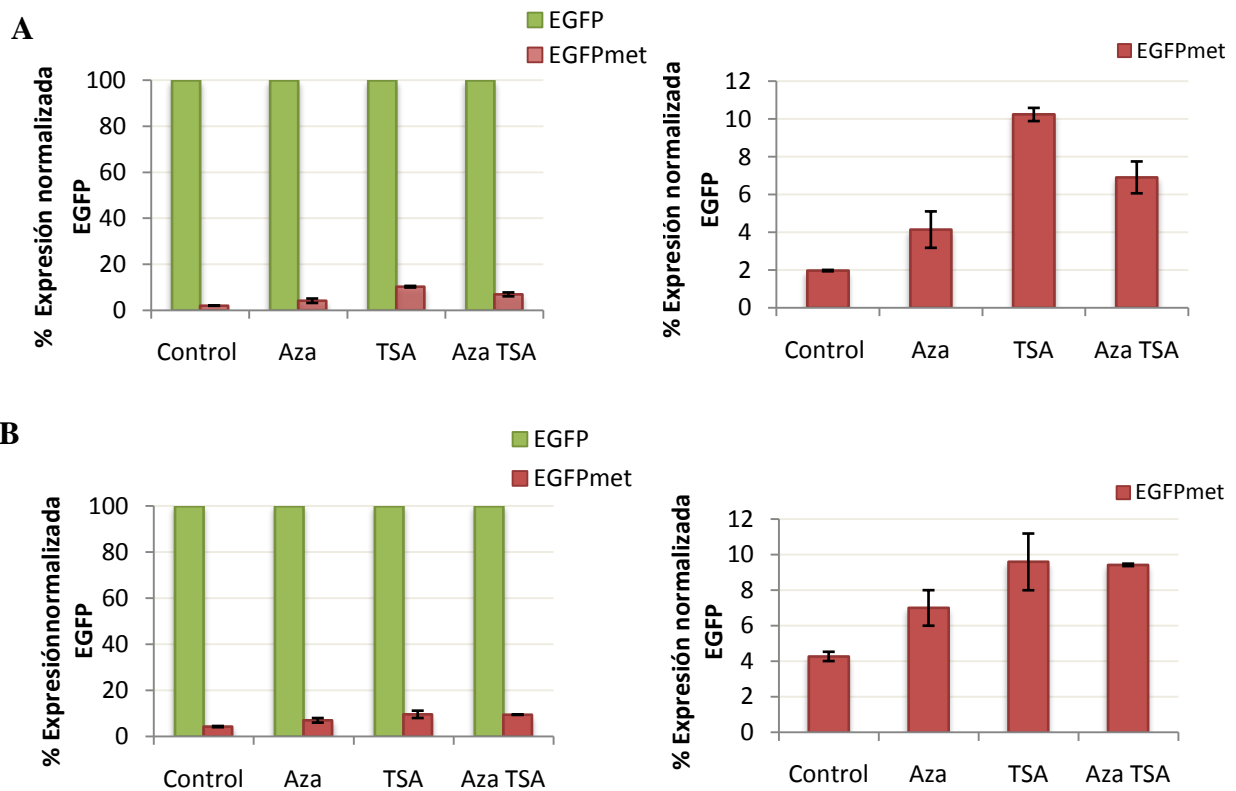


Figura 12. Ensayos con compuestos que alteran el patrón epigenético. **(A) Expresión normalizada de EGFP a las 24 horas.** **(B) Expresión normalizada de EGFP a las 48 horas.** Transfección de HEK293 con distintos agentes modificadores del epigenoma: Aza: 5-Aza-dC; TSA: Tricostatina A. EGFP: transfección realizada con TdTomato-N1: TK-EGFP; EGFPmet: transfección realizada con TdTomato-N1: TK-EGFPmet. Se muestran los niveles de expresión de EGFP correspondientes a dos análisis independientes (media +/- error estándar de la media).

DISCUSIÓN

Más allá de la secuencia primaria del DNA, los mecanismos epigenéticos asignan un papel crucial a la organización de la cromatina en el establecimiento de patrones específicos de expresión génica (Bender, 2004). El avance en el estudio de la epigenética ha favorecido el uso del concepto de *epigenoma* como responsable de la regulación del genoma. El epigenoma incluye un conjunto de marcas epigenéticas que constituyen una capa adicional de información superpuesta a la secuencia de DNA. Entre las diferentes marcas epigenéticas se incluyen la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas (Holliday, 2005). La metilación del DNA se asocia generalmente con silenciamiento génico, mientras que las modificaciones de histonas producen estados de activación y de represión.

En este contexto, uno de los objetivos de este trabajo ha sido desarrollar un sistema para analizar los mecanismos mediante los que la metilación del DNA, induce silenciamiento génico. Para ello, se ha cuantificado la expresión de la proteína EGFP en transfectantes transitorios en la línea celular HEK293. Las transfecciones fueron realizadas a diferentes tiempos con el vector TK-EGFP nativo o previamente metilado *in vitro*. Los resultados revelaron una disminución de la expresión de la proteína fluorescente cuando la transfección fue realizada con el vector metilado en comparación con la elevada expresión de EGFP en las transfecciones llevadas a cabo con el vector nativo sin metilar. Resultados similares fueron obtenidos por Cervoni y colaboradores (Cervoni & Szyf, 2001) y por Detich y colaboradores (Detich *et al*, 2003; Detich *et al*, 2002). Todos estos resultados corroboran que la metilación del DNA reprime la transcripción y participa en el silenciamiento de la expresión génica.

Además, en nuestro estudio hemos observado como la represión génica de la proteína verde fluorescente aumentaba en función del tiempo en las transfecciones realizadas con el vector previamente metilado. Kass y colaboradores en su trabajo (Kass *et al*, 1997) obtuvieron resultados similares y sugieren que el silenciamiento dependiente del tiempo podría estar ocurriendo mediante un mecanismo de represión indirecto. Este mecanismo se produce por la unión de proteínas que presentan afinidad por dinucleótidos CpG metilados (*methyl-CpG-binding proteins*, MBP), que a su vez reclutan represores de la transcripción y/o factores remodeladores de la cromatina.

Apoiando este modelo, existen investigaciones que sugieren que el DNA ectópico una vez introducido en las células, se ensambla formando una estructura de tipo nucleosómico (Cervoni & Szyf, 2001), aunque se cree que esta estructura no se sigue compactando hasta llegar al nivel característico de la cromatina celular. Aun así, es muy probable que la maquinaria celular reconozca esta estructura y actúe de manera similar a como lo hace sobre la cromatina. Varios estudios han sido realizados en los que se ha demostrado que TSA activa la transcripción inhibiendo HDACs y facilitando la desmetilación de genes reporteros ectópicos metilados después de la transfección (Cervoni & Szyf, 2001; Detich *et al*, 2003; Detich *et al*, 2002).

Los resultados obtenidos en los transfectantes transitorios con TK-EGFP_{met} tras el tratamiento con TSA, mostraron un incremento de la expresión de EGFP con respecto a la condición control sin tratamiento. Estos resultados sugieren que probablemente el DNA metilado, cuando ha sido transfectado en las células humanas, ha adquirido una estructura similar a la de un nucleosoma originando una gran represión génica y que tras el tratamiento con TSA, con el que se favorece la permanencia de los grupos acetilo en los extremos amino terminales de las histonas, se relaja la interacción de las histonas con el DNA y se facilita la expresión de EGFP.

La 5-Aza-dC ha sido utilizada en este estudio como control negativo para ver los cambios celulares producidos tras la incubación con un compuesto externo. Este compuesto ejerce su acción inhibitoria sobre las DNMT1 en el proceso de replicación del DNA. La 5-Aza-dC se incorpora en el DNA durante la replicación y forma un complejo con la metiltransferasa que posteriormente es degradado produciéndose así una desmetilación global (*Issa & Kantarjian, 2009*). El plásmido TK-EGFP usado en este trabajo no tiene capacidad replicativa en las células HEK293, por lo que no debería verse afectado por una desmetilación pasiva inducida con 5-Aza-dC. Sin embargo, los resultados obtenidos tras el tratamiento revelan un incremento de la expresión de la proteína verde fluorescente tras la incubación con 5-Aza-dC, aunque no tan grande como el inducido por la TSA. Para interpretar estos resultados, hay que tener en cuenta la posibilidad de que la 5-Aza-dC ejerza un efecto indirecto sobre el promotor TK, resultado de la capacidad de este compuesto para activar diferentes vías de señalización celular. Por ejemplo, se ha demostrado que la 5-Aza-dC favorece la formación de dsRNAs y con ello la activación de rutas de señalización dependientes de RNA que tienen como consecuencia final la activación de determinados genes anteriormente silenciados (*Roulois et al, 2015*). Otro posible modo de acción indirecta de 5-Aza-dC podría estar relacionado con el efecto citotóxico que produce la incorporación masiva de este compuesto al DNA nuclear (*Chiappinelli et al, 2015*). La citotoxicidad y el daño en el DNA tras su incorporación permite a las células activar mecanismos que pueden revertir una metilación anormal de un promotor, re-activar genes silenciados y llevar a cabo vías nuevas de señalización celular (*Chiappinelli et al, 2015*).

En conclusión, los resultados de este trabajo demuestran que el sistema de detección diseñado constituye una herramienta útil para el estudio de los mecanismos implicados en el silenciamiento génico asociado a la metilación del DNA.

CONCLUSIONES

- » El uso de dos plásmidos con genes reporteros distintos permite usar experimentos de transfección celular para analizar de forma cuantitativa el silenciamiento génico causado por la metilación del DNA.
- » La represión génica causada por la metilación del DNA aumenta en función del tiempo transcurrido tras su introducción en la célula, lo que sugiere un mecanismo de silenciamiento indirecto.
- » La represión génica se ve contrarrestada por un inhibidor de deacetilasas de histonas, lo que indica que una vez en el interior celular el DNA metilado adquiere una estructura de tipo nucleosómico.

BIBLIOGRAFÍA

Albert B, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.D (1992) *Biología Molecular de la Célula*. Barcelona, Ediciones Omega.

Bender J (2004) DNA methylation and epigenetics. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 41-68

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**: 6-21

Cervoni N, Szyf M (2001) Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* **276**: 40778-40787

Cowan LA, Talwar S, Yang AS (2010) Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors. *Epigenomics* **2**: 71-86

Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, Hein A, Rote NS, Cope LM, Snyder A, Makarov V, Budhu S, Slamon DJ, Wolchok JD, Pardoll DM, Beckmann MW, Zahnow CA, Merghoub T, Chan TA, Baylin SB, Strick R (2015) Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell* **162**: 974-986

Christman JK (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**: 5483-5495

Deaton AM, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* **25**: 1010-1022

Detich N, Bovenzi V, Szyf M (2003) Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* **278**: 27586-27592

Detich N, Theberge J, Szyf M (2002) Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem* **277**: 35791-35794

Du R, Liu Z, Hou X, Fu G, An N, Wang L (2016) Trichostatin A potentiates genistein-induced apoptosis and reverses EMT in HEP2 cells. *Mol Med Rep* **13**: 5045-5052

Felsenfeld G, Groudine M (2003) Controlling the double helix. *Nature* **421**: 448-453

Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES (1998) DNA Methylation in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 223-247

Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**: 481-514

Holliday R (2005) DNA methylation and epigenotypes. *Biochemistry (Mosc)* **70**: 500-504

Hsieh TF, Fischer RL (2005) Biology of chromatin dynamics. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 327-351

Issa JP, Kantarjian HM (2009) Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res* **15**: 3938-3946

Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080

- Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* **7**: 157-165
- Kim SN, Choi HY, Kim YK (2009) Regulation of adipocyte differentiation by histone deacetylase inhibitors. *Arch Pharm Res* **32**: 535-541
- Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**: 89-97
- Kress C, Thomassin H, Grange T (2001) Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett* **494**: 135-140
- Maria Ines Perez Millan, Damasia Becu-Villalobos (2009). La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. *Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME CONICET, Buenos Aires. MEDICINA (Buenos Aires); 69: 370-374*
- Miranda TB, Jones PA (2007) DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* **213**: 384-390
- Nakao M (2001) Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* **278**: 25-31
- Ooi SK, Bestor TH (2008) Cytosine methylation: remaining faithful. *Curr Biol* **18**: R174-176
- Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D, Ramsahoye B (2010) Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res* **38**: 4313-4324
- Raftopoulos L, Katsi V, Makris T, Tousoulis D, Stefanadis C, Kallikazaros I (2015) Epigenetics, the missing link in hypertension. *Life Sci* **129**: 22-26
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M (1999) DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6107-6112
- Reik W, Dean W, Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**: 1089-1093
- Roldan-Arjona T, Ariza RR (2009) Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res* **681**: 169-179
- Roulois D, Loo Yau H, Singhanian R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, Han H, Liang G, Jones PA, Pugh TJ, O'Brien C, De Carvalho DD (2015) DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell* **162**: 961-973
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**: 27-36
- Stelzer Y, Shivalila CS, Soldner F, Markoulaki S, Jaenisch R (2015) Tracing dynamic changes of DNA methylation at single-cell resolution. *Cell* **163**: 218-229
- Teperek-Tkacz M, Pasque V, Gentsch G, Ferguson-Smith AC (2011) Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction* **142**: 621-632

- Wise IA, Charchar FJ (2016) Epigenetic Modifications in Essential Hypertension. *Int J Mol Sci* **17**
- Wolffe M (1999) Light hazards from ophthalmic instruments. A clinical problem. *Ophthalmic Physiol Opt* **19**: 363-364
- Wu SC, Zhang Y (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 607-620
- Zhang C, Zhong JF, Stucky A, Chen XL, Press MF, Zhang X (2015) Histone acetylation: novel target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Clin Epigenetics* **7**: 117
- Zhang QJ, Liu ZP (2015) Histone methylations in heart development, congenital and adult heart diseases. *Epigenomics* **7**: 321-330
- Zych J, Stimamiglio MA, Senegaglia AC, Brofman PR, Dallagiovanna B, Goldenberg S, Correa A (2013) The epigenetic modifiers 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A influence adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* **46**: 405-416