



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**Efecto de la disminución de HOTAIR en la hidroximetilación global en la línea celular HeLa**

**T E S I S**

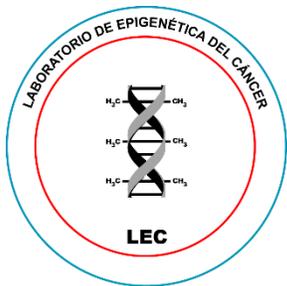
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:

**QBP. OLGA ADAME GUERRERO**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. DANIEL HERNÁNDEZ SOTELO**



CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2019



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

## ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 14 días del mes de diciembre de dos mil dieciocho se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de la disminución de HOTAIR en la hidroximetilación global en la línea celular HeLa", presentada por la alumna Olga Adame Guerrero, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dr. Daniel Hernández Sotelo  
Dirección de tesis

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Vo. Bo

Vo. Bo

UAGRO  
FCQB Coordinación de la  
Maestría en Ciencias  
Biomédicas  
DIRECCIÓN 2018 - 2021

UAGRO  
Facultad de Ciencias  
Químico Biológicas  
DIRECCIÓN 2018 - 2021

El desarrollo de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Epigenética del Cáncer.

Bajo la dirección de:

**Dr. Daniel Hernández Sotelo**

Bajo la asesoría de:

**Dra. Berenice Iliades Aguiar**

**Dr. Oscar del Moral Hernández**

**Dr. Eduardo Castañeda Saucedo**

**Dr. Alfredo Hidalgo Miranda**

Durante el periodo en que curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Olga Adame Guerrero, recibió beca del CONACYT.

# **Efecto de la disminución de HOTAIR en la hidroximetilación global en la línea celular HeLa**

---

## ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>10</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>12</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>26</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>29</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>30</b>

## **Resumen**

Las alteraciones genéticas y epigenéticas conducen al inicio y desarrollo del cáncer. El epigenoma de una célula cancerosa se caracteriza por metilación aberrante de genes supresores de tumor y la consecuencia funcional es la represión transcripcional de estos genes. La evidencia sugiere un papel importante de los RNAs largos no codificantes como moduladores del establecimiento de la metilación del DNA. HOTAIR reprime la expresión de genes supresores de tumor mediante el establecimiento de H3K27me3 y metilación del DNA en regiones promotoras. El cambio en los patrones de metilación en una célula cancerosa se acompaña de la pérdida en los niveles de hidroximetilación. Alteraciones en los niveles de hidroximetilación están relacionados con desregulación de las enzimas TET. En este estudio, valoramos el efecto de la disminución de HOTAIR en el nivel de expresión de TET1 mediante RT-qPCR, y observamos que TET1 disminuye su nivel de expresión. Debido al papel que tiene TET1 en la hidroximetilación, evaluamos el efecto de HOTAIR en la hidroximetilación global utilizando la plataforma de microarreglos. Nuestros resultados muestran que la disminución de HOTAIR disminuye la hidroximetilación global en la línea celular HeLa, pero que los cambios de hidroximetilación ocurren particularmente en la región promotora. El efecto de la hidroximetilación en el promotor induce cambios en los niveles de expresión de IRF1 y CDH2.

**Palabras clave:** lncRNA, metilación, HOTAIR, hidroximetilación, TET1.

**Abstract**

Genetic and epigenetic alterations lead to the initiation and development of cancer. Epigenome of cancer cell is characterized by aberrant methylation of tumor suppressor genes, the functional consequence is the transcriptional repression of these genes. New evidence suggests an important role for long non-coding RNAs as modulators of the establishment of DNA methylation. HOTAIR represses the expression of tumor suppressor genes by establishing H3K27me3 and DNA methylation in promoter regions. The change in methylation patterns in a cancer cell is accompanied by the loss in hydroxymethylation levels. Alterations in hydroxymethylation levels are related to deregulation of TET enzymes. In this study, we assessed the effect of the decrease in HOTAIR on the expression level of TET1 by RT-qPCR, we observed that TET1 decreases its level of expression. Due to the role of TET1 in hydroxymethylation, we evaluated the effect of HOTAIR on global hydroxymethylation using the microarray platform. Our results show that the decrease in HOTAIR decreases the overall hydroxymethylation in the HeLa cell line, but that changes in hydroxymethylation occur particularly in the promoter region. The effect of hydroxymethylation on the promoter induces changes in the expression levels of IRF1 and CDH2.

**Key words:** lncRNA, methylation, HOTAIR, hydroxymethylation, TET1.

## Introducción

El cáncer es una enfermedad que resulta de la acumulación de alteraciones genéticas y cambios epigenéticos (Herceg & Hainaut, 2007). Estas alteraciones conducen a la producción y liberación de señales que inducen la división celular (Hanahan and Weinberg, 2011). A pesar de que las mutaciones genéticas son clave para escapar del nicho celular (Timp & Feinberg, 2013), muchas propiedades de una célula cancerosa no pueden ser atribuidas solo a mutaciones genéticas (Lacobuzio-Donahue, 2009).

La epigenética se define como los cambios que ocurren en el fenotipo sin modificaciones en el genotipo (Allis & Jenuwein 2016). Los mecanismos de regulación epigenética están mediados por metilación del DNA, remodelación de la cromatina y RNAs no codificantes (Kagohara *et al.*, 2018). La metilación del DNA es la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina, esta reacción es catalizada por DNA metiltransferasas (Marchal & Miotto, 2014). En cáncer, el epigenoma se caracteriza por hipometilación global e hipermetilación localizada (Sharma *et al.*, 2010). El papel funcional de la metilación del DNA es asociado, en general, con represión transcripcional (Beckedorff F. *et al.*, 2013), además, la hipermetilación de genes supresores de tumor es un evento que favorece el inicio y progresión del cáncer (Baxter *et al.*, 2011). La evidencia experimental sugiere un papel potencial de lncRNAs en la metilación del DNA (Merry *et al.*, 2015).

Los RNAs no codificantes (ncRNAs) son un grupo de transcritos heterogéneos sin potencial de codificación para proteína (Liu *et al.*, 2013). Estos RNAs pueden clasificarse en RNAs pequeños no codificantes (<200n) y RNAs largos no codificantes (>200n) (Costa, 2010). Los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) pueden modular la expresión de genes que influyen en la regulación del ciclo celular, supervivencia, respuesta inmune o pluripotencia, funciones que determinan el fenotipo de células cancerosas (Huarte, 2015). Uno de los lncRNAs ampliamente estudiado en cáncer es HOTAIR (Hajjari *et al.*, 2015), este RNA remodela la cromatina a través de su interacción con PRC2 (Complejo Represivo Polycom 2) (Rin *et al.*, 2007). El papel de HOTAIR como regulador maestro de la expresión de genes además de ser mediado por modificaciones de histonas, también podría implicar la metilación del DNA

(Hofmann *et al.* 2015; Fang *et al.*, 2015), y aunque son pocos los estudios que denotan el efecto de HOTAIR en la metilación del DNA, existen datos que demuestran que la reducción del nivel de expresión de HOTAIR disminuye la metilación en el promotor de genes supresores de tumor (Lee *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2017).

La metilación del DNA es un evento que puede ser reversible en células de mamíferos (Liu *et al.* 2013). Por lo tanto, la disminución de la metilación del DNA podría implicar la participación de las enzimas TET (Guo *et al.*, 2011). La función catalítica de estas enzimas es el establecimiento de la marca epigenética 5hmC (5 hidroximetilcitosina), esta marca es el resultado de la oxidación de la citosina metilada, proceso conocido como hidroximetilación. Además, este proceso participa como un mecanismo intermedio en la demetilación del DNA (Gao *et al.*, 2014). La familia de enzimas que catalizan la hidroximetilación están conformada por TET1, TET2 y TET3, alteraciones en estas enzimas puede conducir a una reducción de los patrones de hidroximetilación (Tan and Shi, 2012). A diferencia de la metilación, la hidroximetilación está asociada con activación transcripcional (Shukla *et al.*, 2015), y en cáncer, se ha observado disminución en los niveles de hidroximetilación (Weiwei and Min, 2011). Por ejemplo, se ha demostrado que TET1 encuentra disminuido en cáncer de mama y cáncer de colon e incluso se le ha considerado como un gen supresor de tumor (Sang *et al.*, 2015; Neri *et al.*, 2014). Mientras que TET2 se ha observado desregulado en células hematopoyéticas ocasionando leucemia mieloide aguda (LMA) y neoplasias mieloproliferativa (Delhommeau *et al.*, 2009).

En cáncer cervical se ha observado que la metilación del DNA es una alteración temprana y frecuente durante el desarrollo de esta enfermedad (Yang, 2013). Cambios en los patrones de metilación podrían conducir a cambios en los niveles de hidroximetilación, y debido a que actualmente la evidencia sugiere un papel potencial de los RNAs largos no codificantes en la metilación del DNA, el efecto que tienen en la metilación también podría generar cambios en los niveles de hidroximetilación. En este estudio nos interesó valorar el efecto que tiene el RNA largo no codificante HOTAIR en los niveles de hidroximetilación del DNA, utilizando como modelo de estudio la línea celular humana de cáncer cervical HeLa.

## Material y métodos

### Cultivo celular y transfecciones

La línea celular de cáncer cervical HeLa se cultivó en medio DMEM/Ham's F-12 1:1 (CAISSON Laboratories, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino, y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco-BRL, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. La línea celular HeLa se transfectó con 0.02 nMol/uL del interferente para HOTAIR utilizando lipofectamina (Lipofectamine 2000, Invitrogen, Life Technologies). La secuencia del interferente específico para HOTAIR es: DsiRNA-F 5' UAA CAA GAC CAG AGA GCU GUU y DsiRNA-R 5' CCA CAU GAA CGC CCA GAG AUU. Como DsiRNA control: (NC) 5' CUA CAA CAG CCA CAA CGU CdTdT. La extracción del RNA se realizó 48 horas pos-transfección.

### Extracción de RNA

La extracción del RNA total se realizó utilizando TRIzol (Invitrogen, California, EEUU). Se agregaron 400 µl de TRIzol, 80 µl de cloroformo, 200 µL de etanol al 70% y finalmente el RNA se resuspendió en 20 µL de agua DEPC. La cuantificación del RNA se realizó por espectrofotometría mediante el uso del Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### RT-qPCR

La expresión de HOTAIR y de TET1 se determinó utilizando 100 ng de RNA total y el kit SCRIPT One-Step RT-qPCR Green Master (Jena Bioscience). El programa de amplificación preliminar fue el siguiente: 37°C - 30s, 42°C - 5min, 95°C - 5min, 95°C - 20s, temperatura de alineamiento específica del gen (Ta) 30s, 72°C - 30s. Las reacciones de tiempo real se realizaron en el equipo Quant Studio 3 (Thermo Fisher). Los niveles de expresión se determinaron usando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Schmittgen y Livak, 2008) mediante el software Sigma Plot y se utilizó la prueba estadística t-student para determinar diferencias significativas.

### **Modificación del DNA**

La extracción de DNA se realizó con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) y la cuantificación con el Nanodrop 2000. Se modificó 1 µg de DNA utilizando el kit True Methyl oxBS Module (NuGEN Technologies, San Carlos, California). Cada muestra de DNA se dividió en dos alícuotas para ser procesada a través de dos modificaciones químicas, una con bisulfito de sodio (BS), y la modificación que incluye una oxidación previa a la modificación con bisulfito de sodio (oxBS).

### **Microarreglo y análisis de datos**

Se utilizó el microarreglo Infinium Methylation EPIC (Illumina), para determinar el estatus de hidroximetilación a resolución de una base. La detección 5hmC en todo el genoma se realizó usando el sistema iScan (Illumina). Las intensidades de señal (IDATs) se analizaron utilizando el software Partek Genomics Suite, donde se obtuvo la relación entre la intensidad de la sonda metilada y la sonda no metilada (Valor  $\beta$ ). Los valores beta fueron normalizados utilizando el método de normalización SWAN. Se realizó filtración de sondas, por lo que se excluyeron del estudio aquellas sondas con valor de  $p > 0.01$ , sondas dirigidas a sitios no CpG o SNPs, además se eliminaron aquellas sondas que pertenecen al cromosoma X y Y. Una vez obtenidos los valores  $\beta$  de cada muestra y sus respectivos tratamientos de modificación del DNA (BS y OxBS), se obtuvo la diferencia entre el valor  $\beta$  BS y el valor  $\beta$  oxBS ( $\Delta\beta$ ), este valor corresponde al nivel de hidroximetilación de cada sonda analizada. Cada sitio CpG analizado se catalogó como CpGs que aumentan su hidroximetilación si su valor delta beta fue  $> 0.5$ , o bien, CpGs que disminuían su nivel de hidroximetilación si su valor delta beta fue  $< -0.5$ .

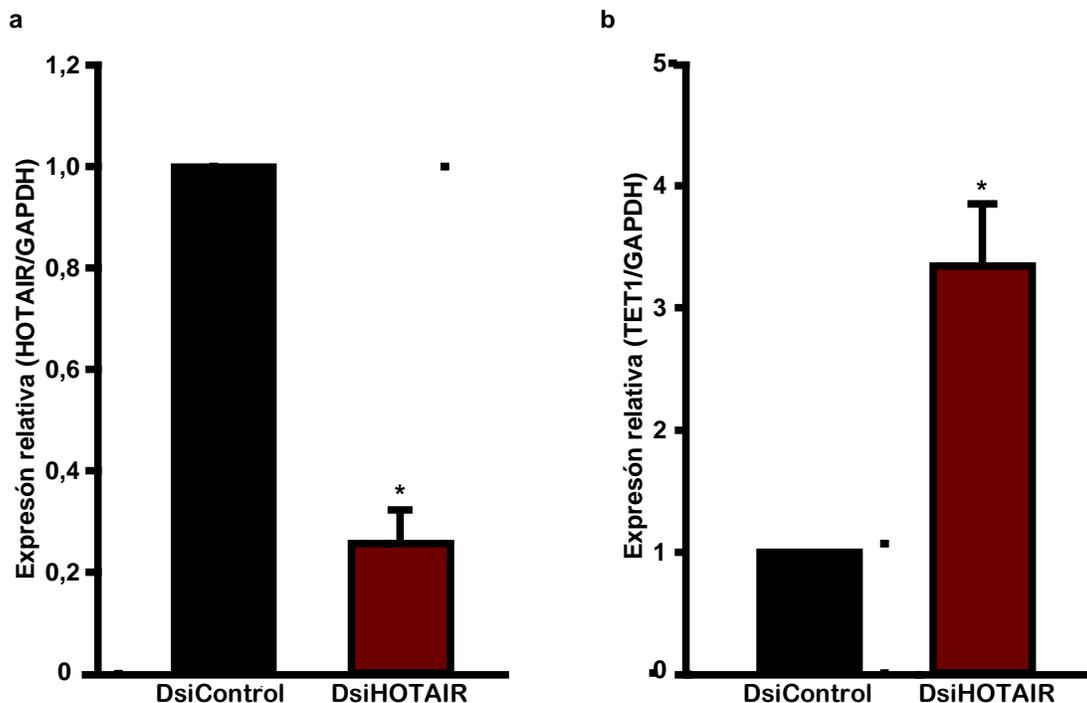
### **Análisis de enriquecimiento de vías**

Se utilizó la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) para la clasificación de vías. El análisis se realizó usando el método GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Se establecieron como vías enriquecidas aquellas que tuvieron un valor de  $p < 0.5$

## Resultados

### La disminución de HOTAIR aumenta el nivel de expresión de TET1.

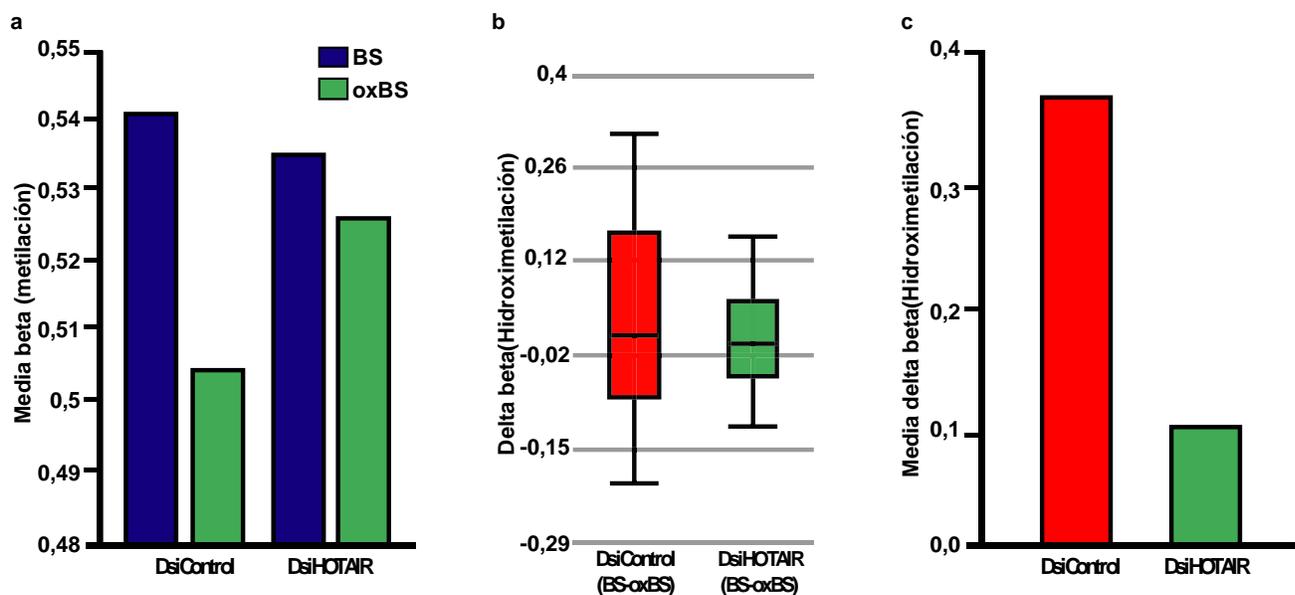
HeLa es una línea celular que expresa niveles altos de HOTAIR comparado con una línea no tumoral (Kim *et al.*, 2014), por ello, para determinar el efecto de HOTAIR en la hidroximetilación global se utilizó esta línea celular como modelo de estudio. Para disminuir los niveles de expresión de HOTAIR se realizaron transfecciones transitorias utilizando un RNA de interferencia dirigido para HOTAIR (DsiHOTAIR), y como control se utilizó un RNA de interferencia control (DsiControl). Después de 48 horas de la transfección, se determinó el nivel de expresión de HOTAIR y que su expresión disminuye aproximadamente 80% (Figura 1a). Una vez confirmada la disminución de la expresión de HOTAIR, se valoró su efecto en la expresión del RNAm de TET1. Este gen codifica para una de las enzimas que lleva a cabo la hidroximetilación del DNA. Nosotros observamos que la disminución de HOTAIR aumenta el nivel de expresión de TET1 (Figura 1b). Estos resultados sugieren un posible papel de HOTAIR en la hidroximetilación del DNA en la línea celular HeLa.



**Figura 1. Efecto de HOTAIR en el nivel de expresión de TET1.** La línea celular HeLa fue transfectada con un DsiRNA específico para HOTAIR y un DsiRNA control. a) Disminución de la expresión de HOTAIR, e) expresión de TET1. Los niveles de expresión se analizaron por RT-qPCR y normalizada respecto a GAPDH. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$

## HOTAIR cambia la hidroximetilación global en células HeLa.

Para determinar el efecto de HOTAIR en la hidroximetilación del DNA a escala global en la línea celular HeLa, se realizó el microarreglo Infinium Human MethylationEPIC BeadChip. Para estimar los niveles de hidroximetilación se realizaron dos modificaciones químicas a las muestras de DNA. La modificación química BS (Bisulfito de sodio) y oxBS (oxidación previa a la modificación con bisulfito de sodio), ambos tratamientos químicos son utilizados para la determinación de metilación del DNA. Sin embargo, el tratamiento químico BS sobre-estima los niveles de metilación del DNA, ya que no discrimina entre citosina metilada y citosina hidroximetilada. La aplicación del tratamiento químico oxBS permite obtener los verdaderos valores de metilación, ya que excluye a la citosina hidroximetilada. En la figura 2a se muestra el nivel metilación de todos los CpGs analizados de cada muestra. La diferencia entre BS y oxBS nos permite distinguir los valores de hidroximetilación tanto en células HeLa transfectada con DsiControl, como las células transfectadas con DsiHOTAIR (Figura 2b), así como el total de hidroximetilación en ambas condiciones (Figura 3c). Estos resultados nos permiten observar que la hidroximetilación global disminuye por efecto de la disminución de HOTAIR.



**Figura 2. La hidroximetilación del DNA disminuye por efecto de la disminución de HOTAIR.** La modificación con bisulfito de sodio sobre-estima el nivel de metilación, mientras que la oxidación previa a la modificación permite determinar los verdaderos valores de metilación. a) . La hidroximetilación es obtenida mediante diferencia entre BS y oxBS (Delta beta) de más de 659,495 sitios CpGs, en b) observamos la distribución de los valores de hidroximetilación. El promedio total de hidroximetilación de todos los sitios analizados es observado en C).

### La disminución de HOTAIR aumenta la hidroximetilación en el cromosoma 1.

Las alteraciones epigenéticas han emergido como eventos importantes en el desarrollo de cáncer (Herceg & Hainaut, 2007). En este estudio nos interesó analizar el estatus de 5hmC en todos los cromosomas. Para determinar el nivel de hidroximetilación total, se realizó la estimación del valor de la media delta beta de todas las sondas analizadas para cada cromosoma, y se observó que del cromosoma 2 al cromosoma 22, los niveles de hidroximetilación disminuyen cuando se disminuye el nivel de expresión de HOTAIR. Sin embargo, en el cromosoma 1, se observa un comportamiento diferente, ya que el nivel de 5hmC es mayor en células HeLa con disminución de HOTAIR.

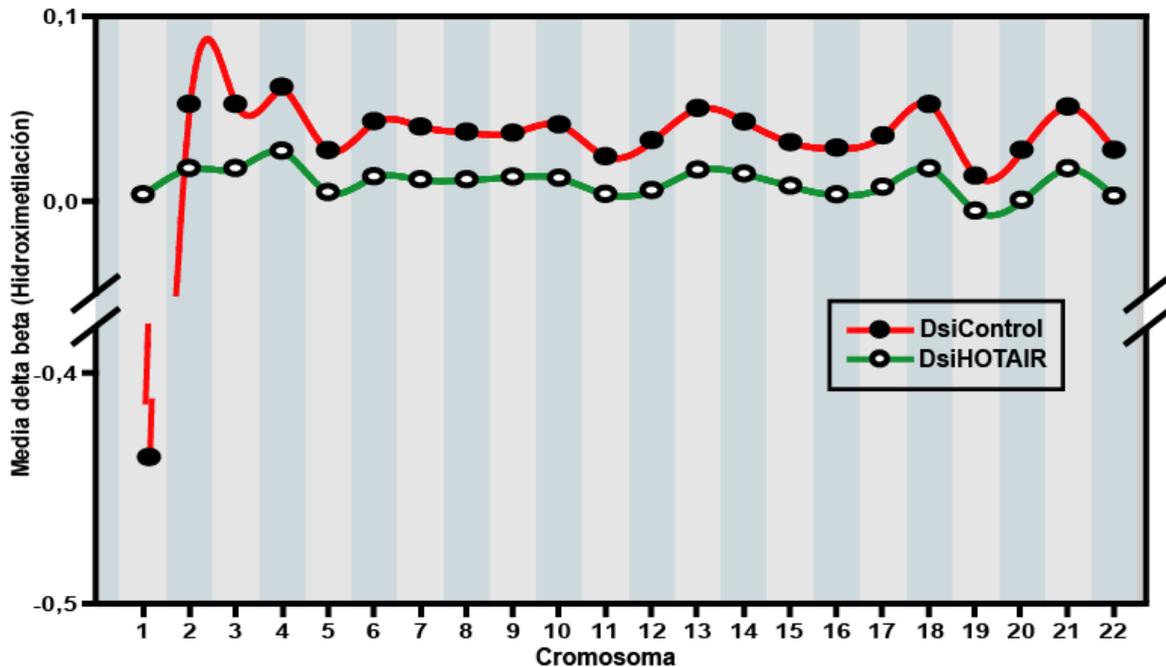
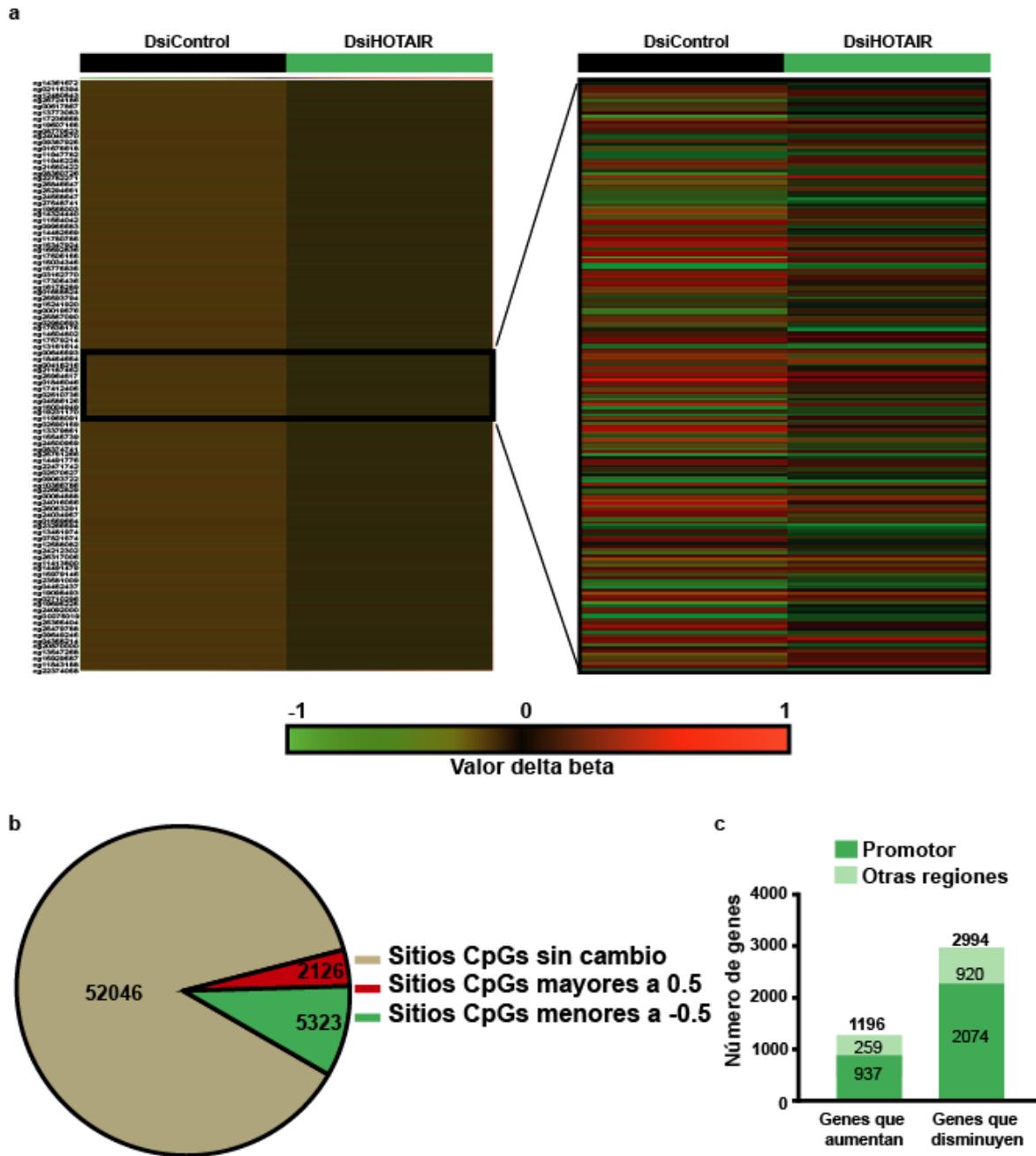


Figura 3. Niveles de hidroximetilación por cromosoma en todos los sitios CpG analizados. Esta grafica está representada con la media delta beta (Hidroximetilación) de todas las sondas analizadas por cromosoma.

### **Hidroximetilación diferencial a resolución de una base.**

El análisis de hidroximetilación del DNA a escala global, nos permite visualizar los cambios de esta marca epigenética en la línea celular HeLa con disminución HOTAIR. Además de este enfoque global, la plataforma de microarreglos EPIC, ofrece información a resolución de una base del estatus de hidroximetilación de todo el genoma. La determinación de hidroximetilación se obtiene a través de la unión de sondas dirigidas a un sitio CpG en particular. Los cambios en los niveles de hidroximetilación se observan en el mapa de calor, donde podemos contrastar el cambio de color que se observa en la condición con disminución de HOTAIR (DsiHOTAIR), respecto a la condición control (DsiControl) (Figura 4a). El nivel de hidroximetilación es determinado por un rango de valores que va desde el -1 hasta 1. Utilizando estos valores se determinó en que sitios CpG cambian los niveles de 5hmC, para ello se estableció un valor corte, es decir, se consideró que todos los sitios CpGs que tuvieron un valor mayor a 0.5 se clasificaron como sitios que aumentaron su nivel de hidroximetilación, mientras que los que tuvieron un valor menor a -0.5 se consideraron como sitios que disminuyeron su nivel de hidroximetilación. Nosotros encontramos que de todos los sitios analizados 2,126 CpGs aumentaron su nivel de hidroximetilación y 5,323 disminuyeron (Fig. 4b). Estos dos números de cambios representan a 1196 y 2994 genes respectivamente. Además, se observó que una gran cantidad de genes cambian su estatus de hidroximetilación en la región promotora, ya que de los 1196 genes que aumentan, 937 tienen cambio en esta región, y de los 2994 genes que disminuyen su nivel de hidroximetilación, 2074 genes tienen cambio en el promotor (Figura 4c). Estos datos concuerdan con lo observado en la figura 2, ya que el resultado final es que hay más sitios CpGs que disminuyen la hidroximetilación del DNA.

Efecto de la disminución de HOTAIR en la hidroximetilación global en la línea celular HeLa



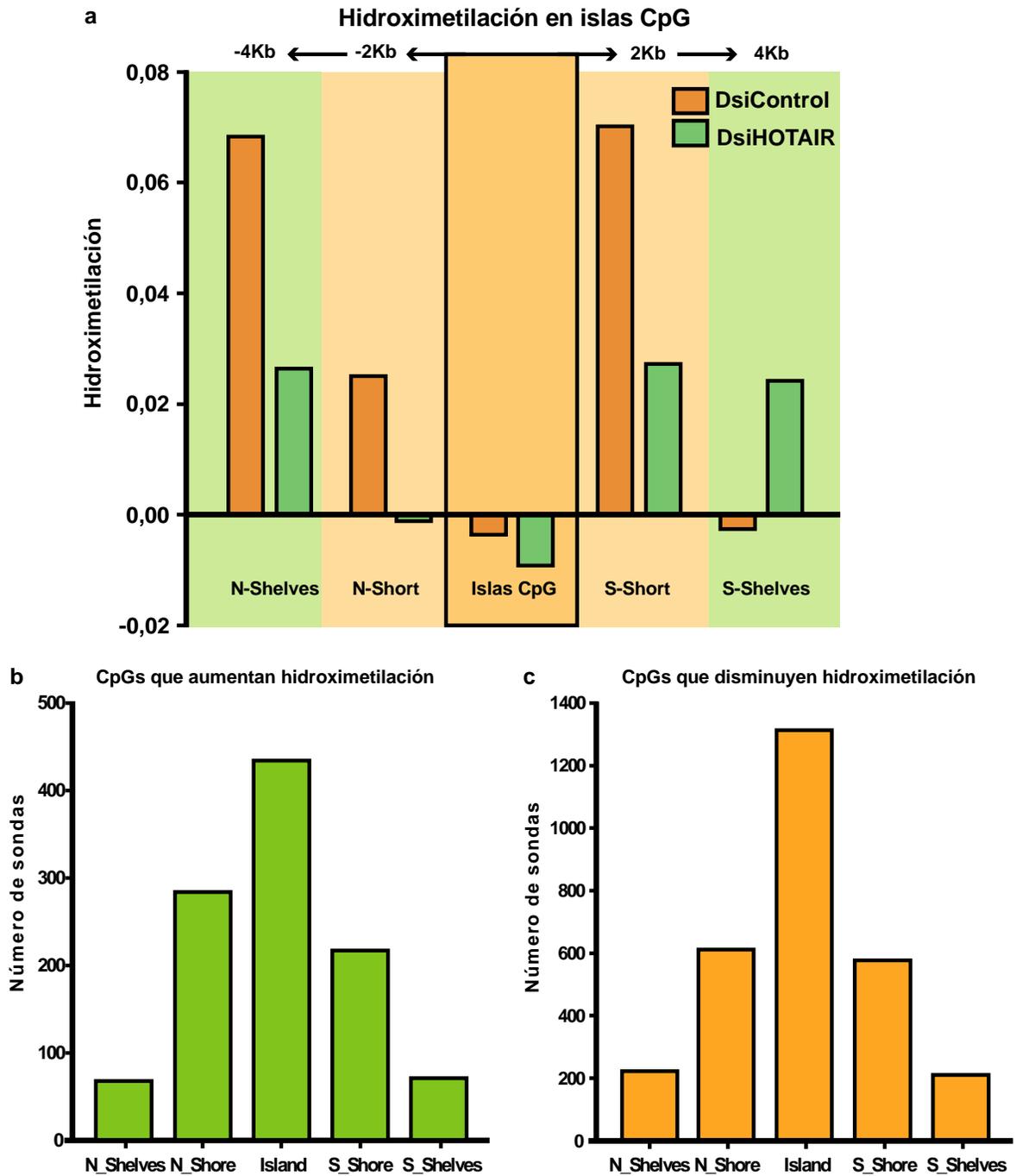
**Figra 4. Niveles de hidroximetilación diferencial.** De los 659,495 sitios CpGs analizados hubo hidroximetilación diferencial en 7,449 CpGs (a y b), lo cual representa 1.12%. CpGs que aumentan hidroximetilación se representan con 1196 genes, y los que disminuyen con 2994 genes(c).

## **Niveles de hidroximetilación en islas CpG**

El genoma humano tiene más de 30000 islas CpG (Jeziorska et al., 2017). Pero la densidad de sitios CpGs es diferente en todo el genoma, en este sentido ya se han clasificado algunas regiones genómicas de acuerdo a su contenido de CpGs. Generalmente, secuencias de aproximadamente 500-1500 pb con alta densidad de CpGs son caracterizadas como Islas CpG. Otras regiones genómicas con una menor densidad en CpGs, se clasifican de acuerdo a su localización respecto a la isla CpG, es decir, regiones genómicas a 2 Kilobases (Kb) de la isla CpG se conocen como islas Short. Regiones genómicas posicionadas a 2Kb de las islas Short se conocen como islas Shelves. Tanto las islas Short como las islas Shelves, pueden estar río arriba (N), como río abajo(S) de la isla CpG (Moran et al., 2015).

Las islas CpG son regiones que se encuentran asociadas promotores, y los promotores son regiones importantes en la regulación transcripcional de un gen (Jeziorska et al., 2017). Además, ya se sabe que el efecto funcional de la hidroximetilación del DNA en promotores, es asociado a la activación transcripcional (Neri et al., 2013). Por ello, analizamos los niveles de hidroximetilación en islas CpG y sus regiones adyacentes. En nuestro estudio encontramos, que el estatus de hidroximetilación disminuye tanto en islas CpG, islas N-Shelves, islas N-Short, islas S-Short, pero aumenta en islas S-Shelves en células HeLa con disminución de HOTAIR (Figura 5a). Si posicionamos la isla CpG en el promotor, podríamos inferir que está cercana al sitio de inicio de la transcripción, y la región S-shelves correspondería al cuerpo del gen. Por lo tanto, estos datos nos permiten sugerir que hay pérdida de hidroximetilación en el promotor y ganancia en el cuerpo del gen.

Además, se analizó el número de sondas que aumentan y disminuyen su nivel de hidroximetilación en las diferentes regiones CpG, y se observó que la mayoría de sondas que aumentan (Figura 5b), como las que disminuyen (Figura 5c) se localizan en la isla CpG. Asumiendo que las islas CpG están en el promotor, entonces estos datos coinciden con lo ya observado previamente en la figura 4c, y sugiere que los cambios en la hidroximetilación por efecto de la disminución de HOTAIR ocurren principalmente en el promotor.



**Figura 5. Niveles de hidroximetilación en islas CpG.** Se obtuvo la media de todas las sondas analizadas para cada región analizada (Isla N-Shelves, N-Short, Isla CpG, S-Short y S-Shelves) en las dos condiciones DsiControl y DsiHOTAIR (a). Se graficó el número de sondas de cada región analizada, perteneciente a los CpGs que aumenta hidroximetilación (b) y a los CpGs que disminuyen hidroximetilación (c).

### **HOTAIR se asocia a vías implicadas en cáncer.**

La mayoría de cambios en los niveles de hidroximetilación, son observados en el promotor (Figura 4c). El efecto funcional de este cambio, podría observarse en el nivel de expresión del gen, lo cual a su vez podría estar afectando vías de señalización relacionadas con la función del gen. Por ello, para determinar la posible implicación funcional de los genes que cambian su nivel de hidroximetilación por efecto de la disminución de HOTAIR, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías utilizando la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) de todos aquellos genes que cambiaran su estatus de hidroximetilación en su promotor. Podemos observar que las vías enriquecidas (con un valor de  $p < 0.05$ ) en las que participan los 937 genes que aumentaron su nivel de hidroximetilación (Figura 4c), son leucemia mieloide crónica, metabolismo de las purinas, contracción vascular del musculo liso, citotoxicidad mediada por células NK, cáncer de pulmón de células pequeñas, vía de señalización de las neurotrofinas, biosíntesis de los ácidos grasos insaturados, diabetes juvenil, vía de señalización de calcio e interacción neuroactiva ligando-receptor (Figura 6a). Mientras que en el grupo de genes que disminuyen su nivel de hidroximetilación en su promotor, participan en vías como melanogénesis, uniones estrechas, moléculas de adhesión celular (CAMs), carcinoma de células basales, adhesiones focales, guía axonal, vía de señalización Wnt, vías en cáncer, interacción neuroactiva ligando-receptor (Figura 6b). Estos resultados concuerdan con lo ya encontrado previamente en el grupo de trabajo (Datos no publicados) donde se observa de manera in vitro que la disminución de HOTAIR disminuye la actividad de la vía de señalización Wnt. Estos datos sugieren que el efecto que tiene HOTAIR en cáncer, podría ser mediado por los niveles de hidroximetilación del DNA.

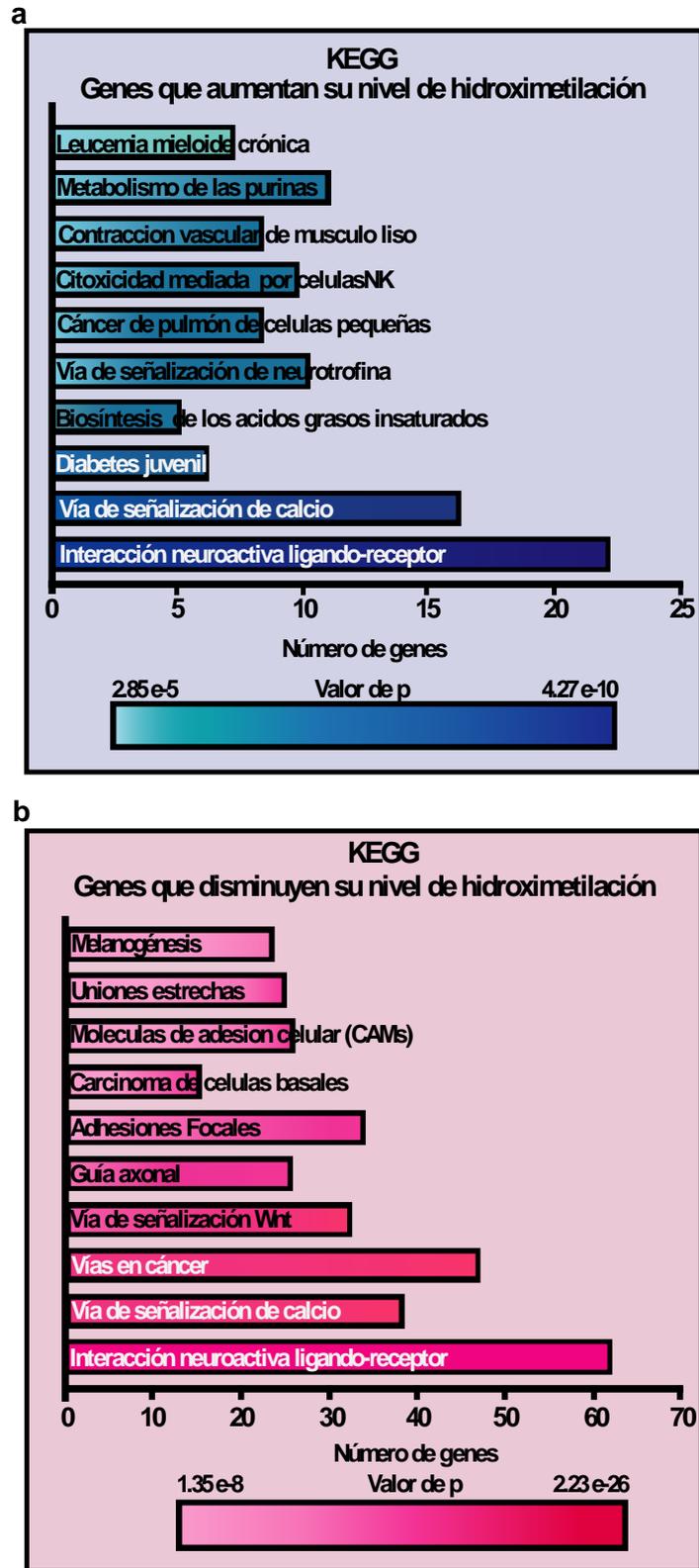
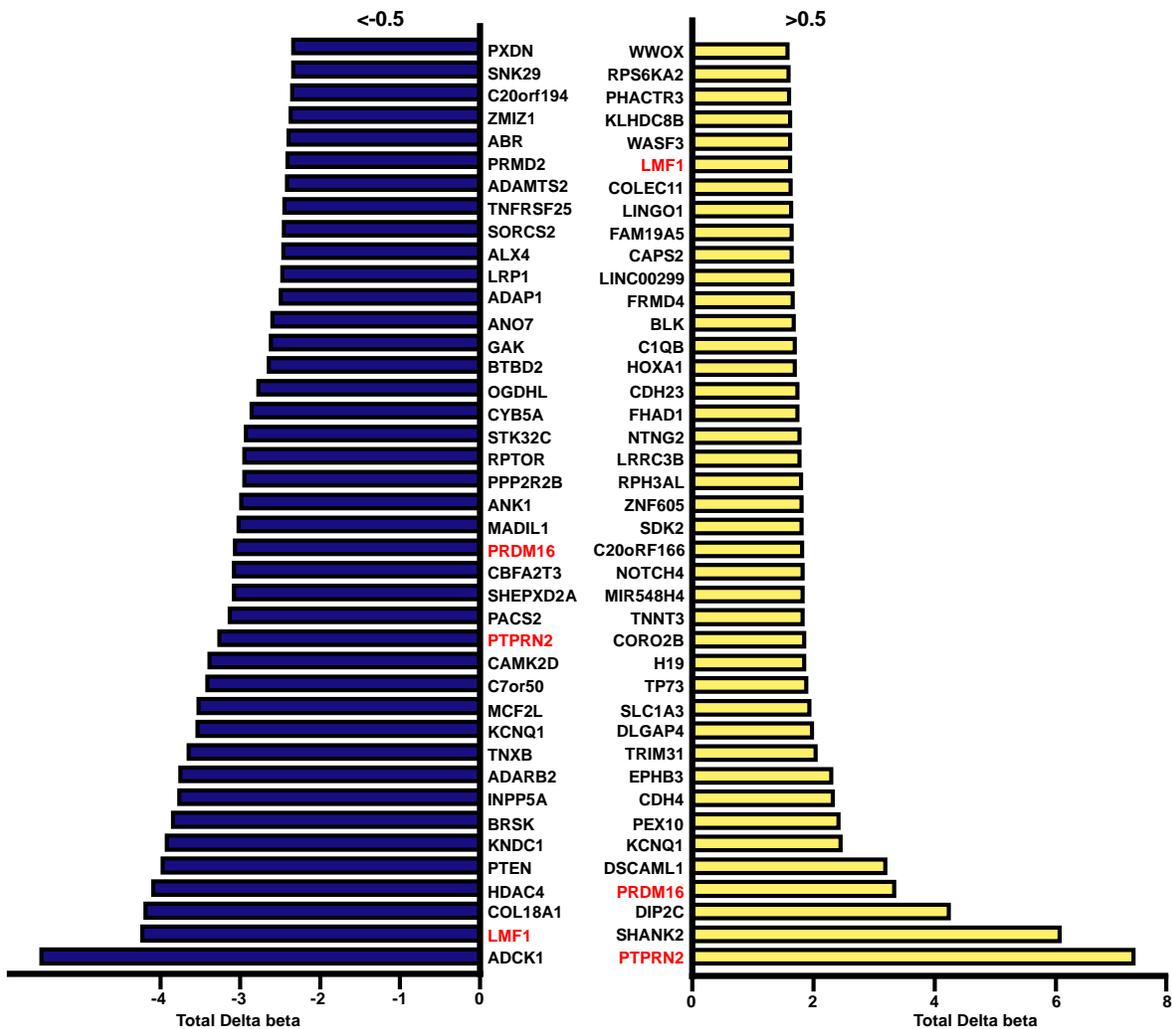


Figura 6. Análisis de enriquecimiento de vías de los genes que cambian su hidroximetilación. Se realizó el análisis en GSEA, y se consideraron como vías enriquecidas aquellas que tuvieron un valor de  $p < 0.5$ .

### Genes que cambian su nivel de hidroximetilación.

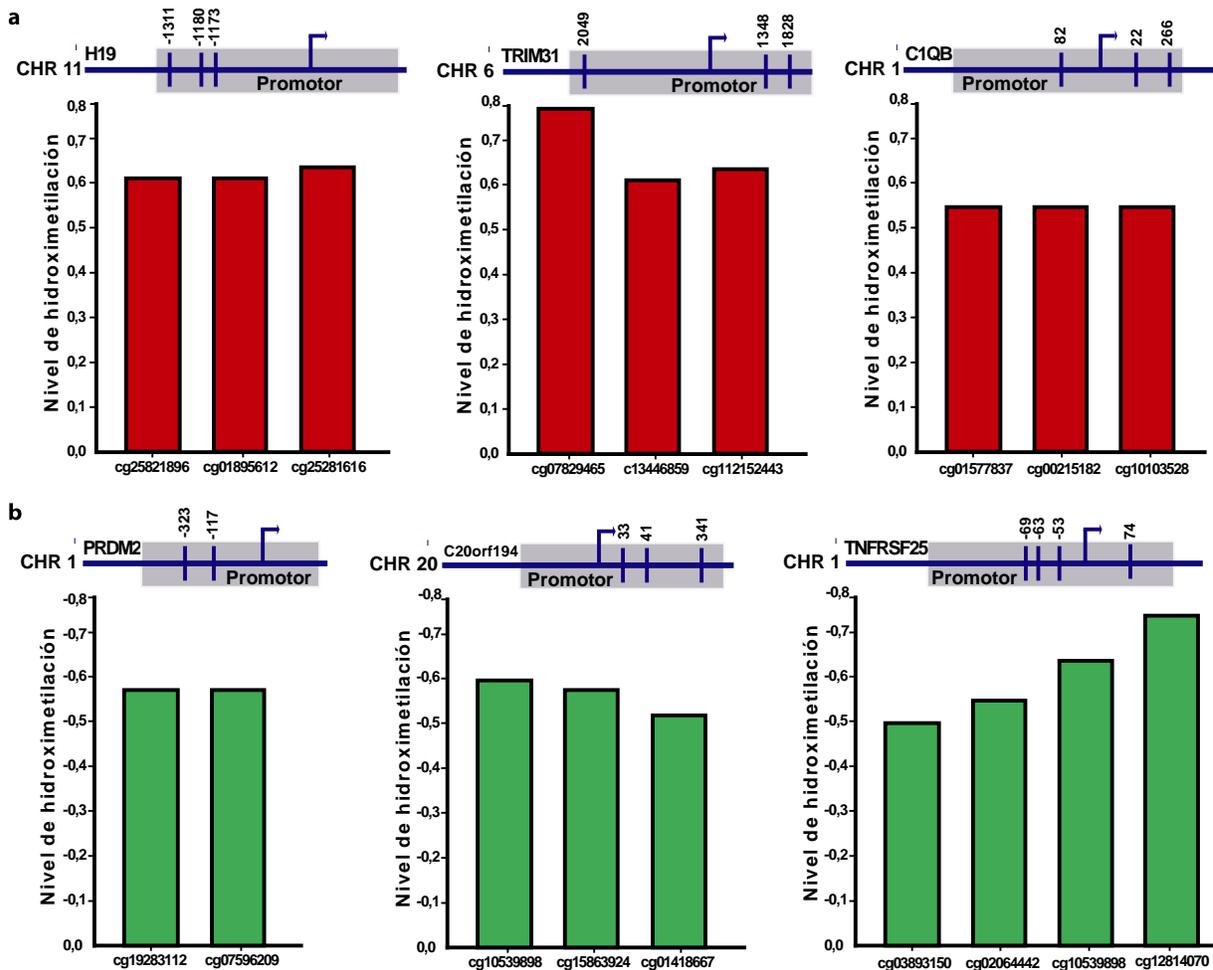
La hidroximetilación del DNA, es una marca epigenética que está distribuida en todo el genoma (Shi et al., 2007). En este sentido, los genes pueden presentar cambios de su nivel de 5hmC en diferentes sitios CpGs. Considerando esto, se realizó un análisis en el que se incluyeron aquellos genes que cambiaron su nivel de hidroximetilación en tres o más sondas, y encontramos que más de 40 genes aumentaron y disminuyeron su nivel de hidroximetilación. Así mismo también observamos, que algunos genes como PRDM16, PTPRN2 y LMF1 en algunas sondas aumentaban y otras disminuían su nivel de hidroximetilación (Figura 7).



**Figura 7. Genes que cambian su hidroximetilación en tres o más sondas.** El total delta beta es representado con la suma de los valores de cada sonda que cambio su hidroximetilación más de 0.5 en barras amarillas, o menos de  $-0.5$  en barras azules. En rojo se muestran los genes que coinciden en ambos grupos.

### Genes que cambian su nivel de hidroximetilación en el promotor.

A pesar de que algunos genes cambian su estatus de 5hmC en diferentes sondas, no todos los cambios ocurren en una misma región. Hasta ahora, la evidencia muestra que el efecto de los niveles de hidroximetilación en promotores se asocia con la activación transcripcional del gen. Por ello, se realizó el análisis de aquellos genes de la figura 7 que aumentarían y disminuirían su nivel de hidroximetilación en el promotor por efecto de la disminución de HOTAIR. Podemos observar que genes como H19, TRIM31, C1QB aumentan en diferentes sondas su nivel de hidroximetilación (Figura 8a). Entre los genes que disminuyen los niveles de 5hmC en el promotor cuando se disminuye a HOTAIR encontramos a PRDM2, C20orf194 y TNFRSF25 (Figura 8b).



**Figura 8. Genes que cambian su hidroximetilación en el promotor.** Genes que aumentan su hidroximetilación en diferentes regiones del promotor (a), y genes que disminuyen su hidroximetilación (b). Cada barra representa una sonda dirigida a un sitio CpG en el promotor. Los cambios son observados en la línea celular HeLa con disminución de HOTAIR respecto al control.

### **La hidroximetilación en el promotor induce la expresión génica.**

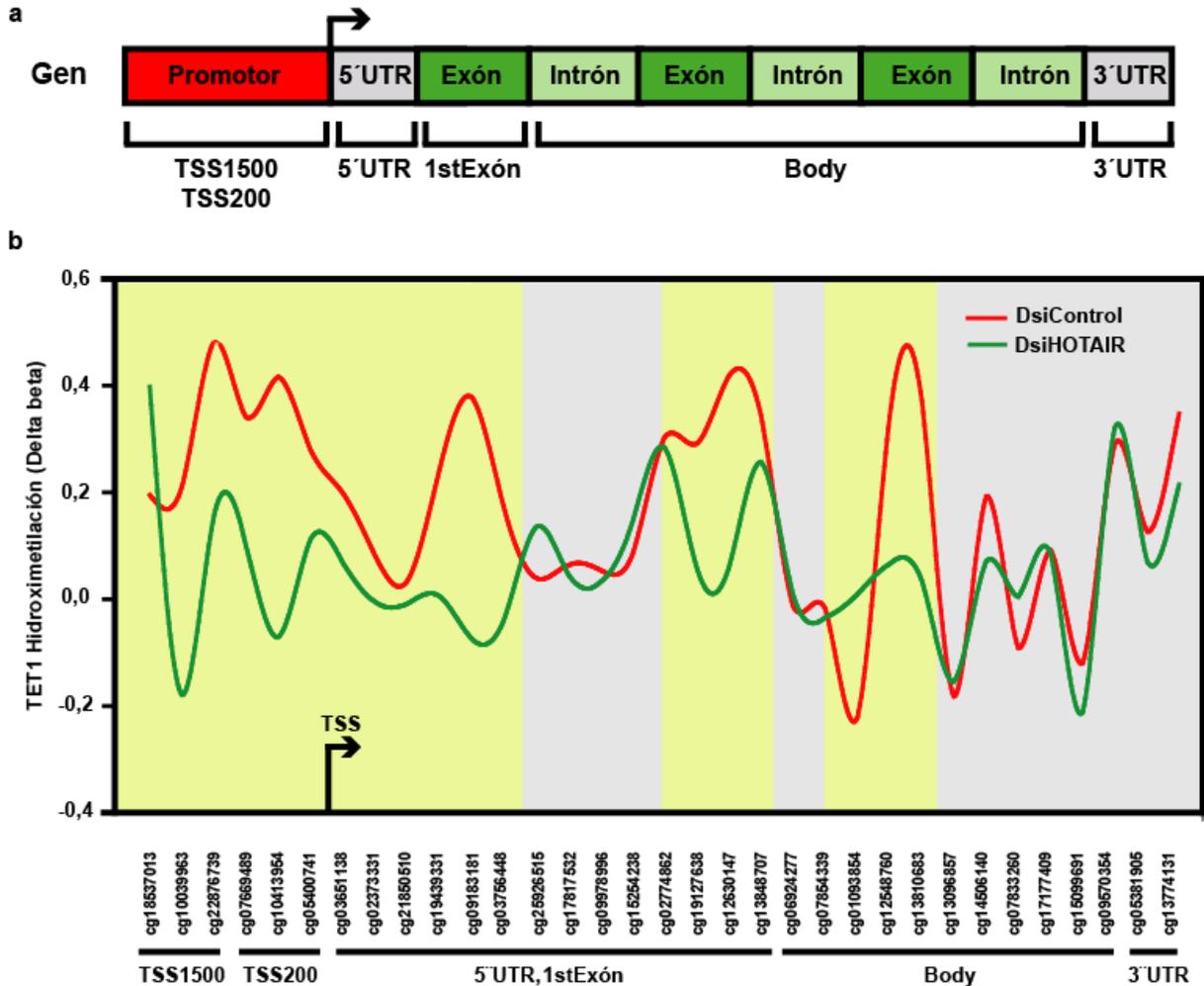
Los patrones de 5hmC varían a través de todo el genoma, y aunque se consideró como cambio valores mayores a 0.5 y valores menores a -0.5, se ha observado que cambios sutiles también pueden influir en el nivel de expresión de un gen. Por ello, en este estudio se realizó un mapeo de todos los sitios CpG analizados para genes que ya se tiene conocimiento de que cambian su nivel de expresión en nuestro modelo de estudio. La ubicación genómica de los CpGs analizados por gen tiene una cobertura que incluye regiones TSS1500 (a 1500 pb del sitio de inicio de la transcripción), TSS200 (a 200 pb del sitio de inicio de la transcripción), 5´UTR, 1stExón (Primer exón), Cuerpo del gen (Body) y región 3´UTR (Figura 9a). Uno de los genes analizados es TET1, el cual observamos que aumenta su nivel de expresión (Figura 1b) cuando se disminuye a HOTAIR. Podemos visualizar que el CpG mapeado con la sonda cg14312538 ubicado en TSS1500, tiene un nivel de 5hmC mayor cuando se disminuye a HOTAIR, sin embargo, a lo largo de todo el gen observamos que la mayoría de CpGs tienen menor hidroximetilación (Figura 9b). Este resultado indica que probablemente este CpG sea importante en la regulación transcripcional de TET1.

Además, también analizamos a IRF1, un gen que codifica para un factor de la transcripción que es considerado un supresor de tumor, ya que regula la expresión de genes involucrados en proliferación, apoptosis y respuesta inmune, eventos alterados en cáncer (Bouker et al., 2018). Nosotros observamos que cuando se disminuye a HOTAIR, IRF1 aumenta sus niveles de 5hmC en las regiones TSS1500 y TSS200, pero en parte de la región 5´UTR y el cuerpo del gen disminuye la hidroximetilación. El efecto de estos cambios se observa en el aumento del nivel de expresión de IRF1 como consecuencia de la disminución de HOTAIR.

CDH2 es un gen que codifica para la proteína N-Cadherina que es un marcador de transición epitelio mesénquima (EMT) (Chen et al., 2018). Determinamos el estatus de 5hmC de este gen y observamos que desde la región TSS1500, TSS200 y parte del primer exón (1stExón) tienen niveles de 5hmC menores en células HeLa con disminución de HOTAIR, pero en algunos sitios del cuerpo del gen (Body) hay un ligero aumento. El análisis de expresión reveló que CDH2 disminuye su nivel de expresión cuando se disminuye a HOTAIR.

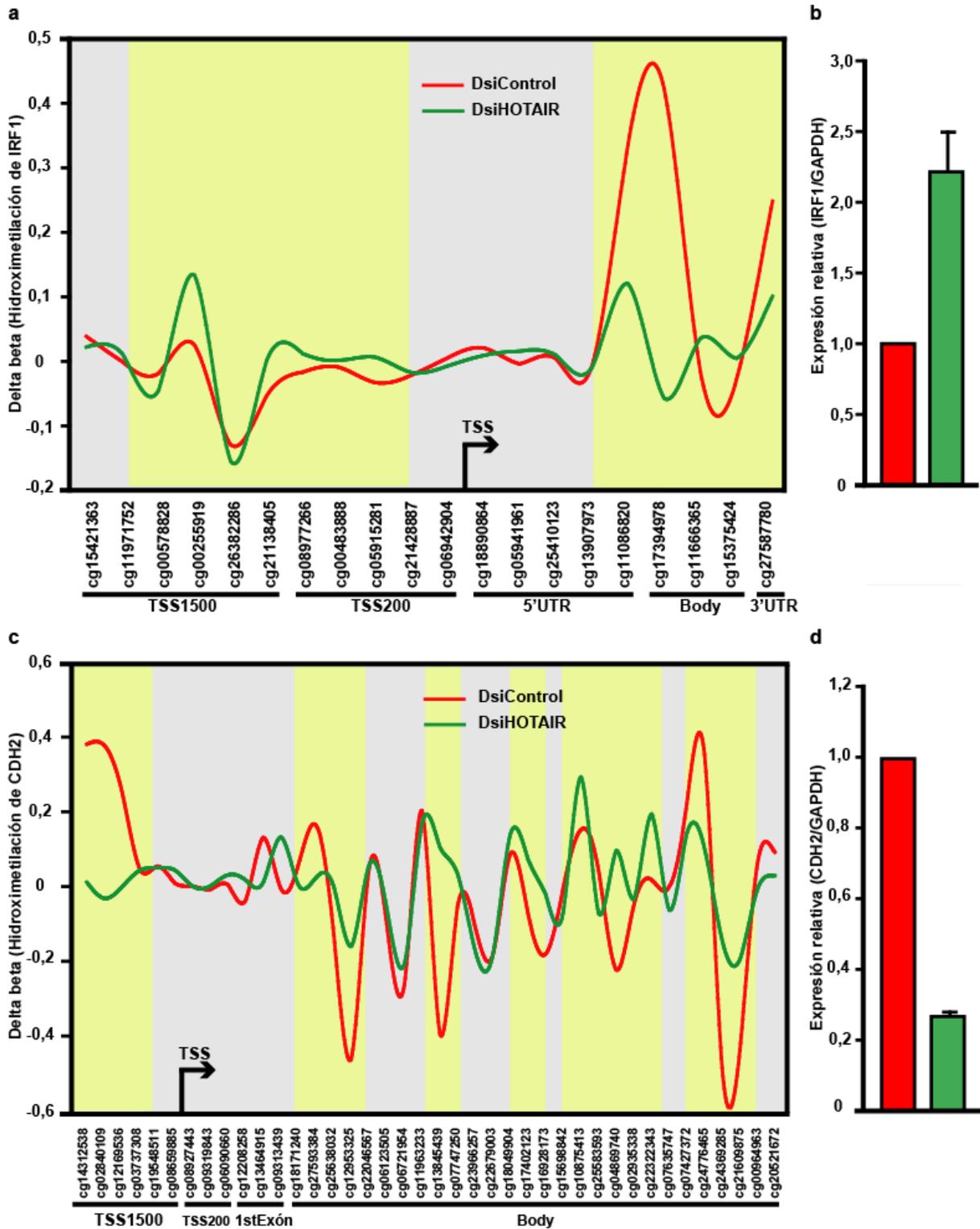
**Efecto de la disminución de HOTAIR en la hidroximetilación global en la línea celular HeLa**

Todos estos resultados obtenidos, nos indican que los niveles de hidroximetilación en el promotor se correlacionan con el nivel de expresión del gen. Además de que el efecto transcripcional que puede tener HOTAIR en algunos genes, podría ser mediado por los cambios en los niveles de 5hmC.



**Figura 9. Niveles de hidroximetilación de TET1.** Las sondas dirigidas a cada gen, están distribuidas en varias regiones genómicas pertenecientes al gen (a). Mapeo del estatus de hidroximetilación para cada sonda analizada en TET1 (b). El sombreado amarillo representa las zonas de cambio.

Efecto de la disminución de HOTAIR en la hidroximetilación global en la línea celular HeLa



**Figura 10. Niveles de hidroximetilación de genes que cambian su nivel expresión.** Estatus de hidroximetilación de cada sonda analizada para los genes IRF1(a), y CDH2 (c). Los niveles de expresión fueron analizados por RT-qPCR, la barra roja representa la línea celular HeLa transfectada con DsiControl y la barra verde con DsiHOTAIR (b, c).

## **Discusión**

Los RNAs largos no codificantes pueden modular la expresión de genes que influyen en la regulación del ciclo celular, supervivencia, respuesta inmune, pluripotencia, entre otras funciones que determinan el fenotipo de células cancerosas (Huarte, 2015), y debido a los procesos biológicos en los que participan los genes regulados por lncRNAs, se ha propuesto a estas moléculas como participantes clave en las características del cáncer (Rao et al., 2017). HOTAIR es uno de estos RNAs, considerado un regulador maestro de genes debido a que induce la expresión de oncogenes y reprime la expresión de genes supresores de tumor (Gupta et al., 2010). Los mecanismos de regulación transcripcional mediados por HOTAIR incluyen el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina como PRC2 (Complejo Represivo Polycom 2), el cual induce la trimetilación de la lisina 27 en la histona 3 (Ma et al., 2014). Sin embargo, en unos estudios ya se ha mostrado que HOTAIR participa en la metilación de genes supresores de tumor como WIF1 y PCDH10 (Lee et al., 2016; Su et al., 2017).

En este estudio nos interesó valorar el efecto de HOTAIR en la hidroximetilación del DNA, debido a que previamente se ha observado un papel importante de HOTAIR en la metilación del DNA, y cambios en los patrones de metilación pueden conducir a cambios en los niveles de hidroximetilación (Li & Liu 2011). Así mismo se ha observado que HOTAIR tiene un efecto en el nivel de expresión de TET1 una de las enzimas que cataliza la hidroximetilación (Figura 1b). Además, estudios previos han reportado que el nivel de expresión de la enzima TET1 y no de TET2 y TET3, esta disminuido tanto en pacientes (Bronowicka-Kłys et al., 2017), como en líneas celulares de cáncer cervical (Ciccarone et al., 2014; Huisman et al., 2016). Por lo que, el efecto que tiene HOTAIR en el nivel de expresión de TET1 podría cambiar los patrones de hidroximetilación del DNA.

En nuestro estudio se realizó la determinación del nivel de hidroximetilación a través de la estimación de la diferencia entre los valores beta BS y oxBS (Figura 2). A pesar de que hay estudios que demuestran que el aumento en el nivel de expresión de TET1 aumenta los niveles de hidroximetilación global, nosotros observamos un resultado contrario a lo reportado previamente (Neri et al., 2013). En algunos estudios, se ha

mostrado que la disminución de HOTAIR disminuye la proliferación celular (Li et al., 2018), la migración y la invasión en la línea celular HeLa (Kim et al., 2015). La alteración de estos procesos, podría sugerir que las características del fenotipo canceroso son reducidas por efecto de la disminución de HOTAIR. En células cancerosas generalmente se observa que los niveles de 5hmC están disminuidos respecto al tejido normal (Li & Liu 2011), por ello, esperábamos que al disminuir a HOTAIR aumentaran los niveles de hidroximetilación global, sin embargo, el resultado obtenido fue totalmente contrario (Figura 2c). En este contexto ya se ha reportado que en algunas líneas celulares de cáncer hay aumento de los niveles globales de 5hmC, tal es el caso de cáncer pancreático (Bhattacharyya et al., 2013).

También analizamos el estatus de hidroximetilación por cromosoma y encontramos que en el cromosoma 1, los niveles de 5hmC son mayores en células HeLa con disminución de HOTAIR (Figura 3), a pesar de que no hay estudios que muestren diferencias en los niveles de 5hmC, si hay reportes de manera más particular que han encontrado que en diferentes tipos de cáncer hay pérdida del locus del cromosoma 1p36 (Bagchi & Mills, 2008). Este locus es importante debido a que alberga genes que son catalogados como genes supresores de tumor. Además, también se ha relacionado la disminución o pérdida de la expresión de estos genes debido hipermetilación en su promotor (Mori et al., 2017). Por lo tanto, el aumento en el nivel de hidroximetilación de este cromosoma podría sugerir que los genes localizados ahí, serán re-expresados cuando se disminuyen los niveles de HOTAIR.

La distribución genómica de la hidroximetilación tiene un efecto funcional dependiendo de que regiones genómicas que sean hidroximetiladas (Wu et al., 2011). Cuando se analiza el perfil de 5hmC por regiones genómicas, observamos que, los niveles de 5hmC disminuyen en islas shelves-N, islas short-N, islas CpG, islas short-S, y aumenta en islas shelves-S (Figura 5a). Estos datos concuerdan con lo ya reportado, donde observa que la hidroximetilación en células de cáncer pancreático está disminuida en promotores, exones, islas CpG e islas shore (Bhattacharyya et al., 2013).

El efecto funcional que tiene la hidroximetilación es relacionada con la actividad transcripcional del gen. Por ello, para conocer la posible implicación funcional de los

cambios en el nivel hidroximetilación, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías de aquellos genes que cambiaron su hidroximetilación en regiones promotoras. Encontrando que 937 genes aumentaron y 2074 disminuyeron su nivel de 5hmC (Figura 4c), cabe destacar que los genes que los dos grupos de genes estaban involucrados en vías que ya se han reportado como alteradas o desreguladas en cáncer (Figura 6). Pero es interesante observar que algunos de los genes que disminuyen su hidroximetilación están implicados en la vía de señalización de Wnt (Figura 6b), una vía comúnmente alterada en varios tipos de cáncer humano (Zhan et al., 2016). A pesar de que nuestro análisis para el enriquecimiento de vías no incluye una metodología experimental, previos análisis en nuestro grupo de trabajo revelan que HOTAIR puede modular la actividad de esta vía de señalización (Tesis de doctorado Salmeron-Barcenas Erick Genaro). Así mismo, estos datos concuerdan con lo ya reportado en otros modelos celulares, donde se observa que la sobreexpresión de HOTAIR activa esta vía de señalización (Li et al., 2016). Además, de manera independiente también se ha observado que, en modelos celulares de cáncer de colon, la re-expresión TET1 induce el aumento en la expresión de reguladores negativos de la vía Wnt (Neri et al., 2015) y en consecuencia la reducción de la actividad de esta vía de señalización.

También analizamos el estatus de 5hmC en el promotor de diferentes genes. H19 es un RNA largo no codificante que ha sido considerado supresor de tumor (Yoshimizu et al., 2008). TRIM31 es una proteína que regula negativamente el ciclo celular (Li et al., 2014). C1QB es un gen que se ha observado que en glioblastoma disminuye su expresión (Janoueix-Lerosey et al., 2004). En estos genes se encontró que aumentan su hidroximetilación en el promotor, por lo que podemos sugerir que aumentarían su nivel de expresión (Figura 8a). Mientras que en PRDM2 (miembro de la superfamilia de metiltransferasas de histonas/proteínas), C20orf194 (gen no caracterizado) y TNFRSF25 (miembro de la familia de receptores TNF) disminuyeron su nivel hidroximetilación en el promotor (Figura 8b). Si bien, en estos genes no se evaluó el nivel de expresión, para determinar el efecto de la hidroximetilación en la expresión de genes, se analizó la hidroximetilación en genes de los que ya se conoce el nivel de expresión en células HeLa con disminución de HOTAIR. Uno de estos genes es TET1

(Figura 1b), IRF1 y CDH2, tanto para TET1 e IRF1 encontramos que sus niveles de expresión aumentan, y que en sitios particulares de la región TSS1500 de ambos genes hay aumento de hidroximetilación (Figura 9b, 10a y 10b). Mientras que CDH2 disminuye su expresión y observamos que desde la región TSS1500, TSS200 y parte del primer exón (1<sup>ts</sup>Exón) tienen niveles de 5hmC menores en células HeLa con disminución de HOTAIR, pero en algunos sitios del cuerpo del gen (Body) hay un ligero aumento de hidroximetilación (Figura 10c y 10d). Estos resultados nos sugieren que la hidroximetilación del DNA en promotores se asocia con la activación transcripcional.

### **Conclusiones**

- La disminución de HOTAIR disminuye el nivel de hidroximetilación global en la línea celular HeLa.
- HOTAIR tiene un papel importante en cáncer mediante la regulación de vías de señalización asociadas a esta patología, y el efecto de HOTAIR en estas vías, puede ser mediado por su efecto en la hidroximetilación del DNA.
- El aumento en los niveles de hidroximetilación en el promotor de TET1, e IRF1 mediados por la disminución de HOTAIR, se asocia al aumento de sus niveles de expresión.

## Referencias

- Allis, C.D. & Jenuwein, T., 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature reviews. Genetics*, 1, pp.1–14.
- Bagchi, A., & Mills, A. A. (2008). The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer research*, 68(8), 2551-2556.
- Baxter, E., Windloch, K.G., Frank, L., Jason, S., (2011). Epigenetic regulation in cancer development. *Frontiers in Bioscience*, 16(1), pp. 2-11.
- Beckedorff, F.C. Amaral, M.S., Deocesano-Pereira, C. y Verjovski-Almeida S. (2013) "Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics", *Bioscience4 reports*, 33(4), pp. 667–675.
- Bhattacharyya, S., Pradhan, K., Campbell, N., Mazdo, J., Vasantkumar, A., Maqbool, S., & Grealley, J. M. (2017). Altered hydroxymethylation is seen at regulatory regions in pancreatic cancer and regulates oncogenic pathways. *Genome research*.
- Bronowicka-Kłys, D. E., Roszak, A., Pawlik, P., Sajdak, S., Sowińska, A., & Jagodziński, P. P. (2017). Transcript levels of ten-eleven translocation type 1-3 in cervical cancer and non-cancerous cervical tissues. *Oncology Letters*, 13(5), 3921-3927.
- Ciccarone, F., Valentini, E., Bacalini, M.G., Zampieri, M., Calabrese, R., Guastafierro, T. *et al.*, (2014). Poly (ADP-ribosyl)ation is involved in the epigenetic control of *TET1* gene transcription, *Oncotarget*, 5(21), pp. 10356-10367.
- Costa, F. F. (2010) Non-coding RNAs: Meet thy masters, *Bioessays*, 32, pp. 5 Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nature medicine*, 21(11), 1253-1261.
- Fang, S., Gao, H., Tong, Y., Yang, J., Tang, R., Niu, *et al.*, (2015) Long noncoding RNA-HOTAIR affects chemoresistance by regulating HOXA1 methylation in small cell lung cancer cells, *Laboratory Investigation*, 96, pp. 60-68.
- Gao, F., Xia, Y., Wang, J., Lin, Z., Ou, Y., Liu, X. *et al.*, (2014). Integrated analyses of DNA methylation and hydroxymethylation reveal tumor suppressive roles of ECM1, ATF5, and EOMES in human hepatocellular carcinoma, *Genome Biology*, 15(533), pp.1-13.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G., Song, H., (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423–434.
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, Jeewon., Horlings, H. M., Wong, D. J. *et al.*, (2010) Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis, *Nature*, 464,1071–6.
- Hajjari, M., & Salavaty, A. (2015). HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer biology & medicine*, 12(1), 1.

- Hanahan, D. & Weinberg, R. a., (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Herceg, Z., & Hainaut, P. (2007). Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular oncology*, 1(1), 26-41.
- Huisman, C., van der Wijst, M. G., Schokker, M., Blancafort, P., Terpstra, M. M., Kok, K. *et al.*, (2016). Re-expression of selected epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes in cervical cancer by TET2-directed demethylation. *Molecular Therapy*, 24(3), 536-547.
- Hofmann, S., Bure, I., Agaimy, A., Hartmann, A., Haller, F. y Moskalev, E. (2015) Long non-coding RNA HOTAIR affects DNA methylation patterns in gastrointestinal stromal tumours (GIST), *European Journal of Cancer Supplements*,13,1,pp. 20-21
- Jeziorska, D. M., Murray, R. J., De Gobbi, M., Gaentzsch, R., Garrick, D., Ayyub, H., & Graham, B. (2017). DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity during differentiation and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(36), E7526-E7535.
- Kagohara, L. T., Stein-O'Brien, G. L., Kelley, D., Flam, E., Wick, H. C., Danilova, L. V. *et al.*, (2017). Epigenetic regulation of gene expression in cancer: techniques, resources and analysis. *Briefings in functional genomics*, 17(1), 49-63.
- Lacobuzio-Donahue, C. A. (2009). Epigenetic changes in cancer. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*, 4, 229-249.
- Lee, N. K., Lee, J. H., Kim, W. K., Yun, S., Youn, Y. H., Park, C. H. *et al.*, (2016). Promoter methylation of PCDH10 by HOTAIR regulates the progression of gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget*, 7(46), 75307.
- Li, M., Gao, F., Xia, Y., Tang, Y., Zhao, W., Jin, C., ... & Wang, Y. (2016). Filtrating colorectal cancer associated genes by integrated analyses of global DNA methylation and hydroxymethylation in cancer and normal tissue. *Scientific reports*, 6, 31826.
- Li, J., Yang, S., Su, N., Wang, Y., Yu, J., Qiu, H., & He, X. (2016). Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR leads to chemoresistance by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human ovarian cancer. *Tumor Biology*, 37(2), 2057-2065.
- Liu, X., Liu, Z., Sun, M., Liu, J., Wang, Z. y De, W. (2013b) The long non-coding RNA HOTAIR indicates a poor prognosis and promotes metastasis in non-small cell lung cancer, *BMC cancer*, 13, pp. 1-1099–608.
- Marchal, C., & Miotto, B. (2015). Emerging concept in DNA methylation: role of transcription factors in shaping DNA methylation patterns. *Journal of cellular physiology*, 230(4), 743-751.
- Matthias, W., Liou, W., Pulverer, W., Singer, C. F., Rappaport-Fuerhauser, C., Kandioler, D., ... & Weihäusel, A. (2013). Cytosine 5-hydroxymethylation of the LZTS1 gene is reduced in breast cancer. *Translational oncology*, 6(6), 715-IN27.

- Merry, C. R., Forrest, M. E., Sabers, J. N., Beard, L., Gao, X. H., Hatzoglou, M. *et al.*, (2015). DNMT1-associated long non-coding RNAs regulate global gene expression and DNA methylation in colon cancer. *Human molecular genetics*, 24(21), 6240-6253
- Moran, S., Arribas, C., & Esteller, M. (2016). Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*, 8(3), 389-399.
- Neri, F., Dettori, D., Incarnato, D., Krepelova, A., Rapelli, S., Maldotti, M., ... & Oliviero, S. (2015). TET1 is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the WNT pathway. *Oncogene*, 34(32), 4168.
- Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Brugmann, S. A. *et al.*, (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *cell*, 129(7), 1311-1323.
- Sharma, S., Kelly, T. K. y Jones, P. A. (2010) "Epigenetics in cancer", *Carcinogenesis*, 31(1), pp. 27–36.
- Shi, D. Q., Ali, I., Tang, J., & Yang, W. C. (2017). New insights into 5hmC DNA modification: generation, distribution and function. *Frontiers in genetics*, 8, 100.
- Shukla, A., Sehgal, M., Sing, R. S. (2015) Hydroxymethylation and its potential implication in DNA repair system: A review and future perspectives. *Gene*. pp.1-10.
- Su, C., Li, J., Cao, Y., Xiao, L., & Shi, C. (2017). Long noncoding RNA HOTAIR promotes cisplatin resistance in gastric cancer through promoting WIF-1 promoter methylation. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(2), 2717-2726.
- Tan, L., and Shi, Y. G., (2012) Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease, *Development*, 139, pp. 1895-1902
- Timp, W., & Feinberg, A. P. (2013). Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nature Reviews Cancer*, 13(7), 497-510.
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, *et al.*, (2015) Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347(6220):1260419.
- Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C. *et al.*, (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation, *Nature*, 439, pp. 871-874.
- Weiwei, L., and Min, L., (2011) Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine in Different Human Tissues, *Journal of Nucleic Acids*, pp. 1-6.
- Zhao, Y., Sun, H., & Wang, H. (2016). Long noncoding RNAs in DNA methylation: new players stepping into the old game. *Cell & Bioscience*, 6(1), 45.