

UNIVERSIDAD DE LA SABANA

FACULTAD DE MEDICINA

Doctorado en Biociencias



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LA HISTONA DEMETILASA KDM4C EN EL DESARROLLO DEL
CÁNCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO**

Memoria presentada para optar al título de doctor

Presentada por:

Jeison García Serrano

Director:

Fernando Lizcano Losada

CHIA, CUNDINAMARCA

2018

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE LA SABANA

FACULTAD DE MEDICINA

Doctorado en Biociencias



PAPEL DE LA HISTONA DEMETILASA KDM4C EN EL DESARROLLO DEL
CÁNCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO

Memoria presentada para optar al título de doctor

Presentada por:

Jeison García Serrano

Director:

Fernando Lizcano Losada

CHIA, CUNDINAMARCA

2018

Nota de aceptación

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Bogotá, Colombia. 2018

DEDICATORIA

A Edilma, Cindy, Nicolás y Anita, el verdadero motor

que me impulsa día a día

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme permitido vivir hasta este día. Por haber sido mi luz, mi roca y mi camino. Por los retos que enfrente a su lado y la fortaleza que me otorgo en los momentos de debilidad.

Le doy las gracias a mi madre, sin su esfuerzo no sería la persona que soy hoy. Gracias por tus consejos y el cariño que siempre has demostrado para este hijo que te quiere. Gracias también a Jonathan y Dany, que juntos y cada una de nuestras familias somos una aún más grande.

A mi familia, Cindy, Nico y Anita, el regalo más grande y la razón para levantarme cada mañana. Gracias por su paciencia, su comprensión, las alegrías y tristezas que hemos compartido y todas las experiencias que quedan por venir.

Gracias especiales al Dr. Fernando Lizcano Losada, que con su calidad profesional y personal no solo fortaleció mis conocimientos, sino mi espíritu y creencias. Gracias por su comprensión, apoyo y guía.

Agradezco a cada uno de los profesores que me acompañaron desde mi niñez, este paso no sería posible sin sus enseñanzas.

Gracias también a la Universidad de La Sabana, por acogerme como estudiante, apoyarme e ilustrarme en los campos necesarios para crecer personal y profesionalmente.

Le agradezco a mis compañeros de doctorado y laboratorio, Diana, Wendy, Daniel... siendo tantos no alcanza el espacio para nombrar a cada uno, por toda

su colaboración y compañía, porque de una manera u otra también contribuyeron a este logro.

Gracias especiales también al Japanese Foundation for Cancer reseach (Ganken), al Dr. Toru Hirota y a su grupo por acogerme y enseñarme tantas nuevas perspectivas que me permitieron dar una nuevo rumbo a todo mi trabajo.

Gracias a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia- FIDIC y al grupo de procesos agro-industriales de la Universidad de La Sabana. Dr. Hernando Curtidor, Dra. Maria Isabel Quintanilla y Dr. Luis Eduardo Diaz, sin su colaboración no podría haber completado los experimentos necesarios para culminar este trabajo.

Gracias a todos los que están y a los que nos acompañarán siempre en espíritu... por creer y enseñarme a confiar en mí. Muchas gracias a todos.

CONTENIDO

1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	12
1.1. <i>La expresión génica y la epigenética</i>	12
1.2. <i>Modificaciones epigenéticas</i>	13
1.2.1. <i>Modificaciones del ADN: Metilación</i>	16
1.2.2. <i>Modificaciones epigenéticas de las proteínas</i>	17
1.2.2.1. <i>Citrulinación</i>	17
1.2.2.2. <i>Ribosilación</i>	18
1.2.2.3. <i>Fosforilación</i>	19
1.2.2.4. <i>Isomerización cis-trans</i>	20
1.2.2.5. <i>Ubiquitinación</i>	21
1.2.2.6. <i>Sumolización</i>	22
1.2.2.7. <i>Acetilación</i>	23
1.3. <i>Metilación de histonas</i>	25
1.3.1. <i>Amina Oxidasas</i>	28
1.3.2. <i>Oxigenasas: Jumonji-Containing Domain Proteins</i>	30
1.3.2.1. <i>Histona demetiladas de la familia KDM4</i>	33

1.3.2.1.1. KDM4A.....	35
1.3.2.1.2. KDM4B.....	35
1.3.2.1.3. KDM4D y KDM4E	36
1.3.2.2. <i>Papel de KDM4C en el fenotipo celular</i>	37
1.3.3. <i>Potencial terapéutico de las KDM</i>	39
2. CAPITULO II. LA ACTIVIDAD DE KDM4C MODULA LA PROLIFERACION CELULAR Y LA SEGREGACION CROMOSOMICA EN LINEAS CELULARES DE CANCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO.	42
2.1. <i>Introducción</i>	42
2.2. <i>Métodos empleados</i>	47
2.2.1. <i>Cultivo celular e inhibición de la actividad enzimática</i>	47
2.2.2. <i>Ensayos de Inmunofluorescencia (IFA)</i>	48
2.2.3. <i>Ensayos de proliferación</i>	49
2.2.4. <i>Análisis estadístico</i>	50
2.3. <i>Análisis de Resultados</i>	50
2.3.1. <i>KDM4C se localiza en los cromosomas durante la mitosis</i>	51
2.3.2. <i>La inhibición de KDM4C incrementa los errores durante la segregación cromosómica</i>	54

2.3.3. *La proliferación celular se afecta por la inhibición de KDM4C*.....57

3. CAPITULO III. KDM4C ES RECLUTADA A LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS Y ES RELEVANTE PARA LA ESTABILIDAD CROMOSÓMICA, MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR EN UNA LÍNEA DE CÁNCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO.....59

3.1. *Introducción*59

3.2. *Métodos Empleados*.....61

3.2.1. *Cultivo celular e interferencia del ARN*61

3.2.2. *Western blot*61

3.2.3. *Ensayos de Inmunofluorescencia (IFAs)*.....62

3.2.4. *Ensayos de proliferación*.....63

3.2.5. *Ensayos de migración e invasión*64

3.2.6. *Análisis Kaplan-Meier*64

3.2.7. *Análisis estadístico*.....65

3.3. *Análisis de Resultados*.....65

3.3.1. *KDM4C se asocia con los cromosomas mitóticos y está involucrada en la segregación mitótica*.....66

3.3.2. *KDM4C es importante para la proliferación celular*69

3.3.3.	<i>El silenciamiento de KDM4C reduce la migración celular de HCC38</i>	71
3.3.4.	<i>Pacientes con altos niveles de expresión de KDM4C presentan una mejor prognosis</i>	74
4.	DISCUSIÓN	75
5.	CONCLUSIONES	81
6.	RECOMENDACIONES	83
7.	LISTA DE TABLAS	85
8.	LISTA DE FIGURAS	86
9.	REFERENCIAS	88
10.	LISTA DE ANEXOS	123

1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. *La expresión génica y la epigenética*

La complejidad del ser humano se concentra en los más de 30000 genes que componen nuestro genoma, almacenando la información necesaria para la expresión de macromoléculas en espacio y tiempo específicos, permitiendo el mantenimiento del fenotipo celular [1]. La regulación de la expresión génica envuelve la modificación de la estructura compleja del ADN nuclear, alterando la complejidad del enrollamiento de la doble hebra en un octámero de proteínas histonas como parte de la unidad básica de la cromatina: el nucleosoma [2, 3].

El nucleosoma fue descrito por el premio nobel de química en 1974, Roger Kornberg [3], y está compuesto por un octámero de cuatro proteínas llamadas histonas (H3, H4, H2A y H2B), proteínas muy básicas alrededor de las cuales se enrollan 147 pares de bases de ADN dando 1,65 vueltas y cuya estructura se interconecta con los nucleosomas adyacentes mediante la histona H1. Las histonas se caracterizan por dos dominios principales: una región central plegada, que interactúa con el DNA, formada por una α -hélice larga flanqueada por dos α -hélices cortas, y un dominio N-terminal poco estructurado, de 15 a 30 residuos, denominado “cola de histona” y el cual es blanco de modificaciones post-transcripcionales que afectan la estructura de la cromatina y su función [3-6]. Así pues, las modificaciones de la cromatina representan el principal nivel de regulación para todos los procesos metabólicos del ADN, entre los que se incluyen

la transcripción, recombinación, reparación del ADN, replicación, formación del centrómero, división celular, y en conjunto todas las señales biológicas que dan lugar a las respuestas moleculares que permiten conservar la homeostasis de las células.

La epigenética, entendida como aquellos fenotipos estables y heredables que resultan de cambios a nivel cromosómico sin afectar la secuencia primaria del ADN, involucra la modificación de la estructura de la cromatina, como resultante de la adición/remoción de grupos funcionales covalentes a las histonas y el ADN [7]. En este marco, variaciones en la estructura o grado de compactación de la cromatina llevan a la regulación de la expresión de los genes asociados a una región específica del genoma, al facilitar o dificultar el acceso de las proteínas nucleares requeridas para tal proceso.

1.2. Modificaciones epigenéticas

Estos mecanismos involucran alteraciones como la metilación del ADN sobre el carbono 5' de la citosina en regiones ricas en los di-nucleótidos CpG, así como modificaciones post-traduccionales de las histonas, incluyendo la metilación, citrulinación y ADP-ribosilación de arginina (esta última también presente sobre residuos de ácido glutámico, aspártico, asparragina y lisina); metilación, acetilación, biotilación, ubiquitinación y sumolización de lisina; fosforilación de serina, tirosina y treonina, y la isomerización cis-trans de la prolina (Figura 1) [4, 8-10]. Por otra parte, junto con la actividad enzimática de los diferentes grupos de proteínas encargadas de estas modificaciones, se ha descrito la importancia de

secuencias de ARN no codificantes, los cuales tienen la capacidad de regular la expresión génica a nivel transcripcional, post-transcripcional y epigenético [11], junto con su asociación con el mantenimiento de la homeostasis celular, relacionada con diferentes alteraciones en los perfiles de expresión de estas macromoléculas los cuales han sido observados en el desarrollo de gran número de patologías como Alzheimer, Huntington, Parkinson, afecciones cardiovasculares, y cáncer de seno y vejiga [12].

Cada una de estas modificaciones tiene su efecto característico sobre el nivel de expresión de un gen. En el caso de las modificaciones post-traduccionales de las histonas, mientras la adición de grupos acetilo se relaciona con activación de la transcripción, la metilación de lisina puede asociarse con la activación o represión en función del residuo metilado y el grado de metilación, dando nacimiento al llamado “código de histonas”. Frente a la importancia de estos fenómenos de regulación, se ha descrito ampliamente la influencia de alteraciones en las diferentes rutas que los involucran así como en las proteínas asociadas a dichos mecanismos de regulación en el desarrollo de un gran número de enfermedades, incluyendo afecciones a nivel neurológico, endocrino, y aquellas capaces de alcanzar un carácter sistémico como el cáncer [13-17].

En consecuencia, grandes esfuerzos se han dirigido a la identificación y caracterización de los diferentes reguladores epigenéticos cuyo fenotipo ha sido alterado en líneas tumorales, con el fin de identificar blancos terapéuticos potenciales para el desarrollo de nuevas y más eficientes estrategias de

1.2.1. Modificaciones del ADN: Metilación.

Consiste en la adición de un grupo metilo (CH_3) al ADN, principalmente en regiones ricas en residuos de citosina-guanina (llamadas islas de dinucleótidos CpG, donde “p” hace referencia al grupo fosfato que los une) [32, 33]. Esta modificación asociada con la represión de la transcripción es mediada por las ADN metiltransferasas, se presenta en las zonas reguladoras de la expresión génica, y alteraciones en su patrón normal de metilación pueden inducir la expresión aberrante de genes en los diferentes tejidos en los que se encuentran silenciados; por ejemplo, se ha observado frecuentemente una reducción en los niveles de metilación del ADN en las regiones reguladoras de genes comprometidos en el desarrollo de tumores del colon, páncreas, estómago, hígado, pulmón, riñón, cérvix y seno [34, 35]. De esta forma la hipometilación puede favorecer la inestabilidad genómica, especialmente en regiones próximas a los centrómeros y subteloméricas, resultando en la pérdida de heterocigocidad y la inadecuada expresión de genes que hacen parte de la heterocromatina facultativa.

La metilación del ADN está catalizada por distintas familias de ADN metiltransferasas (DNMTs) formando 5'-metil-citosina. Durante la fase S, las DNMTs copian el patrón de metilación de la hebra parental a la hebra hija del ADN, de forma que la metilación se hereda tras la división celular [33]. Existe una relación funcional entre metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas, ya que se ha demostrado la participación de proteínas de unión al ADN metilado (Methyl-CpG-binding domain proteins, MBD) en el

reclutamiento/inhibición de los complejos proteicos con actividad histona deacetilasa e histona metiltransferasa en la cromatina [36, 37]. Estas regiones suelen estar hipo-acetiladas e hiper-metiladas en residuos específicos de histonas como H3K9 y H3K27 mientras que los promotores de genes activos, no metilados, presentan hiperacetilación de H3 y H4 y metilación de H3K4.

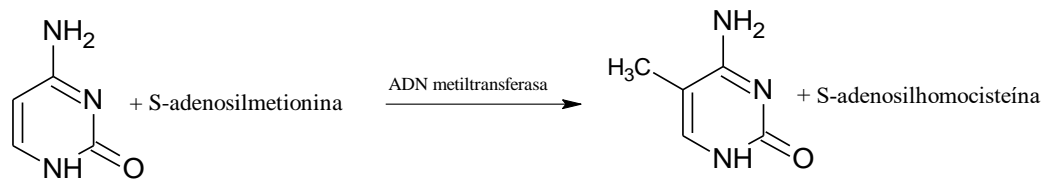


Figura 2. Patrón de la Metilación del ADN. La ADN metiltransferasa adiciona un grupo metilo al heterociclo presente en la citosina, empleando S-adenosilmetionina como fuente del grupo a adicionar.

1.2.2. Modificaciones epigenéticas de las proteínas

1.2.2.1. Citrulinación

La citrulinación consiste en la conversión de un residuo de arginina de una proteína en un residuo de citrulina. Las enzimas encargadas de esta conversión son las peptidilarginin deaminasas, mediante la substitución de un grupo cetiimino por un grupo ceto. La citrulinación de proteínas representa un blanco de ataque para el sistema inmune, y ha sido ampliamente asociada con el desarrollo de enfermedades de tipo reumatoide [38-40].

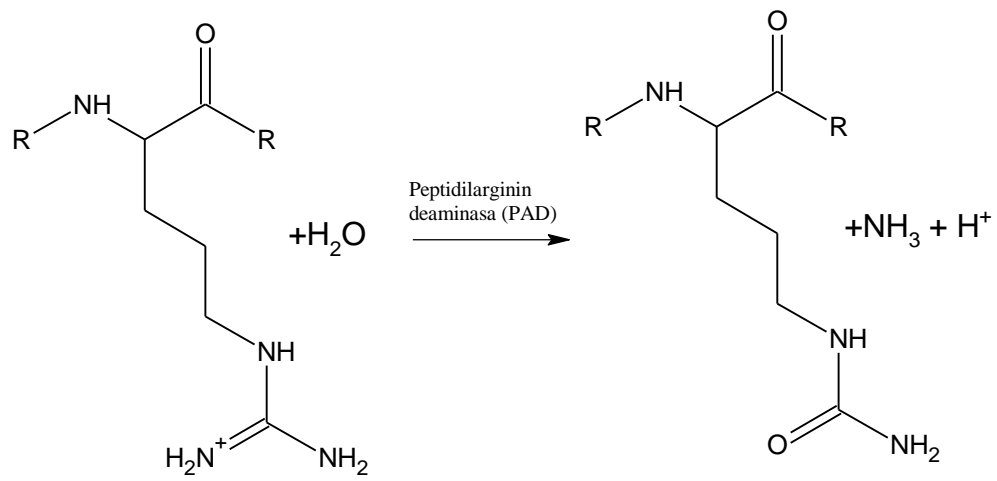


Figura 3. Citrulinación de proteínas. La enzima peptidilarginil deaminasa elimina el grupo amino terminal de la arginina, convirtiendo este aminoácido en un residuo de citrulina. La modificación de la carga positiva de este residuo altera los perfiles de interacción de este residuo con otras moléculas.

1.2.2.2. Ribosilación.

La ADP-ribosilación es una modificación post-traduccional que implica la adición de uno o más grupos ADP a residuos de arginina, y participa en procesos de apoptosis, respuesta al daño al ADN, proliferación celular, transducción de señales y transcripción, entre otros. Estas modificaciones son catalizadas por la familia de enzimas ADP-ribosiltransferasas, que transfieren uno o varios grupos ADP-ribosil a un residuo de arginina, lisina, cisteína, ácido glutámico, ácido aspártico y asparragina [41].

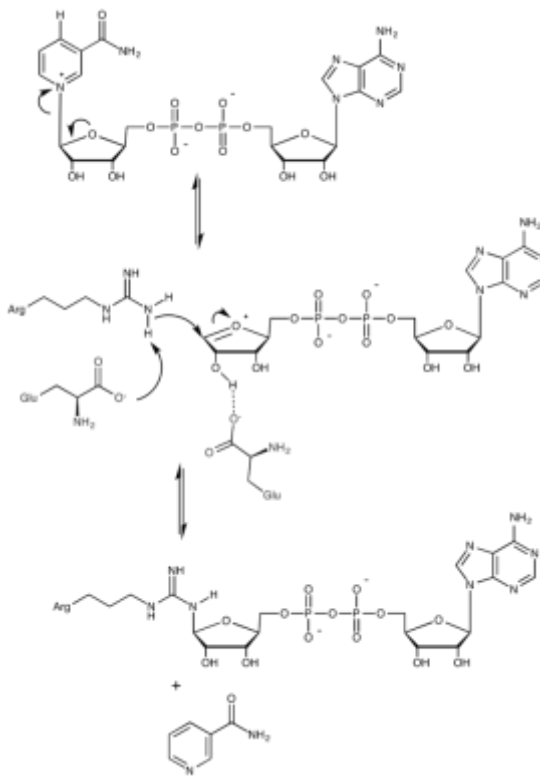


Figura 4. ADP-ribosilación de arginina. Las enzimas ADP-ribosil transferasas emplean nicotinamida adenina dinucleotido (NAD⁺, parte superior de la figura) como molécula donante, en la cual el rompimiento del enlace entre la nicotinamida y la ribosa produce un ion oxonio. Que facilita el ataque nucleofílico del residuo de arginina. El residuo es entonces adenilado, liberando nicotinamida

1.2.2.3. Fosforilación

Los procesos de fosforilación a nivel de los residuos de serina, treonina y tirosina en gran número de proteínas son de gran importancia en las cascadas de transducción de señal dependientes de quinasas (enzimas que adicionan el grupo fosfato) y fosfatasas (enzimas que retiran el grupo fosfato) [42], y su alteración se encuentra asociada con el desarrollo de diferentes enfermedades metabólicas y

degenerativas entre las que se cuentan la diabetes tipo II, hiperplasia y Enfermedad de Alzheimer [43].

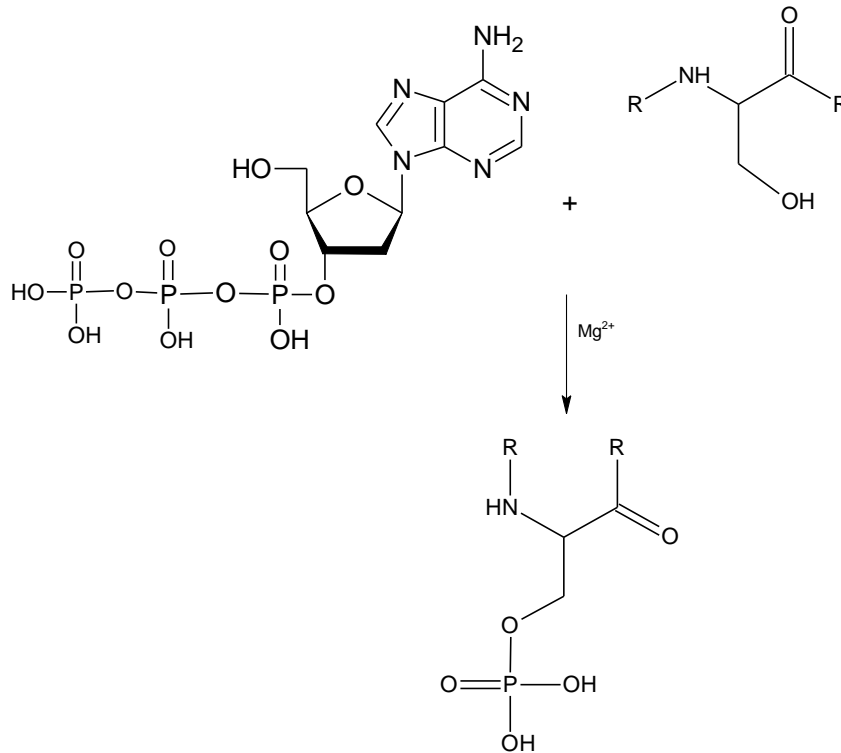


Figura 5. Fosforilación de serina. La transferencia de un grupo fosfato empleando una molécula de ATP como fuente es facilitada por serin/treonin proteína quinasas en presencia de Mg²⁺.

1.2.2.4. Isomerización cis-trans

La isomerización cis-trans de la prolina regula la cinética de plegamiento molecular de las proteínas, en función de la diferencia en la repulsión estérica alrededor del enlace peptídico. Durante la síntesis proteica, los ribosomas incorporan los residuos de prolina exclusivamente en su forma trans, la cual puede ser modificada por la acción de la familia de enzimas peptidil-prolil isomerasas [44].

Entre las proteínas blanco de esta modificación se encuentran importantes factores en el desarrollo de desórdenes psiquiátricos, neurodegeneración, infecciones virales y cáncer, lo que ha despertado gran interés en la búsqueda de inhibidores específicos para modular la actividad de esta familia de enzimas con fines terapéuticos [45, 46].

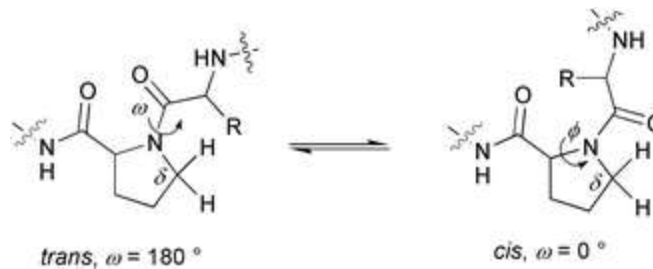


Figura 6. Isomerización cis-trans prolina. Debido a su estructura única, la prolina es el único alfa aminoácido con la capacidad de cambiar su configuración cis-trans en torno al enlace peptídico que esta forma al interior de péptidos y proteínas, alterando así la estructura de la macromolécula.

1.2.2.5. Ubiquitinación.

La ubiquitina es una proteína altamente conservada de 76 aminoácidos comúnmente adicionada al amino épsilon de un residuo de lisina de la proteína blanco. Esta modificación puede realizarse en diferentes residuos de lisina (multiubiquitinación) o mediante la adición de dos o más moléculas de ubiquitina sobre el mismo residuo (poliubiquitinación). La ubiquitinación ha sido ampliamente asociada con el marcaje de proteínas para su acortamiento o degradación por parte del proteasoma, así como participa en procesos de respuesta inmunológica, inflamación, transcripción, reparación del ADN, biogénesis y desarrollo celular,

entre otros [47-50]. En adición, defectos en las ubiquitina ligasas han sido asociadas con diferentes patologías incluyendo atrofas musculares, múltiples formas de neoplasia, alteraciones del sistema inmune, infecciones virales, entre otros [51-54].

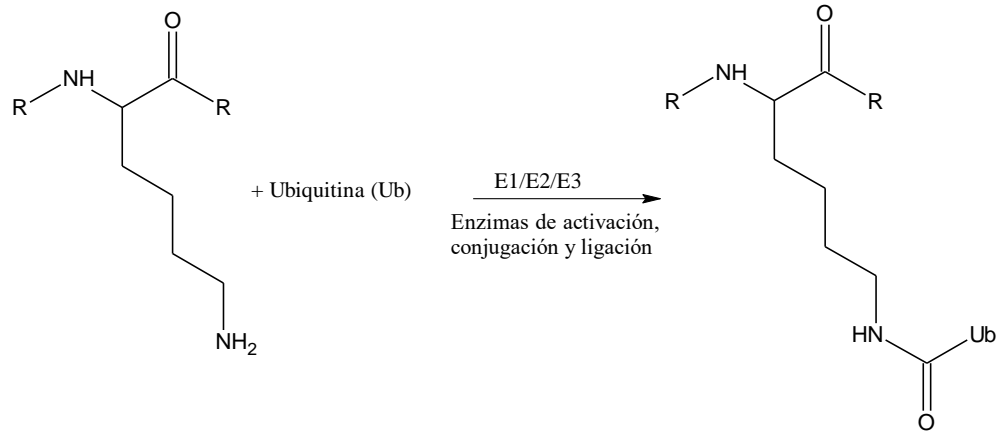


Figura 7. Ubiquitinación de la Lisina por acción de las enzimas de activación (E1), conjugación (E2) y ligación (E3). El proceso puede repetirse en múltiples residuos de la proteína a ubiquitinar.

1.2.2.6. Sumolización

Las proteínas SUMO (small ubiquitin-related modifiers) son macromoléculas de estructura similar a la ubiquitina, y las cuales, a diferencia de la marcación hacia la degradación proteosómica dirigida por la ubiquitina, dirigen diferentes procesos incluyendo la importación de proteínas al núcleo, transcripción, apoptosis, senescencia y estabilidad proteica [55]. Alteraciones en la regulación de esta modificación post-traducciona ha sido asociada con desórdenes neurológicos, cáncer, infecciones virales, entre otros [56-59].

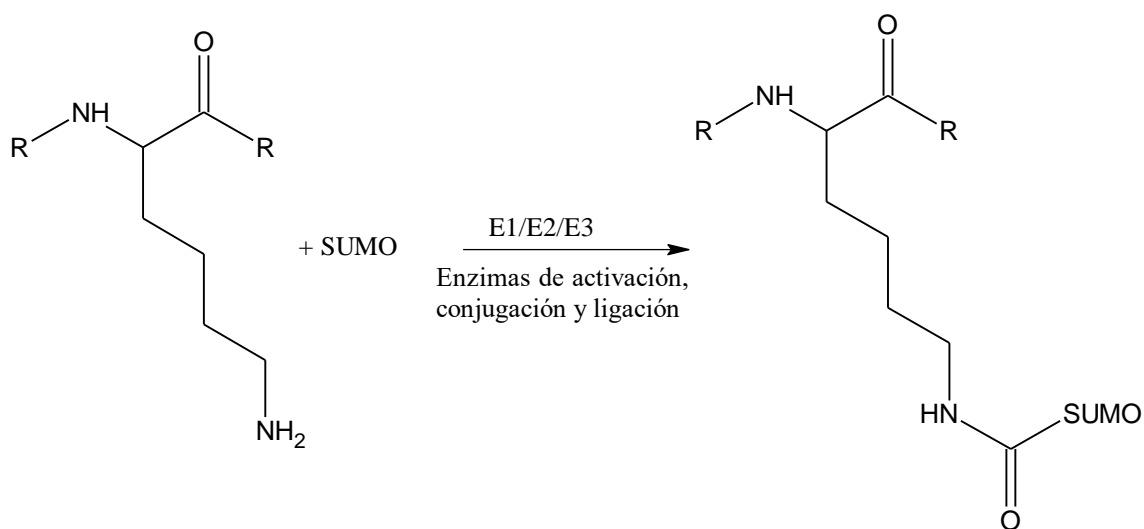


Figura 8. SUMOlicaci3n de lisina. La adici3n de la familia de prote3nas SUMO comparte un mecanismo similar al proceso de ubiquitinaci3n, catalizada de igual manera por complejos enzimáticos de activaci3n, conjugaci3n y ligaci3n.

1.2.2.7. Acetilaci3n

La acetilaci3n de histonas tiene lugar en m3ltiples residuos de lisina y es llevada a cabo por varios tipos de enzimas conocidos como HATs (Histone acetilases). La mayor3a de las HATs forman parte de grandes complejos multiproteicos y se agrupan en distintas familias como GNAT, MYST, CBP/p300, etc. Los miembros de la familia Gcn5/PCAF (GNAT) funcionan como coactivadores de distintos activadores de la transcripci3n. Contienen un dominio acetil-transferasa y un bromo-dominio, por el que se unen a los residuos de acetil-lisinas, el cual fue el primer dominio de uni3n a histonas caracterizado estructuralmente. En adici3n, la familia p300/CBP tambi3n ha sido extensamente estudiada, siendo reguladores m3s globales de la transcripci3n [60, 61].

La deacetilación de histonas por el contrario se correlaciona con compactación de la cromatina y represión transcripcional. Hay varias familias de histonas deacetilasas (HDAC): clase I (HDAC 1, 2, 3 y 8), clase II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10), clase IV (HDAC 11) y la clase III NAD-dependiente de la familia SIRT (sir-tuinas). Las HDAC de clase I, las histona-deacetilasas más conocidas, están presentes en numerosos complejos de represión junto con co-represores como el correceptor de receptor nuclear 1 (NcoR), correceptor de receptor nuclear 2/mediador de los receptores de hormona tiroidea y retinoides (SMRT), factor mielóide similar a ELF-1 (MEF), proteína de unión a metil CpG (MeCP2), proteína con hélices emparejadas anfipáticas (Sin3A), entre otros, que son atraídos a regiones específicas de la cromatina para reprimir la expresión génica [60, 61].

Esta modificación sucede específicamente en aminoácidos básicos como lisina y arginina, y las proteínas involucradas en la conservación/eliminación del grupo acetilo han sido ampliamente estudiadas como blancos terapéuticos en el tratamiento de diferentes tipos de patologías como cáncer (de próstata, pulmón, glioblastomas, entre otros), enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes [62-65].

La importancia de la acetilación está directamente asociada a su conocido papel en la regulación de la expresión génica. Siendo una de las modificaciones postraduccionales más ampliamente estudiadas, se ha determinado que en presencia de hiper-acetilación, las histonas interactúan débilmente con el ADN y la cromatina se encuentra transcripcionalmente activa, mientras que la cromatina

hipo-acetilada se encuentra silenciada debido a la unión fuerte entre los grupos amino de la lisina y los grupos fosfato del esqueleto estructural del ADN

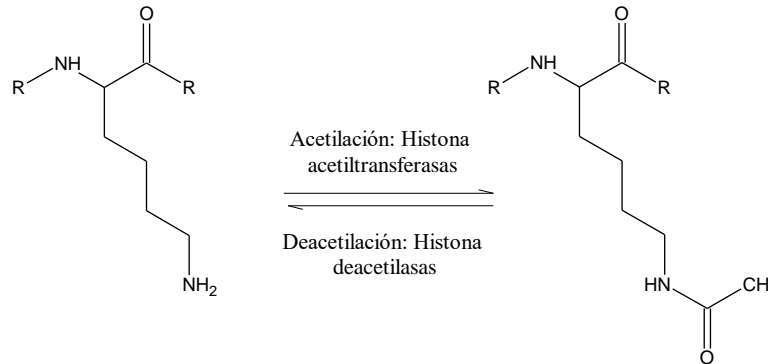


Figura 9. Acetilación/Deacetilación de Lisina en histonas. Representación esquemática de la reacción que controla la acetilación-deacetilación.

1.3. Metilación de histonas

En gran parte de procesos celulares, las modificaciones covalentes inducidas por metilación involucran aminoácidos de carácter básico como arginina, histidina y lisina. En las histonas, los residuos de arginina pueden ser estos residuos pueden ser mono o dimetilados de manera simétrica o asimétrica, mientras que la lisina puede ser encontrada en su forma mono, di o trimetilada.

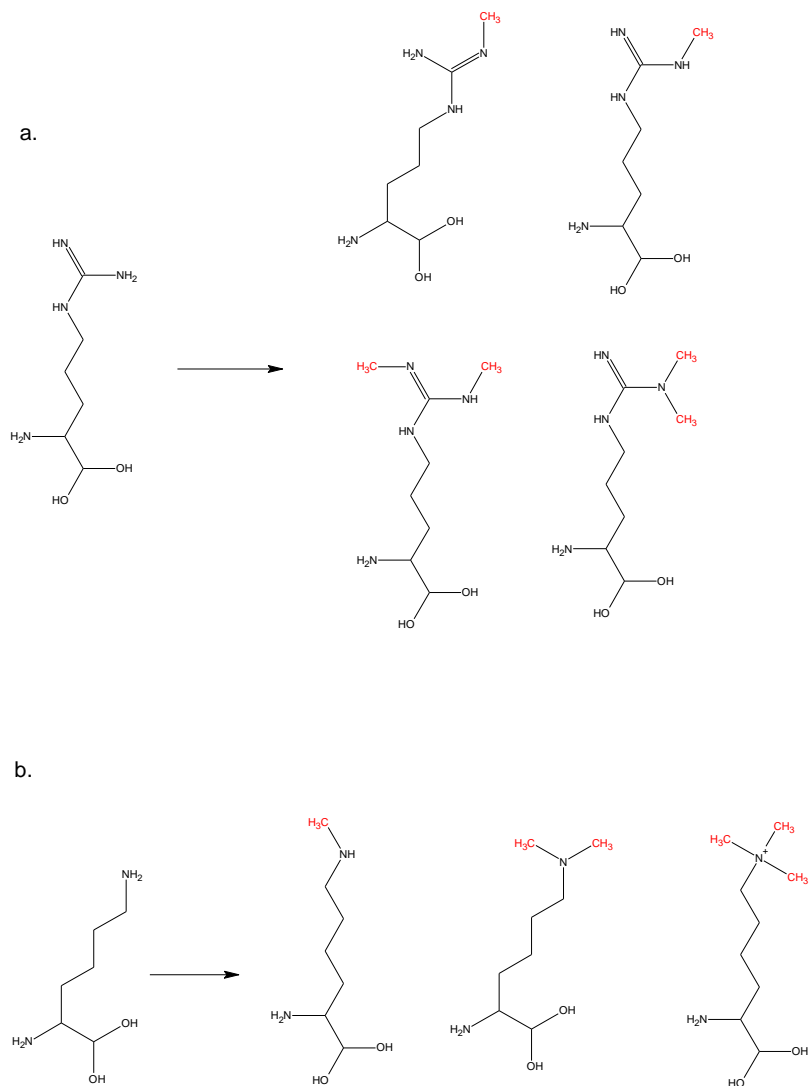


Figura 10. Patrones de metilación de a. arginina y b. lisina. En función de su estructura, la monometilación de la arginina puede generar diferentes estructuras sobre el extremo terminal de este aminoácido. En el caso de la lisina, el grupo amino terminal puede ser mono, di o trimetilado, generando diferentes efectos sobre la estructura e interacción de la proteína blanco de estas modificaciones.

Como parte de las modificaciones post-transcripcionales de las histonas, la metilación se consideró por amplio tiempo como una marca estable e irreversible

de la cromatina, tomando en cuenta que las tasas de cambio en esta modificación eran comparables con los de las mismas histonas [66]. Sin embargo, en el año 2004 Shi et al. describieron el mecanismo de acción de la primera demetilasa específica a lisina (LSD-1), también conocida como KDM-1 (Lysine (K) demethylase 1), rompiendo el paradigma de la metilación irreversible y abriendo un nuevo panorama en la investigación de estas proteínas y su asociación con los mecanismos epigenéticos de regulación [67].

La aparición de nuevas tecnologías de secuenciación y análisis han permitido la identificación del patrón de metilación de las histonas en el genoma humano [68], permitiendo a su vez establecer asociaciones entre el fenotipo celular y la metilación-demetilación como parte del desarrollo celular y en procesos relacionados con la aparición de diferentes patologías. Al interior del nucleosoma, las histonas H3 y H4 son los principales blancos de estas modificaciones, cuyas alteraciones han sido asociadas con el desarrollo de diferentes formas del cáncer [69]. La adición de grupos metilo a estos componentes del nucleosoma es catalizada por diferentes enzimas agrupadas en tres clases principales: a) histona metil-transferasas específicas de lisina conteniendo el dominio SET. Son las responsables de las metilaciones en las histonas H3 (residuos K4, K9, K27, K36) y H4 (K20); b) lisina metil-transferasas sin dominio SET, que metilan a H3K79 y c) arginina metiltransferasas que metilan distintos residuos de arginina en las histonas H3 y H4 [70, 71].

Dichas observaciones han despertado un gran interés en la caracterización de las

diferentes proteínas asociadas a la regulación epigenética de la metilación de las histonas, entre las cuales las recientemente descritas histona demetilases han tomado un papel protagónico como blancos prometedores para futuros tratamientos contra las células tumorales. Tras su descubrimiento, se ha adelantado un gran esfuerzo en la identificación y caracterización de las diferentes proteínas con actividad demetilasa sobre residuos de las histonas. Las principales proteínas descubiertas a la fecha son aquellas pertenecientes a la superfamilia amina oxidasa, enzimas dependientes de flavin adenina dinucleotido (FAD) como cofactor, y la superfamilia oxigenasa, cuya actividad demetilasa es dependiente de Fe(II) y α -cetoglutarato, asociada con la presencia de un dominio característico denominado Jumonji, familias que serán analizadas en detalle a continuación.

1.3.1. Amina Oxidasas

Este grupo de proteínas con actividad dependiente de FAD presenta dos miembros principales: KDM-1A y KDM-1B. Los miembros de esta familia catalizan la oxidación y degradación de monoaminas como los neurotransmisores y algunas poliaminas como espermidina, cadaverina o putrescina. Su mecanismo de actividad involucra la transferencia de un hidrogeno de un grupo metilo de una lisina mono- o di-metilada para producir un intermediario imino que posteriormente libera una molécula de formaldehído y el producto demetilado (Figura 11).

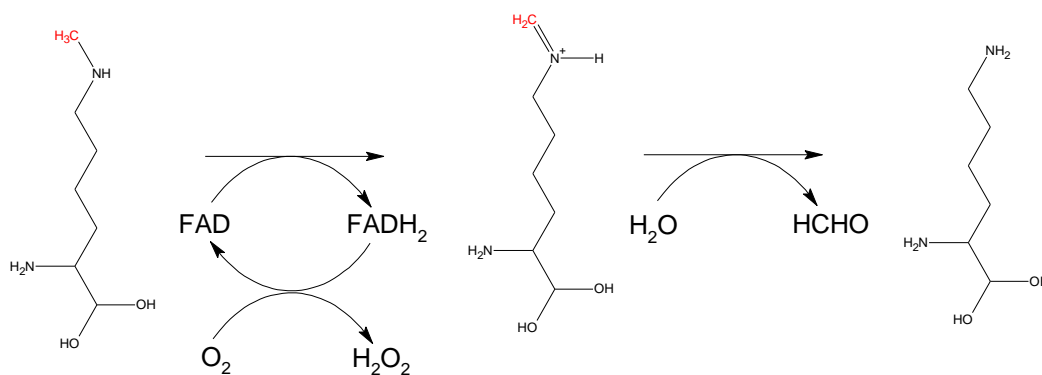


Figura 11. Mecanismo de acción de las Amina oxidasas. Esta familia de enzimas emplea FAD como cofactor, generando un intermediario imino que permite la remoción de grupos metilo a partir de residuos mono- o di-metilados de lisina, liberando formaldehído como subproducto.

KDM-1A, también conocida como LSD-1 (Lysine Demethylase-1), corresponde a la primer histona demetilasa en ser descubierta [67] y su actividad está dirigida sobre las formas mono- y dimetilada de la lisina 4 de la histona 3. Esta importante proteína participa en una gran variedad de procesos biológicos incluyendo la formación de órganos durante el desarrollo embrionario, hematopoiético, neuronal y osteogénico [72], y ha sido asociada con el crecimiento tumoral y metástasis en diferentes tipos de cáncer como neuroblastoma [73], cáncer colorectal [74], leucemia [75], cáncer de seno [76] cáncer de próstata [77], entre otros.

Por otra parte, la función biológica de KDM-1B es desconocida aun en gran medida. Principalmente se ha descrito su importancia como enhancer de la transcripción de regiones de la cromatina con alto nivel de codificación génica [78] y en el mantenimiento de la impronta genómica materna [79, 80], con una posible relevancia biológica en la proliferación y desarrollo del cáncer de seno [81].

1.3.2. Oxigenasas: Jumonji-Containing Domain Proteins

En contraste con la actividad mono- y di-metilasa de los miembros de la familia amina oxidasa, las proteínas con actividad oxigenasa presentan la capacidad única de eliminar grupos de la forma trimetilada de la lisina, mediante la formación de un intermediario hidroximetil que permite la eliminación del metilo como formaldehído (Figura 12).

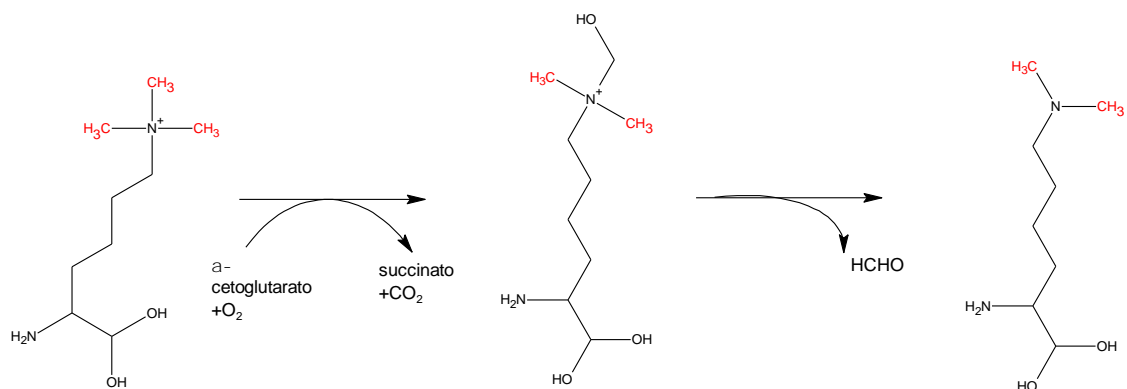


Figura 12. Mecanismo de acción de los miembros de la familia Oxigenasa. Estas proteínas emplean alfa-cetoglutarato como cofactor y en presencia de oxígeno producen un intermediario hidroximetil, que les permite realizar su actividad demetilasa sobre residuos tri-metilados de lisina.

Los miembros de esta familia de proteínas comparten como característica principal la presencia del dominio *jumonji*, descrito en 1995 por Takeuchi y colaboradores en la recién descubierta proteína *jmj*, y cuyo nombre deriva de la forma anormal

del surco neural en ratones mutantes en *jmj*, el cual adopta una estructura cruciforme, que en japonés traduce *Jumonji* [82].

Se han descrito dos dominios jumonji presentes en los miembros de esta familia de proteínas, *jmjN* y *jmjC*. Entre las más de 100 proteínas descritas en diferentes especies con estos dominios, se ha identificado que bien pueden poseer solo el dominio *jmjC* o ambos dominios en su estructura [83, 84]; siendo este dominio *jmjC* el responsable de la actividad demetilasa de estas proteínas modificadoras de histonas.

Junto con la presencia de los dominios característicos, diferentes regiones de importancia han sido descritas en las proteínas parte de la familia jumonji. Algunos de estos incluyen el dominio ARID de unión a ADN; dominios de interacción proteína-proteína como el TPR (del inglés tetratico-peptide repeat), Tudor, F-BOX y LRR-1 like (Leucine-rich repeats); dominios de unión proteína-ADN como el PHD (plant homeodomain) y dedos de zinc (ZF, zinc finger) [84, 85] (Figura 13).

La actividad de la familia de proteínas jumonji se centra en la demetilación de los residuos tri- y di-metilados de lisina 9, 27 y 36 de la H3, lisina 20 de la H4 y lisina 26 de H1.4, junto con la actividad hidroxilasa reportada para algunas proteínas de este grupo [85]. Estas proteínas participan en diversos procesos a nivel metabólico, desarrollo, biosíntesis e hipoxia [71, 86, 87], despertando gran interés como blancos terapéuticos tomando en cuenta la asociación entre la demetilación de histonas y el desarrollo de un gran número de patologías neurodegenerativas como alzheimer [88, 89], enfermedades autoinmunes [90] y cáncer [4, 91, 92].

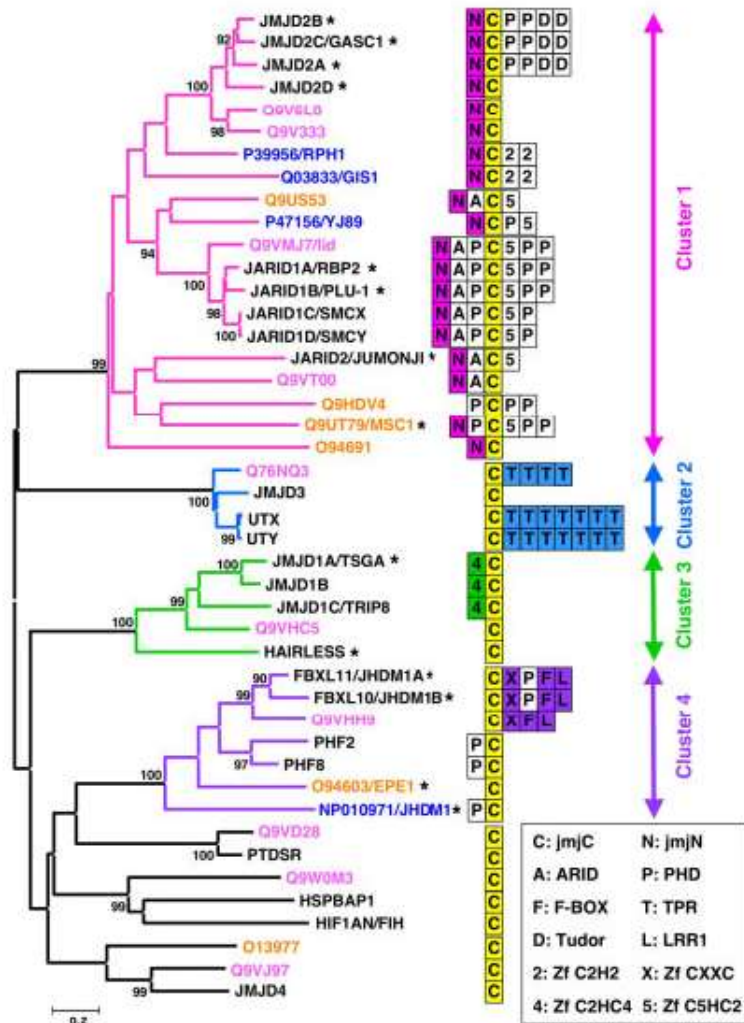


Figura 13. Relación estructural de diferentes miembros de la familia jumonji. Figura tomada de Takeuchi y colaboradores [84], se indican los diferentes miembros de esta familia reportados en humanos, *Drosophila* y levaduras en un árbol de unión de vecinos, junto con una representación esquemática de cada proteína indicando los dominios característicos de cada cluster en un color característico arbitrariamente asignado, según las abreviaturas previamente descritas.

Esta importante familia de proteínas se ha dividido en 7 subfamilias según su actividad y características estructurales. La subfamilia KDM1 (JMJD3) corresponde a aquellas proteínas con actividad amina oxidasa, mientras que las subfamilias KDM2-KDM7 incluyen las proteínas jmjC asociadas con actividad demetilasa, clasificadas en función de sus principales características estructurales, así como dominios funcionales (Tabla 1).

1.3.2.1. *Histona demetilasas de la familia KDM4*

Entre estas subfamilias, los miembros que conforman el grupo KDM4 han despertado gran interés por su participación en la demetilación de la lisina trimetilada 9 y 36 de histona 3, implicadas en procesos de diferenciación y supervivencia de células embrionales [93], respuesta al daño del ADN [94] y regulación de procesos de amplificación génica y disrupción del fenotipo de expresión celular en gran variedad de neoplasias [95-97]. A continuación, se describirán los principales hallazgos y características de las enzimas KDM4A, KDM4B, KDM4D y KDM4E, como parte inicial del análisis de la proteína blanco del presente estudio, KDM4C (JMJD2C).





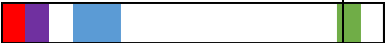
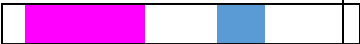

Subfamilia	Proteína	NCBI	Blanco catalítico	Modelo estructural
KDM2 (FBXL)	KDM2A	22992	H3K36, p65	
	KDM2B	84678	H3K36, H3K4me3	
KDM3 (JMJD1)	KDM3A	55818	H3K9	
	KDM3B	51780	H3K9	
	KDM3C	221037	H3K9, MDC1	
KDM4 (JMJD2)	KDM4A	9682	H3K9, H3K36, H1.4K26	
	KDM4B	23030	H3K9, H3K36, H1.4K26	
	KDM4C	23081	H3K9,	
	KDM4D	55693	H3K9, H3K36, H1.4K26	
	KDM4E	390245	H3K9	
KDM5(JARID)	KDM5A	5927	H3K4	
	KDM5B	10765		
	KDM5C	8242		
	KDM5D	8284		
KDM6	KDM6A	7403	H3K27	
	KDM6B	23135		
	KDM6C	7404		
KDM7	KDM7A	80853	H3K9, H3K27, H4K20	
	KDM7B	23133	H3K9, H4K20	
	KDM7C	5253	H3K9, H3K27,	

Tabla No. 1. Características principales de las proteínas KDM. Se presenta la identificación del gen correspondiente a cada proteína, junto con sus blancos catalíticos principales y un modelo estructural de una proteína representativa (marcada con asterisco) para cada grupo. Dominios: jmjN (■), jmjC (■), LRR (■), Zf (■), Tudor (■), PHD (■), ARID (■), TPR (■). Adaptada de Markolovic y colaboradores [85].

1.3.2.1.1. *KDM4A*

KDM4A, también conocida como *JMJD2A* o *JHDM3A*, es una proteína de 1063 aminoácidos que contiene un dominio *jmjN*, un dominio *jmjC*, dos dominios TUDOR y dos dominios PHD (Tabla 1). Se ha descrito ampliamente su amplificación en gran número de carcinomas de células escamosas, pulmón, ovarios, seno y próstata [98-102], cuya relevancia puede estar asociada con su participación en la regulación de genes relacionados con el mantenimiento del fenotipo celular tales como *c-Jun* mediante su asociación con la proteína de activación 1 (AP1) [103]. Adicionalmente, se ha descrito que la desregulación de *KDM4A* afecta tanto la proliferación celular como el progreso tumoral a metástasis en modelos murinos [102].

1.3.2.1.2. *KDM4B*

Esta proteína de 1096 aminoácidos comparte una distribución estructural de dominios similar a la observada en *KDM4A*, y ha sido ampliamente asociada con el desarrollo del cáncer de seno y próstata. Se ha descrito su sobre-expresión en carcinomas de seno positivos al receptor de estrógenos (ER), en los cuales *KDM4B* interactúa directamente con este importante receptor nuclear y recluta complejos de remodelación de la cromatina para regular de expresión de oncogenes específicos y de sí mismas como parte de un loop de retroalimentación [104, 105]. Por otra parte, los elevados niveles de *KDM4B* en el cáncer de próstata se asocian con un incremento en la expresión de oncogenes dependientes del

receptor de andrógenos (AR), y su depleción lleva a una reducción significativa en la expresión de las proteínas asociadas a AR [106].

En adición, KDM4B contribuye al desarrollo de la metástasis de diferentes formas tumorales como hepatomas [107], cáncer colorectal [108, 109], linfoma de Hodgkin[110] y cáncer de útero [111]. Se ha descrito la importancia de KDM4B en la proliferación tumoral asociada con eventos de hipoxia en diferentes tipos de tumores como cáncer de ovario [112], gástrico [113] y colorectal [109]. En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de KDM4B en la proliferación y agresividad de gran variedad de células tumorales en el organismo.

1.3.2.1.3. KDM4D y KDM4E

A diferencia de los demás miembros de esta familia de proteínas, KDM4D y KDM4E no poseen dominios TUDOR ni PHD, lo que no ha permitido establecer claramente su mecanismo de acción en la regulación del fenotipo celular. Recientemente se ha analizado el reclutamiento de KDM4D a sitios de daño al ADN en una ruta dependiente de PARP1 [114], siendo además un regulador de la actividad de la proteína p53 en modelos celulares tumorales [115]. El papel de KDM4E en el organismo y su importancia fenotípica aún están por ser descritos.

1.3.2.2. *Papel de KDM4C en el fenotipo celular*

KDM4C, también conocida como JMJD2C o GASC-1 (del inglés *gene amplified in squamous cell carcinoma*) es una macromolécula de 1056 aminoácidos conteniendo los dominios característicos de la subfamilia KDM4, a ser las regiones jmjN (residuos 16-58), jmjC (residuos 144-310), TUDOR1 (residuos 877-934), TUDOR2 (residuos 935-991), PHD tipo-1 (residuos 689-747) y PHD tipo-2 (residuos 808-865) (Tabla 1). Su actividad enzimática se centra específicamente en la forma trimetilada de las lisinas 9 y 36 de la histona 3 y la Lisina 26 de la Histona 1.4 [116-118].

Desde el punto de vista fisiológico, KDM4C se encuentra asociada con los procesos de embriogénesis y diferenciación [119, 120], adipogénesis por regulación del receptor nuclear PPAR γ [121] y metabolismo de aminoácidos mediante transactivación del regulador transcripcional ATF4 [122], lo que convierte esta proteína en un importante actor para el mantenimiento del fenotipo celular. Por otra parte, el gen *kdm4c* se encuentra sobre-expresado en gran cantidad de tumores incluyendo carcinoma sarcomatoide, linfomas de Hodking y células B, leucemia mieloide aguda, cáncer de seno, cáncer de pulmón, renal y de próstata [123-127]. Dicha sobreexpresión ha sido directamente asociada con eventos de amplificación del loci 9p23-24 del cromosoma 9 [95, 125, 128], y su efecto sobre el desarrollo y supervivencia tumoral incluye diferentes rutas, como la activación de oncogenes como MDM2, regulador de la proteína p53 [129], interacción con el

receptor de andrógenos como estimulante de la expresión génica y proliferación celular asociadas a esta macromolécula [130, 131], interacción y regulación del factor de crecimiento fibroblástico 2 en células de osteosarcoma [132], forma parte del interactoma del coactivador del receptor de esteroides 1 (SRC1), un factor asociado con el incremento de la expresión génica asociada al receptor de estrógenos, así como la modulación de la actividad del factor inducible por la hipoxia (HIF1) en el desarrollo y evolución del cáncer de seno [133]. En este punto, cabe la pena resaltar que KDM4C es el único miembro de la subfamilia KDM4 que interactúa con los cromosomas durante la mitosis, y la disrupción de dicha interacción resulta en alteraciones de la segregación cromosómica, fuente importante de defectos mitóticos e inestabilidad cromosómica. Estos fenómenos han sido también observados en importantes marcadores moleculares del cáncer de seno como la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) [134], cadherina 1 (CDH1) [135], TP53 (p53) [136], y los genes de susceptibilidad de cáncer de seno (BRCA1 y BRCA2, de sus siglas en inglés) [137], entre otros. En conjunto, estas alteraciones en el proceso de mitosis son ampliamente observadas en diferentes neoplasias como se ha revisado elegantemente en trabajos previos [138-140].

1.3.3. *Potencial terapéutico de las KDM*

Teniendo en cuenta la importancia de las proteínas KDM en el desarrollo del cáncer, un gran número de estudios se han dirigido en busca de inhibidores de su actividad enzimática como agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de estas neoplasias. La inhibición de los miembros de la subfamilia KDM1 se ha centrado en su similitud con otras poliamina oxidasas dependientes de FAD, incluyendo un núcleo de 1-amino-2-fenilciclopropil [141]. La especificidad de diferentes inhibidores han permitido obtener moléculas con actividad contra células tumorales, como derivados del tranilcipromin con actividad inhibitoria de KDM1A que presentan actividad pro-apoptotica en células de leucemia mieloide aguda primaria, así como la inhibición de KDM1A puede aumentar la sensibilidad de otras formas de leucemia a agentes terapéuticos como el ATRA (all-trans retinoic acid) [142, 143].

Por otra parte, entre los inhibidores potenciales de las proteínas tipo oxigenasa se han descrito principalmente análogos del α -cetoglutarato con la capacidad de competir con este cofactor y evitar la asociación del Fe^{2+} , como los derivados de la N-oxalil glicina (NOG) y la N-oxalil tirosina, junto con análogos de la 8-hidroxiquinolina y el 2,4-dicarboxilato de piridina (2,4-PDCA) [144, 145]. Una mayor especificidad hacia los miembros de la subfamilia KDM4 ha sido descrita mediante el empleo de derivados de la biperidina, donde los dos nitrógenos piridinicos presentan actividad quelante frente al Fe^{2+} en el sitio activo de proteínas como KDM4A y KDM4E [146, 147]. En adición, se han identificado productos

inhibidores suicidas conteniendo un núcleo fenilciclopropilamina (A, panel derecho). En el caso de las histona demetilases con actividad similar a oxigenasas, se citan compuestos basados en la estructura del N-oxalil glicina, N-oxalil tirosina y ácido 2,4-piridin dicarboxílico (B, panel Izq.), productos naturales como flavonoides y catecoles (B, panel der.), así como derivados de compuestos tipo bupirrimidina a hidroxamato (B, Panel inferior).

En conjunto, el presente análisis sustenta claramente la importancia de KDM4C para el desarrollo de gran cantidad de patologías incluyendo las neoplasias, así como su potencial como blanco terapéutico por parte de inhibidores específicos para obtener la siguiente generación de medicamentos altamente específicos. Sin embargo, dicha investigación requiere conocer las bases de la participación de esta importante demetilasa en el surgimiento y evolución del cáncer. Con este fin, se presentarán dos capítulos con los resultados y análisis en el estudio de KDM4C y su influencia en el avance de una de las formas de neoplasia más agresiva, de difícil manejo y con baja prognosis: el cáncer de seno triple negativo.

2. CAPITULO II. LA ACTIVIDAD DE KDM4C MODULA LA PROLIFERACION CELULAR Y LA SEGREGACION CROMOSOMICA EN LINEAS CELULARES DE CANCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO.

2.1. Introducción

El desarrollo de las diferentes formas de cáncer humano se asocia directamente con alteraciones a nivel de la expresión génica por parte de procesos a nivel epigenético como la metilación del ADN (asociada con el silenciamiento genético), las modificaciones post-traduccionales de las histonas (vinculadas con la adición-eliminación de grupos funcionales específicos, y centro de la presente investigación), ARN no codificante (incluyendo los microARN, permiten la regulación de la síntesis de proteínas mediante la modulación del transcrito) y el splicing alternativo (mecanismo de eliminación de intrones que permite la expresión de diferentes proteínas a partir de un mismo gen, ampliando la diversidad de polipéptidos a ser producidos). Alteraciones en estos importantes procesos desembocan en el aumento de defectos a nivel de expresión proteica y en la distribución de la información cromosómica durante la mitosis, factores relacionados comúnmente con modificaciones de las macromoléculas encargadas de la regulación epigenética del ciclo celular [4, 150]. Como parte de las neoplasias que afectan a la humanidad, el cáncer de seno representa uno de los más agresivos grupos de tumores, con gran heterogeneidad a nivel poblacional

incluyendo características como edad, etnia y perfil socioeconómico [151-154], en las que influyen importantes diferencias en los perfiles de expresión de reconocidos marcadores como los receptores de estrógenos y progesterona, p53, el factor de crecimiento epidermal [155], junto con los genes BRCA1 y BRCA2, los cuales han sido ampliamente descritos como blanco de mutaciones que conllevan a un importante incremento en el riesgo de desarrollar esta enfermedad [156, 157], siendo BRCA1 asociado principalmente con la generación de tumores de alto riesgo y agresividad [158, 159]. En consecuencia, es posible reconocer diferentes formas de cáncer de seno como el fenotipo basal-like (una neoplasia cercana a la forma triple negativa de la enfermedad), normal-like, Luminal A y Luminal B, y finalmente la forma enriquecida en el receptor del factor de crecimiento epidermal 2 (HER2/ERBB2) [160]. Entre estas, las neoplasias de seno triple negativo/basal-like representan el fenotipo tumoral más agresivo y de peor prognosis, con un difícil tratamiento y manejo de la evolución de la enfermedad [161, 162]. Esta forma del cáncer de seno se caracteriza por la ausencia de la expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y HER2, los cuales son los principales blancos terapéuticos de gran mayoría de los medicamento empleados para el desarrollo del cáncer. En conjunto, el cáncer de seno triple negativo es responsable del 15%-20% de las 500.000 muertes anuales asociadas a esta forma de neoplasia, resaltando su importancia como problema de salud pública mundial [161, 163-165].

Parte de los múltiples factores ambientales y genéticos asociados al desarrollo del cáncer, la conservación del fenotipo celular está directamente relacionado con la conservación de la información genética a nivel secuencial y estructural, así como el correcto mantenimiento de la regulación dinámica de la cromatina, la estructura que contiene el ADN en todo núcleo eucariótico evolucionado [166, 167]. La herencia de la estructura genética de toda célula toma lugar durante la duplicación de una célula madre cuya información cromosómica es segregada a sus células hijas como parte de proceso altamente complejo y regulado conocido como mitosis [168, 169], siendo que diferentes defectos en tan finamente regulado proceso se han asociado con el desarrollo del cáncer [170-172]. La transcripción de la información genética está regulada por diferentes mecanismos que involucran interferencia del ARN, metilación del ADN y modificaciones postraduccionales (PTM) de las histonas [2, 4, 173]. Entre las PTMs más comunes sobre estas proteínas nucleares se encuentran la fosforilación, ubiquitinación, sumolización, ADP-ribosilación, acetilación, deaminación, isomerización de la prolina y metilación [174, 175].

Una de las más importantes PTMs es la metilación/demetilación de histonas, la cual está directamente asociada con la represión o activación de la expresión de genes que participan en la recombinación y reparación del ADN, impronta y mitosis, entre otros procesos [176-178]. La metilación de las histonas se consideró una marca estable de la cromatina por largo tiempo, pero el descubrimiento relativamente reciente de las histona demetilasas ha abierto un nuevo panorama

en el análisis de esta PTM, tomando en cuenta que alteraciones en las proteínas encargadas de regular los niveles de metilación/demetilación de las histonas han sido asociadas con el desarrollo de gran número de enfermedades, incluyendo el cáncer [179-183].

Dos familias de macromoléculas están asociadas con la demetilación de histonas en residuos de lisina, agrupadas bajo la familia KDM (del inglés histone lysine demethylases): Las demetilinasas específicas de lisina (LSD/KDM1) son enzimas dependientes de flavina con la capacidad de demetilar las formas mono y dimetiladas de la lisina, mientras que las proteínas pertenecientes a la subfamilia jumonji-containing domain proteins (JMJs) presentan la habilidad única de modificar residuos trimetilados de lisina mediante un mecanismo dependiente de Fe^{2+} y 2-oxoglutarato [183-185]. Las proteínas JMJ han despertado gran interés debido a su relevancia para el desarrollo de un amplio número de neoplasias [125, 186, 187]. Como parte de esta familia, los miembros del subgrupo JMJD2/KDM4 están asociados con el desarrollo del cáncer de seno, mediante su participación en procesos de desarrollo y proliferación celular. Adicionalmente se ha descrito su participación en la evolución de los tumores primarios en su forma metastática altamente agresiva, dependiente de su capacidad migratoria e invasiva [101, 117, 184, 188, 189].

Parte de este importante subgrupo. La demetilasa de histonas KDM4C, es un relevante oncogén, blanco de eventos de amplificación y sobre-expresión en gran cantidad de neoplasias humanas incluyendo linfoma, leucemia mieloide aguda,

cáncer, pulmón, carcinoma sarcomatoide de pulmón, y próstata [95, 123, 128, 130, 190, 191], incluyendo las formas más agresivas del cáncer de seno basal-like [192], siendo reconocida como un marcador potencial de prognosis para el fenotipo invasivo de esta forma de la enfermedad [193, 194]. Por otra parte, KDM4C es el único miembro de la subfamilia KDM4/JMJD2 asociado con la segregación de los cromosomas durante la mitosis en la línea celular de osteosarcoma U2OS [138], lo que resalta su relevancia en la evolución del cáncer asociado con inestabilidad cromosómica y defectos mitóticos [171, 195]. Sin embargo, los mecanismos específicos y rutas asociadas con la actividad de KDM4C en el desarrollo tumoral aún no han sido completamente determinados.

Este capítulo describe el efecto de la actividad enzimática de KDM4C en la proliferación celular y segregación cromosómica de tres líneas celulares de cáncer de seno triple negativo, empleando como modulador de la demetilación el inhibidor específico NCDM-32B [27]. Estos análisis demuestran que KDM4C es importante para la proliferación celular y el mantenimiento de la integridad de la información genética durante la mitosis para esta forma de neoplasia altamente agresiva, soportando la relevancia de KDM4C como un posible blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer de seno triple negativo.

2.2. *Métodos empleados*

2.2.1. *Cultivo celular e inhibición de la actividad enzimática*

Las líneas celulares de cáncer de seno triple negativo HCC38 (ATCC CRL-2314), MDA-MB-436 (ATCC HTB-130) y MDA-MB-453 (ATCC HTB-131) se obtuvieron de la American Tissue Culture Collection (ATCC). La línea HCC38 se cultivó en medio modificado RPMI 1640-ATCC (Gibco), mientras que las líneas MDA-MB-436 y MDA-MB-453 se cultivaron en medio DMEM (Gibco) en presencia de 0.01mg/mL insulina. Todos los medios de cultivo se suplementaron con suero fetal bovino al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%, para su uso a 37°C bajo una atmósfera de 5% en CO₂. Para realizar la inhibición enzimática de KDM4C para los siguientes experimentos, las células se cultivaron hasta una confluencia de 30%-40% para ser sincronizadas por depleción de suero en medio de cultivo libre de suero durante 12 horas, obteniendo un rendimiento promedio del 82%. A continuación, las células se liberaron de la sincronización mediante lavado con buffer PBS y la adición de medio suplementado como se describió anteriormente [196]. Luego, las células se subcultivaron en platos de cultivo de 6 pozos (1x10⁶ células/pozo) hasta alcanzar un 70% de confluencia, y se incubaron con el inhibidor específico NCDM-32b (Wako chemicals) a concentraciones finales de 50 uM y 100 uM por pozo, siendo esta última concentración la elegida para los ensayos posteriores. El efecto de la inhibición se evaluó de acuerdo con los ensayos de inmunofluorescencia (IFA) o proliferación celular (MTT) [99].

2.2.2. Ensayos de Inmunofluorescencia (IFA)

Células de las diferentes líneas celulares se cultivaron sobre cubreobjetos pretratados con 1M HCl at 55°C por 6 horas, seguido de lavados con agua ultrapura y lavados consecutivos con concentraciones crecientes de etanol (al 50%, 70% y 95%) por 30 minutos cada uno. Los cubreobjetos tratados se almacenaron en etanol al 95% hasta su uso. Una vez se obtuvo el cultivo celular sobre los cubreobjetos, estas se trataron con NCDM-32b como se describió anteriormente. Tras 48 horas, las muestras se pre-extrajeran con una mezcla de PBS/ 0.2% Triton X-100 y se fijaron por tratamiento con formaldehído al 3.7% durante 15 minutos. Las células fijadas se permeabilizaron con 0.5% Triton X-100 en PBS, y se incubaron con albumina sérica bovina al 3% en PBS por 1 h. A continuación, las células se trataron con anticuerpos anti-KDM4A (Abcam ab24545), anti-KDM4C (Abcam ab85454) o anti-trimetil H3K9 (Abcam ab10812) durante toda la noche a 4°C en una dilución 1:250. Tras el tratamiento, se realizaron tres lavados con mezcla de PBS/0.01% Triton X-100 seguidos de la incubación con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488, dilución 1:500, Abcam 150077) por 1h. Luego, las células se lavaron dos veces y se montaron para su análisis en ProLong Diamond Antifade Mountant con DAPI (Life Technologies). Todas las imágenes se obtuvieron en un microscopio Eclipse Ni-E (Nikon) y se analizaron con el software ImageJ (NIH), mediante la delimitación de diferentes estructuras celulares y la cuantificación de su circularidad, área y fluorescencia, utilizando diferentes medidas de la intensidad de fondo en regiones adyacentes a

la célula en análisis. La fluorescencia total corregido se determinó como la densidad integrada - (área celular × fluorescencia promedio de fondo), en un proceso adaptado de acuerdo a estrategias ampliamente descritas [197-199].

2.2.3. Ensayos de proliferación

Células correspondientes a las tres líneas celulares tratadas con inhibidor se analizaron mediante un ensayo de evaluación de proliferación con el reactivo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) mediante la detección de su forma reducida (MTT, (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano), de acuerdo a protocolos previamente reportados [189]. 1500 células se sembraron y cultivaron en platos de 96 pozos de acuerdo a las condiciones previamente descritas. Un día después (día 0) las células se trataron con NCDM-32b (100 µL por pozo, 100 µM), de igual manera que controles correspondientes a cada tratamiento, incluyendo blancos sin células, sin MTT y sin tratamiento para cada experimento en busca de evitar cualquier interferencia del background. Luego las células se trataron con 20 µL de MTT (Life Technologies M6494, 5mg/mL) por 4 horas a 24 horas y 48 horas post-inhibición. Tras completar el tiempo, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 150 µL de DMSO. La absorbancia de cada muestra y control se determinó a 550 nm usando un lector de microplacas (Tristar² LB 942 Multimode Reader, Berthold Technologies).

2.2.4. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, y los resultados que se presentaran son producto de al menos dos experimentos independientes. La comparación estadística de los datos se realizó mediante ANOVA (una vía) y evaluación de medias (Prueba de t-student) con el software SPSS 10.0 (IBM), con un corte de significancia de $p < 0.05$.

2.3. Análisis de Resultados

Los resultados obtenidos permiten analizar la relevancia de la actividad demetilasa de KDM4C en el fenotipo de tres líneas celulares de cáncer de seno triple negativo: En primer lugar, la proliferación de las líneas celulares disminuyó cuando la actividad demetilasa de KDM4C se redujo, junto con un incremento en la cantidad de errores en la segregación cromosómica cuando células tratadas con inhibidor se compararon con células sin tratamiento. Tomando en cuenta la importancia de las histona demetilasa en el desarrollo de un gran número de neoplasias [101, 117, 184, 188, 189], los miembros de la subfamilia KDM4 son blancos promisorios para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad [183, 200]. Estos factores, junto con la importancia de la amplificación del cromosoma 9p24.3 en cáncer de seno, el cual contiene el gen *kdm4c*, es manifiesta la importancia de esta histona demetilasa para el desarrollo tumoral [99, 116, 125].

2.3.1. KDM4C se localiza en los cromosomas durante la mitosis

Los ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-KDM4C y anti-KDM4A se realizaron en las líneas de cáncer de seno triple negativo. KDM4A no es reclutada durante el proceso de mitosis y presenta una distribución difusa, mientras que KDM4C interactúa con los cromosomas mitóticos, lo que resalta su relevancia potencial para la segregación cromosómica en células tumorales de cáncer de seno frente a los demás miembros de la subfamilia KDM4 (Figura 15). Para evaluar el efecto de la inhibición de KDM4C en neoplasia de seno, se evaluó el efecto de un inhibidor específico en las tres líneas celulares empleadas. Los ensayos de inmunofluorescencia de las células tratadas confirmaron un incremento significativo en los niveles de H3K9-3me cuando las células se trataron con NCDM-32b (Figura 16), demostrando que el inhibidor NCDM-32b modula la actividad de KDM4C bajo las condiciones experimentales seleccionadas.

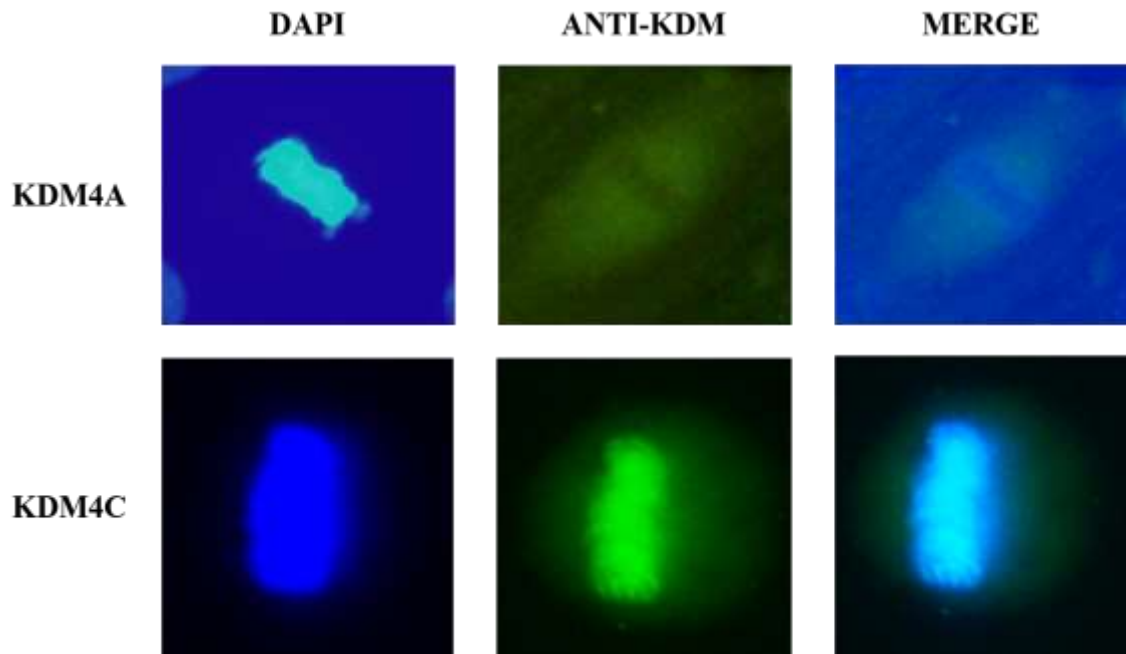


Figura 15. Localización celular de KDM4C y KDM4A durante la mitosis. Immunofluorescencias representativas de KDM4C y KDM4A en la línea celular HCC-38 son ilustradas, demostrando el patrón diferencial de distribución para ambas proteínas. KDM4C colocaliza con la señal de AND detectada con DAPI, mientras que KDM4A es excluida de los cromosomas mitóticos. Tomada de Garcia y Lizcano [139].

Trabajos previos realizados en la línea de osteosarcoma U2OS han mostrado que KDM4C presenta una distribución celular única, la cual está relacionada con el mantenimiento de la estabilidad cromosómica ya que la alteración de los niveles de expresión de esta histona demetilasa promueve la aparición de errores durante la mitosis [138]. Nuestros experimentos mostraron que KDM4C es reclutada a los cromosomas durante la mitosis en células de cáncer de seno triple negativo, en contraste con la proteína KDM4A la cual es completamente excluida de la

estructura cromosómica (Figure 15). Esta localización está asociada con el mantenimiento de los niveles de trimetilación de H3K9, al observar un incremento significativo en la señal correspondiente a la forma trimetilada de esta lisina en comparación con células no tratadas (Figure 16), indicando que la actividad de KDM4C es necesario para la distribución correcta de la información genética en células tumorales de cáncer de seno.

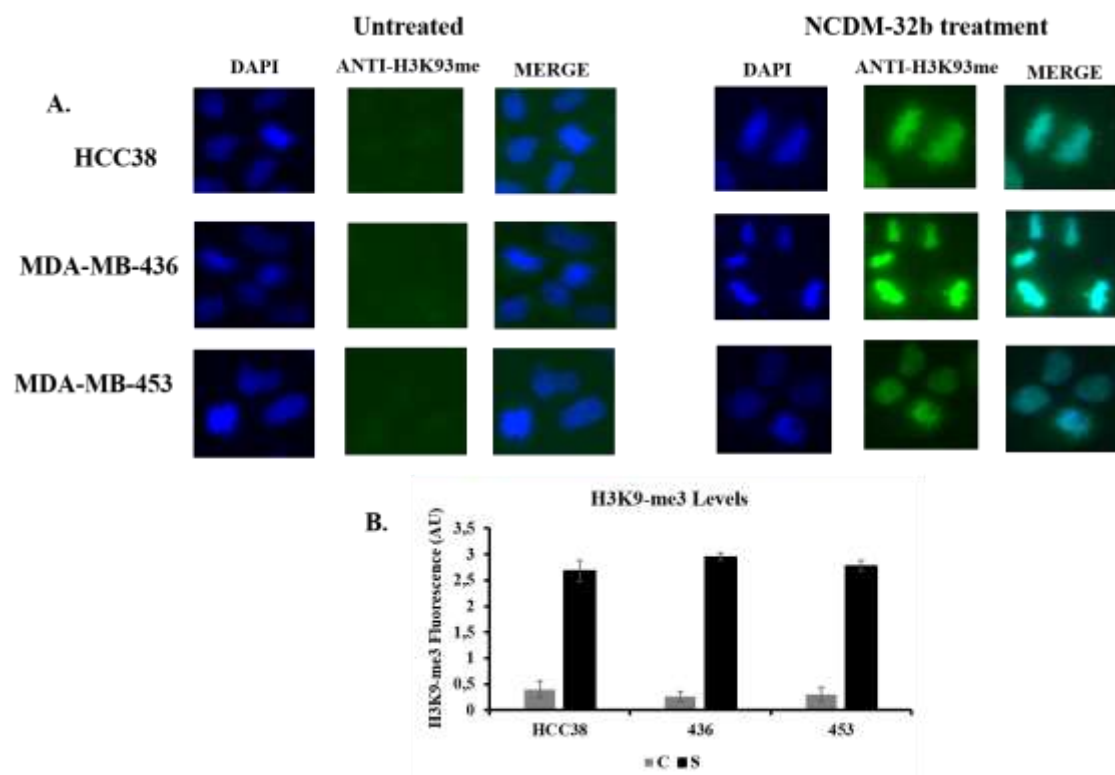


Figura 16. La inhibición de KDM4C con NCDM-32b afecta los niveles de metilación de la histona 3 Lisina 9. A. Immunofluorescencia de las líneas celulares HCC38, MDA-MB-436 y MDA-MB-453 tratadas (derecha) o sin tratamiento (izq.) con el inhibidor. Note el incremento significativo en la intensidad de fluorescencia para las muestras tratadas con respecto a las células control. Todas las imágenes se registraron a 80 ms bajo las mismas condiciones de exposición. B. Cuantificación de los niveles de histona 3 lisina 9 trimetilada mediante análisis con el software ImageJ (NIH, USA),

mostrando un incremento significativo de los niveles de H3K9-3me hasta un promedio de 65% (Datos no mostrados) para todos los tratamientos. Tomada de Garcia y Lizcano [139].

2.3.2. La inhibición de KDM4C incrementa los errores durante la segregación cromosómica

La relevancia de la actividad de KDM4C durante la segregación de la información génica se analizó mediante el tratamiento de las líneas celulares sincronizadas HCC38, MDA-MB-436 and MDA-MB-453 con el inhibidor NCDM-32b (Figura 17). En comparación con las células no tratadas, el número de defectos mitóticos tales como cromosomas en lag (asociados con un movimiento retrasado durante la anafase, que pueden resultar en aneuploidias) se incrementó en 38% en promedio en las tres líneas celulares de cáncer de seno, así como se observó un aumento en la presencia de micronúcleos (fragmentos de cromosomas o cromosomas completos presentes al exterior del núcleo, resultantes de defectos en la segregación) hasta 20-26% debido a la inhibición de KDM4C. (Figura 17B). En conjunto, estos resultados demuestran que la actividad de KDM4C es importante para mantener una correcta distribución de los genes durante la mitosis.

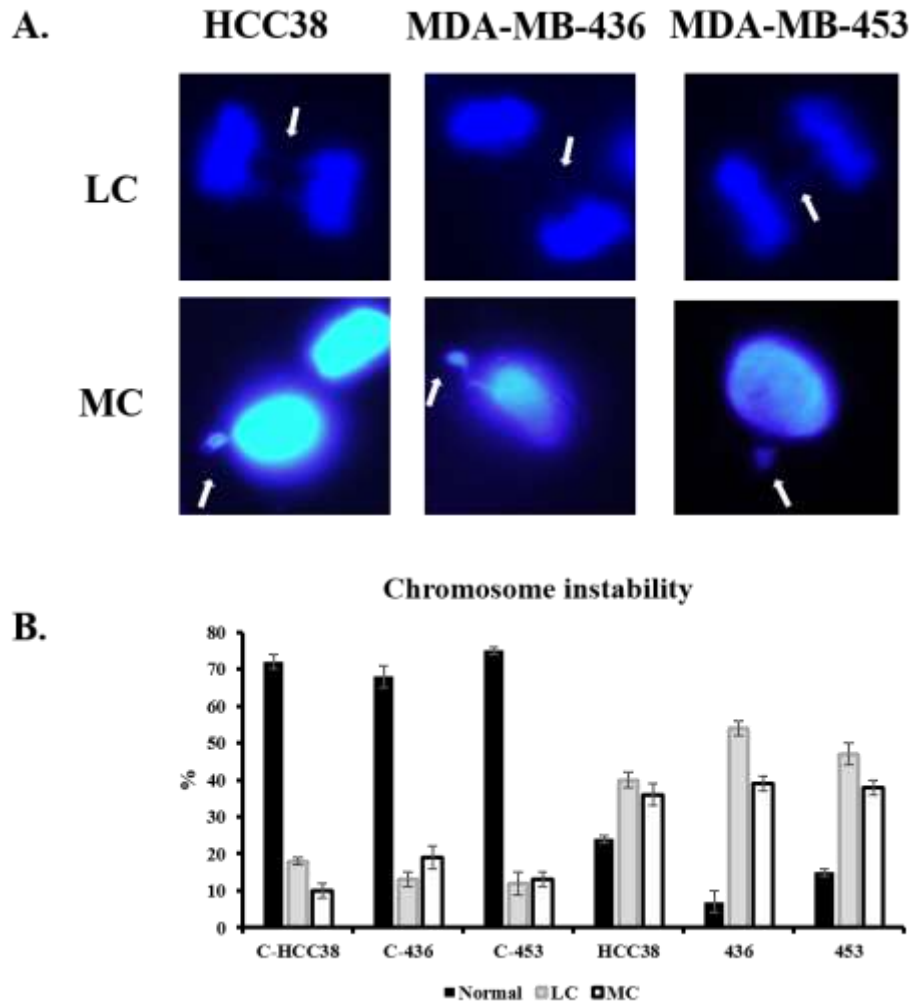


Figura 17. Efecto de la actividad de KDM4C en la estabilidad cromosómica. A. Inmunofluorescencias representativas a 100x de muestras por analizadas por triplicado como se describe en la sección 2.2.2. 30-40 células seleccionadas al azar (1×10^6 células/pozo) se analizaron por muestra para ilustrar diferentes errores de segregación. Línea superior: Cromosomas en lag (LC), Línea inferior: micronúcleos (MC). El ADN se detectó mediante DAPI. B. Cuantificación de los errores en la segregación cromosómica, determinados para este experimento. Cada muestra se analizó 48h-postratamiento y se comparó con su control correspondiente. Las diferencias se presentan como porcentaje. Tomada de Garcia y Lizcano [139].

Estas observaciones concuerdan con el efecto de estudios de RNAi en otras líneas celulares tumorales [138]. Así, el incremento de defectos mitóticos (cromosomas en lag y micronúcleos) observado en células tratadas (Figura 17), sugiere que la demetilación de la H3K9-3me por acción de KDM4C es un proceso clave para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica en células tumorales de seno. Por otra parte, se ha descrito que los micronúcleos de algunas líneas celulares pueden ser recuperados por las células hijas [201], in embargo, la extensa evidencia de la asociación entre los errores durante la distribución de la información genética y la inestabilidad cromosómica [202-204], junto con la exposición de los cromosomas externos a daños en la estructura del ADN al estar presente en los micronúcleos, y que también pueden ser heredados por la células hijas [205], resalta la importancia de realizar mayores estudios para caracterizar el papel principal de KDM4C durante la segregación cromosómica como parte de la elucidación de la relación ente defectos mitóticos, aneuploidia e inestabilidad cromosómica. Desde este punto de vista, se ha demostrado que la acetilación y metilación de H3K9 participan de un proceso secuencial relevante para la condensación de cromosomas [206], lo que representa una ruta epigenética asociada con estos importantes eventos.

Por otra parte, La modulación de la expresión de KDM4C mediante acción de RNAi específicos también resulta en alteraciones en la segregación cromosómica, afectando la proliferación celular y las capacidades de migración e invasión en una línea de cáncer de seno (Garcia, J., Lizcano, F. *KDM4C is recruited to mitotic*

chromosomes and is relevant for chromosomal stability, cell migration and invasion of triple negative breast cancer cells. Aceptado en *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. DOI: 10.1177/1178223418773075). Finalmente, estos resultados indican la importancia de KDM4C y su actividad enzimática para la segregación cromosómica.

2.3.3. La proliferación celular se afecta por la inhibición de KDM4C

La proliferación celular de las líneas de cáncer de seno triple negativo tratadas con NCMD-32b, junto con controles sin tratamiento se analizó mediante un ensayo MTT. Tras 24 horas y 48 horas, se evidenció una reducción significativa de la proliferación para todas las líneas celulares (promedios de 15% a 24h y 48% a 48h) en comparación con células no tratadas. (Figura 18), indicando que KDM4C está asociada con la viabilidad de las células tumorales de seno triple negativo, en concordancia con resultados previamente observados con otros miembros de la subfamilia KDM4 [104, 189].

La influencia de KDM4C en la distribución líneas celulares de cáncer de seno puede ser analizada, tomando en cuenta que la inhibición de su actividad conlleva a una distribución significativa de la multiplicación celular (Figura 18). Este fenómeno es observado en otras líneas celulares con patrones diferentes de expresión incluyendo células her2/neu (+) [192, 207, 208]. En otros campos de investigación se ha determinado que esta importante demetilasa se encuentra asociada con la regulación del crecimiento celular en líneas normales y tumorales,

[209], sugiriendo que KDM4C y sus proteínas asociadas están relacionadas con la proliferación de estas células mediante una ruta independiente que involucra el sistema her2/neu-, que aún debe ser determinada.

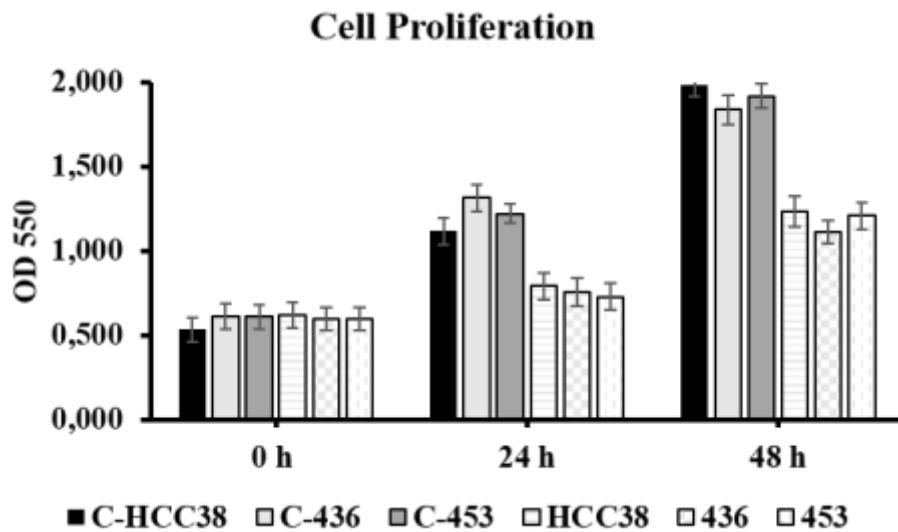


Figura 18. Ensayos de proliferación celular. Se evaluó la densidad óptica a 550 nm a 24h y 48h mediante un ensayo MTT a cada muestra no expuesta (controles-C) o expuesta (Muestras) al tratamiento con NCDM-32b. Note la reducción significativa en la densidad óptica para las células tratadas en contraste con sus controles correspondientes. Tomada de Garcia y Lizcano [139].

3. CAPITULO III. KDM4C ES RECLUTADA A LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS Y ES RELEVANTE PARA LA ESTABILIDAD CROMOSÓMICA, MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR EN UNA LÍNEA DE CÁNCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO.

3.1. Introducción

El cáncer de seno es la forma de neoplasia que más afecta a las mujeres, convirtiéndose en un problema de salud pública que genera más de un millón de muertes por año [163]. Por tanto, aquellos factores moleculares cuya expresión es alterada en linajes tumorales frente a células normales han sido reconocidos como blancos potenciales para el tratamiento de esta enfermedad. Entre estos, los miembros de la familia (JMJ) domain-containing protein family han despertado un interés especial debido a su relevancia en diferentes tipos de cáncer [125, 187]. Como se mencionó en el capítulo anterior, en el caso del cáncer de seno, los miembros del subgrupo de histone demetilinasas KDM4 (JMJ2) se relacionan con el desarrollo, proliferación, y habilidades migratorias e invasivas. [117, 189].

En concordancia con lo descrito anteriormente, la oxigenasa KDM4C es un importante miembro de la familia KDM4, que es frecuentemente sobreexpresado en varias formas de cáncer [95, 123, 128, 130, 190]. Adicionalmente es importante recordar que KDM4C es el único miembro que reconoce e interactúa con los cromosomas mitóticos, y su sobre-expresión está asociada con inestabilidad

cromosómica en la línea celular U2OS [138], un fenómeno común en el desarrollo de gran número de neoplasias [171, 195].

KDM4C ha sido directamente asociada con la progresión del cáncer de seno a través de la ruta de respuesta a hipoxia mediante la coactivación del factor inducible de hipoxia 1 (HIF1) [124] y es reconocido como un marcador potencial de prognosis de las formas invasivas de esta enfermedad [193, 194]. Aunque el mecanismo específico por el cual KDM4C está involucrada con la evolución de este tipo de tumores, se ha demostrado que la inhibición de la actividad enzimática de KDM4C afecta la estabilidad cromosómica y la proliferación celular en líneas de cáncer de seno triple-negativo [210]. Tales observaciones resaltan la importancia de esta proteína para la supervivencia y fenotipo de las formas más agresivas de este tipo de neoplasias.

Este capítulo describe la caracterización del fenotipo celular de la ausencia de KDM4C en la proliferación, migración e invasión de la línea de cáncer de seno triple negativo (HCC-38), una variante de ésta enfermedad que representa un subtipo heterogéneo de malignidad, asociada directamente con un curso clínico agresivo y de pobre prognosis [211]. Aquí, se describe la importancia de KDM4C para la proliferación celular, segregación cromosómica, migración e invasión. Por otra parte, ensayos de inmunofluorescencia demostraron que KDM4C interactúa con los cromosomas durante la mitosis, donde su actividad se encuentra asociada al mantenimiento de una correcta distribución génica. En adición, los ensayos de migración e invasión indicaron que KDM4C puede estar involucrada en la

regulación de rutas específicas de invasión celular, independientes de los mecanismos de migración en líneas de cáncer de seno triple negativo.

3.2. *Métodos Empleados*

3.2.1. *Cultivo celular e interferencia del ARN*

La línea celular HCC38 se obtuvo de la American Tissue Culture Collection (ATCC) y se cultivó en medio modificado de RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10% y penicilina/estreptomicina a 37° bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Para realizar los ensayos de interferencia, una vez las células alcanzaron una confluencia del 70% se transfectaron con siRNA 200nM usando lipofectamina RNAiMAX. Los siRNAi empleados para el silenciamiento de KDM4C son como sigue: (1c) GAG UUC CGG GAG UUC AAC AAA U y (2c) AGA CCU AGC ACA CUG GAA GCU UCG G. Los niveles de expresión de KDM4C tras la depleción se evaluaron por western blot. Todos los experimentos se desarrollaron por duplicado, y los resultados presentados provienen de al menos dos experimentos independientes.

3.2.2. *Western blot*

Las células HCC38 se lisaron en un coctel en presencia de buffer RIPA (1x PBS, 1% Nonidet P-40, y 0.1% SDS) junto con un inhibidor de proteasas de acuerdo a estudios anteriores [121]. Tras la centrifugación post-tratamiento, 10 µg de proteína del sobrenadante se mezclaron con un volumen igual de buffer de muestra y se desnaturalizaron a 95° por 25 min. Luego, las muestras se separaron

por SDS-PAGE 10% y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Tras la separación electroforética, las muestras se transfirieron a una membrana de PVDF con un buffer, y se transfirieron a una membrana (PDVF) empleando buffer de transferencia a pH 8.3 (39 mM glicina, 48 mM Tris base, 0.037% SDS, y 20% metanol). Después de la transferencia, las proteínas se incubaron en buffer PBS en presencia de 0.1% (v/v) Tween 20 y 5% leche descremada por 1 h a temperatura ambiente. Una vez la membrana se lavó, esta se incubó con el anticuerpo anti-KDM4C (Dilución 1:500; Abcam ab85454) por 2 h. A continuación, las mezclas se lavaron de nuevo tres veces con PBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo IgG anti-conejo (Dilución 1:2000; Abcam ab6721) conjugado con HRP por 1 h. Como paso siguiente las muestras se lavaron de nuevo 3 veces y la membrana se reveló usando solución Luminata Crescendo (Merck, Massachusetts, U.S.A.) y se visualizó en un MyECL Imager (ThermoFischer Scientific, Waltham, U.S.A.) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante).

3.2.3. *Ensayos de Inmunofluorescencia (IFAs)*

1×10^5 Células HCC38 se cultivaron en cubreobjetos tratados para ser expuestos a con los siRNAs como se describió anteriormente. 48 h post-tratamiento, las células se preextrajeron con 0.2% PBS/Triton y se fijaron en formaldehido 3.7% por 15 minutos a temperatura ambiente. Las células fijas se permeabilizaron con PBS-0.5% Triton y se bloquearon con albumina sérica bovina 3% en PBS por una hora.

Luego, las células se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-KDM4C (Abcam ab85454), anti-KDM4A (Abcam 24545) o anti-trimetil H3K9 (Abcam ab10812) a una dilución de 1:250 seguida por tres lavados con PBS conteniendo Triton X-100 0.01%, seguido de una incubación con el anticuerpo Alexa Fluor 488 (Dilución 1:500, Abcam 150077). Las células se lavaron dos veces y se montaron en ProLong Diamond Antifade Mountant con DAPI (Life Technologies, ThermoFischer Scientific, Waltham, U.S.A.). Las imágenes se adquirieron en un microscopio Eclipse Ni-E (Nikon, Melville, U.S.A.) y se analizaron con ImageJ software (NIH) a 40X-100X por triplicado en tres experimentos independientes. [197].

3.2.4. Ensayos de proliferación

Un ensayo previamente descrito para KDM4A fue adaptado para evaluar la proliferación de la línea de cáncer de seno triple negativo [189]. Células HCC38 se sembraron en platos de 96 pozos y se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 (ATCC modificado) conteniendo 10% FBS. Un día después (día 0), las células se trataron con Lipofectamina RNAiMAX sola o Lipofectamina RNAiMAX y los diferentes siRNAs a un volumen final de 100 µL por pozo. Durante este proceso, una muestra correspondiente a cada tratamiento se incubó con 20 µL de MTT (Life Technologies, ThermoFischer Scientific, Waltham, U.S.A.) por 4h. Al terminar, el sobrenadante se removió y se adicionaron 150 µL de DMSO. La absorbancia se midió a 550 nm usando un lector de placas (Tristar² LB 942 Multimode Reader,

Berthold Technologies, Calmbacher, Germany). Después de 24h y 48h, el control y las células tratadas con RNAi se analizaron con MTT como en el día 0.

3.2.5. Ensayos de migración e invasión

La capacidad de migración e invasión de células HCC38 tratadas con KDM4C siRNAs se evaluó usando los siguientes kits comerciales disponibles de millipore (Massachusetts, U.S.A.): (1) Chemotaxis Cell Migration Assay Kit (ECM508) y (2) Collagen Cell Invasion Assay Kit (ECM551). Las células se analizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante 2h después de la transfección con KDM4C siRNAs. Las células se tripsinizaron y resuspendieron en medio RPMI 1640 libre de suero, para ser sembradas en insertos de cámara de Boyden en una placa de 24 pozos que se encontraban recubiertos con (invasión) o sin (migration) colágeno (BD Biosciences). Luego, 500 μ L de medio RPMI 1640 con 10% FBS se adicionaron a la cámara inferior para promover la Quimiotaxis, y las células migrantes o invasivas se tiñeron y cuantificaron en un lector Tristar² Multimode Reader (LB 942, Berthold Technologies, Calmbacher, Germany) a 550 nm tras 48 h de incubación a 37°C en una incubadora al 5% CO₂.

3.2.6. Análisis Kaplan-Meier

Se realizó un análisis de supervivencia mediante Kaplan-Meier empleando la base de datos pública Kaplan-Meier plotter (kmplot.com)[212]. Esta base de datos contiene información de un amplio número de pacientes de cáncer de seno

(5,143), ovarios (1,816), pulmón (2,437) y gástrico (1,065), con un seguimiento de 69 / 40 / 49 / 33 meses, respectivamente. El sistema Kaplan Meier-Plotter tiene la capacidad para analizar el efecto de 54,675 genes sobre la supervivencia de los pacientes mediante los datos de 10,461 muestras de tumores. Se evaluó el efecto de KDM4C empleando la sonda JetSet '209984_at' en la página específica de cáncer de seno de la base de datos para obtener curva de supervivencia Kaplan-Meier, en las cuales el número de pacientes en términos de mortalidad se reporta en el área inferior de la gráfica principal, en conjunto con las tasas de riesgo (hazard ratios, HR) en intervalos de confianza (confidence intervals, CI) del 95%, junto con los correspondiente valores P (log-rank test).

3.2.7. Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como promedios de error estándar, y se obtuvieron de al menos dos tratamientos independientes con muestras analizadas por triplicado. La comparación estadística se realizó mediante ANOVA (una vía) y evaluación de medias (Student t-test) usando el software SPSS 10.0 (IBM), con un punto de corte de significancia de $p < 0.05$.

3.3. Análisis de Resultados

Este capítulo describe el efecto de la ausencia de KDM4C en la segregación cromosómica y las capacidades proliferativas, migratorias e invasivas de una línea de cáncer de seno triple-negativo. La reducción en los niveles de KDM4C permitió

un incremento de la forma trimetilada de H3K9. Estos datos sugieren que la expresión de genes involucrados en la división celular de líneas tumorales de cáncer de seno puede ser modulada por la actividad enzimática de KDM4C. Por otra parte, esta característica puede estar relacionada con la región cromosómica que contiene el gen *kdm4c*, el cual forma parte del frecuentemente observado amplicon 9p24.3 en células de cáncer de seno, próstata y esófago. [116, 125, 208], aunque no se ha descrito completamente el rol específico de esta histona demetilasa en el desarrollo de estas líneas tumorales. Este estudio presenta el efecto del silenciamiento de KDM4C en una línea de cáncer de seno triple negativo, asociada con un incremento en los defectos de segregación cromosómica que afecta la supervivencia de las células tumorales. En conjunto, estas observaciones demuestran la relevancia de KDM4C en el mantenimiento de del fenotipo de una de formas más agresivas de neoplasia de seno.

3.3.1. KDM4C se asocia con los cromosomas mitóticos y está involucrada en la segregación mitótica.

Para evaluar el efecto de la reducción de KDM4C en el cáncer de seno, siRNAs contra KDM4C se probaron en la línea de cáncer de seno triple negativo HCC38. El análisis por Western blot confirmó la expresión de KDM4C en los controles de la línea celular HCC38, la cual se redujo significativamente por el tratamiento con los siRNA 1c y 2c. Estas observaciones se confirmaron también por IFAs (Figuras

19A y 19B); Con base en este resultado, estos siRNAs se emplearon para examinar el fenotipo celular de HCC38 frente a la depleción de KDM4C.

Como se mencionó anteriormente, Kupershmit y colaboradores demostraron que KDM4C es el único miembro de la subfamilia KDM4 que interactúa con los cromosomas durante la mitosis en células de osteosarcoma, y que su silenciamiento o sobre-expresión lleva a un incremento en el número de errores durante la segregación cromosómica [138]. De manera similar, KDM4C es reclutada hacia los cromosomas mitóticos y permanece asociada a estos a lo largo de las diferentes fases de la mitosis en una línea de cáncer de seno triple-negativo. (Figuras 19A y 20A). En contraste con KDM4C, KDM4A es completamente excluida de los cromosomas bajo las mismas condiciones (Figura 19A). Estos resultados indican que KDM4C es el único miembro de la subfamilia KDM4 que participa activamente en mitosis. En busca de caracterizar la localización y funcionalidad de esta proteína durante la mitosis. Se silenció transitoriamente la expresión de KDM4C y se evaluó la presencia de diversos errores cromosómicos mediante IFA. KDM4C es reclutada al núcleo durante la interfase (Figura 19B) e interactúa con los cromosomas a lo largo de la evolución de la mitosis (Figure 20A), indicando que KDM4C participa activamente en la distribución de la información genética en células de cáncer de seno.

El papel de la presencia de KDM4C en la segregación cromosómica se evidencia en el incremento del número de errores asociados a este proceso, principalmente el número de cromosomas en lag y micronúcleos (Figura 20B). Estos resultados

indican que fenómenos como aneuploidia e inestabilidad cromosómica, los cuales se observan comúnmente en células de cáncer de seno [213, 214], pueden estar asociados con cambios en la actividad o niveles de expresión de KDM4C durante la mitosis. De manera análoga, se observe un aumento significativo en la forma trimetilada la H3K9 en células tratadas con el siRNA (Figura 20C), lo cual ha sido también reportado en otras líneas neoplásicas bajo condiciones similares [138]. Estas características fortalecen la necesidad de realizar estudios adicionales para identificar el mecanismo de acción de KDM4C durante la mitosis, tomando en cuenta que la sobre-expresión de la proteína también afecta el proceso de mitosis en la línea celular de osteosarcoma [138].

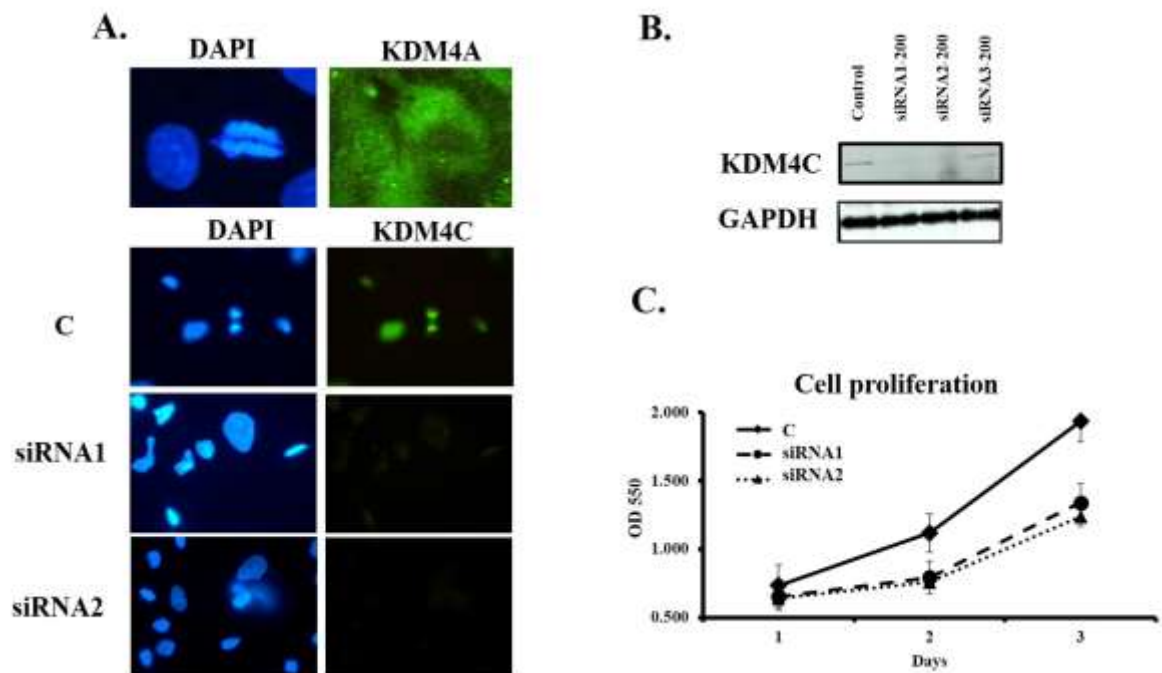


Figura 19. El silenciamiento de KDM4C por tratamiento con siRNA y su efecto en la proliferación celular. Todas las imágenes y datos corresponden a muestras representativas de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado A. IFAs de células HCC38 tratadas con

siRNA o no tratadas, como se describe en la sección 3.2.1. Note que KDM4C, pero no KDM4A, está presente en los cromosomas durante la mitosis. Adicionalmente, se observa una reducción significativa de la fluorescencia en las muestras tratadas 1C y 2C con respecto a los controles, donde la señal de KDM4C colocaliza con la tinción con DAPI. B. Western blot del extracto total de proteínas de células tratadas con cada siRNA comparadas con extractos análogos de células control tratadas con Lipofectamina RNAiMAX solamente. La Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se empleó como gen "housekeeping". La intensidad de las bandas se analizó mediante el software ImageJ (NIH, USA) mostrando una reducción en los niveles de KDM4C hasta en 85% (Datos no mostrados), para el tratamiento con los siRNAs 1c y 2c. C. Ensayos de proliferación celular. La densidad óptica a 550 nm se evaluó a 24h y 48h mediante un ensayo MTT, con una reducción significativa de la señal para las células tratadas con los siRNAi (1c y 2c) respecto a los controles.

3.3.2. *KDM4C es importante para la proliferación celular*

La relevancia de KDM4C para la supervivencia de células de cáncer de seno triple-negativo se probó mediante ensayos de proliferación empleando células HCC38 tratados con los siRNA 1c y 2c. 24h y 48h después de las transfección con los siRNAs, se observó (barras negras, Figure 19C) una reducción significativa de la proliferación celular (aproximadamente 20% y 40%, respectivamente) en contraste con células sin tratamiento (Figura 19C), sugiriendo que KDM4C está asociado con la supervivencia de la línea HCC38. Estos resultados concuerdan con reportes previos que involucran otros miembros de la subfamilia KDM4 en cáncer de mama [104, 189].

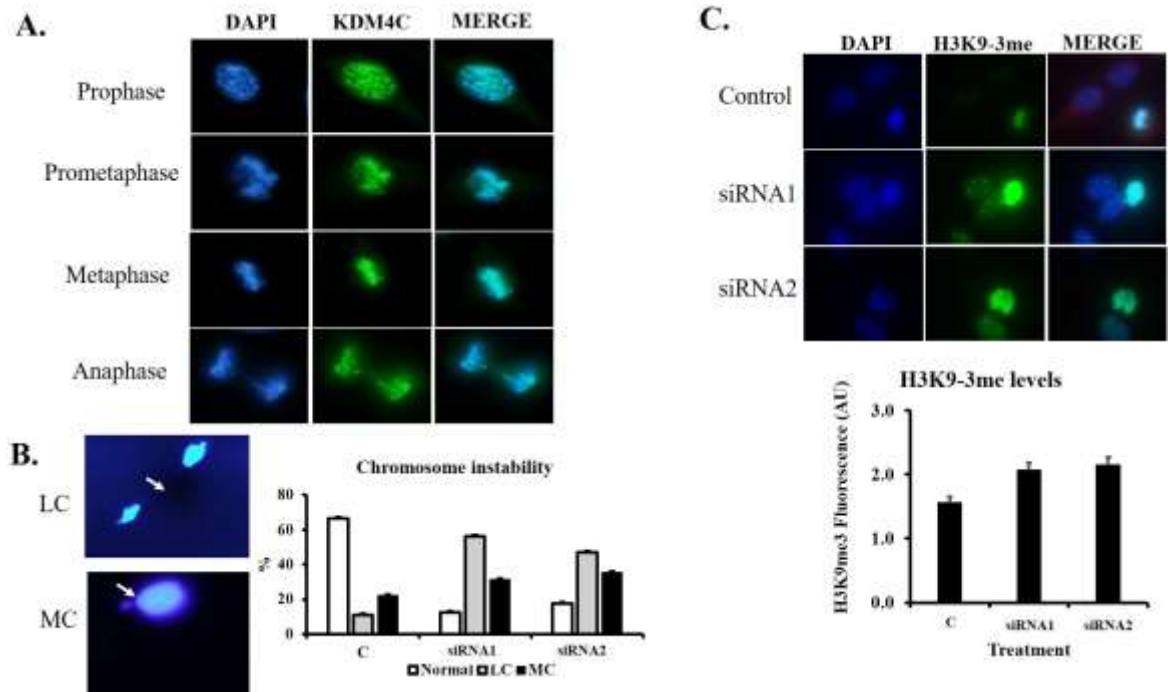


Figura 20. Localización de KDM4C y el efecto de su silenciamiento en la estabilidad cromosómica.

A. IFAs representativos a 100x para muestras por triplicado, en las cuales 20-30 células al azar se seleccionaron por muestra en diferentes estadios de la mitosis, ilustrando la localización de KDM4C en los cromosomas durante su segregación. ADN (DAPI, Azul), KDM4C (Anti-KDM4C, Verde) e imágenes de unión se presentan. B. Inmunofluorescencias representativas mostrando defectos tales como cromosomas en lag (LG) y micronúcleos (MC) en las células HCC38 tratadas con siRNA. La cuantificación de dichos errores en la segregación cromosómica se presenta en la figura inferior. C. IFAs de controles y células tratadas con siRNA presentando los niveles de trimetilación de la H3K9. La intensidad de las señales para determinar la demetilación de la histona blanco se evaluaron mediante el software ImageJ software (National Institute of Health, USA) según se presenta en la figura inferior.

3.3.3. *El silenciamiento de KDM4C reduce la migración celular de HCC38*

La capacidad de migración e invasión de HCC38 se evaluó en presencia o ausencia de KDM4C mediante ensayos Transwell. Las células carentes de KDM4C mostraron una reducción en su habilidad e migración comparado con las células sin tratar (Figura 21A). Sin embargo, bajo las mismas condiciones su capacidad invasiva a través de una matriz de colágeno se incrementó (Figura 21B). Adicionalmente, los efectos aleatorios que puedan afectar el experimento pueden ser ignorados tomando en cuenta las células HCC38 son incapaces de migrar o invadir cuando se empleó medio libre de suero en la parte inferior de las cámaras Transwell correspondientes a cada ensayo.

El proceso de invasión es un mecanismo complejo y activo, que envuelve la polarización y formación de protrusiones celulares conocidas como invadopodia, que reconocen e interactúan con la matriz extracelular (MEC) en un esquema mediado por diferentes integrinas, seguido por el reclutamiento de un amplio número de moléculas con la capacidad de degradar la MEC y facilitar el movimiento celular a través de barreras biológicas [215].

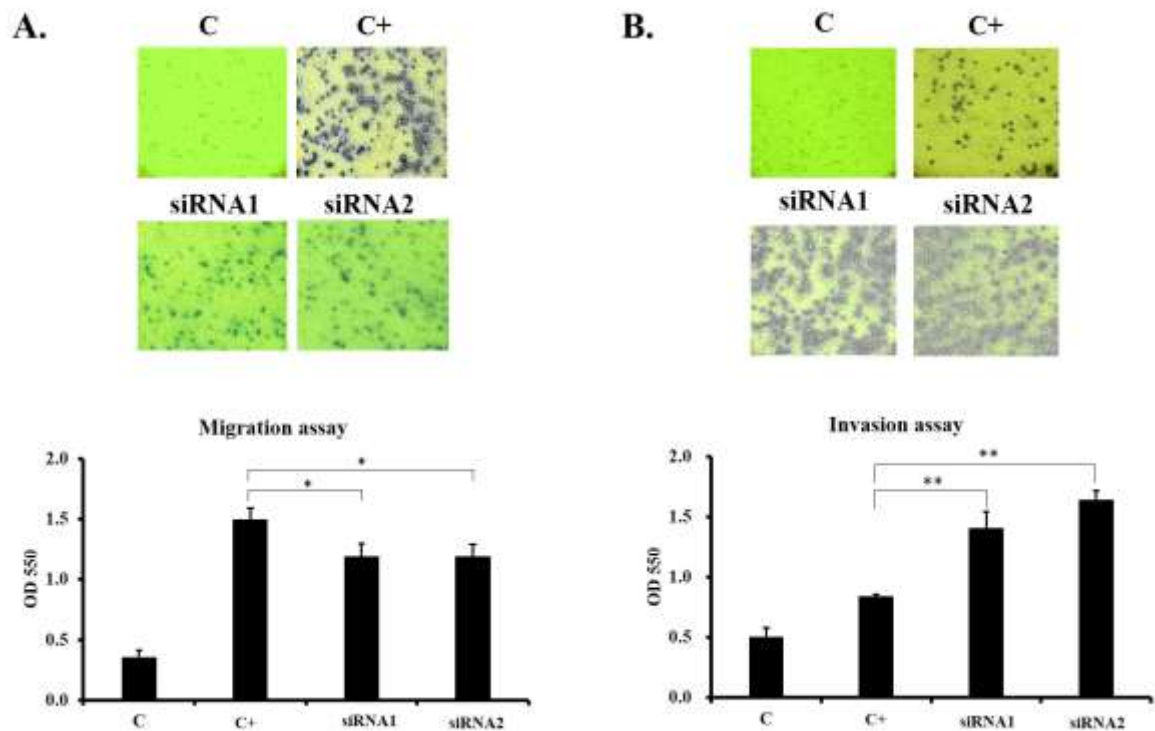


Figura 21. Ensayos de migración e invasión. A. Ensayos de migración empleando células con depleción de KDM4C o células controles realizados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Tinciones representativas de células migratorias se presentan en cada muestra con su cuantificación a OD 550 nm, con una reducción clara en la migración de las células HCC38 tras el tratamiento con siRNAs. B. Ensayos de invasión de células HCC38 en presencia o ausencia de KDM4C. Se presentan imágenes ilustrativas y su cuantificación, confirmando un incremento de la capacidad invasiva de la línea HCC38 tras el silenciamiento de KDM4C. La información presentada ilustra los errores estándar de los promedios de los datos de al menos tres experimentos independientes, donde * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$. Estas observaciones confirman el incremento de invasividad de las células HCC38 tras la reducción de la expresión de KDM4C.

Amplios estudios desarrollados con otro de los miembros relevantes de la subfamilia KDM4, la proteína KDM4A, han demostrado su importancia en los procesos de migración e invasión, ya que su eliminación resulta en una reducción de ambos mecanismos de movimiento en células de cáncer de seno [101, 189]. De la misma manera, en los experimentos aquí realizados bajo condiciones similares a las descritas para KDM4A, el silenciamiento de KDM4C también redujo el número de células migratorias en ensayos tipo transwell (Figure 21A). Sin embargo, no se observó el mismo fenómeno sobre la capacidad invasiva de la línea tumoral HCC38 (Figure 21B). Este comportamiento sugiere que KDM4C puede estar asociada con la expresión o actividad de proteínas que participan en la regulación de las rutas de migración/invasión, tales como la ruta Src quinasa-FAK (del inglés Focal Adhesion Kinase). Es importante resaltar que se ha demostrado que el silenciamiento de FAK en células de melanoma produce un fenotipo celular similar al observado aquí para KDM4C: la promoción de la capacidad invasiva junto a una reducción en la migración celular [216]. Estas observaciones impulsan el análisis de posibles relaciones moleculares entre KDM4C y la señalización mediada por FAK-Src, como por ejemplo la descripción previa de la modulación de la actividad de FAK en carcinomas por acción del silenciamiento de la inositol hexakisfosfato quinasa 1 (IP6K1) [217], quinasa cuyos niveles de expresión están relacionados con la disociación de KDM4C de la cromatina, incrementando los niveles de H3K9me3 [218].

3.3.4. Pacientes con altos niveles de expresión de KDM4C presentan una mejor prognosis

La importancia de KDM4C como marcador de prognosis se evaluó mediante la base de datos asociada al servicio Kaplan-Meier plotter [212]. Empleando la información disponible, se obtuvieron curvas para todos los pacientes con cáncer de seno (n=3951; Figura 22A). En adición, se obtuvieron curvas de supervivencia con diferencia significativas para los siguientes subgrupos: Receptor de estrógenos (ER) negativo (n=801; Figura 22B) y presencia en nódulos linfáticos positiva (n=1133; Figura 22C). En estos casos, una elevada expresión del mRNA de KDM4C se correlaciono significativamente con la supervivencia libre de recaída (RFS), indicando que bajos niveles de KDM4C se correlacionan con un mayor riesgo de recaída y el desarrollo de una forma más agresiva de cáncer de seno en estos pacientes. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia con relevancia estadística al analizar muestras de pacientes con cáncer de seno triple negativo (n=255, HR, 0.78; 95% CI, 0.51-1.2; P=0.26), talvez debido a la cantidad limitada de muestras disponibles para este tipo de pacientes, tomando en cuenta que la relevancia de KDM4C para esta forma de la enfermedad ha sido evaluada en trabajos previos. Con respecto a la ausencia de significancia estadística al comparar muestras negativas a PR (n=549, HR, 0.76; 95% CI, 0.54-1.05; P=0.099) y HER2 (n=800, HR, 0.82; 95% CI, 0.6-1.12; P=0.2), esto puede indicar una ruta independiente para el papel de KDM4C en el desarrollo de estos fenotipos específicos de cáncer de seno.

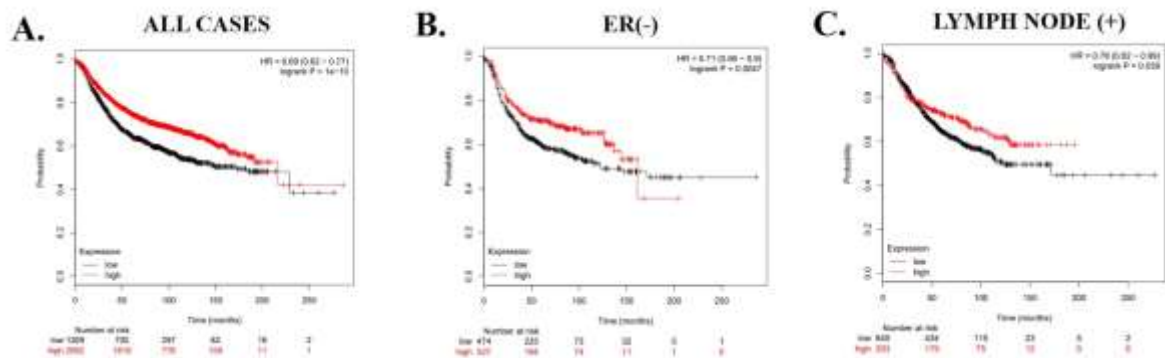


Figura 22. Gráfica Kaplan-Meier. Gráficas de supervivencia de cáncer de seno basados en la expresión de KDM4C para todos los casos de cáncer de seno reportados en kmplot.com (A), así como en función de la ausencia de expresión del receptor de estrógenos (B) o presencia de células tumorales en los nódulos linfáticos (C). Empleando una base de datos pública (KM plotter; www.kmplot.com), Las curvas de supervivencia libre de recaída se analizaron mediante la obtención de valores HR y Log-rank. Los valores P correspondientes se calcularon en la base de datos y se presentan en cada gráfica.

4. DISCUSIÓN

La familia histona demetilasa (KDM) comprende una amplia variedad de modificadores epigenéticos con la capacidad única de eliminar grupos metilo de residuos de lisina trimetilados. Junto con esta característica, cumplen un importante papel en el mantenimiento del fenotipo celular a lo largo de diferentes procesos incluyendo diferenciación, desarrollo embrionario, respuesta inmune, envejecimiento, entre otros [185, 219-222]. Entre las 7 subfamilias de histona demetilasa, los miembros de la subfamilia KDM4 han despertado gran interés

debido a su participación en el desarrollo una gran variedad de enfermedades y desórdenes neurológicos [223, 224], incluyendo varias formas de cáncer como leucemia, linfoma clásico de Hodgkin, próstata, seno, [97, 99, 110, 225, 226]. KDM4C, también conocida como JMJD2C o GASC1, es un importante oncogen que forma parte de las proteínas inducibles por hipoxia [221] y cuya amplificación ha sido ampliamente descrita en gran variedad de neoplasias [95, 97, 171, 200]. La función de KDM4C en el desarrollo y supervivencia de células tumorales envuelve diferentes mecanismos, incluyendo su activación mediada por hipoxia, un fenómeno comúnmente observado en estadios tempranos de la enfermedad [227-229]; modulación de la ruta JAK/STAT, la cual está asociada con el mantenimiento del fenotipo celular, y cuya alteración está asociada con el desarrollo de ciertas leucemias [230] o activación de rutas dependientes del receptor de andrógenos en el cáncer de próstata [130]. Con respecto al cáncer de seno, KDM4C ha sido reconocido como un marcador potencial de prognosis de esta forma de la enfermedad [193], formando parte del interactoma represor de la transcripción del coactivador del receptor esteroideal (Src-1) como mediador del silenciamiento de CD24 y PAWR (Pro-Apoptotic WT1 Regulator).

Este trabajo describe la caracterización del efecto del silenciamiento de KDM4c, así como el de la inhibición de su actividad por parte del inhibidor NCDM-32b, en el desarrollo y supervivencia de líneas de cáncer de seno triple-negativo. En primer lugar, la importancia de la localización celular de KDM4C se evaluó en diferentes líneas de cáncer de mama triple negativo, siendo ubicada a nivel de los

cromosomas durante el proceso de mitosis (Figuras 15 y 20). Cabe resaltar que Kupersmith y colaboradores [138] demostraron recientemente que esta histona demetilasa es la única proteína de la subfamilia KDM4 con la capacidad de interactuar con la cromatina durante la mitosis en células derivadas de osteosarcoma (U2OS), lo cual concuerda con nuestros resultados en los cuales KDM4A, otra importante histona demetilasa en el desarrollo del cáncer de seno [101, 187], es excluida de la estructura mitótica en las líneas celulares evaluadas. Dicha localización puede implicar la asociación de KDM4C con procesos de importancia para la segregación cromosómica, tomando en cuenta la importancia del silenciamiento o sobre-expresión de KDM4C frente a un incremento en el número de errores presentes durante la mitosis en células U2OS [138]. Cabe notar que, en condiciones similares, el silenciamiento de KDM4C incrementó el número de errores mitóticos (micronúcleos y cromosomas en lag) en la línea celular triple-negativa HCC38 (Figura 20), fenómeno que también se observó al inhibir la actividad demetilasa de esta proteína (Figura 17). Estos hechos indican que la actividad de KDM4C está directamente relacionada con su participación en el mantenimiento de una correcta segregación cromosómica. Tales características soportan la importancia del estudio de los inhibidores de la actividad demetilasa como bases promisorias para el diseño de la nueva generación de tratamientos para este tipo de enfermedades [231-233].

Adicionalmente se analizó la influencia de KDM4C en la proliferación celular, encontrando que tanto la inhibición enzimática como la delección de la proteína

resultaron en una disminución de la tasa de multiplicación tumoral frente a líneas celulares no tratadas (Figuras 18 y 19). Aunque el papel de KDM4C en la evolución del cáncer de seno aun esta por ser completamente determinado, estos resultados soportan observaciones previas acerca de la influencia de esta proteína en la multiplicación celular, tomando en cuenta que KDM4C modula la expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento celular tales como los activadores HRAS y MYC, y la proteína de control del ciclo celular CDCL5 [209].

Por otra parte, la influencia del silenciamiento de KDM4C en los procesos de migración e invasión se probó mediante ensayos transwell (Figura 21). La disminución en los niveles de expresión de KDM4C produjo una disminución en la capacidad migratoria de la línea celular HCC38, de manera similar al efecto de otros miembros de la familia KDM4 en diversas clases de células tumorales, así como el efecto de estudios similares empleando esta proteína en otras formas de neoplasia como cáncer de pulmón u osteosarcoma [97, 132, 234].

De manera interesante, al someter celular tratadas con siRNA dirigido contra KDM4C a prueba de invasión, la disminución de los niveles de expresión de KDM4C resultó en un incremento en la capacidad invasiva de la línea celular de cáncer de seno triple negativo (Figura 21). Este resultado indica que KDM4C puede representar un papel único e independiente del observado en otros tipos de cáncer en el desarrollo del cáncer de seno triple negativo, en el cual puede estar involucrada con los mecanismos de regulación que median la evolución entre células migratorias e invasivas, ya que un fenotipo similar de inducción de la

invasividad vs. reducción de la migración se ha observado en ensayos bajo condiciones similares con la proteína FAK, una de las proteínas que median el paso de una célula tumoral entre un fenotipo migratorio y un fenotipo agresivo e invasivo [216]. Con respecto a este comportamiento, los perfiles de expresión del mRNA de KDM4C se analizó mediante gráficas Kaplan-Meier. De manera interesante, las muestras de cáncer de seno que presentan bajos niveles de este mRNA presentan una alta correlación con eventos de recurrencia en pacientes con cáncer de seno, principalmente en casos específicos en función de la expresión de importantes marcadores como el receptor de estrógenos y la invasión a nódulos linfáticos (Figura 22). Estos resultados indican que KDM4C inhibe la evolución del cáncer de seno, controlando su agresividad como una función independiente de la amplia variedad de fenotipos que se pueden observar en las diferentes formas de cáncer de seno. En adición, en cuanto se refiere a cáncer de seno, se ha reportado que KDM4C puede ser analizado como un marcador de prognosis positiva, ya que su negatividad se encuentra asociada a tipos de cáncer histopatológicos altamente agresivos (ductal, grado II, grado III y triple negativo) [194]. Dentro de los resultados más interesantes del estudio mencionado se encuentran los niveles de expresión de KDM4C en función del grado histológico de la muestra analizada. En este caso KDM4C presenta una mayor presencia en los tumores Grado I, mientras que disminuye en tumores grado II y grado III, indicando que la función de KDM4C puede estar involucrada principalmente con las fases tempranas de la evolución del tumor donde aún no es relevante la capacidad invasiva de las células, y disminuir a medida que la célula

tumoral evoluciona a un fenotipo agresivo y metastático, observaciones que pueden asociarse con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Sin embargo, se requiere amplia evidencia para soportar o descartar cada una de estas hipótesis, lo que abre un interesante camino para nuevos estudios en esta área.

En resumen, este trabajo presenta la determinación de los efectos de la disminución de los niveles de KDM4C o de su actividad enzimática, en la capacidad de división celular, proliferación, segregación cromosómica, migración e invasión de diferentes líneas tumorales de cáncer de mama triple negativo, incluyendo por ejemplo a HCC38, una línea ductal primaria tipo tumor-nodo-metástasis (TNM) estadio IIB, grado 3. En conjunto, los resultados resaltan la importancia de KDM4C y su actividad demetilasa para cada uno de los procesos mencionados en modelos celulares de las formas más agresivas de cáncer de seno, soportando el potencial de KDM4C como un promisorio blanco para nuevos tratamientos contra el cáncer de seno triple negativo, refractario a gran número de estrategias terapéuticas y de pobre prognosis para más del medio millón de mujeres que anualmente padecen este tipo de neoplasias, la principal razón del desarrollo de la presente investigación.

5. CONCLUSIONES

- KDM4C interactúa con los cromosomas mitóticos en diferentes líneas modelo de cáncer de seno triple negativo, manteniendo dicha interacción a lo largo de la división celular, en contraste con la localización de otros miembros de esta importante subfamilia de proteínas como KDM4A.
- Alteraciones en los niveles de expresión de KDM4C, así como la inhibición de su actividad enzimática, resultan en un incremento significativo en diferentes defectos de la segregación cromosómica, resaltando la importancia de KDM4C en el mantenimiento de la integridad de la información génica.
- La proliferación celular de líneas de cáncer de seno triple negativo está directamente asociada a los niveles de expresión y actividad demetilasa de KDM4C, indicando la relevancia de esta proteína en el crecimiento tumoral de esta forma de neoplasia.
- KDM4C está involucrada en la regulación de los fenómenos de migración e invasión celular, siendo que la reducción de su perfil de expresión disminuye la capacidad migratoria mientras promueve el desarrollo de un fenotipo invasivo en líneas de cáncer de seno triple negativo, generando nuevas rutas de investigación frente a la participación de KDM4C en los procesos asociados a la migración celular y la capacidad metastásica de la forma más agresiva de cáncer de seno.

- Como marcador potencial de pronóstico en el desarrollo de cáncer de seno, KDM4C presenta un potencial de gran interés, tomando en cuenta que bajos niveles del mRNA de esta proteína en muestras de pacientes se encuentran asociados a un mayor tiempo de supervivencia libre de recaídas, lo que puede indicar que KDM4C es requerida en fases tempranas de la enfermedad, con tendencia a disminuir a medida que el tumor evoluciona a formas más agresivas e invasivas.
- KDM4C participa en procesos de vital importancia para el desarrollo y evolución del cáncer de seno triple negativo, involucrando la multiplicación celular durante el crecimiento del tumor inicial, así como los procesos asociados con el movimiento celular que, bajo una fina regulación celular, finalmente resultan en la invasión de diferentes tejidos y la diseminación de células malignas a diferentes órganos del cuerpo durante el desarrollo de la metástasis. Modular la presencia de la proteína, así como su actividad demetilasa, representan blancos prometedores para el desarrollo de nuevos tratamientos eficaces y específicos de las formas más agresivas y de peor pronóstico de neoplasias de seno triple negativo.

6. RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos en líneas celulares son altamente relevantes, y su mayor contraste sería el análisis de los parámetros aquí presentados en muestras obtenidas de tejido vivo, derivado de mastectomías en las cuales pueden obtenerse células tumorales en su ambiente común, y además pueden obtenerse controles de tejido del mismo paciente, generando puntos de comparación más precisos.
- Junto con el análisis a nivel de línea celular y muestras de tejido, el potencial de ensayos in vivo en modelos adecuados representa una poderosa herramienta en la determinación de la importancia de KDM4C en un organismo completo. En este caso el empleo de modelos knock-down condicionales para KDM4C pueden ser de gran utilidad, y serían ampliamente recomendados para este tipo de trabajos.
- La actividad de KDM4C y su papel epigenético, así como su importancia para la división celular pueden también estar asociados a alteraciones en los perfiles de expresión o modificación de la actividad de importantes arcadores moleculares como PTEN, CDH1 o los genes BRCA1/2, entre otros. En busca de establecer el mecanismo de acción de KDM4C, es altamente recomendable establecer el efecto de la alteración de esta histona demetilasa en la expresión y función de estas relevantes proteínas.

- Los resultados de los ensayos de migración e invasión abren un gran número de posibilidades frente al mecanismo, ruta de señalización o blancos de modificación de la actividad de KDM4C que pueden ser también de importancia para el fenotipo agresivo del cáncer de seno triple negativo. Es por tanto de gran relevancia elucidar el papel de KDM4C en la capacidad migratoria e invasiva de este tipo de cáncer.
- El objetivo primario de todo estudio de este tipo debe involucrar la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias o tecnologías para el tratamiento de las enfermedades en pro del beneficio del paciente. Desde este punto de vista, la relevancia de la actividad de KDM4C implica que es importante analizar la posibilidad de identificar o diseñar nuevos inhibidores frente a la actividad de esta proteína, evaluando su potencial como tratamiento y posible escalamiento para su aplicación comercial.

7. LISTA DE TABLAS

Tabla No. 1. Características principales de las proteínas KDM.....	34
---	----

8. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modificaciones post-trasduccionales de las histonas	15
Figura 2. Patrón de la Metilación del ADN	17
Figura 3. Citrulinación de proteínas	18
Figura 4. ADP-ribosilación de arginina	19
Figura 5. Fosforilación de serina	20
Figura 6. Isomerización cis-trans prolina	21
Figura 7. Ubiquitinación de la Lisina	22
Figura 8. SUMOización de lisina	23
Figura 9. Acetilación/Deacetilación de Lisina en histonas	25
Figura 10. Patrones de metilación de a. arginina y b. lisina.	26
Figura 11. Mecanismo de acción de las Amina oxidasas	29
Figura 12. Mecanismo de acción de los miembros de la familia Oxigenasa	30
Figura 13. Relación estructural de diferentes miembros de la familia jumonji	32
Figura 14. Inhibidores de histona demetilasa	40
Figura 15. Localización celular de KDM4C y KDM4A durante la mitosis.	52

Figura 16. La inhibición de KDM4C con NCDM-32b afecta los niveles de metilación de la histona 3 Lisina 9	53
Figura 17. Efecto de la actividad de KDM4C en la estabilidad cromosómica	55
Figura 18. Ensayos de proliferación celular	58
Figura 19. El silenciamiento de KDM4C por tratamiento con siRNA y su efecto en la proliferación celular	68
Figura 20. Localización de KDM4C y el efecto de su silenciamiento en la estabilidad cromosómica.....	70
Figura 21. Ensayos de migración e invasión	72
Figura 22. Gráfica Kaplan-Meier	75

9. REFERENCIAS

- [1] B.S. Shruthi, P. Vinodhkumar, Selvamani, Proteomics: A new perspective for cancer, *Advanced biomedical research*, 5 (2016) 67.
- [2] A.J. Bannister, T. Kouzarides, Regulation of chromatin by histone modifications, *Cell research*, 21 (2011) 381-395.
- [3] R.D. Kornberg, Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA, *Science*, 184 (1974) 868-871.
- [4] F. Lizcano, J. Garcia, Epigenetic control and cancer: the potential of histone demethylases as therapeutic targets, *Pharmaceuticals*, 5 (2012) 963-990.
- [5] P. Zhu, G. Li, Structural insights of nucleosome and the 30-nm chromatin fiber, *Current opinion in structural biology*, 36 (2016) 106-115.
- [6] M. Xu, B. Zhu, Nucleosome assembly and epigenetic inheritance, *Protein & cell*, 1 (2010) 820-829.
- [7] S.L. Berger, T. Kouzarides, R. Shiekhhattar, A. Shilatifard, An operational definition of epigenetics, *Genes & development*, 23 (2009) 781-783.
- [8] S.L. Berger, The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature*, 447 (2007) 407-412.
- [9] J.A. Latham, S.Y. Dent, Cross-regulation of histone modifications, *Nature structural & molecular biology*, 14 (2007) 1017-1024.

- [10] C. Sawan, Z. Herceg, Histone modifications and cancer, *Advances in genetics*, 70 (2010) 57-85.
- [11] K.C. Wang, H.Y. Chang, Molecular mechanisms of long noncoding RNAs, *Molecular cell*, 43 (2011) 904-914.
- [12] G. Hu, F. Niu, B.A. Humburg, K. Liao, S. Bendi, S. Callen, H.S. Fox, S. Buch, Molecular mechanisms of long noncoding RNAs and their role in disease pathogenesis, *Oncotarget*, 9 (2018) 18648-18663.
- [13] D. Bayarsaihan, Epigenetic mechanisms in inflammation, *Journal of dental research*, 90 (2011) 9-17.
- [14] F.F. Costa, Epigenomics in cancer management, *Cancer management and research*, 2 (2010) 255-265.
- [15] H.C. Tsai, S.B. Baylin, Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine, *Cell research*, 21 (2011) 502-517.
- [16] F.R. Zahir, C.J. Brown, Epigenetic impacts on neurodevelopment: pathophysiological mechanisms and genetic modes of action, *Pediatric research*, 69 (2011) 92R-100R.
- [17] X. Zhang, S.M. Ho, Epigenetics meets endocrinology, *Journal of molecular endocrinology*, 46 (2011) R11-32.
- [18] S. Castellano, D. Kuck, M. Viviano, J. Yoo, F. Lopez-Vallejo, P. Conti, L. Tamborini, A. Pinto, J.L. Medina-Franco, G. Sbardella, Synthesis and biochemical evaluation of delta(2)-isoxazoline derivatives as DNA methyltransferase 1 inhibitors, *Journal of medicinal chemistry*, 54 (2011) 7663-7677.

- [19] Y. Chen, W. Jie, W. Yan, K. Zhou, Y. Xiao, Lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1): A potential molecular target for tumor therapy, *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 22 (2012) 53-59.
- [20] T.Z. Yi, J. Li, X. Han, J. Guo, Q. Qu, L. Guo, H.D. Sun, W.H. Tan, DNMT Inhibitors and HDAC Inhibitors Regulate E-Cadherin and Bcl-2 Expression in Endometrial Carcinoma in vitro and in vivo, *Chemotherapy*, 58 (2012) 19-29.
- [21] M. Ahmad, A. Hamid, A. Hussain, R. Majeed, Y. Qurishi, J.A. Bhat, R.A. Najar, A.K. Qazi, M.A. Zargar, S.K. Singh, A.K. Saxena, Understanding Histone Deacetylases in the Cancer Development and Treatment: An Epigenetic Perspective of Cancer Chemotherapy, *DNA and cell biology*, (2012).
- [22] O. Mehdi, S. Francoise, C.L. Sofia, G. Urs, Z. Kevin, S. Bernard, S. Igor, C.D. Anabela, L. Dominique, M. Eric, O. Ali, HDAC gene expression in pancreatic tumor cell lines following treatment with the HDAC inhibitors panobinostat (LBH589) and trichostatine (TSA), *Pancreatology*, 12 (2012) 146-155.
- [23] P.N. Munster, K.T. Thurn, S. Thomas, P. Raha, M. Lacevic, A. Miller, M. Melisko, R. Ismail-Khan, H. Rugo, M. Moasser, S.E. Minton, A phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatment of patients with hormone therapy-resistant breast cancer, *British journal of cancer*, 104 (2011) 1828-1835.
- [24] T. Oike, H. Ogiwara, K. Torikai, T. Nakano, J. Yokota, T. Kohno, Garcinol, a Histone Acetyltransferase Inhibitor, Radiosensitizes Cancer Cells by Inhibiting Non-Homologous End Joining, *International journal of radiation oncology, biology, physics*, (2012).

- [25] K.T. Thurn, S. Thomas, A. Moore, P.N. Munster, Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer, *Future Oncol*, 7 (2011) 263-283.
- [26] N. Uehara, K. Yoshizawa, A. Tsubura, Vorinostat enhances protein stability of p27 and p21 through negative regulation of Skp2 and Cks1 in human breast cancer cells, *Oncology reports*, (2012).
- [27] S. Hamada, T. Suzuki, K. Mino, K. Koseki, F. Oehme, I. Flamme, H. Ozasa, Y. Itoh, D. Ogasawara, H. Komaarashi, A. Kato, H. Tsumoto, H. Nakagawa, M. Hasegawa, R. Sasaki, T. Mizukami, N. Miyata, Design, synthesis, enzyme-inhibitory activity, and effect on human cancer cells of a novel series of jumonji domain-containing protein 2 histone demethylase inhibitors, *Journal of medicinal chemistry*, 53 (2010) 5629-5638.
- [28] M. Rao, N. Chinnasamy, J.A. Hong, Y. Zhang, M. Zhang, S. Xi, F. Liu, V.E. Marquez, R.A. Morgan, D.S. Schrupp, Inhibition of histone lysine methylation enhances cancer-testis antigen expression in lung cancer cells: implications for adoptive immunotherapy of cancer, *Cancer research*, 71 (2011) 4192-4204.
- [29] G. Toyokawa, H.S. Cho, Y. Iwai, M. Yoshimatsu, M. Takawa, S. Hayami, K. Maejima, N. Shimizu, H. Tanaka, T. Tsunoda, H.I. Field, J.D. Kelly, D.E. Neal, B.A. Ponder, Y. Maehara, Y. Nakamura, R. Hamamoto, The histone demethylase JMJD2B plays an essential role in human carcinogenesis through positive regulation of cyclin-dependent kinase 6, *Cancer Prev Res (Phila)*, 4 (2011) 2051-2061.

- [30] G. Toyokawa, H.S. Cho, K. Masuda, Y. Yamane, M. Yoshimatsu, S. Hayami, M. Takawa, Y. Iwai, Y. Daigo, E. Tsuchiya, T. Tsunoda, H.I. Field, J.D. Kelly, D.E. Neal, Y. Maehara, B.A. Ponder, Y. Nakamura, R. Hamamoto, Histone lysine methyltransferase Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in human carcinogenesis through regulation of the Wnt pathway, *Neoplasia*, 13 (2011) 887-898.
- [31] J. Wang, F. Lu, Q. Ren, H. Sun, Z. Xu, R. Lan, Y. Liu, D. Ward, J. Quan, T. Ye, H. Zhang, Novel histone demethylase LSD1 inhibitors selectively target cancer cells with pluripotent stem cell properties, *Cancer research*, 71 (2011) 7238-7249.
- [32] B. Jin, Y. Li, K.D. Robertson, DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?, *Genes & cancer*, 2 (2011) 607-617.
- [33] A. Bird, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes & development*, 16 (2002) 6-21.
- [34] M. Kulis, M. Esteller, DNA methylation and cancer, *Advances in genetics*, 70 (2010) 27-56.
- [35] C. Kurkjian, S. Kummar, A.J. Murgo, DNA methylation: its role in cancer development and therapy, *Current problems in cancer*, 32 (2008) 187-235.
- [36] H. Cedar, Y. Bergman, Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms, *Nature reviews. Genetics*, 10 (2009) 295-304.
- [37] R.A. Irvine, I.G. Lin, C.L. Hsieh, DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation, *Molecular and cellular biology*, 22 (2002) 6689-6696.

- [38] L. Johansson, F. Pratesi, M. Brink, L. Arlestig, C. D'Amato, D. Bartaloni, P. Migliorini, S. Rantapaa-Dahlqvist, Antibodies directed against endogenous and exogenous citrullinated antigens pre-date the onset of rheumatoid arthritis, *Arthritis research & therapy*, 18 (2016) 127.
- [39] B.R. England, G.M. Thiele, T.R. Mikuls, Anticitrullinated protein antibodies: origin and role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Current opinion in rheumatology*, 29 (2017) 57-64.
- [40] N. Umeda, I. Matsumoto, H. Kawaguchi, Y. Kurashima, Y. Kondo, H. Tsuboi, H. Ogishima, T. Suzuki, Y. Kagami, T. Sakyu, A. Ishigami, N. Maruyama, T. Sumida, Prevalence of soluble peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) and anti-PAD4 antibodies in autoimmune diseases, *Clinical rheumatology*, 35 (2016) 1181-1188.
- [41] P.O. Hassa, S.S. Haenni, M. Elser, M.O. Hottiger, Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70 (2006) 789-829.
- [42] T. Hunter, Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell*, 80 (1995) 225-236.
- [43] H. Jacobsen, D.A. Epstein, R.M. Friedmann, B. Safer, P.F. Torrence, Double-stranded RNA-dependent phosphorylation of protein P1 and eukaryotic initiation factor 2 alpha does not correlate with protein synthesis inhibition in a cell-free system from interferon-treated mouse L cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80 (1983) 41-45.
- [44] W.J. Wedemeyer, E. Welker, H.A. Scheraga, Proline cis-trans isomerization and protein folding, *Biochemistry*, 41 (2002) 14637-14644.

- [45] B.M. Duniak, J.E. Gestwicki, Peptidyl-Proline Isomerases (PPlases): Targets for Natural Products and Natural Product-Inspired Compounds, *Journal of medicinal chemistry*, 59 (2016) 9622-9644.
- [46] R. Striker, A. Mehle, Inhibitors of peptidyl proline isomerases as antivirals in hepatitis C and other viruses, *PLoS pathogens*, 10 (2014) e1004428.
- [47] G.L. Grice, J.A. Nathan, The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73 (2016) 3497-3506.
- [48] L. Zhang, F. Gong, The emerging role of deubiquitination in nucleotide excision repair, *DNA repair*, 44 (2016) 118-122.
- [49] B. Suresh, J. Lee, S.H. Hong, K.S. Kim, S. Ramakrishna, The role of deubiquitinating enzymes in spermatogenesis, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72 (2015) 4711-4720.
- [50] A. Etzioni, A. Ciechanover, E. Pikarsky, Immune defects caused by mutations in the ubiquitin system, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 139 (2017) 743-753.
- [51] E. Lazzari, G. Meroni, TRIM32 ubiquitin E3 ligase, one enzyme for several pathologies: From muscular dystrophy to tumours, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 79 (2016) 469-477.
- [52] J. Liu, C. Zhang, X.L. Wang, P. Ly, V. Belyi, Z.Y. Xu-Monette, K.H. Young, W. Hu, Z. Feng, E3 ubiquitin ligase TRIM32 negatively regulates tumor suppressor p53 to promote tumorigenesis, *Cell death and differentiation*, 21 (2014) 1792-1804.

- [53] E. Kudryashova, J. Wu, L.A. Havton, M.J. Spencer, Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM32 in mice leads to a myopathy with a neurogenic component, *Human molecular genetics*, 18 (2009) 1353-1367.
- [54] J. Li, Q.Y. Chai, C.H. Liu, The ubiquitin system: a critical regulator of innate immunity and pathogen-host interactions, *Cellular & molecular immunology*, 13 (2016) 560-576.
- [55] A. Princz, N. Tavernarakis, The role of SUMOylation in ageing and senescent decline, *Mechanisms of ageing and development*, (2017).
- [56] F.Y. Liu, Y.F. Liu, Y. Yang, Z.W. Luo, J.W. Xiang, Z.G. Chen, R.L. Qi, T.H. Yang, Y. Xiao, W.J. Qing, D.W. Li, SUMOylation in Neurological Diseases, *Current molecular medicine*, (2017).
- [57] L. Gong, R. Qi, D.W. Li, Sumoylation Pathway as Potential Therapeutic Targets in Cancer, *Current molecular medicine*, (2016).
- [58] W.S. Yang, M. Campbell, P.C. Chang, SUMO modification of a heterochromatin histone demethylase JMJD2A enables viral gene transactivation and viral replication, *PLoS pathogens*, 13 (2017) e1006216.
- [59] Y. Liu, Z. Zheng, B. Shu, J. Meng, Y. Zhang, C. Zheng, X. Ke, P. Gong, Q. Hu, H. Wang, SUMO Modification Stabilizes Enterovirus 71 Polymerase 3D To Facilitate Viral Replication, *Journal of virology*, 90 (2016) 10472-10485.
- [60] D.E. Sterner, S.L. Berger, Acetylation of histones and transcription-related factors, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 64 (2000) 435-459.

- [61] A. Eberharter, P.B. Becker, Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics, *EMBO reports*, 3 (2002) 224-229.
- [62] A. Richters, A.N. Koehler, Epigenetic Modulation using Small Molecules - Targeting Histone Acetyltransferases in Disease, *Current medicinal chemistry*, (2017).
- [63] A. Ansari, M.S. Rahman, S.K. Saha, F.K. Saikot, A. Deep, K.H. Kim, Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease, *Aging cell*, 16 (2017) 4-16.
- [64] C. Angiolilli, D.L. Baeten, T.R. Radstake, K.A. Reedquist, The acetyl code in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases, *Epigenomics*, (2017).
- [65] X. Qiu, X. Xiao, N. Li, Y. Li, Histone deacetylases inhibitors (HDACis) as novel therapeutic application in various clinical diseases, *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 72 (2017) 60-72.
- [66] A.J. Bannister, R. Schneider, T. Kouzarides, Histone methylation: dynamic or static?, *Cell*, 109 (2002) 801-806.
- [67] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstine, P.A. Cole, R.A. Casero, Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1, *Cell*, 119 (2004) 941-953.
- [68] A. Barski, S. Cuddapah, K. Cui, T.Y. Roh, D.E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev, K. Zhao, High-resolution profiling of histone methylations in the human genome, *Cell*, 129 (2007) 823-837.

- [69] R.A. Varier, H.T. Timmers, Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer, *Biochimica et biophysica acta*, 1815 (2011) 75-89.
- [70] J. Wesche, S. Kuhn, B.M. Kessler, M. Salton, A. Wolf, Protein arginine methylation: a prominent modification and its demethylation, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, (2017).
- [71] M. Luo, Current chemical biology approaches to interrogate protein methyltransferases, *ACS chemical biology*, 7 (2012) 443-463.
- [72] J.M. Burg, J.E. Link, B.S. Morgan, F.J. Heller, A.E. Hargrove, D.G. McCafferty, KDM1 class flavin-dependent protein lysine demethylases, *Biopolymers*, 104 (2015) 213-246.
- [73] J.H. Schulte, S. Lim, A. Schramm, N. Friedrichs, J. Koster, R. Versteeg, I. Ora, K. Pajtler, L. Klein-Hitpass, S. Kuhfittig-Kulle, E. Metzger, R. Schule, A. Eggert, R. Buettner, J. Kirfel, Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy, *Cancer research*, 69 (2009) 2065-2071.
- [74] D. Jie, Z. Zhongmin, L. Guoqing, L. Sheng, Z. Yi, W. Jing, Z. Liang, Positive expression of LSD1 and negative expression of E-cadherin correlate with metastasis and poor prognosis of colon cancer, *Digestive diseases and sciences*, 58 (2013) 1581-1589.
- [75] D.P. Mould, A.E. McGonagle, D.H. Wiseman, E.L. Williams, A.M. Jordan, Reversible inhibitors of LSD1 as therapeutic agents in acute myeloid leukemia: clinical significance and progress to date, *Medicinal research reviews*, 35 (2015) 586-618.

- [76] Q. Zhu, Y. Huang, L.J. Marton, P.M. Woster, N.E. Davidson, R.A. Casero, Jr., Polyamine analogs modulate gene expression by inhibiting lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and altering chromatin structure in human breast cancer cells, *Amino acids*, 42 (2012) 887-898.
- [77] D. Rotili, S. Tomassi, M. Conte, R. Benedetti, M. Tortorici, G. Ciossani, S. Valente, B. Marrocco, D. Labella, E. Novellino, A. Mattevi, L. Altucci, A. Tumber, C. Yapp, O.N. King, R.J. Hopkinson, A. Kawamura, C.J. Schofield, A. Mai, Pan-histone demethylase inhibitors simultaneously targeting Jumonji C and lysine-specific demethylases display high anticancer activities, *Journal of medicinal chemistry*, 57 (2014) 42-55.
- [78] R. Fang, A.J. Barbera, Y. Xu, M. Rutenberg, T. Leonor, Q. Bi, F. Lan, P. Mei, G.C. Yuan, C. Lian, J. Peng, D. Cheng, G. Sui, U.B. Kaiser, Y. Shi, Y.G. Shi, Human LSD2/KDM1b/AOF1 regulates gene transcription by modulating intragenic H3K4me2 methylation, *Molecular cell*, 39 (2010) 222-233.
- [79] D.N. Ciccone, H. Su, S. Hevi, F. Gay, H. Lei, J. Bajko, G. Xu, E. Li, T. Chen, KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints, *Nature*, 461 (2009) 415-418.
- [80] K.R. Stewart, L. Veselovska, J. Kim, J. Huang, H. Saadeh, S. Tomizawa, S.A. Smallwood, T. Chen, G. Kelsey, Dynamic changes in histone modifications precede de novo DNA methylation in oocytes, *Genes & development*, 29 (2015) 2449-2462.
- [81] T.A. Katz, S.N. Vasilatos, E. Harrington, S. Oesterreich, N.E. Davidson, Y. Huang, Inhibition of histone demethylase, LSD2 (KDM1B), attenuates DNA

methylation and increases sensitivity to DNMT inhibitor-induced apoptosis in breast cancer cells, *Breast cancer research and treatment*, 146 (2014) 99-108.

[82] T. Takeuchi, Y. Yamazaki, Y. Katoh-Fukui, R. Tsuchiya, S. Kondo, J. Motoyama, T. Higashinakagawa, Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation, *Genes & development*, 9 (1995) 1211-1222.

[83] D. Balciunas, H. Ronne, Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors, *Trends in biochemical sciences*, 25 (2000) 274-276.

[84] T. Takeuchi, Y. Watanabe, T. Takano-Shimizu, S. Kondo, Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development, *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 235 (2006) 2449-2459.

[85] S. Markolovic, T.M. Leissing, R. Chowdhury, S.E. Wilkins, X. Lu, C.J. Schofield, Structure-function relationships of human JmjC oxygenases-demethylases versus hydroxylases, *Current opinion in structural biology*, 41 (2016) 62-72.

[86] N.R. Rose, M.A. McDonough, O.N. King, A. Kawamura, C.J. Schofield, Inhibition of 2-oxoglutarate dependent oxygenases, *Chemical Society reviews*, 40 (2011) 4364-4397.

[87] C.J. Schofield, Z. Zhang, Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes, *Current opinion in structural biology*, 9 (1999) 722-731.

- [88] R. Cacabelos, C. Torrellas, Epigenetics of Aging and Alzheimer's Disease: Implications for Pharmacogenomics and Drug Response, *International journal of molecular sciences*, 16 (2015) 30483-30543.
- [89] R. Lardenoije, A. Iatrou, G. Kenis, K. Kompotis, H.W. Steinbusch, D. Mastroeni, P. Coleman, C.A. Lemere, P.R. Hof, D.L. van den Hove, B.P. Rutten, The epigenetics of aging and neurodegeneration, *Progress in neurobiology*, 131 (2015) 21-64.
- [90] H. Long, H. Yin, L. Wang, M.E. Gershwin, Q. Lu, The critical role of epigenetics in systemic lupus erythematosus and autoimmunity, *Journal of autoimmunity*, 74 (2016) 118-138.
- [91] R. Mathur, L. Sehgal, O. Havranek, S. Kohrer, T. Khashab, N. Jain, J.A. Burger, S.S. Neelapu, R.E. Davis, F. Samaniego, Inhibition of demethylase KDM6B sensitizes diffuse large B-cell lymphoma to chemotherapeutic drugs, *Haematologica*, 102 (2017) 373-380.
- [92] C.A. Zahnow, M. Topper, M. Stone, T. Murray-Stewart, H. Li, S.B. Baylin, R.A. Casero, Jr., Inhibitors of DNA Methylation, Histone Deacetylation, and Histone Demethylation: A Perfect Combination for Cancer Therapy, *Advances in cancer research*, 130 (2016) 55-111.
- [93] M. Wan, J. Liang, Y. Xiong, F. Shi, Y. Zhang, W. Lu, Q. He, D. Yang, R. Chen, D. Liu, M. Barton, Z. Songyang, The trithorax group protein Ash2l is essential for pluripotency and maintaining open chromatin in embryonic stem cells, *The Journal of biological chemistry*, 288 (2013) 5039-5048.

- [94] L.C. Young, D.W. McDonald, M.J. Hendzel, Kdm4b histone demethylase is a DNA damage response protein and confers a survival advantage following gamma-irradiation, *The Journal of biological chemistry*, 288 (2013) 21376-21388.
- [95] A. Italiano, R. Attias, A. Aurias, G. Perot, F. Burel-Vandenbos, J. Otto, N. Venissac, F. Pedeutour, Molecular cytogenetic characterization of a metastatic lung sarcomatoid carcinoma: 9p23 neocentromere and 9p23-p24 amplification including JAK2 and JMJD2C, *Cancer genetics and cytogenetics*, 167 (2006) 122-130.
- [96] J.C. Black, A.L. Manning, C. Van Rechem, J. Kim, B. Ladd, J. Cho, C.M. Pineda, N. Murphy, D.L. Daniels, C. Montagna, P.W. Lewis, K. Glass, C.D. Allis, N.J. Dyson, G. Getz, J.R. Whetstine, KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors, *Cell*, 154 (2013) 541-555.
- [97] L.C. Young, M.J. Hendzel, The oncogenic potential of Jumonji D2 (JMJD2/KDM4) histone demethylase overexpression, *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 91 (2013) 369-377.
- [98] T.D. Kim, F. Jin, S. Shin, S. Oh, S.A. Lightfoot, J.P. Grande, A.J. Johnson, J.M. van Deursen, J.D. Wren, R. Janknecht, Histone demethylase JMJD2A drives prostate tumorigenesis through transcription factor ETV1, *The Journal of clinical investigation*, 126 (2016) 706-720.
- [99] Q. Ye, A. Holowatyj, J. Wu, H. Liu, L. Zhang, T. Suzuki, Z.Q. Yang, Genetic alterations of KDM4 subfamily and therapeutic effect of novel demethylase inhibitor in breast cancer, *American journal of cancer research*, 5 (2015) 1519-1530.

- [100] C. Marvalim, J.X. Wong, N. Sutiman, W.T. Lim, S.W. Tan, R. Kanesvaran, Q.S. Ng, A. Jain, M.K. Ang, W.L. Tan, C.K. Toh, E.H. Tan, B. Chowbay, Influence of the KDM4A rs586339 polymorphism on overall survival in Asian non-small-cell lung cancer patients, *Pharmacogenetics and genomics*, 27 (2017) 120-123.
- [101] W.L. Berry, S. Shin, S.A. Lightfoot, R. Janknecht, Oncogenic features of the JMJD2A histone demethylase in breast cancer, *International journal of oncology*, 41 (2012) 1701-1706.
- [102] X. Ding, H. Pan, J. Li, Q. Zhong, X. Chen, S.M. Dry, C.Y. Wang, Epigenetic activation of AP1 promotes squamous cell carcinoma metastasis, *Science signaling*, 6 (2013) ra28 21-13, S20-15.
- [103] Y. Liu, D. Zhang, HP1a/KDM4A is involved in the autoregulatory loop of the oncogene gene c-Jun, *Epigenetics*, 10 (2015) 453-459.
- [104] M. Kawazu, K. Saso, K.I. Tong, T. McQuire, K. Goto, D.O. Son, A. Wakeham, M. Miyagishi, T.W. Mak, H. Okada, Histone demethylase JMJD2B functions as a co-factor of estrogen receptor in breast cancer proliferation and mammary gland development, *PLoS one*, 6 (2011) e17830.
- [105] L. Shi, L. Sun, Q. Li, J. Liang, W. Yu, X. Yi, X. Yang, Y. Li, X. Han, Y. Zhang, C. Xuan, Z. Yao, Y. Shang, Histone demethylase JMJD2B coordinates H3K4/H3K9 methylation and promotes hormonally responsive breast carcinogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) 7541-7546.
- [106] K. Coffey, L. Rogerson, C. Ryan-Munden, D. Alkharaf, J. Stockley, R. Heer, K. Sahadevan, D. O'Neill, D. Jones, S. Darby, P. Staller, A. Mantilla, L. Gaughan,

C.N. Robson, The lysine demethylase, KDM4B, is a key molecule in androgen receptor signalling and turnover, *Nucleic acids research*, 41 (2013) 4433-4446.

[107] Z. Chen, X. Wang, R. Liu, L. Chen, J. Yi, B. Qi, Z. Shuang, M. Liu, X. Li, S. Li, H. Tang, KDM4B-mediated epigenetic silencing of miRNA-615-5p augments RAB24 to facilitate malignancy of hepatoma cells, *Oncotarget*, 8 (2017) 17712-17725.

[108] Y. Liu, P. Zheng, Y. Liu, T. Ji, X. Liu, S. Yao, X. Cheng, Y. Li, L. Chen, Z. Xiao, J. Zhou, J. Li, An epigenetic role for PRL-3 as a regulator of H3K9 methylation in colorectal cancer, *Gut*, 62 (2013) 571-581.

[109] L. Fu, L. Chen, J. Yang, T. Ye, Y. Chen, J. Fang, HIF-1alpha-induced histone demethylase JMJD2B contributes to the malignant phenotype of colorectal cancer cells via an epigenetic mechanism, *Carcinogenesis*, 33 (2012) 1664-1673.

[110] H. Bur, K.M. Haapasaari, T. Turpeenniemi-Hujanen, O. Kuittinen, P. Auvinen, K. Marin, Y. Soini, P. Karihtala, Strong KDM4B and KDM4D Expression Associates with Radioresistance and Aggressive Phenotype in Classical Hodgkin Lymphoma, *Anticancer research*, 36 (2016) 4677-4683.

[111] M.T. Qiu, Q. Fan, Z. Zhu, S.Y. Kwan, L. Chen, J.H. Chen, Z.L. Ying, Y. Zhou, W. Gu, L.H. Wang, W.W. Cheng, J. Zeng, X.P. Wan, S.C. Mok, K.K. Wong, W. Bao, KDM4B and KDM4A promote endometrial cancer progression by regulating androgen receptor, c-myc, and p27kip1, *Oncotarget*, 6 (2015) 31702-31720.

[112] C. Wilson, L. Qiu, Y. Hong, T. Karnik, G. Tadros, B. Mau, T. Ma, Y. Mu, J. New, R.J. Louie, S. Gunewardena, A.K. Godwin, O.W. Tawfik, J. Chien, K.F. Roby,

A.J. Krieg, The histone demethylase KDM4B regulates peritoneal seeding of ovarian cancer, *Oncogene*, (2016).

[113] J.G. Kim, J.M. Yi, S.J. Park, J.S. Kim, T.G. Son, K. Yang, M.A. Yoo, K. Heo, Histone demethylase JMJD2B-mediated cell proliferation regulated by hypoxia and radiation in gastric cancer cell, *Biochimica et biophysica acta*, 1819 (2012) 1200-1207.

[114] H. Khoury-Haddad, P.T. Nadar-Ponniah, S. Awwad, N. Ayoub, The emerging role of lysine demethylases in DNA damage response: dissecting the recruitment mode of KDM4D/JMJD2D to DNA damage sites, *Cell Cycle*, 14 (2015) 950-958.

[115] T.D. Kim, S. Oh, S. Shin, R. Janknecht, Regulation of tumor suppressor p53 and HCT116 cell physiology by histone demethylase JMJD2D/KDM4D, *PLoS one*, 7 (2012) e34618.

[116] P.A. Cloos, J. Christensen, K. Agger, A. Maiolica, J. Rappsilber, T. Antal, K.H. Hansen, K. Helin, The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3, *Nature*, 442 (2006) 307-311.

[117] W.L. Berry, R. Janknecht, KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells, *Cancer research*, 73 (2013) 2936-2942.

[118] Z. Chen, J. Zang, J. Whetstine, X. Hong, F. Davrazou, T.G. Kutateladze, M. Simpson, Q. Mao, C.H. Pan, S. Dai, J. Hagman, K. Hansen, Y. Shi, G. Zhang, Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members, *Cell*, 125 (2006) 691-702.

- [119] Y. Katoh, M. Katoh, Comparative integromics on JMJD2A, JMJD2B and JMJD2C: preferential expression of JMJD2C in undifferentiated ES cells, *International journal of molecular medicine*, 20 (2007) 269-273.
- [120] L. Wu, K.K. Wary, S. Revskoy, X. Gao, K. Tsang, Y.A. Komarova, J. Rehman, A.B. Malik, Histone Demethylases KDM4A and KDM4C Regulate Differentiation of Embryonic Stem Cells to Endothelial Cells, *Stem cell reports*, 5 (2015) 10-21.
- [121] F. Lizcano, C. Romero, D. Vargas, Regulation of adipogenesis by nuclear receptor PPARgamma is modulated by the histone demethylase JMJD2C, *Genetics and molecular biology*, 34 (2011) 19-24.
- [122] E. Zhao, J. Ding, Y. Xia, M. Liu, B. Ye, J.H. Choi, C. Yan, Z. Dong, S. Huang, Y. Zha, L. Yang, H. Cui, H.F. Ding, KDM4C and ATF4 Cooperate in Transcriptional Control of Amino Acid Metabolism, *Cell reports*, 14 (2016) 506-519.
- [123] L. Rui, N.C. Emre, M.J. Kruhlik, H.J. Chung, C. Steidl, G. Slack, G.W. Wright, G. Lenz, V.N. Ngo, A.L. Shaffer, W. Xu, H. Zhao, Y. Yang, L. Lamy, R.E. Davis, W. Xiao, J. Powell, D. Maloney, C.J. Thomas, P. Moller, A. Rosenwald, G. Ott, H.K. Muller-Hermelink, K. Savage, J.M. Connors, L.M. Rimsza, E. Campo, E.S. Jaffe, J. Delabie, E.B. Smeland, D.D. Weisenburger, W.C. Chan, R.D. Gascoyne, D. Levens, L.M. Staudt, Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes, *Cancer cell*, 18 (2010) 590-605.
- [124] W. Luo, R. Chang, J. Zhong, A. Pandey, G.L. Semenza, Histone demethylase JMJD2C is a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 that is required

for breast cancer progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (2012) E3367-3376.

[125] J. Wu, S. Liu, G. Liu, A. Dombkowski, J. Abrams, R. Martin-Trevino, M.S. Wicha, S.P. Ethier, Z.Q. Yang, Identification and functional analysis of 9p24 amplified genes in human breast cancer, *Oncogene*, 31 (2012) 333-341.

[126] J.M. Krill-Burger, M.A. Lyons, L.A. Kelly, C.M. Sciulli, P. Petrosko, U.R. Chandran, M.D. Kubal, S.I. Bastacky, A.V. Parwani, R. Dhir, W.A. LaFramboise, Renal cell neoplasms contain shared tumor type-specific copy number variations, *The American journal of pathology*, 180 (2012) 2427-2439.

[127] F. Wein, T. Otto, P. Lambertz, J. Fandrey, M.L. Hansmann, R. Kuppers, Potential role of hypoxia in early stages of Hodgkin lymphoma pathogenesis, *Haematologica*, 100 (2015) 1320-1326.

[128] C. Helias, S. Struski, C. Gervais, V. Leymarie, L. Mauvieux, R. Herbrecht, M. Lessard, Polycythemia vera transforming to acute myeloid leukemia and complex abnormalities including 9p homogeneously staining region with amplification of MLLT3, JMJD2C, JAK2, and SMARCA2, *Cancer genetics and cytogenetics*, 180 (2008) 51-55.

[129] A. Ishimura, M. Terashima, H. Kimura, K. Akagi, Y. Suzuki, S. Sugano, T. Suzuki, Jmjd2c histone demethylase enhances the expression of Mdm2 oncogene, *Biochemical and biophysical research communications*, 389 (2009) 366-371.

[130] M. Wissmann, N. Yin, J.M. Muller, H. Greschik, B.D. Fodor, T. Jenuwein, C. Vogler, R. Schneider, T. Gunther, R. Buettner, E. Metzger, R. Schule, Cooperative

demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression, *Nature cell biology*, 9 (2007) 347-353.

[131] H.Y. Lee, E.G. Yang, H. Park, Hypoxia enhances the expression of prostate-specific antigen by modifying the quantity and catalytic activity of Jumonji C domain-containing histone demethylases, *Carcinogenesis*, 34 (2013) 2706-2715.

[132] X. Li, S. Dong, Histone demethylase JMJD2B and JMJD2C induce fibroblast growth factor 2: mediated tumorigenesis of osteosarcoma, *Medical oncology*, 32 (2015) 53.

[133] C.A. Walsh, J.C. Bolger, C. Byrne, S. Cocchiglia, Y. Hao, A. Fagan, L. Qin, A. Cahalin, D. McCartan, M. McIlroy, P. O'Gaora, J. Xu, A.D. Hill, L.S. Young, Global gene repression by the steroid receptor coactivator SRC-1 promotes oncogenesis, *Cancer research*, 74 (2014) 2533-2544.

[134] Z. Zhang, S.Q. Hou, J. He, T. Gu, Y. Yin, W.H. Shen, PTEN regulates PLK1 and controls chromosomal stability during cell division, *Cell Cycle*, 15 (2016) 2476-2485.

[135] I. Garcia-Higuera, E. Manchado, P. Dubus, M. Canamero, J. Mendez, S. Moreno, M. Malumbres, Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1, *Nature cell biology*, 10 (2008) 802-811.

[136] Y. Zhao, K. Ando, E. Oki, A. Ikawa-Yoshida, S. Ida, Y. Kimura, H. Saeki, H. Kitao, M. Morita, Y. Maehara, Aberrations of BUBR1 and TP53 gene mutually associated with chromosomal instability in human colorectal cancer, *Anticancer research*, 34 (2014) 5421-5427.

- [137] M.A. Vollebergh, J. Jonkers, S.C. Linn, Genomic instability in breast and ovarian cancers: translation into clinical predictive biomarkers, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69 (2012) 223-245.
- [138] I. Kupershmit, H. Khoury-Haddad, S.W. Awwad, N. Guttmann-Raviv, N. Ayoub, KDM4C (GASC1) lysine demethylase is associated with mitotic chromatin and regulates chromosome segregation during mitosis, *Nucleic acids research*, 42 (2014) 6168-6182.
- [139] J. Garcia, F. Lizcano, KDM4C Activity Modulates Cell Proliferation and Chromosome Segregation in Triple-Negative Breast Cancer, *Breast cancer : basic and clinical research*, 10 (2016) 169-175.
- [140] T. Potapova, G.J. Gorbsky, The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis, *Biology*, 6 (2017).
- [141] Y. Huang, L.J. Marton, P.M. Woster, R.A. Casero, Polyamine analogues targeting epigenetic gene regulation, *Essays in biochemistry*, 46 (2009) 95-110.
- [142] A.A. Lokken, N.J. Zeleznik-Le, Breaking the LSD1/KDM1A addiction: therapeutic targeting of the epigenetic modifier in AML, *Cancer cell*, 21 (2012) 451-453.
- [143] T. Schenk, W.C. Chen, S. Gollner, L. Howell, L. Jin, K. Hebestreit, H.U. Klein, A.C. Popescu, A. Burnett, K. Mills, R.A. Casero, Jr., L. Marton, P. Woster, M.D. Minden, M. Dugas, J.C. Wang, J.E. Dick, C. Muller-Tidow, K. Petrie, A. Zelent, Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia, *Nature medicine*, 18 (2012) 605-611.

- [144] N.R. Rose, E.C. Woon, G.L. Kingham, O.N. King, J. Mecinovic, I.J. Clifton, S.S. Ng, J. Talib-Hardy, U. Oppermann, M.A. McDonough, C.J. Schofield, Selective inhibitors of the JMJD2 histone demethylases: combined nondenaturing mass spectrometric screening and crystallographic approaches, *Journal of medicinal chemistry*, 53 (2010) 1810-1818.
- [145] R.J. Hopkinson, A. Tumber, C. Yapp, R. Chowdhury, W. Aik, K.H. Che, X.S. Li, J.B. Kristensen, O.N. King, M.C. Chan, K.K. Yeoh, H. Choi, L.J. Walport, C.C. Thinnes, J.T. Bush, C. Lejeune, A.M. Rydzik, N.R. Rose, E.A. Bagg, M.A. McDonough, T. Krojer, W.W. Yue, S.S. Ng, L. Olsen, P.E. Brennan, U. Oppermann, S. Muller-Knapp, R.J. Klose, P.J. Ratcliffe, C.J. Schofield, A. Kawamura, 5-Carboxy-8-hydroxyquinoline is a Broad Spectrum 2-Oxoglutarate Oxygenase Inhibitor which Causes Iron Translocation, *Chemical science*, 4 (2013) 3110-3117.
- [146] K.H. Chang, O.N. King, A. Tumber, E.C. Woon, T.D. Heightman, M.A. McDonough, C.J. Schofield, N.R. Rose, Inhibition of histone demethylases by 4-carboxy-2,2'-bipyridyl compounds, *ChemMedChem*, 6 (2011) 759-764.
- [147] N.R. Rose, S.S. Ng, J. Mecinovic, B.M. Lienard, S.H. Bello, Z. Sun, M.A. McDonough, U. Oppermann, C.J. Schofield, Inhibitor scaffolds for 2-oxoglutarate-dependent histone lysine demethylases, *Journal of medicinal chemistry*, 51 (2008) 7053-7056.
- [148] M. Sakurai, N.R. Rose, L. Schultz, A.M. Quinn, A. Jadhav, S.S. Ng, U. Oppermann, C.J. Schofield, A. Simeonov, A miniaturized screen for inhibitors of Jumonji histone demethylases, *Molecular bioSystems*, 6 (2010) 357-364.

- [149] X. Luo, Y. Liu, S. Kubicek, J. Myllyharju, A. Tumber, S. Ng, K.H. Che, J. Podoll, T.D. Heightman, U. Oppermann, S.L. Schreiber, X. Wang, A selective inhibitor and probe of the cellular functions of Jumonji C domain-containing histone demethylases, *Journal of the American Chemical Society*, 133 (2011) 9451-9456.
- [150] S.K. Zaidi, A.J. Van Wijnen, J.B. Lian, J.L. Stein, G.S. Stein, Targeting deregulated epigenetic control in cancer, *Journal of cellular physiology*, 228 (2013) 2103-2108.
- [151] M.L. Shoemaker, M.C. White, M. Wu, H.K. Weir, I. Romieu, Differences in breast cancer incidence among young women aged 20-49 years by stage and tumor characteristics, age, race, and ethnicity, 2004-2013, *Breast cancer research and treatment*, (2018).
- [152] J.L. Moss, B. Liu, E.J. Feuer, Urban/Rural Differences in Breast and Cervical Cancer Incidence: The Mediating Roles of Socioeconomic Status and Provider Density, *Women's health issues : official publication of the Jacobs Institute of Women's Health*, 27 (2017) 683-691.
- [153] M. Krzyzak, D. Maslach, M. Juczewska, W. Lasota, D. Rabczenko, J. Marcinkowski, A. Szpak, Differences in breast cancer incidence and stage distribution between urban and rural female population in Podlaskie Voivodship, Poland in years 2001-2002, *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 17 (2010) 159-162.
- [154] T.H. Keegan, E.M. John, K.M. Fish, T. Alfaro-Velcamp, C.A. Clarke, S.L. Gomez, Breast cancer incidence patterns among California Hispanic women: differences by nativity and residence in an enclave, *Cancer epidemiology*,

biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 19 (2010) 1208-1218.

[155] A.M. Kabel, Tumor markers of breast cancer: New perspectives, Journal of Oncological Sciences, 3 (2017) 5-11.

[156] D.P. Atchley, C.T. Albarracin, A. Lopez, V. Valero, C.I. Amos, A.M. Gonzalez-Angulo, G.N. Hortobagyi, B.K. Arun, Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer, Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 26 (2008) 4282-4288.

[157] F. Karami, P. Mehdipour, A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer, BioMed research international, 2013 (2013) 928562.

[158] P. Sharma, Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer, The oncologist, 21 (2016) 1050-1062.

[159] S. Shiovitz, L.A. Korde, Genetics of breast cancer: a topic in evolution, Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 26 (2015) 1291-1299.

[160] K.M. O'Brien, S.R. Cole, C.K. Tse, C.M. Perou, L.A. Carey, W.D. Foulkes, L.G. Dressler, J. Geradts, R.C. Millikan, Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study, Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 16 (2010) 6100-6110.

- [161] N. Cancer Genome Atlas, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, 490 (2012) 61-70.
- [162] S. Badve, D.J. Dabbs, S.J. Schnitt, F.L. Baehner, T. Decker, V. Eusebi, S.B. Fox, S. Ichihara, J. Jacquemier, S.R. Lakhani, J. Palacios, E.A. Rakha, A.L. Richardson, F.C. Schmitt, P.H. Tan, G.M. Tse, B. Weigelt, I.O. Ellis, J.S. Reis-Filho, Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24 (2011) 157-167.
- [163] WHO, World cancer report, World Health Organization, (2008).
- [164] N. Howlader, S.F. Altekruse, C.I. Li, V.W. Chen, C.A. Clarke, L.A. Ries, K.A. Cronin, US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status, *Journal of the National Cancer Institute*, 106 (2014).
- [165] K.D. Voduc, M.C. Cheang, S. Tyldesley, K. Gelmon, T.O. Nielsen, H. Kennecke, Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28 (2010) 1684-1691.
- [166] G. Li, D. Reinberg, Chromatin higher-order structures and gene regulation, *Current opinion in genetics & development*, 21 (2011) 175-186.
- [167] M. Li, Y. Fang, Histone variants: the artists of eukaryotic chromatin, *Science China. Life sciences*, 58 (2015) 232-239.

- [168] F.G. Westhorpe, A.F. Straight, The centromere: epigenetic control of chromosome segregation during mitosis, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7 (2015) a015818.
- [169] J.J. Vicente, L. Wordeman, Mitosis, microtubule dynamics and the evolution of kinesins, *Experimental cell research*, 334 (2015) 61-69.
- [170] C. Dominguez-Brauer, K.L. Thu, J.M. Mason, H. Blaser, M.R. Bray, T.W. Mak, Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies, *Molecular cell*, 60 (2015) 524-536.
- [171] K. Tanaka, T. Hirota, Chromosome segregation machinery and cancer, *Cancer science*, 100 (2009) 1158-1165.
- [172] H. Lee, How chromosome mis-segregation leads to cancer: lessons from BubR1 mouse models, *Molecules and cells*, 37 (2014) 713-718.
- [173] T. Kouzarides, Chromatin modifications and their function, *Cell*, 128 (2007) 693-705.
- [174] J.E. Audia, R.M. Campbell, Histone Modifications and Cancer, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8 (2016).
- [175] S. Kubicek, G. Schotta, M. Lachner, R. Sengupta, A. Kohlmaier, L. Perez-Burgos, Y. Linderson, J.H. Martens, R.J. O'Sullivan, B.D. Fodor, M. Yonezawa, A.H. Peters, T. Jenuwein, The role of histone modifications in epigenetic transitions during normal and perturbed development, *Ernst Schering Research Foundation workshop*, (2006) 1-27.

- [176] J.C. Black, C. Van Rechem, J.R. Whetstone, Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact, *Molecular cell*, 48 (2012) 491-507.
- [177] E.L. Greer, Y. Shi, Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance, *Nature reviews. Genetics*, 13 (2012) 343-357.
- [178] G. Schotta, M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg, T. Jenuwein, A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin, *Genes & development*, 18 (2004) 1251-1262.
- [179] M.T. Pedersen, K. Helin, Histone demethylases in development and disease, *Trends in cell biology*, 20 (2010) 662-671.
- [180] B.J. Thrasher, L.K. Hong, J.K. Whitmire, M.A. Su, Epigenetic Dysfunction in Turner Syndrome Immune Cells, *Current allergy and asthma reports*, 16 (2016) 36.
- [181] Q.J. Zhang, Z.P. Liu, Histone methylations in heart development, congenital and adult heart diseases, *Epigenomics*, 7 (2015) 321-330.
- [182] J.W. Hojfeldt, K. Agger, K. Helin, Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy, *Nature reviews. Drug discovery*, 12 (2013) 917-930.
- [183] C.C. Thirnes, K.S. England, A. Kawamura, R. Chowdhury, C.J. Schofield, R.J. Hopkinson, Targeting histone lysine demethylases - progress, challenges, and the future, *Biochimica et biophysica acta*, 1839 (2014) 1416-1432.
- [184] H. Hou, H. Yu, Structural insights into histone lysine demethylation, *Current opinion in structural biology*, 20 (2010) 739-748.

- [185] S.Y. Park, J.W. Park, Y.S. Chun, Jumonji histone demethylases as emerging therapeutic targets, *Pharmacological research*, 105 (2016) 146-151.
- [186] M.A. Wade, D. Jones, L. Wilson, J. Stockley, K. Coffey, C.N. Robson, L. Gaughan, The histone demethylase enzyme KDM3A is a key estrogen receptor regulator in breast cancer, *Nucleic acids research*, 43 (2015) 196-207.
- [187] L.L. Li, A.M. Xue, B.X. Li, Y.W. Shen, Y.H. Li, C.L. Luo, M.C. Zhang, J.Q. Jiang, Z.D. Xu, J.H. Xie, Z.Q. Zhao, JMJD2A contributes to breast cancer progression through transcriptional repression of the tumor suppressor ARHI, *Breast cancer research : BCR*, 16 (2014) R56.
- [188] B.X. Li, C.L. Luo, H. Li, P. Yang, M.C. Zhang, H.M. Xu, H.F. Xu, Y.W. Shen, A.M. Xue, Z.Q. Zhao, Effects of siRNA-mediated knockdown of jumonji domain containing 2A on proliferation, migration and invasion of the human breast cancer cell line MCF-7, *Experimental and therapeutic medicine*, 4 (2012) 755-761.
- [189] B.X. Li, M.C. Zhang, C.L. Luo, P. Yang, H. Li, H.M. Xu, H.F. Xu, Y.W. Shen, A.M. Xue, Z.Q. Zhao, Effects of RNA interference-mediated gene silencing of JMJD2A on human breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro, *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 30 (2011) 90.
- [190] T.D. Kim, J.R. Fuchs, E. Schwartz, D. Abdelhamid, J. Etter, W.L. Berry, C. Li, M.A. Ihnat, P.K. Li, R. Janknecht, Pro-growth role of the JMJD2C histone demethylase in HCT-116 colon cancer cells and identification of curcuminoids as JMJD2 inhibitors, *American journal of translational research*, 6 (2014) 236-247.

- [191] J. Margareto, O. Leis, E. Larrarte, I.C. Pomposo, J.M. Garibi, J.V. Lafuente, DNA copy number variation and gene expression analyses reveal the implication of specific oncogenes and genes in GBM, *Cancer investigation*, 27 (2009) 541-548.
- [192] G. Liu, A. Bollig-Fischer, B. Kreike, M.J. van de Vijver, J. Abrams, S.P. Ethier, Z.Q. Yang, Genomic amplification and oncogenic properties of the GASC1 histone demethylase gene in breast cancer, *Oncogene*, 28 (2009) 4491-4500.
- [193] Q. Hong, S. Yu, Y. Yang, G. Liu, Z. Shao, A polymorphism in JMJD2C alters the cleavage by caspase-3 and the prognosis of human breast cancer, *Oncotarget*, 5 (2014) 4779-4787.
- [194] B. Berdel, K. Nieminen, Y. Soini, M. Tengstrom, M. Malinen, V.M. Kosma, J.J. Palvimo, A. Mannermaa, Histone demethylase GASC1--a potential prognostic and predictive marker in invasive breast cancer, *BMC cancer*, 12 (2012) 516.
- [195] Y. Guo, C. Kim, Y. Mao, New insights into the mechanism for chromosome alignment in metaphase, *International review of cell and molecular biology*, 303 (2013) 237-262.
- [196] R. Khammanit, S. Chantakru, Y. Kitiyanant, J. Saikhun, Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts, *Theriogenology*, 70 (2008) 27-34.
- [197] L.M. Gallego-Paez, H. Tanaka, M. Bando, M. Takahashi, N. Nozaki, R. Nakato, K. Shirahige, T. Hirota, Smc5/6-mediated regulation of replication progression contributes to chromosome assembly during mitosis in human cells, *Molecular biology of the cell*, 25 (2014) 302-317.

- [198] R.A. McCloy, S. Rogers, C.E. Caldon, T. Lorca, A. Castro, A. Burgess, Partial inhibition of Cdk1 in G₂ phase overrides the SAC and decouples mitotic events, *Cell Cycle*, 13 (2014) 1400-1412.
- [199] O. Gavet, J. Pines, Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis, *Developmental cell*, 18 (2010) 533-543.
- [200] R.M. Labbe, A. Holowatyj, Z.Q. Yang, Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential, *American journal of translational research*, 6 (2013) 1-15.
- [201] Y. Huang, L. Jiang, Q. Yi, L. Lv, Z. Wang, X. Zhao, L. Zhong, H. Jiang, S. Rasool, Q. Hao, Z. Guo, H.J. Cooke, M. Fenech, Q. Shi, Lagging chromosomes entrapped in micronuclei are not 'lost' by cells, *Cell research*, 22 (2012) 932-935.
- [202] J.R. Sawyer, C.M. Swanson, G. Wheeler, C. Cunniff, Chromosome instability in ICF syndrome: formation of micronuclei from multibranching chromosomes 1 demonstrated by fluorescence in situ hybridization, *American journal of medical genetics*, 56 (1995) 203-209.
- [203] E.M. Hatch, M.W. Hetzer, Linking Micronuclei to Chromosome Fragmentation, *Cell*, 161 (2015) 1502-1504.
- [204] M.C. Matrká, R.F. Hennigan, F. Kappes, M.L. DeLay, P.F. Lambert, B.J. Aronow, S.I. Wells, DEK over-expression promotes mitotic defects and micronucleus formation, *Cell Cycle*, 14 (2015) 3939-3953.
- [205] M. Giam, G. Rancati, Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos, *Cell division*, 10 (2015) 3.

- [206] J.A. Park, A.J. Kim, Y. Kang, Y.J. Jung, H.K. Kim, K.C. Kim, Deacetylation and methylation at histone H3 lysine 9 (H3K9) coordinate chromosome condensation during cell cycle progression, *Molecules and cells*, 31 (2011) 343-349.
- [207] A. Ehrbrecht, U. Muller, M. Wolter, A. Hoischen, A. Koch, B. Radlwimmer, B. Actor, A. Mincheva, T. Pietsch, P. Lichter, G. Reifenberger, R.G. Weber, Comprehensive genomic analysis of desmoplastic medulloblastomas: identification of novel amplified genes and separate evaluation of the different histological components, *The Journal of pathology*, 208 (2006) 554-563.
- [208] Z.Q. Yang, I. Imoto, Y. Fukuda, A. Pimkhaokham, Y. Shimada, M. Imamura, S. Sugano, Y. Nakamura, J. Inazawa, Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon at 9p23-24 frequently detected in esophageal cancer cell lines, *Cancer research*, 60 (2000) 4735-4739.
- [209] B.L. Gregory, V.G. Cheung, Natural variation in the histone demethylase, KDM4C, influences expression levels of specific genes including those that affect cell growth, *Genome research*, 24 (2014) 52-63.
- [210] F.E. Abidi, L. Holloway, C.A. Moore, D.D. Weaver, R.J. Simensen, R.E. Stevenson, R.C. Rogers, C.E. Schwartz, Mutations in JARID1C are associated with X-linked mental retardation, short stature and hyperreflexia, *Journal of medical genetics*, 45 (2008) 787-793.
- [211] E. Andreopoulou, S.J. Schweber, J.A. Sparano, H.M. McDaid, Therapies for triple negative breast cancer, *Expert opinion on pharmacotherapy*, (2015) 1-16.

- [212] B. Gyorffy, A. Lanczky, A.C. Eklund, C. Denkert, J. Budczies, Q. Li, Z. Szallasi, An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients, *Breast Cancer Res Treat*, 123 (2010) 725-731.
- [213] S. Marques, J. Fonseca, P.M. Silva, H. Bousbaa, Targeting the spindle assembly checkpoint for breast cancer treatment, *Current cancer drug targets*, 15 (2015) 272-281.
- [214] A.E. Pinto, T. Pereira, G.L. Silva, S. Andre, Aneuploidy identifies subsets of patients with poor clinical outcome in grade 1 and grade 2 breast cancer, *Breast*, 24 (2015) 449-455.
- [215] P. Friedl, K. Wolf, Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms, *Nature reviews. Cancer*, 3 (2003) 362-374.
- [216] K. Kolli-Bouhafs, E. Sick, F. Noulet, J.P. Gies, J. De Mey, P. Ronde, FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells, *Cell death & disease*, 5 (2014) e1379.
- [217] R.S. Jadav, D. Kumar, N. Buwa, S. Ganguli, S.R. Thampatty, N. Balasubramanian, R. Bhandari, Deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 (IP6K1) reduces cell migration and invasion, conferring protection from aerodigestive tract carcinoma in mice, *Cellular signalling*, 28 (2016) 1124-1136.
- [218] A. Burton, C. Azevedo, C. Andreassi, A. Riccio, A. Saiardi, Inositol pyrophosphates regulate JMJD2C-dependent histone demethylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (2013) 18970-18975.

- [219] Y. Munehira, Z. Yang, O. Gozani, Systematic Analysis of Known and Candidate Lysine Demethylases in the Regulation of Myoblast Differentiation, *Journal of molecular biology*, (2016).
- [220] M.K. Kang, S. Mehrazarin, N.H. Park, C.Y. Wang, Epigenetic gene regulation by histone demethylases: emerging role in oncogenesis and inflammation, *Oral diseases*, (2016).
- [221] A. Salminen, K. Kaarniranta, A. Kauppinen, Hypoxia-Inducible Histone Lysine Demethylases: Impact on the Aging Process and Age-Related Diseases, *Aging and disease*, 7 (2016) 180-200.
- [222] R. He, B.L. Kidder, H3K4 demethylase KDM5B regulates global dynamics of transcription elongation and alternative splicing in embryonic stem cells, *Nucleic acids research*, (2017).
- [223] S.S. Pathak, S. Maitra, S. Chakravarty, A. Kumar, Histone Lysine Demethylases of JMJD2 or KDM4 Family are Important Epigenetic Regulators in Reward Circuitry in the Etiopathology of Depression, *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42 (2017) 854-863.
- [224] J.Y. Choi, S.S. Yoon, S.E. Kim, S. Ahn Jo, KDM4B histone demethylase and G9a regulate expression of vascular adhesion proteins in cerebral microvessels, *Scientific reports*, 7 (2017) 45005.
- [225] K. Agger, S. Miyagi, M.T. Pedersen, S.M. Kooistra, J.V. Johansen, K. Helin, Jmjd2/Kdm4 demethylases are required for expression of Il3ra and survival of acute myeloid leukemia cells, *Genes & development*, 30 (2016) 1278-1288.

- [226] D.M. Carter, E. Specker, J. Przygodda, M. Neuenschwander, J.P. von Kries, U. Heinemann, M. Nazare, U. Gohlke, Identification of a Novel Benzimidazole Pyrazolone Scaffold That Inhibits KDM4 Lysine Demethylases and Reduces Proliferation of Prostate Cancer Cells, *SLAS discovery*, (2017) 2472555217699157.
- [227] P.J. Pollard, C. Loenarz, D.R. Mole, M.A. McDonough, J.M. Gleadle, C.J. Schofield, P.J. Ratcliffe, Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , *The Biochemical journal*, 416 (2008) 387-394.
- [228] R. Vadde, S. Vemula, R. Jinka, N. Merchant, P.V. Bramhachari, G.P. Nagaraju, Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer, *Critical reviews in oncology/hematology*, 113 (2017) 22-27.
- [229] A. El Guerrab, A. Cayre, F. Kwiatkowski, M. Privat, J.M. Rossignol, F. Rossignol, F. Penault-Llorca, Y.J. Bignon, Quantification of hypoxia-related gene expression as a potential approach for clinical outcome prediction in breast cancer, *PloS one*, 12 (2017) e0175960.
- [230] L.M. Scott, M.K. Gandhi, Deregulated JAK/STAT signalling in lymphomagenesis, and its implications for the development of new targeted therapies, *Blood reviews*, 29 (2015) 405-415.
- [231] F. Thaler, C. Mercurio, Compounds and methods for inhibiting histone demethylases: a patent evaluation of US20160102096A1, *Expert opinion on therapeutic patents*, 26 (2016) 1367-1370.

[232] M. Korczynska, D.D. Le, N. Younger, E. Gregori-Puigjane, A. Tumber, T. Krojer, S. Velupillai, C. Gileadi, R.P. Nowak, E. Iwasa, S.B. Pollock, I. Ortiz Torres, U. Oppermann, B.K. Shoichet, D.G. Fujimori, Docking and Linking of Fragments To Discover Jumonji Histone Demethylase Inhibitors, *Journal of medicinal chemistry*, 59 (2016) 1580-1598.

[233] S.D. Nielsen, U. Leurs, M. Bergner, S.A. Barris, K. Devkota, K. Meyer, D. Iaria, J. McCaughan, B. Lohse, J.L. Kristensen, R.P. Clausen, Synthesis and Characterisation of Substrate-Based Peptides as Inhibitors of Histone Demethylase KDM4C, *Protein and peptide letters*, 23 (2016) 772-776.

[234] N. Li, D. Jiang, Jumonji domain containing 2C promotes cell migration and invasion through modulating CUL4A expression in lung cancer, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 89 (2017) 305-315.

10.LISTA DE ANEXOS

10.1. Artículo de revisión producto de investigación:

“Epigenetic Control and Cancer: The Potential of Histone Demethylases as Therapeutic Targets”. Fernando Lizcano and Jeison Garcia. Pharmaceuticals (Basel). 2012 Sep 12;5(9):963-90.

10.2. Artículo producto de investigación:

“KDM4C Activity Modulates Cell Proliferation and Chromosome Segregation in Triple-Negative Breast Cancer”. Jeison Garcia and Fernando Lizcano. Breast Cancer (Auckl). 2016 Nov 2;10:169-175.

10.3. Artículo producto de investigación:

“KDM4C is recruited to mitotic chromosomes and is relevant for chromosomal stability, cell migration and invasion of triple negative breast cancer cells”. Jeison Garcia and Fernando Lizcano. Accepted by Breast Cancer Basic and Clinical Research. Manuscript DOI: 10.1177/1178223418773075