

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD IRAPUATO**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA**

**“Estudio de la función de motivos de DNA putativos reguladores de la  
metilación del DNA en la aterosclerosis”**

**Tesis que presenta**

**Fabiola Estefanía Tristán Flores**

**para obtener el Grado de**

**Doctor en Ciencias**

**en la Especialidad de**

**Biotecnología de Plantas**

**Co-Directores de Tesis: Dra. Gertrud Lund y**

**Dr. Silvio Zaina\***

**\*Universidad de Guanajuato**

**Irapuato, Guanajuato**

**Febrero 2018**

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN - Unidad Irapuato, Departamento de Ingeniería Genética, Laboratorio de Epigenética en conjunto con la Universidad de Guanajuato Campus León, Departamento de Ciencias Médicas División de Ciencias de la Salud, bajo la codirección de la Dra. Gertrud Lund y el Dr. Silvio Zaina, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los Proyectos de Ciencia Básica no. 134631 y la beca para estudios de doctorado no. 332118. Este trabajo fue realizado del 01 de Marzo de 2012 al 30 de Septiembre de 2017.

Miembros del Comité de Asesores:

Dr. Plinio Antonio Guzmán Villate

Dr. Luis José Delaye Arredondo

Dr. Stefan De Folter

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Fecha de examen de grado: 26 de Febrero de 2018

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi familia mi mamá Ernestina, papá Raúl, hermano Raúl y hermana Claudia, a mi abuelita Galinda, mis tías y tíos, por darme tanto cariño, incentivar-me, creer en mí, los amo.

Al amor de mi vida, mi amigo, a la persona que cada día amo más Guillermo Silva.

A mis cuñadas Martha, Laura y Sandra, así como a Don Memo y la Sra. Trini gracias por su apoyo, los quiero mucho.

A mis directores de tesis, Gertrud Lund y Silvio Zaina por la oportunidad de unirme a grupo de trabajo, su paciencia al dirigirme y por su humanidad.

A la BQ. Dalia Rodríguez-Ríos por su asesoría durante todo el desarrollo del apartado experimental de este proyecto.

Dra. Yolanda Alvarado-Caudillo por su asesoría durante el desarrollo del apartado experimental de este proyecto.

Laura Aguilar-Henonin por su asistencia técnica en la manipulación de la levadura *S. cerevisiae* y en los experimentos de un híbrido.

A los miembros de mi comité, Dr. Plinio Antonio Guzmán Villate, Dr. Luis José Delaye Arredondo, Dr. Stefan De Folter, Dra. Diana Patricia Portales Pérez por sus aportaciones a lo largo del doctorado y por su gran disponibilidad. Al Dr. Luis Delaye por facilitarnos el acceso a su nodo computacional (proyecto CONCYTEG “Laboratorio de aprendizaje e investigación en cómputo biológico: LAICBIO, Clave: GTO-2012-C02-187442”)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca nacional no. 332118 para la realización de estudios de doctorado y al Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato, por la formación recibida en el programa de Biotecnología de Plantas.

A todo el personal académico, administrativo y de mantenimiento del CINVESTAV Unidad Irapuato parte importante en el centro de investigación.

A mis compañeros de laboratorio Carmen, Eduardo, José, Pili y Dalia por todo su apoyo y consejos.

A mis amigos lincees en especial a Roberto por su apoyo en el tiempo real, a Lilia, Raquel, Juan Antonio, Alberto, Adrián, Aly, Ana, Lucy, Vicky, Dianita, Diana, Daniel, Jonitas, Lore, Fer, Mak, Tere, Rafa gracias por estar siempre a mi lado.

*Dedico esta tesis a las mujeres que más he admirado, a mi mama Ernestina Flores de la Rosa y a mi abuelita Galinda de la Rosa por enseñarme que nunca hay que darse por vencido, que siempre hay luchar por nuestras metas, por darme tanto amor, gracias por ser el mejor ejemplo de mi vida. Las amaré por siempre.*

## Índice de contenido

Índice de Tablas .....	7
Índice de Figuras .....	8
Abreviaturas .....	9
1. Resumen .....	11
2. Abstract.....	13
3. Antecedentes.....	15
3.1 Epigenética y metilación del DNA .....	15
3.2 Aterosclerosis y la metilación del DNA.....	16
3.3 Motivo DMM.....	18
3.4 Retrotransposones <i>Alu</i> .....	19
3.5 RNA largos no codificantes .....	21
4. Justificación.....	23
5. Hipótesis.....	23
6. Objetivos.....	24
6.1 General.....	24
6.2 Específicos.....	24
7. Estrategia experimental .....	25
7.1 Ensayo de un híbrido en levadura .....	25
7.2 Cultivo celular y estimulación con agonistas de LXR.....	25
7.3 Identificación de la secuencia de lncRNAs con DMM.....	26
7.4 Muestras vasculares humanas .....	26
7.5 Expresión del RNAm, RT semicuantitativo y cuantitativo .....	27
7.6 Secuenciación del DNA convertido con bisulfito de sodio .....	27
7.7 Análisis de restricción del DNA convertido por bisulfito (COBRA Combined Bisulfite Restriction Analysis) del elemento <i>Alu</i> .....	28
7.8 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) .....	28
7.9 Transfección y ensayo con luciferasa .....	29
7.10 Análisis estadísticos .....	30
7.11 Análisis de datos de RNA largos no codificantes y <i>Alu</i> .....	30
7.13 Análisis filogenéticos.....	30

7.14 Análisis de datos microarreglos .....	31
8. Resultados .....	32
8.1 Filogenia del DMM con respecto a las subfamilias de <i>Alu</i> .....	32
8.2 LXRβ y PPAN se unen específicamente al DMM .....	35
8.3 La activación de LXR hipermetila al DMM en <i>Alu</i> .....	38
8.4 Expresión y mDNA diferencial de los lncRNAs en respuesta a la activación del LXR .....	39
8.5. Expresión y mDNA diferencial de los lncRNAs en arterias humanas .....	42
8.6 Perfiles de mDNA que flanquea a <i>Alu</i> en lesiones ateroscleróticas con diferente severidad .....	44
8.7 Análisis de regulación dirigida por los lncRNAs <i>in cis</i> .....	48
8.8 <i>Alu</i> en lncRNAs .....	50
9. Discusión .....	53
10. Conclusiones .....	57
11. Bibliografía .....	58
12. Anexos.....	71
12.1 Información suplementaria.....	71
12.2 Trabajos publicados durante la estancia de Doctorado .....	75

## Índice de Tablas

Tabla 1- Oligonucleótidos para expresión del RNAm. ....	27
Tabla 2- Oligonucleótidos para secuenciación de DNA convertido con bisulfito de sodio. ....	28
Tabla 3- Oligonucleótidos para CHIP. ....	29
Tabla 4- Oligonucleótidos para ensayo con luciferasa. ....	30
Tabla Suplementaria 1- Proteínas de unión al DMM en el ensayo de un híbrido.....	71
Tabla Suplementaria 2- Clasificación de aortas usadas con lesión estable.....	72

## Índice de Figuras

Figura 1- Motivo DMM..	18
Figura 2- Retrotransposición de <i>Alu</i> .....	20
Figura 3- Árbol filogenético de las subfamilias de <i>Alu</i> con respecto al DMM.....	33
Figura 4- Alineamiento del DMM con las subfamilias de <i>Alu</i> más cercanas.....	34
Figura 5- Alineamiento del DMM con las subfamilias de <i>Alu</i> menos conservadas en el DR2.....	34
Figura 6- Interacción del LXRβ y PPAN con el DMM.....	36
Figura 7- Unión de LXRβ al DMM de los lncRNAs.....	37
Figura 8- Los agonistas de LXR aumentan la metilación de <i>Alu</i> .....	39
Figura 9- Cambios de expresión de lncRNAs inducidos por agonistas de LXR.....	40
Figura 10- Cambios de expresión de blancos de LXR inducidos por agonistas de LXR... 41	
Figura 11- Perfil de metilación de ICG que flanquean lncRNAs con DMM y al promotor de genes o los lncRNAs.....	42
Figura 12- Nivel de expresión y mRNA de lncRNAs y respectivo gen adyacente en aorta..	43
Figura 13- Perfiles de mRNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando <i>Alu</i> a +100 pb en no-ICG y ICG en aterosclerosis humana.....	45
Figura 14- Perfiles de cambios de mRNA (microarreglo 450K) en regiones flanqueando <i>Alu</i> en no-ICG y ICG. ....	47
Figura 15- Perfiles de cambios de mRNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando <i>MIR</i> en no-ICG y ICG.....	48
Figura 16- Ensayo de activación <i>in cis</i> .....	50
Figura 17- Distribución de <i>Alu</i> en el genoma.....	51
Figura 18- Posición de <i>Alu</i> en transcritos.....	52
Figura Suplementaria 1- Perfiles de mRNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando <i>Alu</i> en no-ICG y ICG en aterosclerosis humana.....	72
Figura Suplementaria 2- Perfiles de mRNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando <i>MIR</i> en no-ICG y ICG en ateromas estables.....	73
Figura Suplementaria 3- Perfiles de mRNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando <i>MIR</i> en no-ICG y ICG en ateromas sintomáticos.....	74

## Abreviaturas

3-AT	3-aminotriazol
450K	Infinium Human Methylation 450 Bead Chip (en ingles)
5meC	5-metilcitosina
AAs	Arterias coronárias ateroscleróticas
ACACA	Acetil CoA carboxilasa
<i>ANRIL</i>	Antisense noncoding RNA in the INK4 locus (en ingles)
BER	Reparación por excisión de base
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina.
<i>COBRA</i>	Análisis de restricción del DNA convertido por bisulfito (Combine Bisulfite Restriction Analysis)
CpG	Citosina-fosfato-guanina
<i>DHFR</i>	Dihidrofolato reductasa
<i>Dlx5/6</i>	Distal-less homeobox 5/6 (en ingles)
<i>Dlx6a</i>	Antisentido distal-less homeobox 5/6 (en ingles)
DM-ICG	ICG diferencialmente metiladas
DMM	Motivo diferencialmente metilado ( <u>D</u> ifferential <u>M</u> ethylation <u>M</u> otif)
DNAc	DNA complementario
DR2	Repetido directo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
<i>FASN</i>	Ácido graso sintetasa (Fatty Acid Synthase)
FBS	Suero fetal bovino
ICG	Islas CpG
LINE	Elementos nucleares largos dispersos (Long Interspersed Nucleic Element)

lncRNA	RNA largos no codificantes
LTR	Repeticiones terminales largas (Long Terminal Repets)
LXRB	Receptor X de hígado beta (Liver X Receptor Beta)
mDNA	Metilación del DNA
<i>MIR</i>	Repeticiones dispersas en mamíferos (Mammalian-wide Interspersed Repeats)
non-LTR	Sin repeticiones terminales largas (Long Terminal Repets)
ORF	Marco de lectura abierto (Open Reading Frame)
PMA	Formol 12- miristato 13 acetato
PPAN	Peter Pan
PRC2	Complejo Represivo Polycomb 2
RACE	Rápida amplificación de los extremos de DNAC (Rapid Amplification of cDNA Ends)
RN	Receptor nuclear
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
RNA-seq	Secuenciación de RNA
SINE	Elementos nucleares cortos dispersos (Short Interspersed Nuclear Element)
<i>SMCR2</i>	Candidato 2 del síndrome Smith-Magenis 2 (Smith-Magenis Syndrome Chromosome Region, Candidate 2)
<i>SREBF1</i>	Factor de transcripción de elementos regulatorios de estero 1 (Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1)
TET	Translocación Ten-eleven

## 1. Resumen

La aterosclerosis está asociada con un metiloma del DNA anormal en el tejido vascular. Sin embargo, los mecanismos que determinan esos perfiles son poco conocidos. Trabajo previo de nuestro grupo identificó un motivo de DNA de 29 pb físicamente asociado con islas de CpG que se encontraban hipometiladas en arterias ateroscleróticas humanas relativo a arterias sanas. Bautizamos al motivo DMM, acrónimo en inglés de Differential Methylation Motif. Ese hallazgo sugirió la hipótesis que el DMM es un potencial sitio de unión de proteínas reguladoras de la metilación del DNA en la aterosclerosis. El presente trabajo pretende entender el papel funcional del DMM.

Primero, demostramos que el DMM tiene identidad de secuencia con los elementos *Alu*, en particular con el promotor de *Alu* (B-box). *Alu* pertenece a una familia de retrotransposones conocida como elementos nucleares cortos dispersos (SINE, Short Interspersed Nuclear Element) que representa más del 10% del genoma humano. Segundo, identificamos al receptor X de hígado beta (LXRB) como ligando del DMM, utilizando una librería de DNA complementario de aorta humana como presa en el ensayo de un híbrido en levadura e inmunoprecipitación de cromatina en monocitos humanos THP-1. Tercero, al estimular células con agonistas sintéticos de LXR y analizar perfiles de metilación de DNA (mDNA) de islas de CpG adyacentes a *Alus* con DMM intacto, degenerado o SINEs que no contiene el DMM, mostramos que la interacción LXR-DMM controla los perfiles locales de mDNA. Cuarto, nos enfocamos en tres RNA largos no codificantes (lncRNAs) intergénicos que contienen el DMM y están adyacentes a blancos

conocidos de LXR. Demostramos que agonistas sintéticos de LXR regulan la expresión de los tres lncRNAs y que estos presentan expresión diferencial entre arterias ateroscleróticas y sanas humanas. Por último, demostramos que los tres lncRNAs no regulan genes blancos de LXR *in cis*.

En conclusión, la interacción LXR-DMM controla los perfiles locales de mDNA, así asignando a LXR una actividad nunca reportada previamente. Además, considerando el papel protector de LXR, nuestros datos indican que la hipermetilación de *Alu* observada en la aterosclerosis es un fenómeno de compensación y no un cambio aterogénico.

## 2. Abstract

Atherosclerosis is associated with an abnormal DNA methylome in the vascular tissue. However, the mechanisms that determine atherosclerosis-specific DNA methylation profiles are poorly understood. Previous work by our group identified a 29-bp DNA motif physically associated with CpG islands that were hypomethylated in human atherosclerotic arteries relative to normal counterparts. We named the motif Differential Methylation Motif (DMM). That finding suggested that DMM is a potential binding site for modifiers of DNA methylation and transcription in atherosclerosis. The present work aims at understanding the functional role of DMM.

First, we demonstrate that DMM is part of *Alu*, a Short Interspersed Nuclear Element (SINE) retrotransposon family that represents more than 10% of the human genome. In particular, DMM is embedded within the *Alu* promoter (B-box) and contains a DR2 nuclear receptor (NR) binding site. Second, by exploiting the yeast one-hybrid assay with a human aorta cDNA library as prey and chromatin immunoprecipitation in human cells, we identified the liver X receptor beta (LXRβ) NR as ligand of the DMM. LXRβ is a pivotal regulator of lipid homeostasis and regulates the progression of atherosclerosis. By mutagenesis, we show that the LXR-DMM interaction is DR2-dependent. Third, we show that the LXR-DMM interaction leads to hypermethylation of *Alu* in human cultured cells. In addition, bioinformatics analysis revealed that DMM is specifically associated with *Alu*-flanking CpG island hypomethylation in human vascular tissue. Fourth, we focused on three intergenic long non-coding RNAs (lncRNAs) that contain the DMM and are adjacent to known targets of LXR. We demonstrate that LXR regulates the

expression of the three lncRNAs and that these displays differential expression between human atherosclerotic and normal arteries. Finally, we found no evidence that the three lncRNAs regulate LXR target gene expression *in cis*.

In conclusion, the LXR-DMM interaction controls local DNA methylation profiles, thus assigning to LXR a novel function. Furthermore, considering the widely accepted atheroprotective role of LXR, our data indicate that the hypermethylation observed of *Alu* in atherosclerosis is a compensatory phenomenon rather than an atherogenic change.

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Epigenética y metilación del DNA

La epigenética estudia modificaciones químicas del DNA y de las histonas, que pueden regular la transcripción y que son potencialmente heredables. Esas marcas epigenéticas incluye la metilación del DNA (mDNA) y modificaciones postraduccionales de histonas (Bird, 1992; Jenuwein & Allis, 2001; Kouzarides, 2007; Murr, 2010). La mDNA es dada por la adición de un grupo metilo originado del donador universal S-adenosilmetionina al carbono 5 de la citosina, resultando en la formación de la 5-metilcitosina (5meC). En eucariontes la mDNA se observa sobre todo en la citosina del dinucleótido CpG (Chiang *et al.*, 1996). La mDNA juega un papel importante en varios fenómenos biológicos incluyendo la impronta genómica, inactivación del cromosoma X y el silenciamiento de elementos repetidos (E. Li, Beard & Jaenisch, 1993; Panning & Jaenisch, 1996; Walsh, Chaillet, & Bestor, 1998).

Las enzimas que catalizan la metilación y desmetilación del DNA son bien conocidas. En mamíferos existen cuatro DNA metiltransferasas activas: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3C. DNMT1 mantiene el perfil celular de mDNA, actuando sobre el DNA hemimetilado después de la replicación durante la división celular, mientras que DNMT3A, DNMT3B y en algunos casos la misma DNMT1 son responsables de la mDNA *de novo*. Por su parte, DNMT3C protege las células germinales masculinas de la actividad de retrotransposones (Barau *et al.*, 2016; T. Chen & Li, 2004; Hata, Okano, Lei, & Li, 2002). Los mecanismos de desmetilación en mamíferos son complejos y han sido atribuidos a las proteínas TET (translocación Ten-eleven), una familia de dioxigenasas. Las TETs catalizan la conversión de 5meC a 5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina y 5-carboxilcitosina. La generación de esas bases induce mecanismos de reparación que reinstauran la citosina en sitios previamente metilados (Guo, Su, Zhong, Ming & Song, 2011; Ito *et al.*, 2010; Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009). También un mecanismo de desmetilación del DNA involucra las desaminasas de la familia AID (AID, subgrupos 1,2 y 3 APOBEC) que desaminan directamente el 5meC, creando un sitio

T-G desapareado que puede ser sustrato de DNA glicosilasas, como TDG o MBD4, y posteriormente reparado por la vía mecanismos de reparación por excisión de base (BER) (Bhutani *et al.*, 2010; Cortellino *et al.*, 2011; Gehring *et al.*, 2006; Haerty & Ponting, 2015).

La gran mayoría (70-80%) de los sitios CpG del genoma de mamíferos se encuentran metilados. Más del 90% de las CpGs metiladas en el genoma humano ocurren en elementos repetidos, particularmente en *Alu* y *LINE1* (Beisel & Paro, 2011; Ehrlich *et al.*, 1982). Por otro lado, existen regiones por lo general no metiladas llamadas islas CpG (ICGs). Estas regiones tienen la característica de ser ricas en nucleótidos C y G (>55%) y en dinucleótidos CpG (frecuencia esperada >0.6) y además más del 70% de los promotores contienen ICGs (Takai & Jones, 2002).

Los efectos de la mDNA sobre la transcripción son dependientes del contexto génico: en promotores la mDNA está generalmente asociada con el silenciamiento, mientras que la asociación es opuesta en el cuerpo del gen. El papel biológico en el cuerpo del gen aún no está completamente explicado, pero existe evidencia de que pueda afectar a la actividad de la RNA polimerasa II, al *splicing* o inhibir el inicio de transcripción dentro el gen (Aran, Toperoff, Rosenberg & Hellman, 2011; Ball, Li, Gao, Lee & Leproust, 2009; Greger, Passarge, Höpping, Messmer & Horsthemke, 1989).

La mDNA es maleable, ya que puede variar durante los procesos fisiológicos normales de la diferenciación celular y del desarrollo, y además en respuesta a factores exógenos al organismo, como la dieta y el estilo de vida (Lorenzen, Martino & Thum, 2012). Por lo tanto, la epigenética puede tener un papel importante en la etiología de las enfermedades determinadas por factores dietéticos y medioambientales, como la aterosclerosis.

### **3.2 Aterosclerosis y la metilación del DNA**

La aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular (ECV) caracterizada por la infiltración lípidos como LDL hacia la pared arterial. Este fenómeno es acompañado por la migración de células del músculo liso así como su proliferación, además de la

inflamación y reclutamiento de células inmunes, y la síntesis de una matriz extracelular. Este complejo proceso resulta en la formación de una lesión fibrocelular también conocida como placa aterosclerótica (Raines & Ross, 1995). El desarrollo de la placa por décadas en humanos es normalmente asintomático, pero en algunos casos presenta síntomas al sufrir ruptura la placa aterosclerótica proceso que causa trombosis y las complicaciones clínicas son: derrame cerebral, infarto del miocardio o enfermedad vascular periférica, dependiendo de la localización anatómica de la rotura (Espondaburu, Alicia, Hunt, & Ocampo, 2004).

La etiología de las ECV es multifactorial, incluyendo el estilo de vida, trastornos metabólicos, entre otros factores de riesgo (Balagopal *et al.*, 2011). Los esfuerzos para entender los mecanismos que conducen a un perfil transcripcional aterogénico se han tradicionalmente enfocado en la genética. Sin embargo, en la última década la epigenética ha despertado un considerable interés en el área de las ECV. El estudio de la mDNA puede ayudar a entender la interacción entre los factores de riesgo de ECV y el genoma. Así como puede proveer información relevante sobre los mecanismos que establecen un programa de transcripción proaterogénica y los caminos para corregirlo (Lund *et al.*, 2004; Zaina & Lund, 2011). En uno de los primeros trabajos sobre mDNA en la aterosclerosis, Lund y colaboradores (2004) demostraron que los cambios en la mDNA global preceden la formación de la placa aterosclerótica, en un modelo murino de aterosclerosis (ratones *knock-out* para la apolipoproteína E). Posteriormente, estudios de genes candidatos revelaron varios loci diferencialmente metilados comparando tejido vascular o sangre periférica de individuos ateroscleróticos y controles (K. C. Chen *et al.*, 2011; Ordovás & Smith, 2010; Zawadzki *et al.*, 2009). Más recientemente, estudios de epigenómica mostraron cambios dinámicos de la mDNA en tejido vascular. Zaina y sus colaboradores identificaron una tendencia general del genoma a la hipermetilación en aortas humanas con aterosclerosis estable (grado III-VII), mientras que en lesiones carotideas que han sufrido ruptura se identificó hipometilación (Zaina *et al.*, 2014, 2015).

### 3.3 Motivo DMM

El antecedente fundamental del presente trabajo es un estudio realizado por nuestro grupo basado en microarreglos de ICGs de arterias coronarias ateroscleróticas (AAs) de pacientes que han sufrido infarto al miocardio. En comparación con controles sanos se demostró cambios en la mDNA de ICGs de AAs (Castillo-Díaz *et al.*, 2010). De las ICG diferencialmente metiladas (DM-ICG), la mayoría (94%) se encontró hipometiladas en AAs, mientras que el 6% fueron hipermetiladas en AAs. Al analizar secuencias de 4 kb centradas en el punto medio de las ICGs hipometiladas en AAs con el software MEME, se identificó un motivo de 29 pb nombrado DMM que estaba presente en el 55% de DM-ICGs hipometiladas en AAs (Figura 1). La presencia de motivos es una señal del posible involucramiento de factores de unión al DNA en el establecimiento de la mDNA diferencial (Castillo-Díaz *et al.*, 2010). En lo particular, nosotros supusimos que DMM era un sitio de unión para factores que causan cambios en la mDNA de ICG. Basado en las características del DMM que se han identificado en el presente trabajo de tesis (véase la sección de Resultados), en los dos párrafos siguientes presentaré una reseña de *Alu* y de los RNA largos no codificantes.



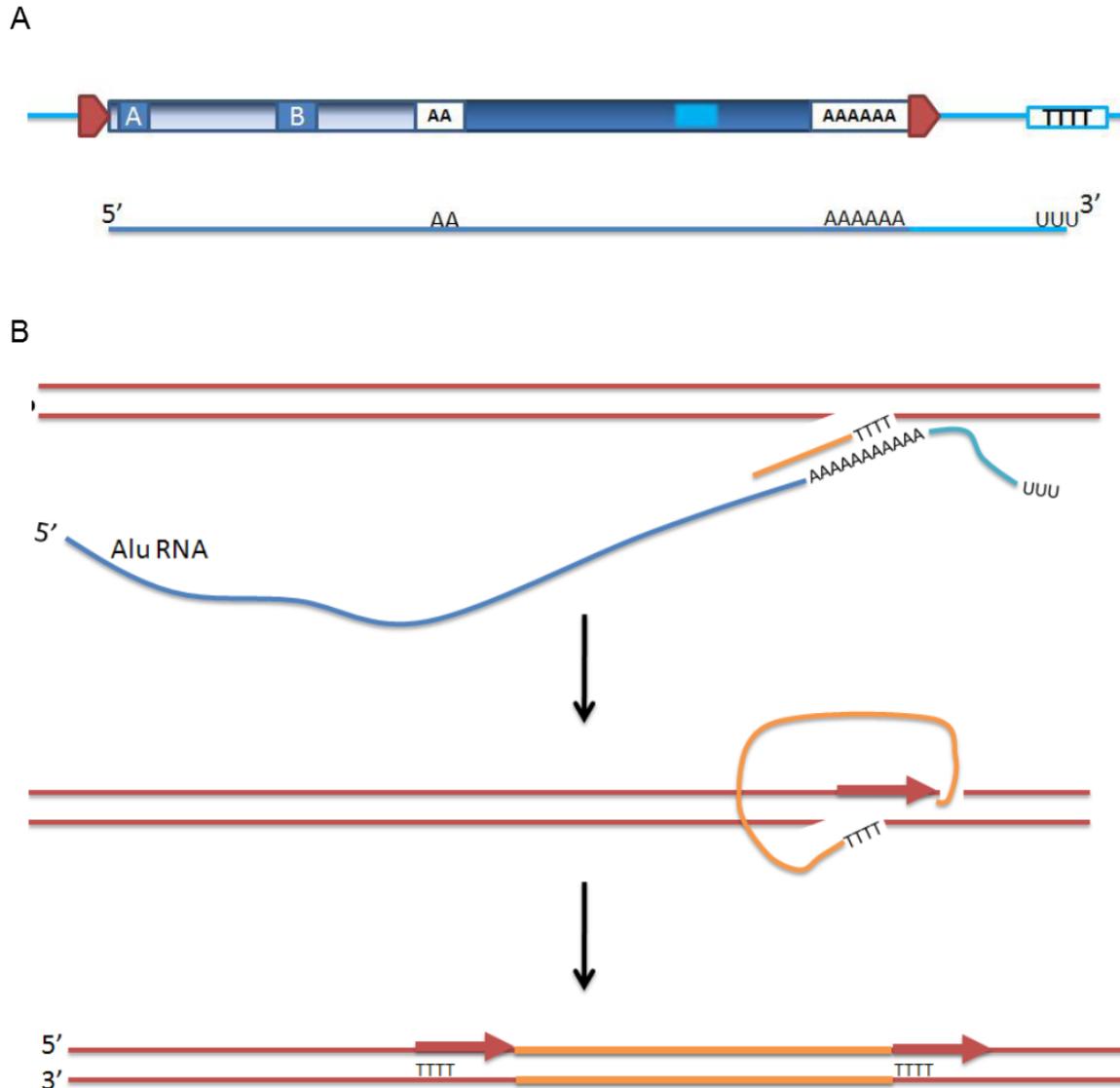
**Figura 1- Motivo DMM.** La secuencia representa el motivo DMM obtenido del análisis *in silico* de secuencias que flanquean las DM-ICGs. La altura de la letra indica la probabilidad de que la base correspondiente esté presente en esa posición. La caja negra contiene una porción del DMM conservada en *M. musculus* (adaptada de Castillo-Díaz *et al.*, 2010).

### 3.4 Retrotransposones *Alu*

Los retrotransposones son secuencias de DNA que se transponen a través de un RNA. Estos se subdividen en dos subclases: aquellos con la presencia de repeticiones terminales largas (LTR, long terminal repeats) y aquellos sin LTR (non-LTR) (Feschotte & Pritham, 2007; Hancks & Kazazian, 2012; Jern & Coffin, 2008; Romanish, Cohen, & Mager, 2010). Los elementos nucleares cortos dispersos (SINE, Short Interspersed Nuclear Element) y los elementos nucleares largos dispersos (LINE, Long Interspersed Nuclear Element) son non-LTR (Nekrutenko & Li, 2001). Los elementos *LINE1* poseen dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2, open reading frame 1 y 2). ORF1 tienen actividad de chaperona de ácidos nucleicos, además participa en la formación de ribonucleoproteínas necesaria para la retrotransposición (Kolosha & Martin, 2003; Kulpa & Moran, 2005; Martin & Bushman, 2001). ORF2 codifica a una transcriptasa inversa que posee un dominio de endonucleasa (Cost GJ, 1998; Q. Feng, Moran, Kazazian & Boeke, 1996; Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH Jr, Boeke JD, 1991). Contrario a los LINEs, los *Alu* no son transposones autónomos, ya que utilizan la maquinaria de los LINE de tipo 1 (*LINE1* o *L1*) para su transposición (Dewannieux, Esnault & Heidmann, 2003).

El SINE más común en primates es el elemento *Alu*, que representa alrededor del 11 % del genoma (aproximado 1.3 millones de copias) (W. H. Li, Gu, Wang, & Nekrutenko, 2001). *Alu* tiene una longitud de ~300 pb y está compuesto por dos divergentes monómeros, que descienden del gen 7SL RNA, un elemento del complejo ribosómico. El monómero izquierdo contiene un promotor de la RNA polimerasa III (box A y B). *Alu* no contiene ningún terminador de transcripción para la RNA polimerasa III, pero termina con una caja TTTT (Figura 2 A). La transcripción de *Alu* catalizada por la RNA polimerasa III, posteriormente la endonucleasa corta en el lugar de inserción preferentemente en la secuencia 5'-TT/AAAA-3'. En el paso siguiente, el RNA mensajero (RNAm) del *Alu* se hibrida con su cola poli A a la anterior secuencia, una vez hibridado se da la transcripción reversa y se produce un segundo corte y el ligamiento al DNA (Figura 2 B, Mark Batzer & Deininger, 2002). Desde el punto de vista evolutivo, los elementos *Alu* se pueden clasificar en tres grandes subfamilias: *AluJ* es la más antigua (tiene ~65 millones de años (MA) con

~160,000 copias), *AluS* de edad intermedia (~30 MA con ~650,000 copias) y *AluY* la más joven (3-6 MA con ~155,000 copias) (M Batzer *et al.*, 1996; Mark Batzer & Deininger, 2002; Bennett *et al.*, 2008; P Deininger, 2011; Labuda & Striker, 1989; Willard, Nguyen, & Schmid, 1987).



**Figura 2- Retrotransposición de *Alu*.** (A) Estructura del elemento *Alu*. (B) Mecanismo de inserción. El proceso empieza con la transcripción dirigida por la RNA polimerasa III, seguida por la inserción y la transcripción reversa *in situ* y ligación (adaptada de Deininger, 2011)

Los *Alus* son relativamente ricos en CpG, sujetos a la mDNA y son responsables de alrededor de 25% de la mDNA del genoma humano (Hellmann-blumberg, Hintz, Gatewood & Schmid, 1993). Desde el punto de vista de la epigenética médica, se ha observado mDNA anormal de *Alu* en algunas enfermedades. Ejemplos son la hipometilación de *Alu* en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Bollati *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2009), osteoporosis (Jintaridth, Tungtrongchitr, Preutthipan, & Mutirangura, 2013) pulmón neoplásico (Lange *et al.*, 2012) y en cáncer de mama y colorrectal (Jackson *et al.*, 2004; Suter, Martin & Ward, 2004). Por otro lado, en la aterosclerosis los *Alus* son consistentemente hipermetilados en todos los cromosomas de lesiones ateroscleróticas estables (Zaina *et al.*, 2014).

### **3.5 RNA largos no codificantes**

Existe evidencia de que una gran parte del genoma se transcribe, pero solo una minoría de los RNAs codifican para proteínas (Bertone *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Consortium *et al.*, 2007; Kapranov *et al.*, 2007). Uno de los tipos de RNA no codificantes son los RNA largos no codificantes (lncRNA por sus siglas en inglés). Estos carecen de marcos de lectura abiertos (ORFs, open reading frames) conservados, tienen un tamaño de >200 nt, son normalmente localizados en el núcleo, presentan un bajo nivel de secuencias conservadas y bajo nivel de expresión. Muchos lncRNAs tienen características de RNAm que codifican a proteínas: sufren *splicing*, son generalmente transcritos por la RNA polimerasa II, presentan poliadenilación y el casquete en el 5' (Kapranov *et al.*, 2007; Mattick & Makunin, 2006; Wu, Li & Sun, 2007). De acuerdo con la enciclopedia de elementos de DNA (ENCODE), el genoma humano contiene 20,687 genes que codifican para proteínas y 9,640 loci para lncRNAs representados en 15,512 transcritos (Harrow *et al.*, 2012). Recientemente se publicó una base de datos nombrado por los autores MiTranscriptome, que compendió 7,256 muestras de RNA-seq del transcriptoma humano. MiTranscriptome identificó 58,648 loci para lncRNAs y 21,313 genes codificantes (Iyer *et al.*, 2015).

Varios lncRNAs están involucrados en la regulación de la expresión génica: ejemplos son *Xist*, *HOTAIR*, *DHFR*, *Evf2*. Estos se han demostrado tener efectos en la activación o represión en *cis* o *trans* por distintos mecanismos (Heard & Disteche, 2006; Lu *et al.*, 2012; Martianov, Ramadass, Serra Barros, Chow & Akoulitchev, 2007). Por ejemplo, la inactivación del cromosoma X se basa en la expresión del lncRNA *Xist* que recluta *in cis* complejos de proteínas que establecen marcas epigenéticas represivas en el cromosoma (Heard & Disteche, 2006). Por otro lado, *HOTAIR*, un lncRNA del locus HOXC, afecta la expresión de genes del locus HOXD localizado en un cromosoma diferente, interactuando con el Complejo Represivo Polycomb 2 (PRC2) (Lu *et al.*, 2012; Rinn *et al.*, 2007). Otros ejemplos son la regulación negativa de la dihidrofolato reductasa (*DHFR*) o la regulación positiva del gen *distal-less homeobox 5/6* (*Dlx5/6*) por lncRNAs (J. Feng *et al.*, 2006; Mantovani *et al.*, 2004; Ørom *et al.*, 2010). En el caso de *DHFR*, contiene un promotor menor que transcribe un lncRNA este se une al promotor mayor y a su factor de transcripción llevando a la disociación del complejo de iniciación provocando la represión de *DHFR* (Martianov *et al.*, 2007). En el caso del *Dlx5/6*, su lncRNA antisentido nombrado *Dlx6as*, forma un complejo con la proteína Dlx2 que activa la transcripción de *Dlx5/6* (J. Feng *et al.*, 2006). En el contexto de las ECV, *ANRIL* es un lncRNA implicado en la aterosclerosis severa. *ANRIL* está localizado en el locus 9p21, y fue identificado como un locus de riesgo de aterosclerosis (Congrains *et al.*, 2012; Gschwendtner *et al.*, 2009; Holdt *et al.*, 2010).

#### **4. Justificación**

La aterosclerosis es una de las principales causas de muerte en el mundo y en México, y seguirá siendo la principal causa de muerte en las próximas dos décadas. Esta enfermedad es causada por múltiples factores como el estilo de vida y la dieta, por lo que se sugiere que la epigenética nos puede ayudar a elucidar la interacción entre los factores de riesgo de la aterosclerosis y el genoma. Datos previos de nuestro grupo sugieren un posible mecanismo de control de la mDNA en la aterosclerosis, basado en el motivo de DNA DMM. El presente trabajo pretende conocer el papel funcional del motivo DMM.

#### **5. Hipótesis**

Las ICGs cercanas al DMM sufren mDNA diferencial en aterosclerosis, por lo tanto, el DMM es un sitio de unión de proteína(s) reguladoras locales de la mDNA en aterosclerosis.

## 6. Objetivos

### 6.1 General

Caracterizar el motivo DMM y evaluar su papel en la mDNA y la regulación génica.

### 6.2 Específicos

- Realizar una filogenia del DMM con respecto a las subfamilias de *Alu*.
- Identificar proteínas de unión al motivo DMM mediante el sistema de un híbrido y validar las proteínas de unión por CHIP.
- Analizar los perfiles de metilación de *Alu* al activar la proteína de unión al DMM en THP-1.
- Identificar la secuencia completa de los lncRNAs por RACE.
- Cuantificar los niveles de transcritos y mDNA de los lncRNAs que contienen al motivo DMM, al activar a la proteína de unión en la línea celular THP-1.
- Cuantificar los niveles de transcritos y mDNA de los lncRNAs que contienen al motivo DMM en arterias ateroscleróticas y sanas.
- Realizar un análisis bioinformático de los perfiles de mDNA de las secuencias que flanquean al DMM en *Alu*.
- Analizar la regulación dirigida por los lncRNA *in cis*.
- Cuantificar el número de elementos *Alu* en los transcritos del genoma.

## **7. Estrategia experimental**

### **7.1 Ensayo de un híbrido en levadura**

Dos copias del motivo DMM ATCACTTGAGGTCAGGAGTTTCGAGACCAG fueron clonadas dentro del vector pHISi (Clontech) río arriba del marcador auxotrófico *HIS3* usando los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI*. La construcción se insertó en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* YM4271 (Genotipo MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *leu2-3, 112*, *trp1-901*, *tyr1-501*, *gal4-D512*, *gal80-D538*, *ade5::hisG*). Todas las construcciones se comprobaron por ensayos de restricción, así como por secuenciación. Se realizó una transformación a gran escala usando 0.5 mg de librería de DNA complementario (DNAc) de aorta humana Matchmaker clonada en el vector pACT2 (Clontech). 400 colonias His+ fueron seleccionadas en medio carente de leucina, uracilo e histidina y suplementado con 75mM de 3-aminotriazol (3-AT) para eliminar la autoactivación. De cada colonia se extrajo el vector, el vector obtenido se transformó en *E. coli*, después se extrajo de *E. coli*, por último, se transformó en la levadura con el DMM en su genoma, se reanalizó la interacción de la proteína del plásmido con el DMM. De ahí se seleccionaron colonias positivas para secuenciar, se identificó las proteínas en la base de datos GenBank (NCBI). Para probar la especificidad de unión a secuencias, se generaron cepas de cebo mutante en las que la parte de AGGTCA del DMM (posición 9-14) fue codificada (GATAGC) o eliminada se transformaron y se seleccionaron con dosis incrementadas de 3-AT (0-50 mM).

### **7.2 Cultivo celular y estimulación con agonistas de LXR**

Los monocitos de THP-1 fueron cultivados en medio RPMI 1640 con L-Glutamato (Life Technologies) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (FBS; Life Technologies) y atmosfera controlada con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Para la diferenciación a macrófagos se trataron alrededor de 10 millones de monocitos de THP-1 con Formol 12- miristato 13 acetato (PMA, Sigma-Aldrich) a 50 ng/ml en medio con la composición mencionada anteriormente por 4 horas, después la concentración del PMA fue bajada a 25 ng/ml por 4 días, cambiando el medio al segundo día de la

diferenciación, estas células que al diferenciarse son adheribles. Para la formación de las células espumosas usamos 10 millones de macrófagos tratados con 150 µg/ml de lipoproteína en medio normal por 24 horas, comprobamos la formación de células espumosas por tinción *old red*. Los monocitos, macrófagos y células espumosas fueron estimuladas con solo DMSO y los agonistas de LXR, 1µM T0901317 en DMSO o con 1µM GW3965 en DMSO por 24 horas, el DMSO se usó como disolvente con una concentración de 0.01 %. Las células HEK293 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con L-Glutamato (Life Technologies), 10% (vol/vol) de FBS (Life Technologies) y atmosfera controlada con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. En ambos tipos celulares no deben exceder de una concentración de ~10<sup>6</sup> células/ml.

### **7.3 Identificación de la secuencia de lncRNAs con DMM**

A partir de 1 µg de RNA extraído de monocitos de THP-1, mediante la rápida amplificación de los extremos de DNAC (RACE) usando el kit GeneRacer™ (Life Technologies) usando el protocolo descrito se identificó el 5' y 3' del lncRNAs, el 5' del RNA fue desfosforilado con la fosfatasa CIP, se removió la CAP del 5', se ligó el oligonucleótido GeneRacer™, se generó el DNAC y usando oligonucleótidos específicos para *IncACACA* y los del kit, identificamos el 5' y 3', los productos del PCR fueron clonados en el vector pCR2.1 TOPO (Life Technologies). Los productos fueron secuenciación usando el oligonucleótido M13R.

### **7.4 Muestras vasculares humanas**

Aortas con aterosclerosis estable (grado III-VII) y normales fueron colectadas entre 3 y 26 horas *post mortem* (n=15 donadores) fueron obtenidas en el Hospital Bellvitge y el Hospital Clínico en Barcelona España acorde al protocolo aprobado por el comité de ética local. Información adicional sobre sexo y edad esta mostrada en la tabla suplementaria 2 y en S1 Zaina *et al.*, 2014. Las lesiones carotideas sintomática y asintomáticas (n=19 en cada grupo) fueron colectadas por endarterectomía, respectivamente después y antes de un evento cerebrovascular (derrame) obtenidas en el Hospital General Malmö de la Universidad Lund en Malmö Suecia,

acorde al protocolo aprobado por el comité de ética local (Zaina *et al.*, 2015). Se obtuvo perfiles de mDNA para aortas y carótidas utilizando el microarreglo de mDNA Infinium Human Methylation 450 Bead Chip abreviado como 450K (Illumina). Las muestras fueron mantenidas en RNAlater (Ambion) a -80 C. Las muestras de aorta fueron usadas para el análisis de expresión semicuantitativa y en tiempo real cuantitativo.

## 7.5 Expresión del RNAm, RT semicuantitativo y cuantitativo

El RNA de células de THP-1 y aorta fue extraído con Trizol™ (Life Technologies) tratado con TURBO™ DNase (Life Technologies). El DNAc fue sintetizado usando 1 µg de RNA para las células y 400 ng para aorta, ambos RNAs con el oligonucleótido dT y catalizado con la transcriptasa reversa SuperScript™ II (Life Technologies). Para el PCR semicuantitativo se usó Platinum™ (Life Technologies). En el caso del ensayo del PCR cuantitativo en tiempo real fue realizado usando SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix (Life Technologies). Se analizó la expresión utilizando los oligonucleótidos de la tabla 1.

**Tabla 1-** Oligonucleótidos para expresión del RNAm.

	Sentido	Antisentido	pb
<i>GAPDH</i>	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	AATAAGGGGTCATTGATGG	108
<i>FASN</i>	TCGGAGAACTTGCAGGAGTT	GACTCCGAAGAAGGAGGCAT	156
<i>SREBF1</i>	GGGTCAGTTGCCCTTCTCA	TGAGACGTGCCAGACTTCTT	141
<i>ACACA</i>	GCCACCCTGAGGTCTTTCTGG	TGAATCGAGAGTGCTGGTTCAG	141
<i>IncFASN</i>	TTCTTGAGGGGACTGTGTGG	ACAATTGGAAGGCTAGTGGG	145
<i>IncACACA</i>	GCCCCACCAACATGGTGAATACTA	GCTCCTTTTGTCTTTCCCTCCC	190
<i>IncSREBF1</i>	GATCATGTTTCTGCCTGGAG	CACAGTAAACGCCCTTGCAT	147

## 7.6 Secuenciación del DNA convertido con bisulfito de sodio

Las células THP-1 fueron estimuladas con el agonista sintético de LXR llamado GW3965 el cual aumenta la actividad de LXR, posteriormente el DNA obtenido de estas células fue tratado con bisulfito de sodio siguiendo el protocolo de EZ DNA Methylation-Gold™ Kit EZ (Zymo Research). Nosotros analizamos la mDNA cerca

del DMM en lncRNAs y la mRNA de la región promotora de *FASN*, *SREBF1* y *ACACA*. La amplificación fue clonada en pCR2.1 TOPO (Life Technologies), ocho clonas por gen fueron secuenciadas y analizadas con el software Kismeth (Clark, Harrison, Paul & Frommer, 1994; Gruntman *et al.*, 2008). Se analizó utilizando los oligonucleótidos de la tabla 2.

**Tabla 2-** Oligonucleótidos para secuenciación de DNA convertido.

	Sentido	Antisentido	pb
<i>FASN</i>	AGTTTTTAGTGTGGTTTAAGT	RCCACATAAACTAACCACTT	342
<i>SREBF1</i>	TTAGGAAATGAGGAAATGAAGTT	CACCTTAAAAAACRAAAAACC	260
<i>ACACA</i>	TTTTTAGTTTTYGTAGAGGGGTT	CCTTACTACAACAAAAAT	499
<i>lncFASN</i>	TTAAGATTTGTAGGAAGT	ACAAATACCTCAAAAACAC	340
<i>lncACACA</i>	GTTTTTTTATTGTAGTGGGAAG	CCACACCTAACTAATTTTTAT	258
<i>lncSREBF1</i>	TTTTAGTTTTTTGAGTAGTTGGG	AACTCACTCCTCAATAAAAAA	309

### 7.7 Análisis de restricción del DNA convertido por bisulfito (COBRA Combined Bisulfite Restriction Analysis) del elemento *Alu*

El DNA tratado con bisulfito de sodio de monocitos, macrófagos y células espumosas estimuladas con los agonistas de LXR, fue usado para realizar PCR con los oligonucleótidos *Alu*-sentido (GGYGYGGTGGTTTACGTTTGTA) y *Alu*-antisentido (TAATATGGTGAAATTTYGTTTTATTAA) con una temperatura de alineamiento de 53°C, por 50 ciclos, la amplificación fue digerida con la enzima de restricción *TaqI* y cuantificado por densitometría (Sirivanichsuntorn *et al.*, 2013). Los oligonucleótidos de *Alu* puede amplificar la mayoría de las subfamilias *Jb*, *Sc*, *Sc8*, *Sg*, *Sg4*, *Sg7*, *Sp*, *Sq*, *Sq4*, *Sx*, *Sx1*, *Sx3*, *Sx4*, *Sz*, *Sz6*, *Y*, *Ya5*, *Ya8*, *Yb8*, *Yb9*, *Yc1*, *Yc2*, *Yd8*, *Yf5*, *Yg6*, *Yk* y *Yk12*. Excepto *FAM*, *FLA*, *FLAM\_A*, *FLAM\_C*, *Jr*, *Jr4*, *Jo*, *Sq2*, *Sq10*, *Sc5*, *Yc5* y *Yh9*.

### 7.8 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Para la inmunoprecipitación se utilizaron dos condiciones, en la primera los monocitos de THP-1 fueron estimulados con DMSO a una concentración final en el medio de 0.01%, en la segunda condición se estimuló con el agonista de LXR

GW3965 con DMSO a una concentración final en el medio de 1µM y 0.01%, respectivamente, por 24 horas. Se usó 20 millones de células por tratamiento se realizó por triplicado, se usó el protocolo descrito por Carey, Peterson y Smale (2009), los parámetros de sonicación fueron 20 segundos con 90 de amplitud por 15 veces. El anticuerpo usado fue anti-LXR beta grado ChIP (cb56237, Abcam), se usó 5 µg. Los lavados y extracción de DNA se realizaron con el protocolo de Rodríguez-Ubreva y Ballestar (2014). Los oligonucleótidos usados tabla 3. Fue usada una concentración de 5% del input, en TBE 1X al 2% se realizó electroforesis de los productos de PCRs, los experimentos fueron realizados con triplicado biológico y técnico.

**Tabla 3-** Oligonucleótidos para ChIP.

	Sentido	Antisentido	pb
<i>GAPDH</i>	CACCAACTGCTTAGCACCCC	GTCAGGTCCACCACTGACAC	472
<i>SREBF1</i>	CTTTAACGAAGGGGGCGGGAG	GAATGGGGTTGGGGTTACTAGCG	110
<i>IncFASN</i>	TTACAAGCATCCACCACCACAC	ACTGAGTTTCCAGCCAGACG	172
<i>IncACACA</i>	AGGCCCTAGAGAGGATGGC	TTGGTGGGGCTTCTCGAAC	165
<i>IncSREBF1</i>	TGGCTCACCCTGTAATCCC	GCCACCCCTATACCCAGCTA	142

## 7.9 Transfección y ensayo con luciferasa

Para la sobreexpresión de *IncACACA*, *IncACACA\** con el DMM aleatorio y el *IncSREBF1* se usaron los oligonucleótidos de la tabla 4 con Platinum® Taq DNA polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen) usando en la amplificación DNAC de THP-1, posteriormente fue insertado en pTracer-SV40 en el sitio *Apal* y *SpeI*. Para el promotor de promotor de *ACACA* y *SREBF1* se usaron los oligonucleótidos de la tabla 4, se amplificado de DNA genómico de células de THP-1 usando Platinum® Taq DNA polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen), se insertó cada secuencia en pGL4 en el sitio *HindIII* y *XhoI*. Realizamos primero la transfección de pTracer-SV40 con cada uno de los lncRNAs en las células HEK293, usando la Lipofectamina 3000 (Invitrogen) con una concentración de 2.5 µg con ~ 1.5 X 10<sup>6</sup> células en tres mililitros de medio. Después de 24 horas se cotransfectó 0.1 µg de pGL4 con cada promotor y 0.1 µg de pRL-TK en cada pozo. Después de 24 horas el ensayo de luciferasa fue

realizado en una placa de lectura usando Dual-Glo (Promega) de acuerdo con el protocolo, cada ensayo se realizó por triplicado.

**Tabla 4-** Oligonucleótidos para ensayo con luciferasa.

	Sentido	Antisentido	pb
<i>IncACACA</i>	AGGGCCCTTATCAGAAGAGGGGACCTGA	GACTAGTTGAGACAGAGTCTCCCTCTCTCA	295
<i>IncACACA*</i>	TCACTTGGATAGCGGAGTTCGAGACCAGCC	GAACTCCGCTATCCAAGTGATCCTCCTGCC	295
<i>IncSREBF1</i>	TGGGCCCTATTTAATCACATCTGCAAGGAC	GCCACTAGTGTAACAATAGAAATTTATTTGGC	591
<i>ACACA</i>	CGCTCGAGCAGTCTGCAGAATCTTCTTTC	TAAGCTTACCGGAAAAGGCCAAGAGGG	855
<i>SREBF1</i>	TAAGCTTCAGCTCTGCTGGGCGGTCGAG	CCACTCGAGGACCCCTTCCCTCCTTCC	950

### 7.10 Análisis estadísticos

Análisis de varianza (ANOVA) con múltiple comparación post hoc Bonferroni con un nivel de significancia de 0.05, además de T-test, fue usado para comparar la expresión y patrones de mDNA, en genes y elementos *Alu*, usando el software SPSS de Windows (versión 19.0) y R (versión 3.2.0).

### 7.11 Análisis de datos de RNA largos no codificantes y *Alu*

Usamos un juego de datos de 7,256 librerías de RNA-seq ya sintetizado en MiTranscriptome (mitranscriptome.org, Iyer *et al.*, 2015) las coordenadas de los elementos de *Alu* fueron obtenidos de UCSC Genome Browser, las secuencias de los elementos de *Alu* fueron adquiridos de Repbase (girinst.org/repbase/, Jurka *et al.*, 2005). Como genoma de referencia usamos el GRCh37. Para analizar la posición de *Alu* en los transcritos nosotros usamos todos los transcritos alternativos, para conocer cuántos genes transcritos contienen al elemento *Alus* en MiTranscriptome nosotros usamos el transcrito de mayor tamaño, así como para conocer el número de *Alus* en genes de transcritos.

### 7.13 Análisis filogenéticos

Nosotros usamos el método de Neighbor-Joining en MEGA 7, usamos 37 de las subfamilias más representativas de *Alu* y el DMM, tomamos 29 pb de la secuencia

con más similitud a el DMM. Las distancias evolutivas fueron estimadas usando el método Maximum Composite Likelihood.

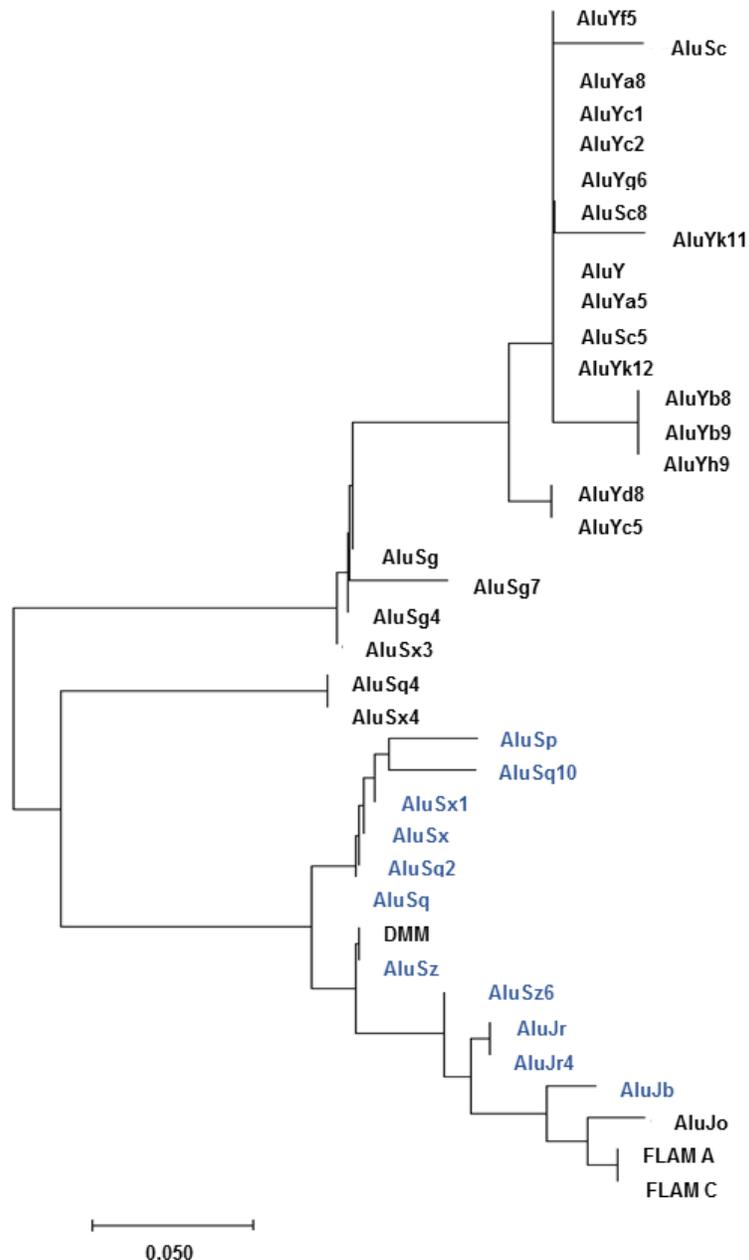
#### **7.14 Análisis de datos microarreglos**

La generación de datos de microarreglos de mDNA Infinium HumanMethylation450 BeadChip (microarreglo 450K) fue previamente descrita (Heyn *et al.*, 2012; Sandoval *et al.*, 2011). El nivel de mDNA, para cada citosina se expresó como un valor Beta calculado como la relación de intensidad de fluorescencia de la metilado a la no metilada de las sondas. Los valores beta fluctuaron entre 0 (no metilado) y 1 (metilado) (Heyn *et al.*, 2012; Sandoval *et al.*, 2011). Los niveles de mDNA analizados en *Alu* y regiones que flanquean a *Alu* cada 10 pb hasta 100 pb y 50 pb cada uno hasta 2 Kb, se analizaron los datos por bioinformática.

## 8. Resultados

### 8.1 Filogenia del DMM con respecto a las subfamilias de *Alu*

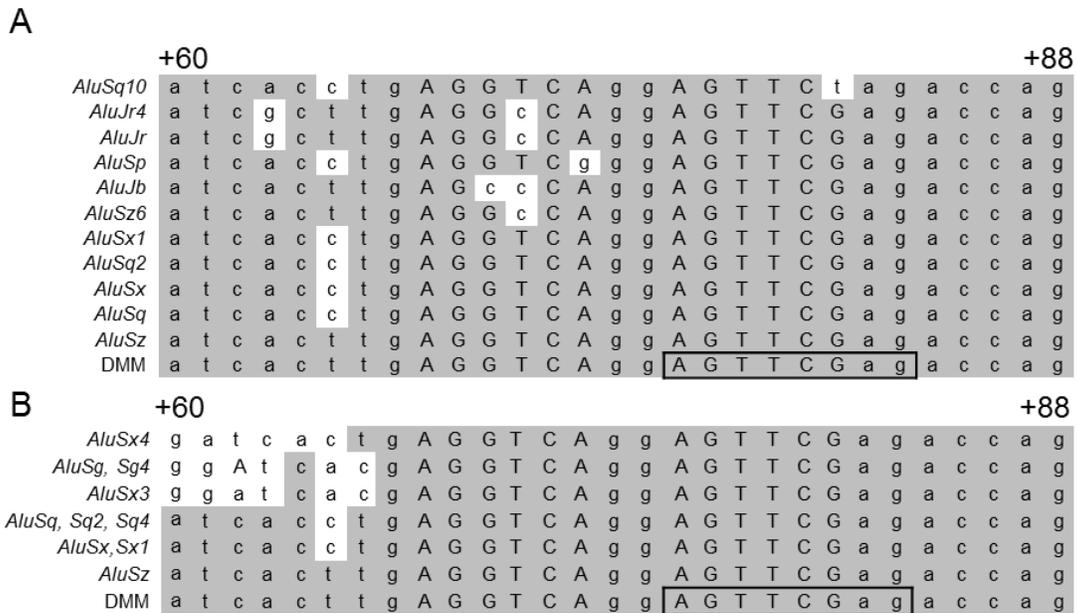
Primero, nos preguntamos si el DMM pertenece a alguna familia con secuencia conservada. Un primer hallazgo fue que el DMM se encuentra en los elementos *Alu*, específicamente incluye a la B box, un sitio de unión de la RNA polimerasa III. Ese dato sugiere que, a través de la regulación de la mDNA el DMM podría provocar cambios en la expresión de los elementos *Alu*. Otro hallazgo fue que el DMM contiene al motivo DR2 (repetido directo 2), un sitio conocido de unión de factores de transcripción. El DR2 está compuesto por dos elementos repetidos directos separado por 2 pb. La secuencia consenso de los elementos repetidos es RGKTCA (R y K indican A o G y G o T, respectivamente). El DMM contiene la secuencia AGGTCAnnAGTTCG así como en la mayoría de las subfamilia *AluS* (Bolotin *et al.*, 2011a; Laperriere, Wang, White, & Mader, 2007). El elemento 3' del DR2 se encuentra dentro de la B box (Figura 4). Sucesivamente, realizamos un árbol filogenético basado en la similitud de cada subfamilia de *Alu* con el DMM de referencia, es decir el DMM compuesto por las bases más frecuentes en cada posición (Figura 1). De ahora en adelante, el DMM de referencia se indicará como DMM.



**Figura 3- Árbol filogenético de las subfamilias de *Alu* con respecto al DMM.** Las subfamilias de *Alu* con mayor similitud al DMM están indicadas en azul.

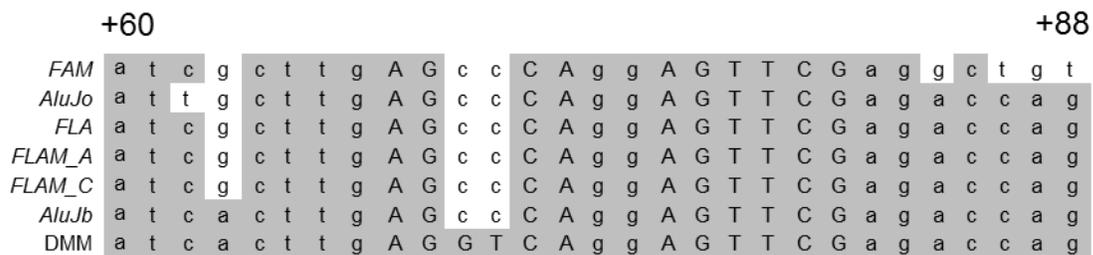
En el análisis filogenético, el largo de las ramas representa la distancia evolutiva. Las subfamilias Sz, Sz6, Sq, Sq2, Sx, Sx1, Jb, Sp, Jr, Jr4 y Sq10, correspondientes a ~750 mil elementos *Alu*, tienen una identidad mayor a 93.1% con el DMM (Figuras 3, 4). La subfamilia Sz tiene un 100 por ciento de identidad con el DMM. Las subfamilias que contienen el DR2 del DMM (secuencia AGGTCAggAGTTTCG) son

Sz, Sx, Sx1, Sx3, Sx4, Sq, Sq2, Sq4, Sg y Sg4, que representan ~500 mil elementos *Alu* (Figura 4 B).



**Figura 4- Alineamiento del DMM con las subfamilias de *Alu* más cercanas.** Subfamilias con mayor similitud al DMM (A) y con el DR2 intacto (B). La posición es relativa en con respecto al 5' de la subfamilia *AluS*. Con fondo gris se muestra la secuencia con identidad al DMM, en mayúsculas los dos motivos DR2 y en la caja la B box.

Los dos motivos DR2 en las diferentes subfamilias de *Alu* están relativamente conservados, excepto en las subfamilias *Jb*, *Jo*, *FAM*, *FLA*, *FLAM\_A*, *FLAM\_C* ya que contiene dos bases del DR2 diferentes (Figura 5).



**Figura 5- Alineamiento del DMM con las subfamilias de *Alu* menos conservadas en el DR2.** La posición es relativa en con respecto al 5' de la subfamilia *AluS*. Con fondo gris se muestra la secuencia con identidad y en mayúsculas los dos motivos DR2.

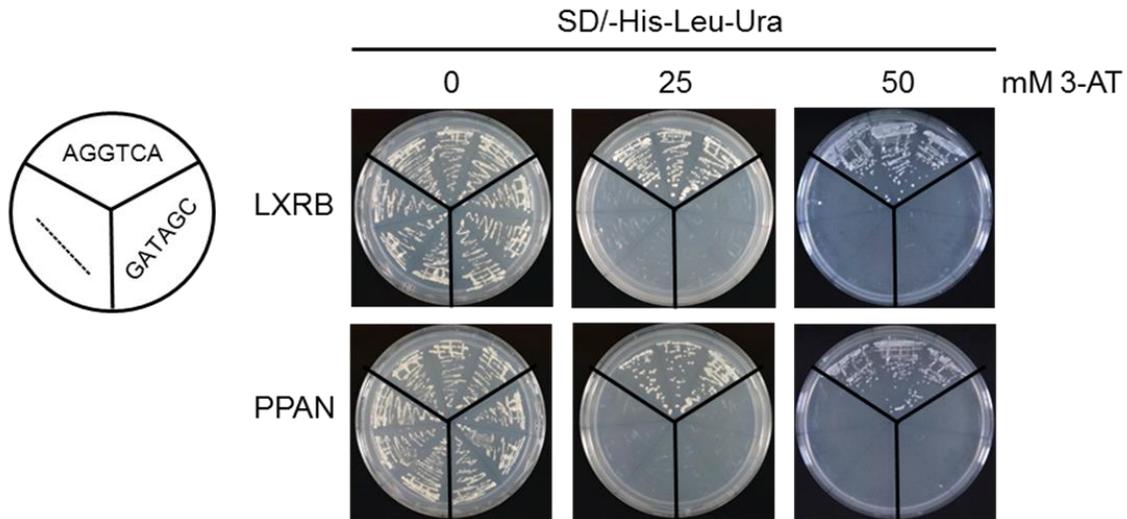
## 8.2 LXR $\beta$ y PPAN se unen específicamente al DMM

La presencia del DR2 sugiere que el DMM podría representar un sitio de unión de proteínas nucleares reguladoras de la mDNA y de la transcripción. Por lo tanto, buscamos proteínas candidatas de unión al DMM por el ensayo de un híbrido en levadura. El ensayo de un híbrido utiliza una serie de genes reporteros para lograr una alta especificidad. La secuencia cebo - en este caso dos copias del DMM - se clonaron arriba del marcador de auxotrofia *HIS3*. El vector se linealiza en la región que codifica para *URA3* y se inserta en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* permitiendo que crezca en ausencia de uracilo (cepa YM4271 auxotrofia para histidina, uracilo y leucina). Después se transforma con el vector que contiene la librería de aorta humana - la presa - donde cada gen está fusionado a un factor de transcripción (*GLA4*) además codifica para *LEU2*. La unión de alguna presa en la secuencia cebo activa la expresión de *HIS3* permitiendo que la colonia crezca en ausencia de histidina en el medio.

Se eligieron 300 colonias que se crecieron en medio carente de uracilo, histidina y leucina adicionado con 75 mM de 3-AT. El 3-AT inhibe el producto de *HIS3* y por lo tanto elimina posibles falsos positivos. La búsqueda dio como resultado 45 colonias independientes que fueron secuenciadas. Diez de las 45 clonas estaban en fase. Entre las clonas en fase, fueron identificadas cinco clonas que codifican para el receptor X de hígado beta (LXR $\beta$ , liver X receptor beta) y una de Peter Pan (PPAN). Por su parte, LXR juega un papel de pivote en la patogénesis de la aterosclerosis, regulando genes involucrados en la homeostasis de lípidos y la inflamación (Bensinger & Tontonoz, 2008; Chinetti-Gbaguidi & Staels, 2009; Oosterveer, Grefhorst, Groen & Kuipers, 2010). PPAN es una proteína poco caracterizada que está involucrada en la biogénesis ribosomal (Ansari & Schwer, 1995; Communi, Suarez-Huerta, Dussossoy, Savi, & Boeynaems, 2001).

Los elementos de respuesta a LXR contienen dos elementos repetidos AGGTCA (Chawla, Repa, Evans & Mangelsdorf, 2001; Mak, Kast-Woelbern, Anisfeld, & Edwards, 2002; Uppal *et al.*, 2007). Este elemento corresponde al motivo DR2 que encontramos en DMM. Para verificar la específica unión de LXR $\beta$  y de PPAN al DMM, fue generada una cepa de *S. cerevisiae* con dos DMMs mutantes

en los cuales el elemento 5' del DR2 en el DMM (AGGTCA) fue eliminado o aleatorizado respectivamente. Como se puede ver en la figura 6, en ninguno de los dos casos hubo crecimiento en la ausencia de histidina, es decir que no hubo interacción con LXR<sub>B</sub> o PPAN. Por lo tanto, concluimos que un DR2 intacto es necesario para la unión de LXR<sub>B</sub> y PPAN al DMM.

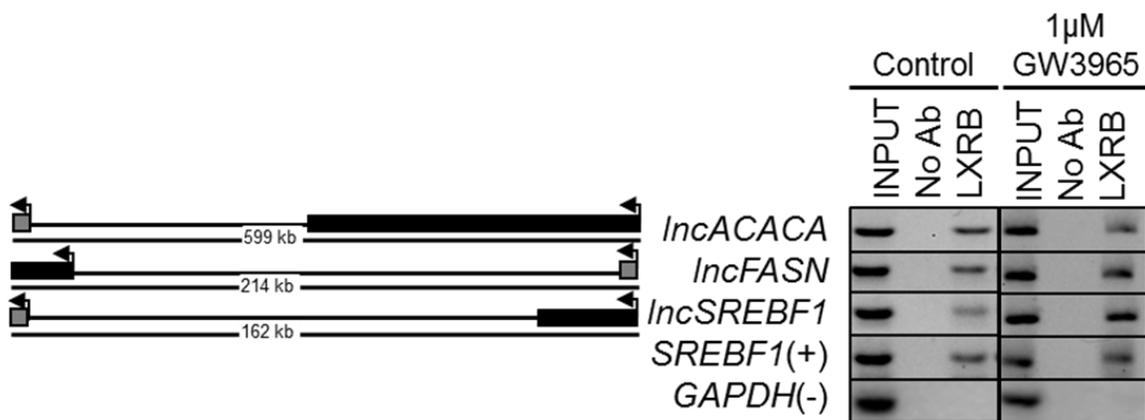


**Figura 6- Interacción del LXR<sub>B</sub> y PPAN con el DMM.** Se muestra en la izquierda una representación esquemática del estriado y en la derecha la interacción entre el DMM completo con LXR<sub>B</sub> y PPAN, con DMM mutantes en los cuales se aleatorizó o se eliminó el elemento 5' del DR2 AGGTCA. LXR<sub>B</sub> y PPAN son clonas obtenidas del ensayo de un híbrido en levadura, las clonas transformadas fueron seleccionadas en medio SC carente de His, Leu y Ura (condiciones de selección estricta).

En la siguiente parte del trabajo, nos enfocamos en la interacción DMM-LXR. Primero, validamos los resultados del ensayo de un híbrido utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Nos enfocamos en tres DMM intergénicos que son parte de lncRNAs y adyacentes a tres blancos de LXR, acetil CoA carboxilasa (*ACACA*), factor de transcripción de elementos regulatorios de esteroles 1 (*SREBF1*, Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1) y ácido graso sintetasa (*FASN*, Fatty Acid Synthase). Los genes *SREBF1*, *ACACA* y *FASN* son relevantes, ya que LXR estimula la lipogénesis induciendo la expresión de ellos (Peet *et al.*, 1998; Repa *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2000). Para mayor claridad en la presentación de los resultados, nombramos los lncRNAs con la nomenclatura de los genes adyacentes es decir *IncACACA*, *IncSREBF1* y *IncFASN*.

El *IncACACA* fue identificado por nosotros por medio de la técnica RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). En el caso de *IncSREBF1* conocido como el candidato 2 del síndrome Smith-Magenis 2 (*SMCR2*, síndrome de anomalía congénita con retraso mental múltiple asociado con anomalías del comportamiento y trastornos del sueño) (Bi *et al.*, 2002) y *IncFASN* con el código de referencia RP13-516M14.4, ambos lncRNAs fueron identificados bioinformáticamente. Para el ChIP se utilizó monocitos de la línea celular THP-1, las células fueron estimuladas con el agonista sintético de LXR GW3965 por un día y como control se usó las células en presencia del vehículo DMSO, se empleó el anticuerpo para LXRβ, se precipito la proteína unida a diferentes fragmentos de DNA y se procedió con la amplificación de los lncRNAs.

Podemos observar que LXRβ se une a *SREBF1* (control positivo), así como a *IncSREBF1*, *IncACACA* y *IncFASN* en monocitos de THP-1, línea celular humana, tanto en presencia como en ausencia del agonista GW3965 (Figura 7). Como validación independiente, se analizó datos de ChIP-seq de sitios de unión al LXR en el genoma de macrófagos THP-1 realizado por otro grupo de investigación (Pehkonen *et al.*, 2012). Analizando los datos encontramos 612, 2,708 y 1,555 lecturas para *IncACACA*, *IncFASN* y *IncSREBF1*, respectivamente de un total de 18,304,931 lecturas. Por lo tanto, el dato ratificó nuestros resultados.

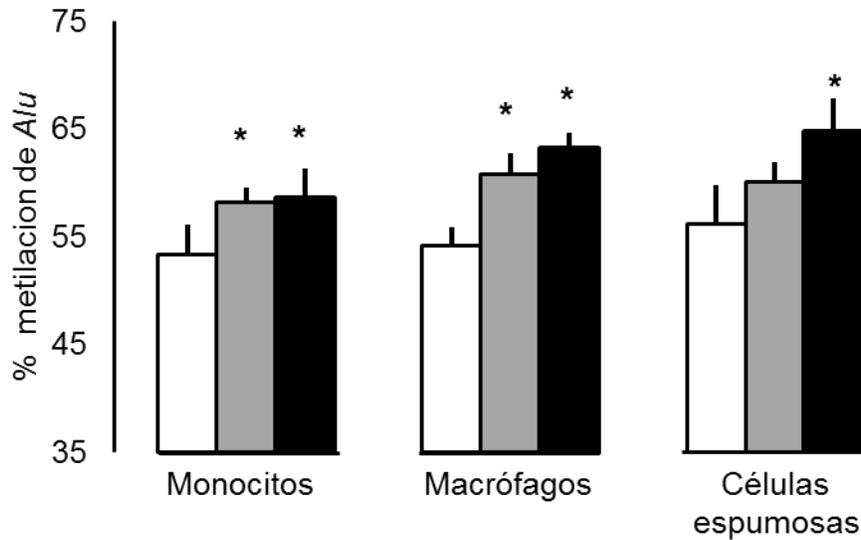


**Figura 7- Unión de LXRβ al DMM de los lncRNAs.** Parte izquierda: diagrama de los lncRNAs (gris) y su gen adyacente. Parte derecha: PCR del material precipitado por inmunoprecipitación de la cromatina con el anticuerpo contra LXRβ.

### 8.3 La activación de LXR hipermetila al DMM en *Alu*

Para estudiar los efectos del LXR sobre la mDNA de *Alu*, utilizamos un ensayo COBRA que permite sondear aquellos elementos que contienen un motivo DR2 más conservado. El ensayo censa 2 CpGs, una de las cuales se encuentra dentro del DMM. Nos preguntamos si los agonistas sintéticos de LXR, GW3965 y T0901317 pueden provocar cambios de mDNA de *Alu* en monocitos, macrófagos y células espumosas de THP-1. La línea monocítica THP-1 es un modelo celular de aterosclerosis por su capacidad de diferenciarse de monocitos a macrófagos. A su vez los macrófagos THP-1 cultivados en presencia de lípidos forman una aproximación de las células espumosas en la placa aterosclerótica (Qin, 2012). Cada tipo celular nos da un panorama de la lesión al nivel inicial, medio y avanzado en del proceso aterosclerótico, los monocitos se encuentran en la sangre periférica y llegan al endotelio en respuesta de una lesión provocado por el LDL, después penetran al tejido vascular diferenciándose a macrófagos, los macrófagos fagocitan LDL formándose las células espumosas en la placa aterosclerótica (Qin, 2012).

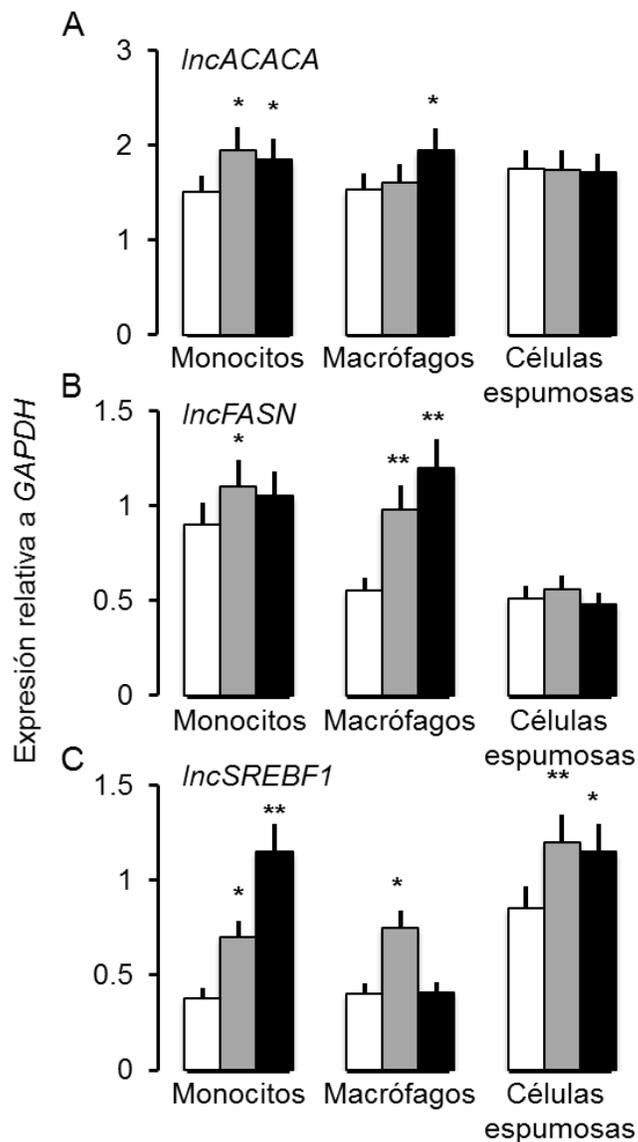
Se encontró una significativa hipermetilación en monocitos y macrófagos tratados con GW3965 y T0901317 comparado con el control ( $p=0.033$  y  $p=0.049$  y  $p=0.037$  y  $p=0.031$ , respectivamente) (Figura 8). En el caso de las células espumosas se observó solo una hipermetilación significativa en células con estimuladas con GW3965 ( $p=0.048$ ) (Figura 8). Lo que nos indica que el modelo del proceso aterosclerótico estimulado con los agonistas de LXR provocan un aumento en la mDNA, que es una respuesta potencialmente benéfica ya que podría indicar una disminución en la transcripción de los elementos *Alu* y por ende una disminución en la retrotranscripción y en la inserción *de novo* de estos elementos.



**Figura 8- Los agonistas de LXR aumentan la metilación de *Alu*.** La gráfica representa un análisis por COBRA del nivel de mRNA de *Alu* en células estimuladas con el vehículo (barras blancas), 1 μM T0901317 (gris) y 1 μM GW3965 (negras). \*,  $p < 0.05$ , test ANOVA y post hoc Bonferroni.

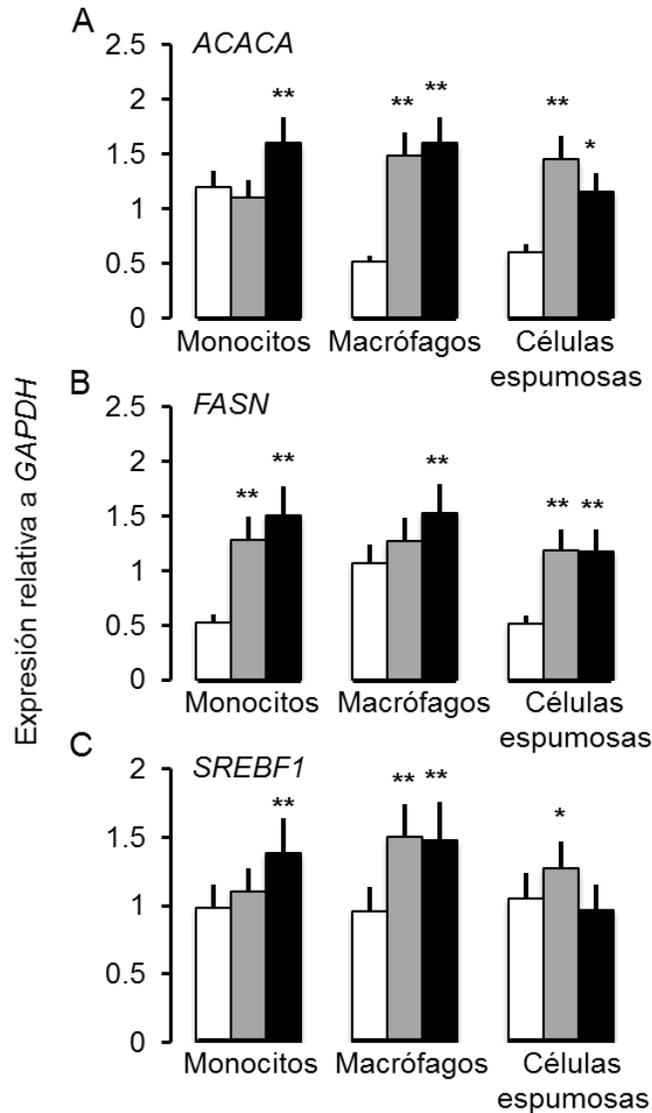
#### 8.4 Expresión y mRNA diferencial de los lncRNAs en respuesta a la activación del LXR

Para conocer el efecto de LXR sobre lncRNAs que contienen al DMM, analizamos la expresión de *lncACACA*, *lncFASN* y *lncSREBF1* y sus genes adyacentes (*ACACA*, *FASN* y *SREBF1*) en monocitos, macrófagos y células espumosas estimuladas con los agonistas T0901317 y GW3965 (Figura 9 y 10, respectivamente). Respecto a la expresión de los tres lncRNAs se observó un evidente aumento en la expresión en monocitos y macrófagos con uno o los dos agonistas (Figura 9). Solo el *lncSREBF1* incrementa su expresión en células espumosas con los dos agonistas (Figura 9 C). Se conoce que ambos agonistas aumentan la actividad de LXR, los agonistas en el modelo aterosclerótico murino muestra una considerable disminución en la placa aterosclerótica, pero cada agonista tiene un efecto en los diferentes en los elementos de respuesta de LXR, los agonistas no se han usado en el tratamiento aterogénico por que generan un aumento en los niveles de triglicéridos en hígado y en plasma (Collins *et al.*, 2002; Repa *et al.*, 2000; J. R. Schultz *et al.*, 2000).



**Figura 9- Cambios de expresión de lncRNAs inducidos por agonistas de LXR.** RT-PCR de *lncACACA* (A), *lncFASN* (B) y *lncSREBF1* (C) en monocitos, macrófagos y células espumosas THP-1. Condiciones: 0.05% DMSO (barras blancas), 1  $\mu$ M T0901317 (gris) o 1  $\mu$ M GW3965 (negras). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , test ANOVA y post hoc Bonferroni.

Como ya se había reportado *ACACA*, *FASN* y *SREBF1* son blancos de LXR. Como esperado, se encontró un evidente aumento en su expresión en monocitos, macrófagos y células espumosas estimuladas con los agonistas de LXR (Figura 10).

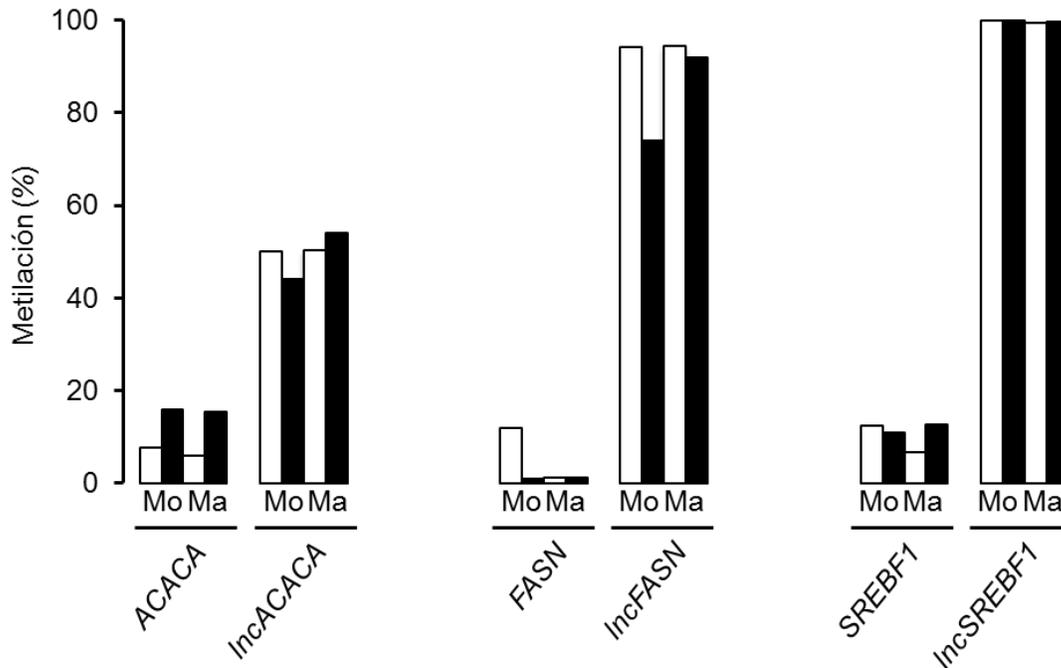


**Figura 10- Cambios de expresión de blancos de LXR inducidos por agonistas de LXR.** RT-PCR de *ACACA* (A), *FASN* (B) y *SREBF1* (C) en monocitos, macrófagos y células espumosas THP-1. Condiciones: 0.05% DMSO (barras blancas), 1 μM T0901317 (gris) o 1 μM GW3965 (negras). \* p<0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, test ANOVA y post hoc Bonferroni.

Basado en lo anterior y en los datos de ChIP, concluimos que el LXRβ estimula la transcripción de los tres lncRNAs uniéndose al DMM de esos loci.

Se analizó también el nivel de la mDNA por secuenciación con bisulfito para el DMM de los tres lncRNAs y la región promotora de los genes adyacentes en células THP-1 (monocitos y macrófagos). Encontramos que los tres genes blancos muestran bajos niveles de mDNA en comparación con los lncRNAs. Los resultados

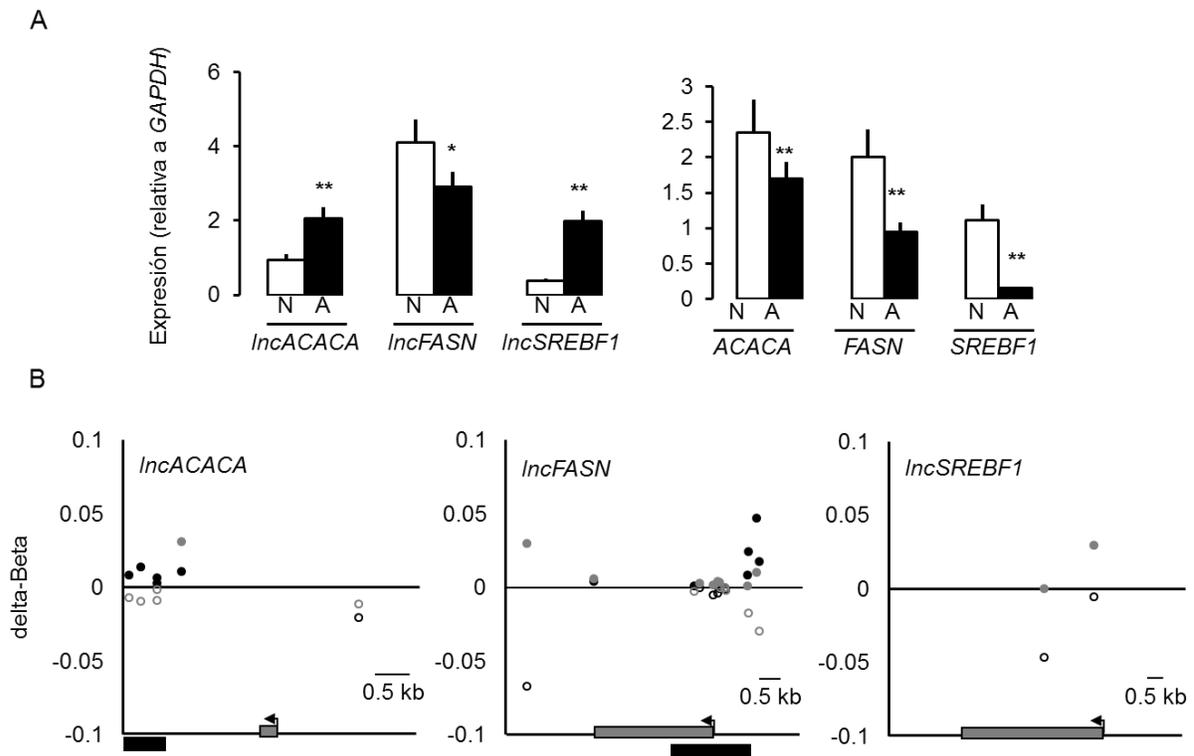
nos indican que el estímulo con los agonistas no tiene algún cambio claro en la metilación. Además de que no se encontró una correlación entre la mDNA y la expresión, este resultado no era el esperado (Figura 11).



**Figura 11- Perfil de metilación de ICG que flanquean lncRNAs con DMM y al promotor de genes o los lncRNAs.** Mo y Ma indican monocitos y macrófagos THP-1, respectivamente. Las barras blancas y negras indican células THP-1 control y estimuladas con GW3965, respectivamente.

### 8.5. Expresión y mDNA diferencial de los lncRNAs en arterias humanas

Se procedió a analizar los niveles de expresión y mDNA de los tres lncRNAs y sus genes adyacentes en arterias de sujetos sanos y arterias con placa estable (Zaina *et al.*, 2014). Se midió la expresión por RT-PCR y se determinó la mDNA de los lncRNAs. El patrón de expresión de los genes *ACACA* y *SREBF1* fueron inversos respecto a sus lncRNAs (Figura 12 A). Es decir, hubo mayor expresión de los lncRNAs y menor expresión de sus genes adyacentes en aterosclerosis, lo que nos indica que estos lncRNAs podrían regular negativamente la expresión de sus genes adyacentes. Por otro lado, el patrón de expresión para *FASN* y el *IncFASN* en los dos casos fue menor en aortas ateroscleróticas (Figura 12 A).



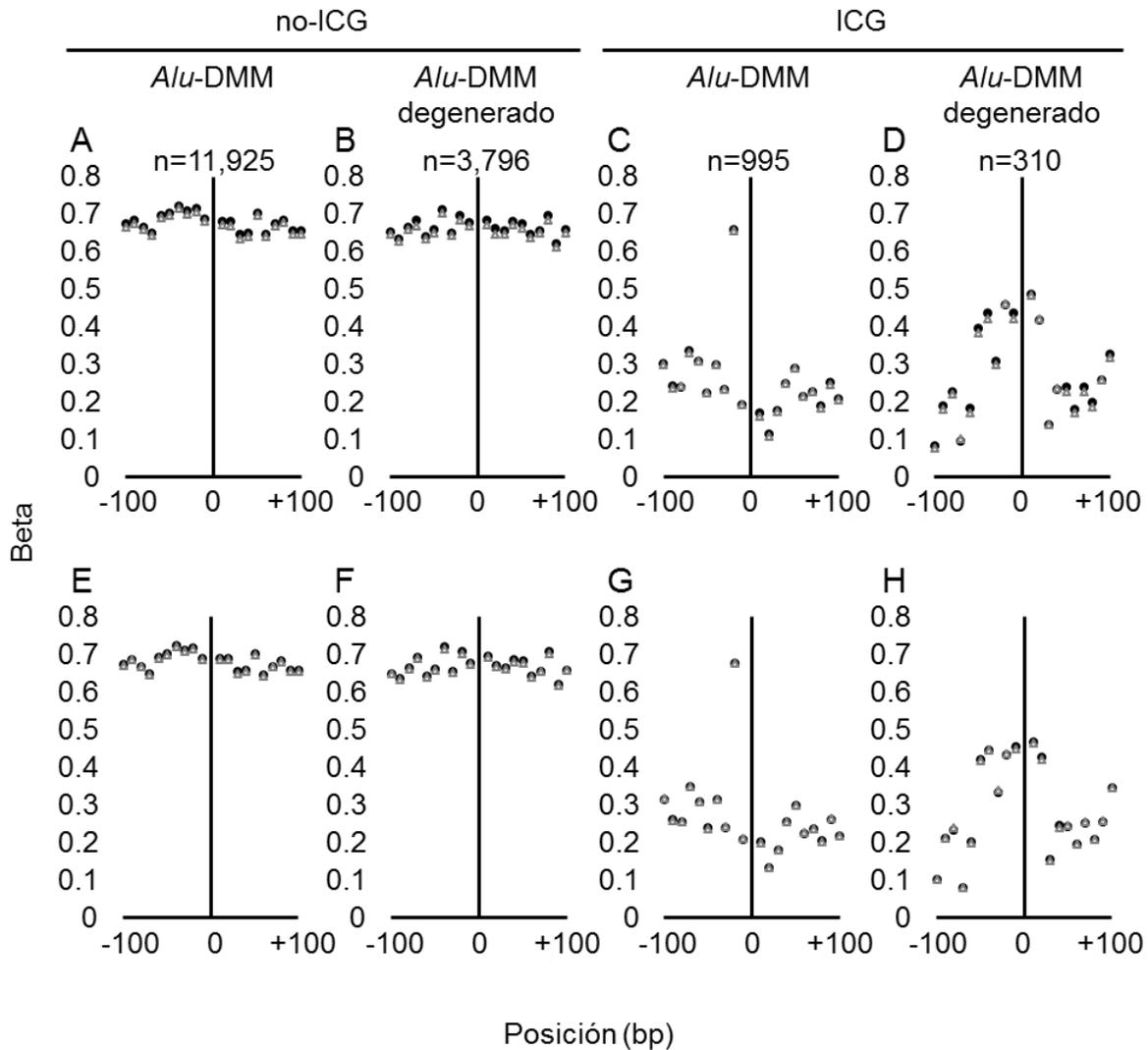
**Figura 12- Nivel de expresión y mDNA de lncRNAs y respectivo gen adyacente en aorta.** (A) Expresión en aortas sanas (barras blancas) y en aortas ateroscleróticas (barras negras) normalizada con *GAPDH*. (B) mDNA. Cada punto representa el delta-Beta de una CG del arreglo de mDNA 450K que flanquean a los lncRNAs ( $\pm 2$  kb). En negro y gris, aorta aterosclerótica/normal y carótidas sintomática/asintomática, respectivamente. Los puntos rellenos y vacíos representan la fracción hipermetilada y hipometilada, respectivamente. Las cajas negras representan ICGs. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , test ANOVA y post hoc Bonferroni.

Respecto a la mDNA en los lncRNAs se censo  $\pm 2$  kb, para *lncACACA* y *lncFASN* se identificó una ICG en este intervalo. Las cuales tienden a la hipermetilación en lesiones estables e hipometilación en lesión sintomática. Patrón generalmente observado en las lesiones ateroscleróticas mencionadas (Figurar 12 B). Para el caso de *lncSREBF1* no hay la suficiente información para ver algún patrón. La mDNA de *lncFASN* tiene correlación con la expresión en lesión estable, porque la hipermetilación en la ICG en su promotor provoca una disminución su expresión. Un efecto interesante es el patrón de expresión de los lncRNA en THP-1 en monocitos y células espumosas (macrófagos cargados con lípidos) comparados con arterias normal y aterosclerótica, respectivamente, los perfiles de expresión tienen un patrón

similar en los dos casos, lo que nos indica que el transcriptoma de los macrófagos en aortas contribuye al perfil de expresión de los lncRNAs (Figuras 9 A-C y 12 A).

## **8.6 Perfiles de mDNA que flanquea a *Alu* en lesiones ateroscleróticas con diferente severidad**

El DMM fue identificado a partir de secuencias de 4 kb cada una centrada en una ICGs que sufrió hipometilación en arterias ateroscleróticas (Castillo-Díaz *et al.*, 2010). Por analogía a ese estudio nos propusimos ver el patrón de metilación de  $\pm$  2 kb que flanquean *Alu* en muestras de tejido humano aterosclerótico y normal analizadas por el Infinium Human Methylation 450 Bead Chip ( $> 450,000$  CpGs) abreviado como microarreglo 450K. Usamos dos conjuntos de muestras, uno consiste en 15 pares de aortas ateroscleróticas con lesiones estables y sus contrapartes normales obtenidas del mismo donador *post mortem*, el otro consiste en lesiones de carotídeas sintomática y asintomática (inestable) (n=19 en cada grupo). Identificamos 314,873 CpGs del 450K que flanquea *Alu*, entonces para el primer microarreglo con lesiones estables y el segundo con sintomáticas, se analizaron los niveles de mDNA que flanquean a los *Alu*-DMM y los *Alu*-DMM degenerado, donde los degenerados son *FAM*, *FLA*, *FLAM\_A*, *FLAM\_C*, *Jb* y *Jo* ya que difieren en dos bases con el motivo DR2. Obtuvimos el promedio de Beta de cada 10 pb hasta llegar a los 100 pb y encontramos que en general los niveles de mDNA de los *Alu*-DMM y los *Alu*-DMM degenerado son mayores en no-ICG que en ICG, como es esperado (Figura 13) (Takai & Jones, 2002; Zaina *et al.*, 2014a). Además, se observó que *Alu*-DMM son significativamente menos metilados relativo a *Alu*-DMM degeneradas en ICG  $\pm 100$  pb, tanto con lesión estable y sintomática ( $p=1.4 \times 10^{-6}$  y  $p= 3.4 \times 10^{-5}$ ; Figura 13 C-D y G-H). Sin embargo, en el rango de  $\pm$  2 kb no se observó ninguna diferencia (Figura Suplementaria 1). Por lo tanto, comparando *Alu*-DMM y *Alu*-DMM degenerado los datos indican que el DMM se asocia con una relativa hipometilación local de ICGs relativamente cercanas.



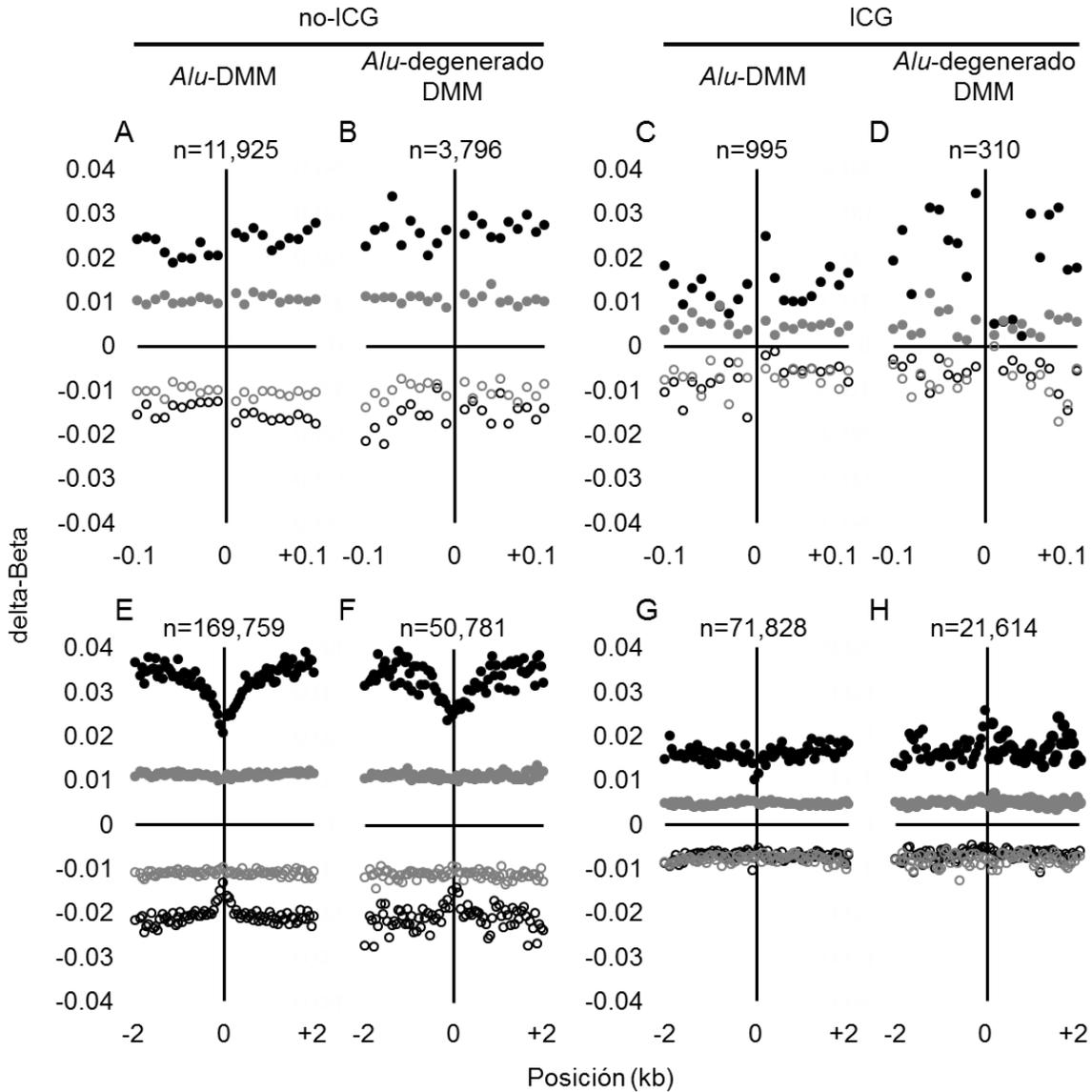
**Figura 13- Perfiles de mDNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando *Alu* a  $\pm 100$  pb en no-ICG y ICG en aterosclerosis humana.** Análisis de las CpGs que flanquean a *Alu* a  $\pm 100$  pb, con DMM (conservado) o DMM-degenerado en ateromas estables (A-D) o en ateromas sintomáticas (E-H). Cada punto indica el promedio de la mDNA del Beta de consecutivos 10 pb. El número de CpGs censadas está indicado en cada respectiva gráfica. Negro y gris, arteria aterosclerótica y normal (A-D) o ateroma sintomático y asintomático (E-H), respectivamente.

Para entender los cambios de metilación en regiones que flanquean a *Alu*, obtuvimos el promedio de delta-Beta (es decir el valor de mDNA de la aorta con lesión estable menos la contraparte normal o de la carótida con lesión sintomática menos la contraparte asintomática) de cada 10 pb hasta llegar a los 100 pb. Encontramos una significativa hipometilación de ICGs flanqueando *Alu*-DMM en comparación con la contraparte que flanquea *Alu*-DMM degenerado (Figura 14 C-

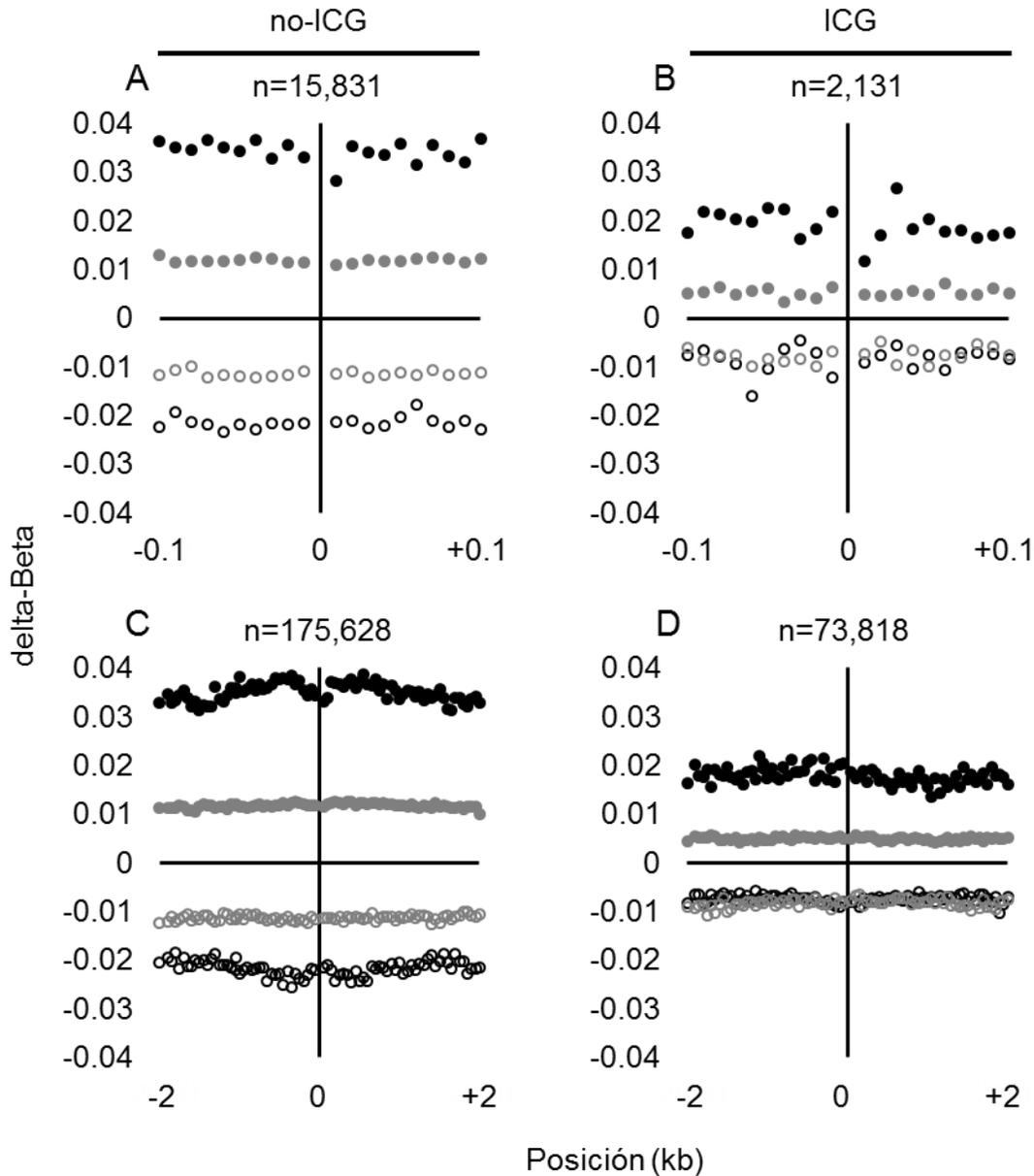
D). Además, las secuencias que flanquean a *Alu*-DMM degenerado muestran una mayor variabilidad de mDNA que en *Alu*-DMM, tanto en no-ICG y ICG (Figura 14). También se realizó un análisis del promedio por cada 50 pb del delta-Beta, río arriba y río abajo de *Alu* hasta alcanzar los 2 kb. En general hay más hipermetilación e hipometilación en aortas con lesión estable que en lesión sintomática (Figura 14). De manera interesante, observamos un pequeño pero claro aumento del delta-Beta conforme está más alejado de *Alu* en no-ICG (curvas con forma de V en la Figura 14 E-F).

Como control adicional, nos preguntamos si el SINE *MIR* (Mammalian wide Interspersed Repeats) que no tiene DMM ni DR2 (Smit & Riggs, 1995), muestra alguna relación con la mDNA en lesiones ateroscleróticas.

El cambio de mDNA en el rango  $\pm 100$  pb alrededor de *MIR* es significativamente más alta que alrededor de *Alu*-DMM intacto en ICGs ( $p=10^{-5}$  Figura 14 C comparado con la Figura 15 B). Interesantemente en este elemento no se observa la pérdida del delta-beta detectada en regiones cercanas a *Alu* (Figura 15 C versus Figura 14 E-F). Así que los efectos que encontramos en *Alu* son muy específicos y diferentes para las secuencias que flanquean a elementos *Alu* con el DMM y con el DMM degenerado.



**Figura 14- Perfiles de cambios de mDNA (microarreglo 450K) en regiones flanqueando *Alu* en no-ICG y ICG.** Análisis de las CpGs que flanquean a *Alu* a  $\pm 100$  pb o  $\pm 2$  Kb. Cada punto indica el promedio de la mDNA del delta-Beta de consecutivos 10 pb (para  $\pm 100$ pb) o 50 pb (para  $\pm 2$  kb). El número de CpGs censadas está indicado en cada respectiva gráfica. En negro y gris, representan estable arteria aterosclerótica y normal, respectivamente. Los puntos rellenos y vacíos representan la fracción hipermetilada y hipometilada, respectivamente.



**Figura 15- Perfiles de cambios de mDNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando *MIR* en no-ICG y ICG.** Se analizó las CpGs que flanquean a *MIR* a  $\pm 100$  pb o  $\pm 2$  Kb. Cada punto indica el promedio de la mDNA del delta-Beta de consecutivos 10 pb (para  $\pm 100$ pb) o 50 pb (para  $\pm 2$  kb). El número de CpGs censadas está indicado en cada respectiva gráfica. Negro y gris, aorta aterosclerótica y normal, respectivamente. Los puntos rellenos y vacíos representan la fracción hipermetilada y hipometilada, respectivamente.

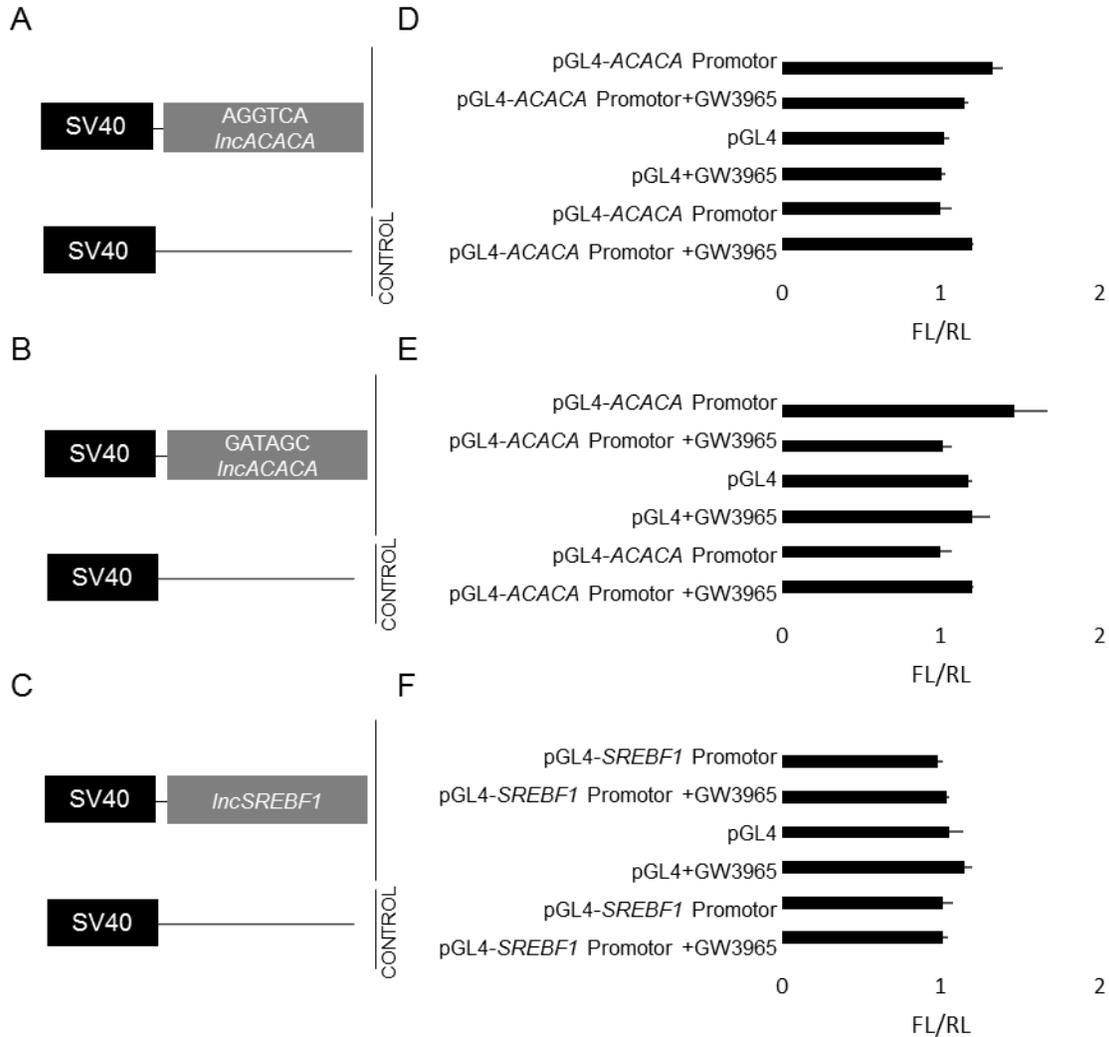
### 8.7 Análisis de regulación dirigida por los lncRNAs *in cis*

Los análisis de expresión nos sugerían que los lncRNAs podrían activar la expresión de sus genes adyacentes. El ensayo con el gen reportero *luciferasa* nos podría ayudar a elucidar este patrón. Así que generamos líneas sobreexpresantes

transitorias para *IncACACA* con el DMM intacto (AGGTCA) y con el DMM aleatorio (GATAGC), así como para *IncSREBF1* (sin el DMM), bajo el promotor SV40 (vector pTracer) (Figura 16 A-C). También se trabajó con el vector pGL4 que cuenta con el gen reportero de *luciferasa 2* de luciérnaga (FL, Firefly *luc2*), en algunos casos se insertó el promotor del gen adyacente para cada lncRNA.

Primero se transfectó la línea celular HEK-293 con las construcciones sobreexpresantes, a las 24 horas se cotransfectó con el vector pGL4 y pRL-TK (contiene la *luciferasa* de Renilla) como control interno en la luminiscencia, a las 24 horas se midió la intensidad de *luciferasa*.

En general los cambios encontrados fueron demasiado débiles para concluir que exista un efecto. Aumenta la actividad de *luciferasa* con la sobreexpresión del *IncACACA* con o sin el DMM intacto, indicándonos que el *IncACACA* activa al promotor de *ACACA*. Este mismo sistema cuando es estimulado con el agonista de LXR que aumenta la expresión de *ACACA* (endógeno) y del *IncACACA* (endógeno) disminuye *luciferasa* y por tanto la actividad de *ACACA* del sistema (Figura 16 A-B y D-E). En el caso de *IncSREBF1* con el promotor *SREBF1* no se encontró ningún efecto.

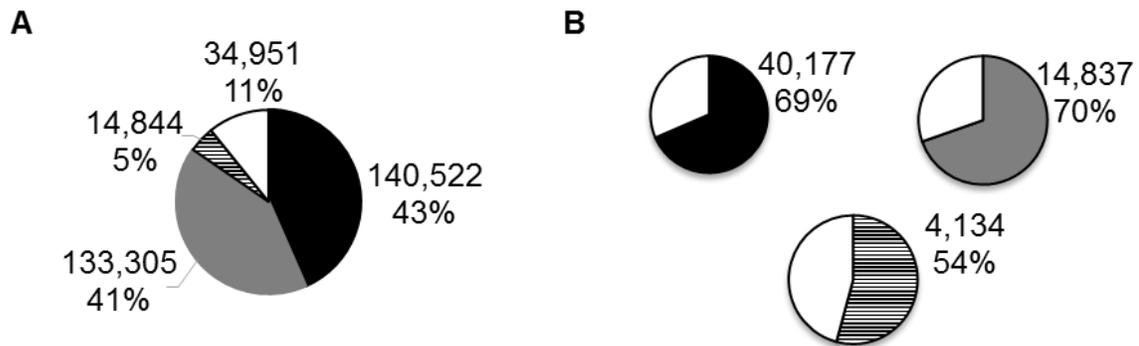


**Figura 16– Ensayo de activación *in cis*.** (A) Esquema de *IncACACA* con el DMM intacto clonado en pTracer bajo el promotor SV40. (B) Esquema de *IncACACA* con el DMM aleatorio clonado en pTracer bajo el promotor SV40. (C) Esquema de *IncSREBF1* sin el DMM clonado en pTracer bajo el promotor SV40. (E-D) Ensayos del gen reportero *luciferasa*, el vector de *luciferasa* de luciérnaga (pGL4) se cotransfectaron con el vector de *luciferasa* de Renilla (pRL-TK) como transfección control. Mostrando la actividad de *luciferasa* relativa de luciérnaga (FL) con respecto a la actividad de Renilla (RL)

### 8.8 *Alu* en lncRNAs

La presencia de *Alu* en los lncRNAs analizados en este trabajo, nos hizo preguntarnos cuál sea la frecuencia de esa coincidencia a nivel del genoma. Para ese fin, analizamos MiTranscriptome, una base de datos de 7,256 librerías de RNA-seq. Utilizamos esta base de datos como un acercamiento más realista de los lncRNAs

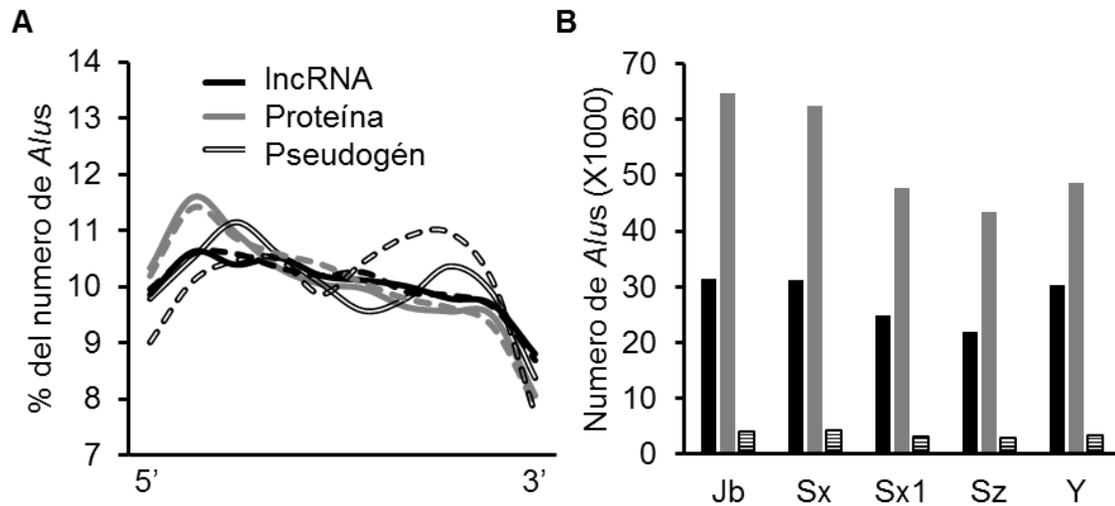
que se encuentran en el genoma, ya que en GENCODE solamente se hace referencia a ~ 15,000 lncRNAs y ~ 20,000 genes que codifican a proteínas. Los datos de MiTranscriptome muestran que existen 58,648 loci para los lncRNAs, 21,313 genes que codifican a proteínas y 7,625 loci de pseudogenes (Iyer *et al.*, 2015). El número de transcritos totales incluyendo las diferentes isoformas son 384,066 en MiTranscriptome, 323,622 (84.26%) de los cuales tiene al menos un *Alu*. De esos el 43% son los lncRNAs (140,522 transcritos), el 41% son proteínas codificantes (133,305 transcritos), el 5% pseudogenes (14,844 transcritos) y el 11% son genes que codifican para varios transcritos (34,951 transcritos) (Figura 17 A). El 69% de los lncRNAs, el 70% de las proteínas y el 54 % de los pseudogenes de la base de datos contienen al menos un *Alu* (Figura 17 B).



**Figura 17- Distribución de *Alu* en el genoma.** (A) transcritos en MiTranscriptome con *Alu* en el genoma. En negro los lncRNAs, en gris los transcritos que codifican para proteínas, el relleno con líneas representa pseudogenes, en blanco son otros donde las secuencias pueden resultar de dos o más transcritos diferentes. (B) Porcentaje de genes que contiene *Alu* in MiTranscriptome, en negro los lncRNAs, en gris las proteínas y el relleno con líneas representa los pseudogenes.

Tomando en cuenta todos los transcritos de las isoformas alternativas, se identificó la posición de *Alu* en los genes de proteínas, lncRNAs y pseudogenes. *Alu* es más abundante en el 5', confirmando el papel potencial de *Alu* como elemento de activación de esos transcritos, ya que podrían usar el promotor interno de *Alu* (box A y B). También se detecta un pico fuerte en el 3', lo que sugiere una función como sitio de reconocimiento al final de la transcripción (Figura 18). De los genes que codifican a proteínas la mayoría contienen elementos *Alu* (~ 500,000), casi el doble

que los lncRNAs (~ 270,000). Las subfamilias de *Alu* más representadas en genes y en lncRNAs son *Jb*, *Sx*, *Sx1*, *Sz* e *Y*.



**Figura 18- Posición de *Alu* en transcritos.** (A) Distribución de la posición de *Alus* en lncRNAs, proteínas y pseudogenes en el eje de las abscisas representa la relativa posición de *Alu*, la línea punteada son los *Alus* inversos, la continua los que se encuentran en sentido. (B) Distribución de las subfamilias más representadas de *Alu* en lncRNAs, proteínas y pseudogenes.

## 9. Discusión

El motivo DMM identificado en secuencias adyacentes a ICG hipometiladas en lesiones ateroscleróticas, esta embebido en los elementos *Alu* (P Deininger, 2011; Rhead *et al.*, 2010). Específicamente, el DMM está localizado en el repetido directo (DR2) y en el B box de *Alu*. El primero es un sitio de unión de factores de transcripción y el segundo es parte del promotor regulado por la RNA polimerasa III (Bolotin *et al.*, 2011b; Laperriere *et al.*, 2007). Encontramos que el LXRB se une al DMM y que dicha unión necesita un DR2 intacto. LXR es un receptor nuclear (RN) que censa niveles de ácidos grasos y colesterol regulando la homeostasis de lípidos, además es antiaterogénico (Bensinger & Tontonoz, 2008; Chinetti-Gbaguidi & Staels, 2009; Oosterveer *et al.*, 2010). Está documentado que LXR se une al DR4 que contiene las mismas repeticiones directas que DR2 (RGKTA) pero separadas por cuatro nucleótidos (Pehkonen *et al.*, 2012; Reynolds, Kumar & Piedrafita, 2006). Existen otros RNs que se unen al elementos *Alu*, como el receptor de ácido retinoico (Vansant & Reynolds, 1995), el receptor de estrógeno (Romano, Delvoux, Fischer & Groothuis, 2007) y el receptor de la hormona tiroidea (Javier Piedrafita *et al.*, 1996). También el factor nuclear 4 de hepatocitos se une DR2 de *Alu* y además activa la transcripción de una lista de genes blancos (Bolotin *et al.*, 2011a). LXR generalmente forma un dímero con el receptor X de retinoide (RXR) para unirse a sus elementos de respuesta. Sin embargo, a pesar de la ausencia de RXR en levadura, nosotros observamos unión de LXRB al DR2 del DMM en el ensayo de un híbrido (Heery *et al.*, 1993; Willy *et al.*, 1995). A la fecha no sabemos cuál es la relevancia de la unión de LXR independiente de RXR en humanos.

Ya estaba documentado el efecto de hipometilación en ICG cercanas al DMM en arterias ateroscleróticas (Castillo-Díaz *et al.*, 2010). En el caso de arterias con lesión estable, las ICGs con el DMM intacto en regiones muy próximas a *Alu* ( $\pm 100$  pb) tienen un nivel de mDNA significativamente menor que las ICGs adyacentes a los *Alu* con el DMM degenerado (subfamilias *FAM*, *FLA*, *FLAM\_A*, *FLAM\_C*, *Jb* y *Jo*) o adyacentes a *MIR*, un SINE que no contiene DMM. Así que podemos especular que el aumento de la mDNA de los *Alu*-DMM degenerados no solo impide

la retrotransposición, sino que evita la transcripción de genes que contienen a este elemento. La mDNA de ICGs adyacente a lncRNAs que contienen DMM se reduce significativamente en arterias sintomáticas. Por lo tanto demostramos un efecto local del DMM sobre la mDNA de ICGs, como se había hipotetizado (Castillo-Díaz *et al.*, 2010).

Además, encontramos que la activación de LXR induce hipermetilación en los elementos *Alu* de la línea celular modelo de la aterosclerosis, THP-1. Esto sugiere un mecanismo mediado por RN para la hipermetilación de *Alu*. En arterias ateroscleróticas también se había identificado hipermetilación en los elementos *Alu* (Zaina *et al.*, 2014). Este elemento es la única secuencia repetida que está consistentemente hipermetilada en el ateroma estable, lo que concuerda con datos similares en sangre periférica de pacientes con ECV (Kim *et al.*, 2010; Zaina *et al.*, 2014a). Basándonos en nuestros datos, sugerimos que LXR estimula la mDNA de *Alu* como una respuesta de protección en la aterosclerosis. Los datos sugieren un mecanismo compensatorio destinado a limitar aún más la retrotransposición por encima de las limitaciones ya impuestas por la hipermetilación de *Alu* fisiológica.

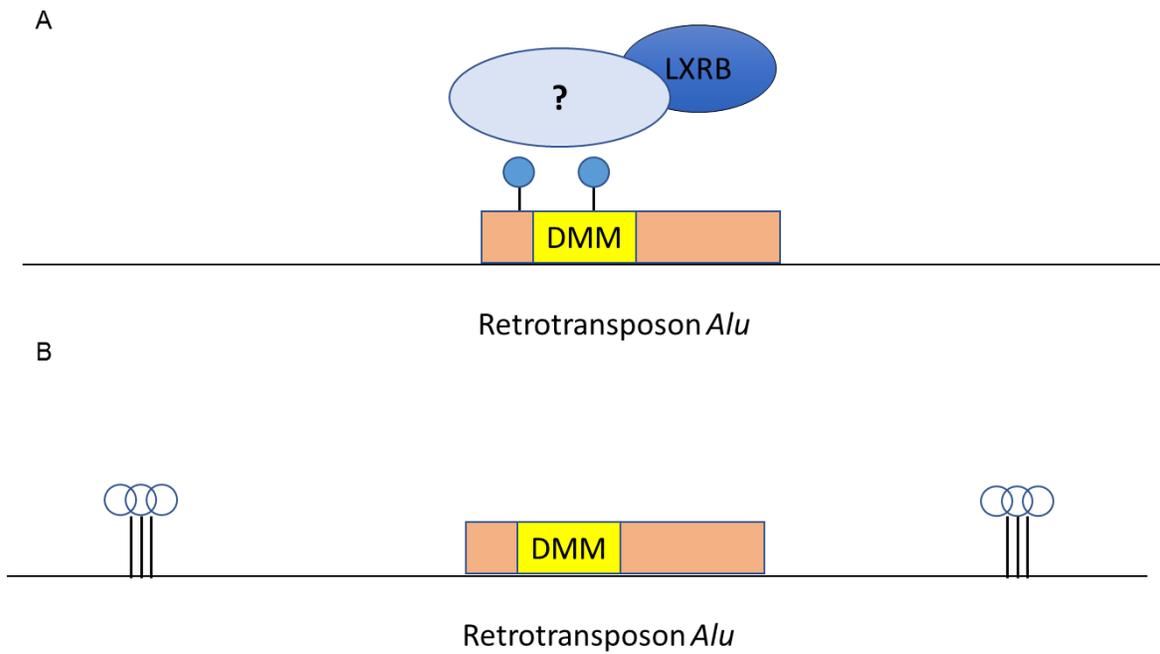
LXR se une y activa la expresión de tres lncRNAs en THP-1 cercanos a genes blanco de LXR, como demuestra el dato que los agonistas de LXR aumentan la expresión de los tres lncRNAs. El patrón de expresión en monocitos y macrófagos THP-1 cargados con lípidos por un lado, y en arterias normales y ateroscleróticas por otro lado, nos indica que los macrófagos en aortas contribuyen al perfil total de expresión en lncRNAs. Desde el punto de vista funcional, los experimentos moleculares y el análisis de expresión no respaldan un papel para los lncRNAs como reguladores transcripcionales *in cis*.

Con respecto al análisis filogenético, el DMM muestra una mayor similitud con subfamilias de *Alu* antiguas y de edad intermedia, divergiendo de la subfamilia más joven Y (Price *et al.*, 2004). Los *Alu*-DMM degenerados pertenecen a precursores de *Alu* como *FAM*, *FLAM*, *FLAM\_A*, *FLAMA\_C* así como de las subfamilias más antiguas, *Jb* y *Jo* (M Batzer *et al.*, 1996; P Deininger, 2011; Quentin, 1992). Respalda el dato de que LXR interactúa con los *Alu* más antiguos, un estudio de otro grupo demostró que LXR induce marcas de histonas

activadoras en loci enriquecido con *AluJ* y *AluS* en células THP-1 (Bouttier *et al.*, 2016). Mostramos anteriormente que una porción del DR2 del DMM es una región conservada en ratón, lo que nos indica la relevancia biológica de LXR-DMM no solo en primates (Castillo-Díaz *et al.*, 2010).

Los datos presentados arriba apoyan a la idea de que *Alu* participa en la regulación de la expresión de lncRNAs y genes codificantes. Para explorar este importante tópico, llevamos a cabo un análisis genómico *in silico* utilizando las bases de datos más recientes (MiTranscriptome). Observamos que *Alu* se encuentra en el 70% de los transcritos de proteínas y el 69% de los transcritos para lncRNAs. Con una mayor densidad en el 5', posiblemente *Alu* sirva como un promotor interno de la transcripción. Otros autores encontraron que fragmentos de *Alu* aparecen en RNAs maduros, incluso dentro del marco de lectura abierto (ORF) (Makałowski, 2000; Nekrutenko & Li, 2001; Yulug, Yulug & Fisher, 1995).

En conclusión, proporcionamos evidencia de una asociación específica entre *Alu*-DMM y la hipometilación de ICGs. Además de asignar al LXR el papel novedoso de ligando de DMM dependiente de un DR2 intacto y un efecto global en la metilación de *Alu* (Figura 19). El análisis *in silico* refuerza la idea de que *Alu* tiene un papel importante en la regulación del transcriptoma.



**Figura 19- Mecanismos de regulación propuestos.** (A) El aumento de la actividad de LXR provoca hipermetilación en los elementos *Alu* en el modelo de THP-1, LXR puede unirse o promover proteínas que estén involucradas en la respuesta de mDNA. (B) En lesión estable aterosclerótica, existe hipometilación en los elementos *Alu* con el DMM intacto, comparado con los elementos *Alu* con el DMM degenerado y con *MIR*, generando una mayor posibilidad de transcripción de los elementos *Alu* con el DMM intacto.

## 10. Conclusiones

- El DMM está localizado en el repetido directo (DR2) y en la B box de *Alu*.
- El DMM muestra una mayor similitud con subfamilias de *Alu* de edad intermedia y antigua, divergiendo de la subfamilia más joven Y.
- El LXRβ y PPAN se unen al DMM y dicha unión requiere al DR2 intacto.
- LXR se une y activa a *lncACACA*, *lncSREBF1* y *lncFASN* en THP-1.
- Los tres lncRNA cuentan con una expresión y mRNA diferencial en arterias con lesión estable.
- El aumento en la actividad de LXR provocan hipermetilación en el elemento *Alu*.
- En lesión estable, la mRNA es significativamente menor en ICGs en regiones muy próximas a *Alu* con el DMM intacto, comparado con el *Alu* con el DMM degenerado o a *MIR*.
- *Alu* se encuentra en el 70% de los transcritos de proteínas y el 69% de los transcritos para lncRNAs, con una mayor densidad en el 5'.

## 11. Bibliografía

- Ansari, A., & Schwer, B. (1995). SLU7 and a novel activity, SSF1, act during the PRP16-dependent step of yeast pre-mRNA splicing. *The EMBO Journal*, *14*(16), 4001–4009. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC394478/>
- Aran, D., Toperoff, G., Rosenberg, M., & Hellman, A. (2011). Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Human Molecular Genetics*, *20*(4), 670–680. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq513>
- Balogopal, P., de Ferranti, S., Cook, S., Daniels, S., Gidding, S., Hayman, L., ... Prevention. (2011). Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, *123*(23), 2749–2769. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31821c7c64>
- Ball, M. P., Li, J. B., Gao, Y., Lee, J., & Leproust, E. (2009). Targeted and genome-scale methylomics reveals gene body signatures in human cell lines. *Nat Biotechnol*, *27*(4), 361–368. <https://doi.org/10.1038/nbt.1533.Targeted>
- Barau, J., Teissandier, A., Zamudio, N., Roy, S., Nalesso, V., Héroult, Y., ... Bourc'his, D. (2016). The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*, *354*(6314), 909–912. <https://doi.org/10.1126/science.aah5143>
- Batzer, M., & Deininger, P. (2002). Alu repeats and human genomic diversity. *Nature Reviews. Genetics*, *3*(5), 370–379. <https://doi.org/10.1038/nrg798>
- Batzer, M., Deininger, P., Hellmann-Blumberg, U., Jurka, J., Labuda, D., Rubin, C., ... Zuckerkandl, E. (1996). Standardized nomenclature for Alu repeats. *Journal of Molecular Evolution*, *42*(1), 3–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576960>
- Beisel, C., & Paro, R. (2011). Silencing chromatin: Comparing modes and mechanisms. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2932>
- Bennett, E. A., Keller, H., Mills, R. E., Schmidt, S., Moran, J. V., Weichenrieder, O., & Devine, S. E. (2008). Active Alu retrotransposons in the human genome. *Genome Research*, *18*(12), 1875–1883. <https://doi.org/10.1101/gr.081737.108>

- Bensinger, S., & Tontonoz, P. (2008). Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*, *454*(7203), 470–477. <https://doi.org/10.1038/nature07202>
- Bertone, P., Stolc, V., Royce, T., Rozowsky, J., Urban, A., Zhu, X., ... Snyder, M. (2004). Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(5705), 2242–2246. <https://doi.org/10.1126/science.1103388>
- Bhutani, N., Brady, J. J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S. Y., & Blau, H. M. (2010). Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, *463*(7284), 1042–7. <https://doi.org/10.1038/nature08752>
- Bi, W., Yan, J., Stankiewicz, P., Park, S. S., Walz, K., Boerkoel, C. F., ... Lupski, J. R. (2002). Genes in a refined Smith-Magenis syndrome critical deletion interval on chromosome 17p11.2 and the syntenic region of the mouse. *Genome Research*, *12*(5), 713–728. <https://doi.org/10.1101/gr.73702>
- Bird, A. (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell*, *70*(1), 5–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1377983>
- Bollati, V., Galimberti, D., Pergoli, L., Dalla Valle, E., Barretta, F., Cortini, F., ... Baccarelli, A. (2011). DNA methylation in repetitive elements and Alzheimer disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(6), 1078–1083. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.01.017>
- Bolotin, E., Chellappa, K., Hwang-Verslues, W., Schnabl, J. M., Yang, C., & Sladek, F. M. (2011a). Nuclear receptor HNF4 $\alpha$  binding sequences are widespread in Alu repeats. *BMC Genomics*, *12*(1), 560. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-560>
- Bolotin, E., Chellappa, K., Hwang-Verslues, W., Schnabl, J. M., Yang, C., & Sladek, F. M. (2011b). Nuclear receptor HNF4 $\alpha$  binding sequences are widespread in Alu repeats. *BMC Genomics*, *12*(1), 560. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-560>
- Bouttier, M., Laperriere, D., Memari, B., Mangiapane, J., Fiore, A., Mitchell, E., ... White, J. H. (2016). Alu repeats as transcriptional regulatory platforms in macrophage responses to M.Tuberculosis infection. *Nucleic Acids Research*, *44*(22). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw782>
- Carey, M. F., Peterson, C. L., & Smale, S. T. (2009). Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). *Cold Spring Harbor Protocols*, *2009*(9), pdb.prot5279-prot5279. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5279>

- Castillo-Díaz, S., Garay-Sevilla, M., Hernández-González, M., Solís-Martínez, M., & Zaina, S. (2010). Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries. *International Journal of Molecular Medicine*, 26(5), 691–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20878091>
- Chawla, A., Repa, J., Evans, R., & Mangelsdorf, D. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5548), 1866–1870. <https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1866>
- Chen, K.-C., Wang, Y.-S., Hu, C.-Y., Chang, W.-C., Liao, Y.-C., Dai, C.-Y., & Juo, S.-H. (2011). OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(5), 1718–1728. <https://doi.org/10.1096/fj.10-174904>
- Chen, T., & Li, E. (2004). Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Current Topics in Developmental Biology*, 60, 55–89. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(04\)60003-2](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(04)60003-2)
- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., ... Gingeras, T. (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5725), 1149–1154. <https://doi.org/10.1126/science.1108625>
- Chiang, P., Gordon, R., Tal, J., Zeng, G., Doctor, B., Pardhasaradhi, K., & McCann, P. (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(4), 471–480. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647346>
- Chinetti-Gbaguidi, G., & Staels, B. (2009). Lipid ligand-activated transcription factors regulating lipid storage and release in human macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(6), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.01.009>
- Clark, S., Harrison, J., Paul, C., & Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research*, 22(15), 2990–2997.
- Collins, J. L., Binz, J. G., Plunket, K. D., Morgan, D. G., Beaudet, E. J., Whitney, K. D., ... Tippin, T. K. (2002). Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(10), 1963–1966. <https://doi.org/10.1021/jm0255116>

- Communi, D., Suarez-Huerta, N., Dussossoy, D., Savi, P., & Boeynaems, J. M. (2001). Cotranscription and Intergenic Splicing of Human P2Y11 and SSF1 Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16561–16566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009609200>
- Congrains, A., Kamide, K., Oguro, R., Yasuda, O., Miyata, K., Yamamoto, E., ... Rakugi, H. (2012). Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis*, 220(2), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.017>
- Consortium, E. P., Birney, E., Stamatoyannopoulos, J., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T., ... Weirauch, M. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447(7146), 799–816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., ... Bellacosa, A. (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, 146(1), 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.020>
- Cost GJ, B. J. (1998). Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure. *Biochemistry*.
- Deininger, P. (2011). Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol*, 12(12), 236. <https://doi.org/gb-2011-12-12-236> [pii]r10.1186/gb-2011-12-12-236
- Deininger, P. (2011). Alu elements: know the SINEs. *Genome Biology*, 12(12), 236. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-12-236>
- Dewannieux, M., Esnault, C., & Heidmann, T. (2003). LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nature Genetics*, 35(1), 41–48. <https://doi.org/10.1038/ng1223>
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., Mccune, R. A., & Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Research*, 10(8), 2709–2721. <https://doi.org/10.1093/nar/10.8.2709>
- Espondaburu, O. R., Alicia, V., Hunt, F., & Ocampo, L. I. (2004). El proceso aterogénico y su desarrollo en las enfermedades autoinmunes \* R esumen, 38(2), 181–192.
- Feng, J., Bi, C., Clark, B., Mady, R., Shah, P., & Kohtz, J. (2006). The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes &*

*Development*, 20(11), 1470–1484. <https://doi.org/10.1101/gad.1416106>

- Feng, Q., Moran, J. V., Kazazian, H. H., & Boeke, J. D. (1996). Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*, 87(5), 905–916.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81997-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81997-2)
- Feschotte, C., & Pritham, E. J. (2007). DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annual Review of Genetics*, 41(1), 331–368. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090448>
- Gehring, M., Huh, J., Hsieh, T.-F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J., ... Fischer, R. (2006). DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell*, 124(3), 495–506. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.034>
- Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E., & Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Human Genetics*, 83(2), 155–158. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/u67522t14j749563.pdf>
- Gruntman, E., Qi, Y., Slotkin, R., Roeder, T., Martienssen, R., & Sachidanandam, R. (2008). Kismeth: analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. *BMC Bioinformatics*, 9, 371.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-371>
- Gschwendtner, A., Bevan, S., Cole, J., Plourde, A., Matarin, M., Ross-Adams, H., ... International Stroke Genetics, C. (2009). Sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke. *Annals of Neurology*, 65(5), 531–539. <https://doi.org/10.1002/ana.21590>
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., & Song, H. (2011). Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle*, 10(16), 2662–2668.  
<https://doi.org/10.4161/cc.10.16.17093>
- Haerty, W., & Ponting, C. P. (2015). Unexpected selection to retain high GC content and splicing enhancers within exons of multiexonic lncRNA loci. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 21(3), 320–332.  
<https://doi.org/10.1261/rna.047324.114>
- Hancks, D. C., & Kazazian, H. H. (2012). Active human retrotransposons: Variation and disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 22(3), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.02.006>
- Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., ... Hubbard, T. (2012).

- GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Research*, 22(9), 1760–1774. <https://doi.org/10.1101/gr.135350.111>
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., & Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development (Cambridge, England)*, 129(8), 1983–1993. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/129/8/1983.short>
- Heard, E., & Disteché, C. (2006). Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes & Development*, 20(14), 1848–1867. <https://doi.org/10.1101/gad.1422906>
- Heery, D. M., Zacharewski, T., Pierrat, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., & Losson, R. (1993). Efficient transactivation by retinoic acid receptors in yeast requires retinoid X receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 4281–4285. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8387213><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC46490>
- Hellmann-blumberg, U., Hintz, M. F. M., Gatewood, J. O. E. M., & Schmid, C. W. (1993). Developmental Differences. *Microbiology*, 13(8), 4523–4530.
- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H., Moran, S., Pisano, D., Gomez, A., ... Esteller, M. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 10522–10527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120658109>
- Holdt, L., Beutner, F., Scholz, M., Gielen, S., Gäbel, G., Bergert, H., ... Teupser, D. (2010). ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(3), 620–627. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.109.196832>
- Ito, S., D'Alessio, A., Taranova, O., Hong, K., Sowers, L., & Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466(7310), 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nature09303>
- Iyer, M., Niknafs, Y., Malik, R., Singhal, U., Sahu, A., Hosono, Y., ... Chinnaiyan, A. (2015). The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genetics*, 47(3), 199–208. <https://doi.org/10.1038/ng.3192>
- Jackson, K., Yu, M. C., Arakawa, K., Fiala, E., Youn, B., Fiegl, H., ... Ehrlich, M. (2004). DNA hypomethylation

- is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer Biology and Therapy*, 3(12), 1225–1231.  
<https://doi.org/1222> [pii]
- Javier Piedrafita, F., Molander, R. B., Vansant, G., Orlova, E. A., Pfahl, M., & Reynolds, W. F. (1996). An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), 14412–14420.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14412>
- Jenuwein, T., & Allis, C. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
- Jern, P., & Coffin, J. M. (2008). Effects of Retroviruses on Host Genome Function. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 709–732. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091501>
- Jintaridh, P., Tungtrongchitr, R., Preutthipan, S., & Mutirangura, A. (2013). Hypomethylation of Alu elements in post-menopausal women with osteoporosis. *PLoS One*, 8(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070386>
- Jurka, J., Kapitonov, V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., & Walichiewicz, J. (2005). Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1–4), 462–467.  
<https://doi.org/10.1159/000084979>
- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D., Dutttagupta, R., Willingham, A., ... Gingeras, T. (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5830), 1484–1488. <https://doi.org/10.1126/science.1138341>
- Kim, M., Long, T. I., Arakawa, K., Wang, R., Yu, M. C., & Laird, P. W. (2010). DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk. *PLoS ONE*, 5(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009692>
- Kolosha, V. O., & Martin, S. L. (2003). High-affinity, non-sequence-specific RNA binding by the open reading frame 1 (ORF1) protein from long interspersed nuclear element 1 (LINE-1). *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8112–8117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210487200>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje

- neurons and the brain. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), 929–930.  
<https://doi.org/10.1126/science.1169786>
- Kulpa, D. A., & Moran, J. V. (2005). Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Human Molecular Genetics*, 14(21), 3237–3248.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi354>
- Labuda, D., & Striker, G. (1989). Sequence conservation in Alu evolution. *Nucleic Acids Research*, 17(7), 2477–2491. <https://doi.org/10.1093/nar/17.7.2477>
- Lange, N., Sordillo, J., Tarantini, L., Bollati, V., Sparrow, D., Vokonas, P., ... Demeo, D. (2012). Alu and LINE-1 methylation and lung function in the normative ageing study. *BMJ Open*, 2(5).  
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001231>
- Laperriere, D., Wang, T.-T., White, J. H., & Mader, S. (2007). Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution. *BMC Genomics*, 8, 23.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-23>
- Li, E., Beard, C., & Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366(6453), 362–365. <https://doi.org/10.1038/366362a0>
- Li, W. H., Gu, Z., Wang, H., & Nekrutenko, A. (2001). Evolutionary analyses of the human genome. *Nature*, 409(February), 847–849. <https://doi.org/10.1038/35057039>
- Lorenzen, J., Martino, F., & Thum, T. (2012). Epigenetic modifications in cardiovascular disease. *Basic Research in Cardiology*, 107(2), 245. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0245-9>
- Lu, L., Zhu, G., Zhang, C., Deng, Q., Katsaros, D., Mayne, S., ... Yu, H. (2012). Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2314-z>
- Lund, G., Andersson, L., Lauria, M., Lindholm, M., Fraga, M., Villar-Garea, A., ... Zaina, S. (2004). DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29147–29154.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M403618200>
- Mak, P., Kast-Woelbern, H., Anisfeld, A., & Edwards, P. (2002). Identification of PLTP as an LXR target gene

- and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *Journal of Lipid Research*, 43(12), 2037–2041. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454263>
- Makalowski, W. (2000). Genomic scrap yard: how genomes utilize all that junk. *Gene*, 259(1–2), 61–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163962>
- Mantovani, F., Piazza, S., Gostissa, M., Strano, S., Zacchi, P., Mantovani, R., ... Del Sal, G. (2004). Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Molecular Cell*, 14(5), 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.007>
- Martianov, I., Ramadass, A., Serra Barros, A., Chow, N., & Akoulitchev, A. (2007). Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature*, 445(7128), 666–670. <https://doi.org/10.1038/nature05519>
- Martin, S. L., & Bushman, F. D. (2001). Nucleic Acid Chaperone Activity of the ORF1 Protein from the Mouse LINE-1 Retrotransposon. *Molecular and Cellular Biology*, 21(2), 467–475. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.2.467-475.2001>
- Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH Jr, Boeke JD, G. A. (1991). Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*, 254(5039), 1808–1810.
- Mattick, J., & Makunin, I. (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, 15 Spec No, 29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>
- Murr, R. (2010). Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Advances in Genetics*, 70, 101–141. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-380866-0.60005-8>
- Nekrutenko, A., & Li, W. (2001). Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends in Genetics: TIG*, 17(11), 619–621. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11672845>
- Oosterveer, M., Grefhorst, A., Groen, A., & Kuipers, F. (2010). The liver X receptor: control of cellular lipid homeostasis and beyond Implications for drug design. *Progress in Lipid Research*, 49(4), 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.03.002>
- Ordovás, J., & Smith, C. (2010). Epigenetics and cardiovascular disease. *Nature Reviews. Cardiology*, 7(9), 510–519. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.104>

- Ørom, U., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G., ... Shiekhattar, R. (2010). Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*, *143*(1), 46–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.001>
- Panning, B., & Jaenisch, R. (1996). DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes & Development*, *10*(16), 1991–2002. <https://doi.org/10.1101/gad.10.16.1991>
- Peet, D., Turley, S., Ma, W., Janowski, B., Lobaccaro, J., Hammer, R., & Mangelsdorf, D. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, *93*(5), 693–704. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630215>
- Pehkonen, P., Welter-Stahl, L., Diwo, J., Ryyänen, J., Wienecke-Baldacchino, A., Heikkinen, S., ... Carlberg, C. (2012). Genome-wide landscape of liver X receptor chromatin binding and gene regulation in human macrophages. *BMC Genomics*, *13*(1), 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-50>
- Price, A. L., Eskin, E., Pevzner, P. A., Price, A. L., Eskin, E., & Pevzner, P. A. (2004). Whole-genome analysis of Alu repeat elements reveals complex evolutionary history Whole-genome analysis of Alu repeat elements reveals complex evolutionary history, (858), 2245–2252. <https://doi.org/10.1101/gr.2693004>
- Qin, Z. (2012). The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, *221*(1), 2–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003>
- Quentin, Y. (1992). Origin of the alu family: A family of alu-like monomers gave birth to the left and the right arms of the alu elements. *Nucleic Acids Research*, *20*(13), 3397–3401.  
<https://doi.org/10.1093/nar/20.13.3397>
- Raines, E., & Ross, R. (1995). Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *The Journal of Nutrition*, *125*(3 Suppl). Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3467356>
- Repa, J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J., Shimomura, I., ... Mangelsdorf, D. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & Development*, *14*(22), 2819–2830. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090130>

- Reynolds, W. F., Kumar, A. P., & Piedrafita, F. J. (2006). The human myeloperoxidase gene is regulated by LXR and PPAR?? ligands. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(2), 846–854. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.119>
- Rhead, B., Karolchik, D., Kuhn, R. M., Hinrichs, A. S., Zweig, A. S., Fujita, P. a, ... Kent, W. J. (2010). The UCSC Genome Browser database: update 2010. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue), D613-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp939>
- Rinn, J., Kertesz, M., Wang, J., Squazzo, S., Xu, X., Brugmann, S., ... Chang, H. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, 129(7), 1311–1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>
- Rodríguez-Ubrea, J., & Ballestar, E. (2014). Chromatin immunoprecipitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1094, 309–18. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-706-8\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-706-8_24)
- Romanish, M. T., Cohen, C. J., & Mager, D. L. (2010). Potential mechanisms of endogenous retroviral-mediated genomic instability in human cancer. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.05.005>
- Romano, A., Delvoux, B., Fischer, D. C., & Groothuis, P. (2007). The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38(1–2), 331–350. <https://doi.org/10.1677/jme.1.02170>
- Sandoval, J., Heyn, H., Moran, S., Serra-Musach, J., Pujana, M., Bibikova, M., & Esteller, M. (2011). Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*, 6(6), 692–702. <https://doi.org/10.4161/epi.6.6.16196>
- Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., ... Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes and Development*, 14(22), 2831–2838. <https://doi.org/10.1101/gad.850400>
- Schultz, J., Tu, H., Luk, A., Repa, J., Medina, J., Li, L., ... Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & Development*, 14(22), 2831–2838. <https://doi.org/10.1101/gad.850400>
- Sirivanichsuntorn, P., Keelawat, S., Danuthai, K., Mutirangura, A., Subbalekha, K., & Kitkumthorn, N. (2013). LINE-1 and Alu hypomethylation in mucoepidermoid carcinoma. *BMC Clinical Pathology*, 13, 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-13-10>

- Smit, A. F. A., & Riggs, A. D. (1995). MIRs are classic, tRNA-derived SINEs that amplified before the mammalian radiation. *Nucleic Acids Research*, 23(1), 98–102. <https://doi.org/10.1093/nar/23.1.98>
- Suter, C. M., Martin, D. I., & Ward, R. I. (2004). Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *International Journal of Colorectal Disease*, 19(2), 95–101. <https://doi.org/10.1007/s00384-003-0539-3>
- Tahiliani, M., Koh, K., Shen, Y., Pastor, W., Bandukwala, H., Brudno, Y., ... Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Takai, D., & Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3740–3745. <https://doi.org/10.1073/pnas.052410099>
- Uppal, H., Saini, S., Moschetta, A., Mu, Y., Zhou, J., Gong, H., ... Xie, W. (2007). Activation of LXRs prevents bile acid toxicity and cholestasis in female mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(2), 422–432. <https://doi.org/10.1002/hep.21494>
- Vansant, G., & Reynolds, W. F. (1995). The consensus sequence of a major Alu subfamily contains a functional retinoic acid response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8229–8233. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8229>
- Walsh, C., Chaillet, J., & Bestor, T. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature Genetics*, 20(2), 116–117. <https://doi.org/10.1038/2413>
- Willard, C., Nguyen, H., & Schmid, C. (1987). Existence of at least three distinct Alu subfamilies. *Journal of Molecular Evolution*, 26(3), 180–186. <https://doi.org/10.1007/bf02099850>
- Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A., & Mangelsdorf, D. J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes and Development*, 9(9), 1033–1045. <https://doi.org/10.1101/gad.9.9.1033>
- Wu, M., Li, L., & Sun, Z. (2007). Transposable element fragments in protein-coding regions and their contributions to human functional proteins. *Gene*, 401(1–2), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.07.012>

- Xie, H., Wang, M., Bonaldo, M., Smith, C., Rajaram, V., Goldman, S., ... Soares, M. (2009). High-throughput sequence-based epigenomic analysis of Alu repeats in human cerebellum. *Nucleic Acids Research*, 37(13), 4331–4340. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp393>
- Yulug, I., Yulug, A., & Fisher, E. (1995). The frequency and position of Alu repeats in cDNAs, as determined by database searching. *Genomics*, 27(3), 544–548. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1090>
- Zaina, S., Gonçalves, I., Carmona, F., Gomez, A., Heyn, H., Mollet, I., ... Esteller, M. (2015). DNA methylation dynamics in human carotid plaques after cerebrovascular events. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(8), 1835–1842. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.115.305630>
- Zaina, S., Heyn, H., Carmona, F. J., Varol, N., Sayols, S., Condom, E., ... Esteller, M. (2014). DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circulation: Cardiovascular Genetics* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000441>
- Zaina, S., & Lund, G. (2011). Epigenetics: a tool to understand diet-related cardiovascular risk? *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 4(5), 261–274. <https://doi.org/10.1159/000334584>
- Zawadzki, C., Chatelain, N., Delestre, M., Susen, S., Quesnel, B., Juthier, F., ... Jude, B. (2009). Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 204(2), 14. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.009>

## 12. Anexos

### 12.1 Información suplementaria

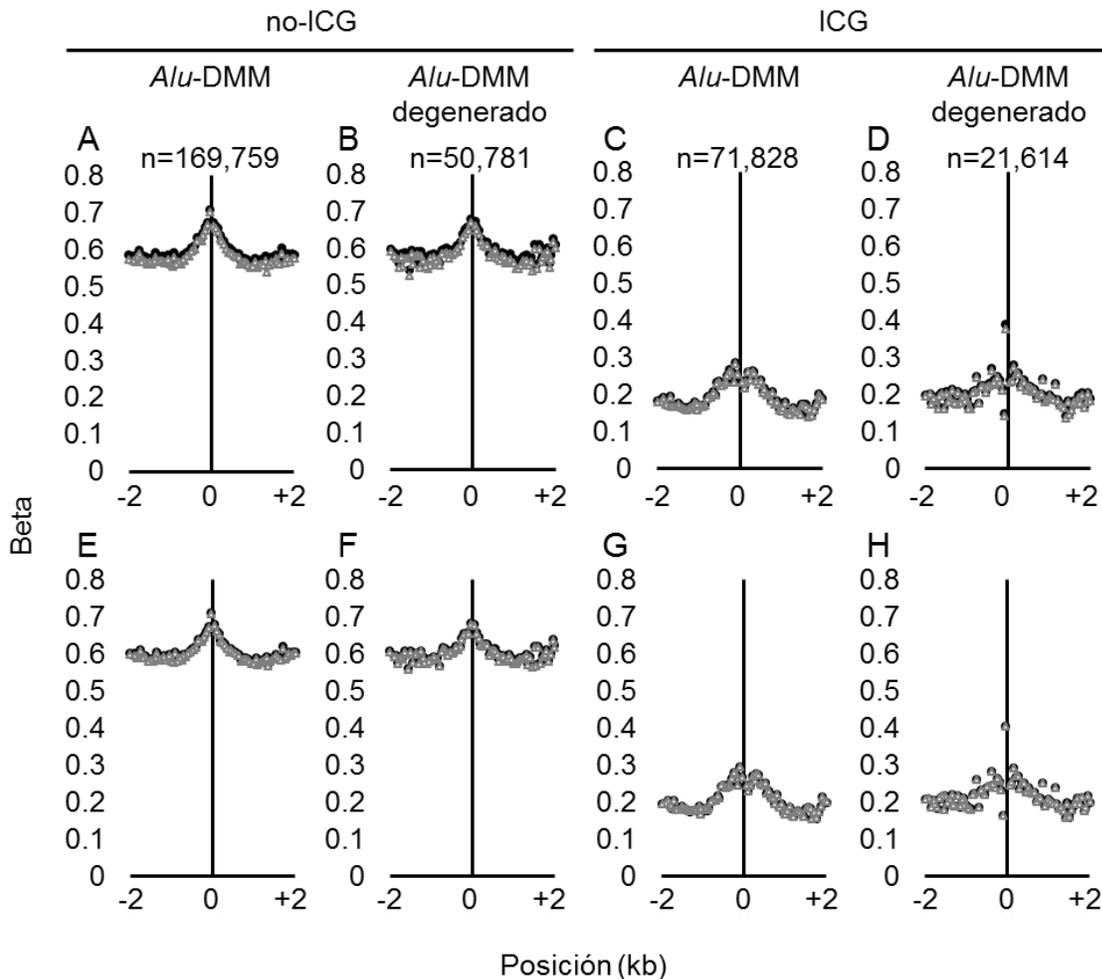
**Tabla Suplementaria 1- Proteínas de unión al DMM en el ensayo de un híbrido.**

Completo ORF	En fase	Gen
NO	NO	Homo sapiens filamin A, alpha (FLNA), transcript variant 1, mRNA
NO	NO	Homo sapiens apoptosis related protein APR-3 mRNA (ATRAID), complete cds
NO	NO	Homo sapiens apoptosis related protein APR-3 mRNA (ATRAID), complete cds
NO	NO	Homo sapiens AT rich interactive domain 4B (RBP1-like) (ARID4B)
NO	NO	Homo sapiens calcium binding protein 39 (CAB39), transcript variant 3, Mrna
NO	NO	Homo sapiens calcium binding protein 39 (CAB39), transcript variant 3, Mrna
NO	NO	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 14 (CXCL14), Mrna
NO	NO	Homo sapiens chromosome 16 open reading frame 45 (C16orf45), transcript variant 1, Mrna
NO	NO	Homo sapiens chromosome 16 open reading frame 45 (C16orf45), transcript variant 1, Mrna
YES	YES	Homo sapiens dual specificity phosphatase 1 (DUSP1), Mrna
NO	NO	Homo sapiens electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide, mRNA (cDNA clone MGC:9356 IMAGE:3852346), complete cds
NO	NO	Homo sapiens feline sarcoma oncogene, mRNA (cDNA clone MGC:34142 IMAGE:5170548 , FES), complete cds
YES	NO	Homo sapiens inner membrane protein, mitochondrial (IMMT), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA
NO	NO	Homo sapiens isolate C-6E mitochondrion, complete genome
NO	NO	Homo sapiens milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFG8), transcript variant 2, Mrna
NO	NO	Homo sapiens mRNA for Splice isoform 2 of P15502 variant, clone: STM04371
NO	NO	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667B0324 (from clone DKFZp667B0324)
NO	NO	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667B0324 (from clone DKFZp667B0324)
NO	NO	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667B0324 (from clone DKFZp667B0324)
YES	YES	Homo sapiens nephroblastoma overexpressed (NOV), Mrna
NO	YES	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2 (NR1H2 or LXRb), transcript variant 1, mRNA
NO	YES	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2 (NR1H2 or LXRb), transcript variant 1, mRNA
NO	YES	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2 (NR1H2 or LXRb), transcript variant 1, mRNA
NO	YES	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2 (NR1H2 or LXRb), transcript variant 1, mRNA
NO	YES	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2 (NR1H2 or LXRb), transcript variant 1, mRNA
YES	YES	Homo sapiens Ppan peter pan homolog (Drosophila)
NO	NO	Homo sapiens prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (PMEPA1), RefSeqGene on chromosome 20
NO	NO	Homo sapiens protein kinase C, delta, mRNA (cDNA clone MGC:49908 IMAGE:5539909), complete cds
YES	YES	Homo sapiens ribosomal protein L27 (RPL27), Mrna
NO	NO	Homo sapiens ribosomal protein L3, mRNA (cDNA clone MGC:104284 IMAGE:6699816), complete cds
YES	YES	Homo sapiens ribosomal protein L37, mRNA (cDNA clone MGC:99571 IMAGE:2819896), complete cds
NO	NO	Homo sapiens ribosomal protein S9 (RPS9), Mrna
NO	NO	Homo sapiens RuvB-like 2 (E. coli), mRNA (cDNA clone MGC:2945 IMAGE:3051517), complete cds
NO	NO	Homo sapiens solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5 (SLC25A5)
NO	NO	Homo sapiens solute carrier family 44, member 2, mRNA (cDNA clone MGC:41799 IMAGE:5268313), complete cds
NO	NO	Homo sapiens sushi-repeat containing protein, X-linked (SRPX), transcript variant 3, Mrna
NO	NO	Homo sapiens vimentin (VIM), Mrna
NO	NO	Homo sapiens vimentin (VIM), Mrna

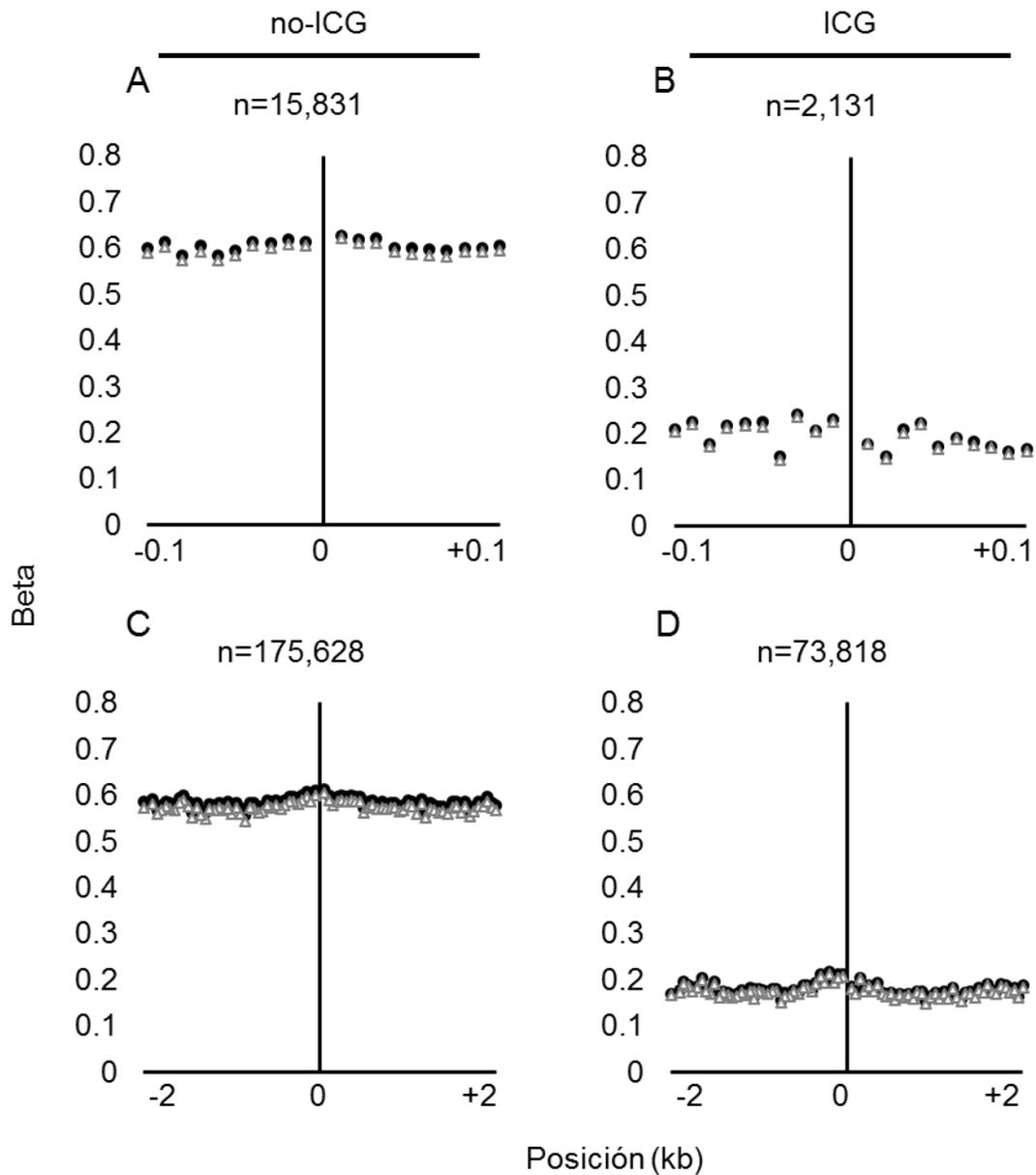
**Tabla Suplementaria 2-** Clasificación de aortas usadas con lesión estable.

No. De muestra	Genero	Edad	Causa de muerte	Clase histológica, muestra N	Clase histológica, muestra A	Clasificación AHA, muestra A
93	M	88	Neumonía	N	Placa calcificada	VII
95	M	69	Mesotelioma	N	EIP	III
96	H	71	Leucemia linfocítica crónica	N+ EI	Placa calcificada y fibrosa	VII
97	H	69	Muerte súbita	EI	Placa calcificada	VII
98	H	65	Linfoma	N	EIP	III
101	H	45	Amiloidosis sistémica	EI	EIP	III

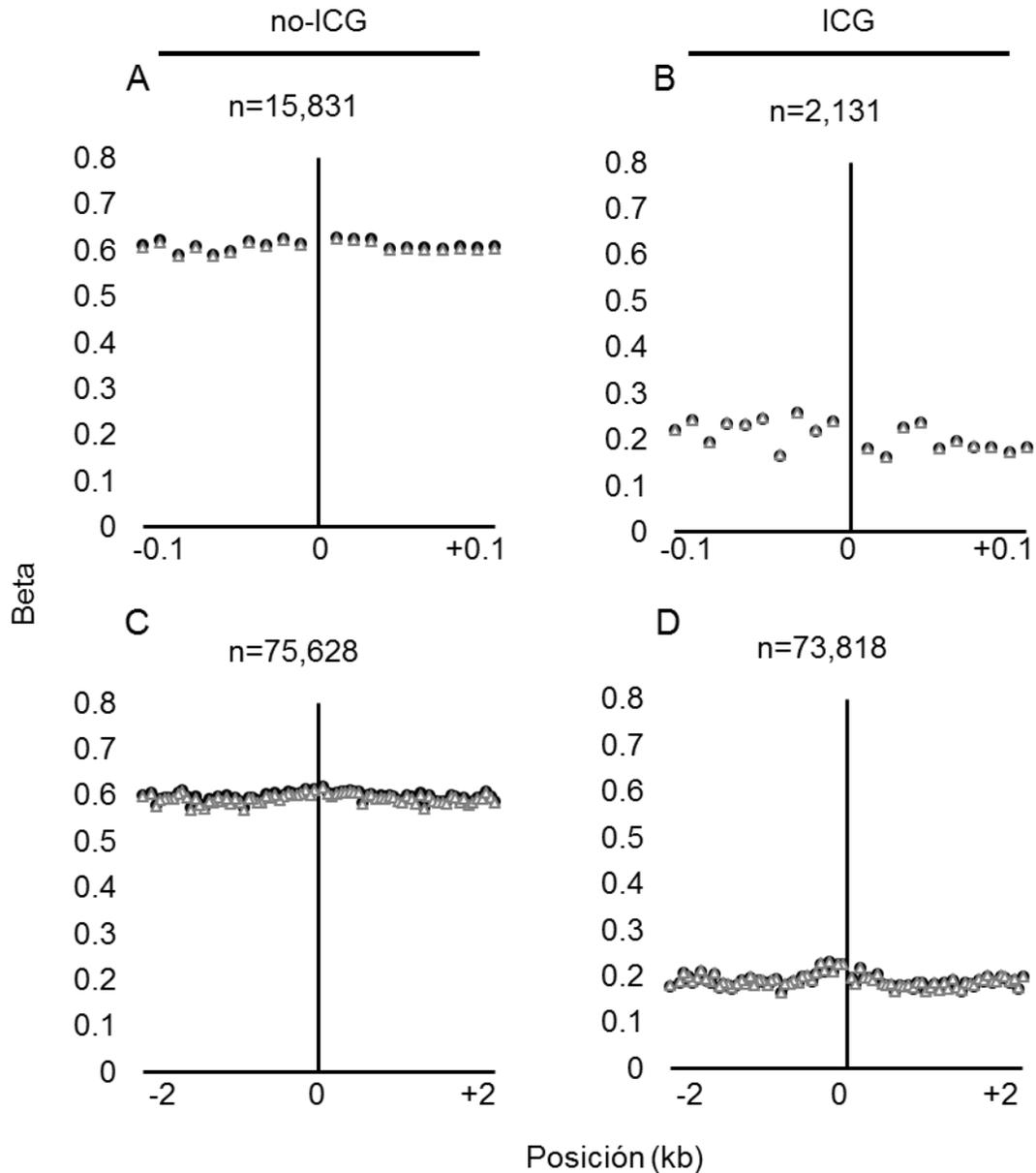
N=normal, EI= engrosamiento de la íntima, EIP= engrosamiento de la íntima patológico, AF= ateroma fibrosa, AHA= American Heart Association



**Figura Suplementaria 1- Perfiles de mDNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando *Alu* en no-ICG y ICG en aterosclerosis humana.** Se analizó las CpGs que flanquean a *Alu* a  $\pm 2$  kb, con DMM (conservado) o DMM-degenerado en ateromas estables (A-D) o en ateromas sintomáticos (E-H). Cada punto indica el promedio de la mDNA del Beta de consecutivos 50 pb. El número de CpGs censadas está indicado en cada gráfica. Negro y gris, arteria aterosclerótica y normal (A-D), o ateroma sintomático y asintomático (E-H), respectivamente.



**Figura Suplementaria 2- Perfiles de mDNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando *MIR* en no-ICG y ICG en ateromas estables.** Se analizó las CpGs que flanquean a *MIR* a  $\pm 100$  pb o  $\pm 2$  Kb. Cada punto indica el promedio de la mDNA del delta-Beta de consecutivos 10 pb (para  $\pm 100$ pb) o 50 pb (para  $\pm 2$  kb). El número de CpGs censadas está indicado en cada respectiva gráfica. Negro y gris, arteria aterosclerótica y normal, respectivamente.



**Figura Suplementaria 3- Perfiles de mDNA (microarreglo 450K) de regiones flanqueando *MIR* en no-ICG y ICG en ateromas sintomáticos.** Se analizó las CpGs que flanquean a *MIR* a  $\pm 100$  pb o  $\pm 2$  Kb. Cada punto indica el promedio de la mDNA del delta-Beta de consecutivos 10 pb (para  $\pm 100$ pb) o 50 pb (para  $\pm 2$  kb). El número de CpGs censadas está indicado en cada gráfica. Negro y gris, ateroma sintomático y asintomático, respectivamente.

## 12.2 Trabajos publicados durante la estancia de Doctorado

**F.E. Tristán-Flores**, P. Guzmán, M.S. Ortega-Kermedy, G. Cruz-Torres, C. de la Rocha, G.A. Silva-Martinez, D. Rodríguez-Ríos, Y. Alvarado-Caudillo, G. Barbosa-Sabanero, S. Sayols, G. Lund, S. Zaina. A Liver X Receptor-binding DNA Motif Associated with Atherosclerosis-specific DNA Methylation Profiles of *Alu* Elements and Neighbouring CpG Islands. *Journal of the American Heart Association*. 2018; 7: e007686.

Contribución de la alumna: obtención de >90% de los datos de biología molecular y de la totalidad de los datos de bioinformática; participación en el diseño de los experimentos; participación en la escritura.

C. de la Rocha, J.E. Pérez-Mojica, S. Zenteno-De León, B. Cervantes-Paz, **F.E. Tristán-Flores**, D. Rodríguez-Ríos, J. Molina-Torres, E. Ramírez-Chávez, Y. Alvarado-Caudillo, F.J. Carmona, M. Esteller, R. Hernández-Rivas, V.G. Reyes-Sánchez, K. Wrobel, K. Wrobel, S. Zaina, G. Lund. Associations between whole peripheral blood fatty acids and DNA methylation in humans. *Scientific Reports*. 2016; 6: 25867.

Contribución de la alumna: participación en la obtención de datos de biología molecular; revisión de la versión final del manuscrito.

S. Zaina, M. del P. Valencia-Morales, **F. E. Tristán-Flores** and G. Lund. Nuclear reprogramming and its role in vascular smooth muscle cells. *Current Atherosclerosis Reports*. 2013; 15: 352.

Contribución de la alumna: participación en la definición del contenido y en la escritura.