

LA VÍA Rb/E2F Y LA FAMILIA DE PROTEÍNAS REPRESORAS POLYCOMB EN EL DESARROLLO DE CÁNCER

MERCEDES IMELDA DÁVALOS-SALAS Y FÉLIX RECILLAS-TARGA*

Instituto de Fisiología Celular, Depto. de Genética Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-242 México, 04510, D.F. *E-mail: frecilla@ifc.unam.mx

RESUMEN

El control adecuado del ciclo celular mediante la acción coordinada de la familia de factores de transcripción E2F resulta ser clave para la homeostasis celular. El entender su modo de acción desde una perspectiva epigenética resulta ser un tema de gran actualidad y cambia la visión de cómo es regulado el ciclo celular. Uno de los principales reguladores epigenéticos está conformado por el grupo de proteínas Polycomb (PcG), relacionadas con procesos patológicos como el cáncer, a través de la desregulación a nivel epigenético de genes supresores de tumores como *BRCA1*, *p16* y *p53*, entre otros. Con relación a lo anterior, la regulación del gen supresor *Retinoblastoma (Rb)* ha sido ampliamente estudiado dada su importante participación como regulador negativo del ciclo celular, pero más reciente se ha demostrado que su modo de acción está relacionado con el grupo de proteínas PcG. Cada uno de los procesos que involucran a componentes de la familia de factores E2F, los miembros de Polycomb y la familia de proteína Rb, parecen ser en cierta medida independientes y, por ende, poco relacionados. Sin embargo, existen evidencias de una convergencia a nivel epigenético en la acción de estos conjuntos de moléculas reguladoras de la progresión del ciclo celular y su desregulación nos puede llevar a entender mejor su contribución al desarrollo de procesos patológicos como el cáncer.

Palabras Clave: *Cáncer, E2F, epigenética, Polycomb, Rb.*

ABSTRACT

The coordinated contribution of the E2F-family of transcription factors is critical for the proper control of the cell cycle with consequences in the cellular homeostasis. Such kind of regulation requires a renewed vision of the control of the cell cycle through the basis of epigenetic mechanisms. One of such regulatory components is the Polycomb Group (PcG) of proteins which have been involved in cancer development through the anomalous regulation, at an epigenetic level, of tumour suppressor genes such as *BRC1*, *p16*, and *p53*, among others. In particular, the tumour suppressor gene *Retinoblastoma (Rb)* plays a central role in the regulation of the cell cycle and is regulated by PcG proteins. The relationship among E2F members, PcG and Rb has not been examined in detail. Here, we describe the epigenetic interaction among these proteins, their association with epigenetic processes and their contribution to cancer development.

Key Words: *Cancer, E2F, epigenetic, Polycomb, Rb.*

INTRODUCCIÓN

Hace más de un siglo que se sugirió que la herencia o adquisición de anomalías genéticas predispone a algunos individuos a padecer cáncer. Pero no fue sino hasta hace dos décadas, con el desarrollo de las tecnologías de la biología molecular, que se han identificado

genes asociados con mayor frecuencia al desarrollo del cáncer. Entre dichos genes se encuentran los oncogenes (que codifican proteínas con ganancia dominante de función) y los genes supresores de tumores (que codifican proteínas con pérdida recesiva de función) los cuales fueron descubiertos principalmente por su alteración en la mayoría de los cánceres humanos^[1]. Gran parte del conocimiento de estos genes fue generado por estudios bioquímicos y funcionales hechos en células en cultivo, aunque la mayoría de la información actual que

Nota: Artículo recibido el 11 de febrero de 2011 y aceptado el 06 de abril de 2011.

explica su contribución en el desarrollo de cáncer, proviene del estudio de su función anormal en modelos animales.

En la última década, con los crecientes avances científicos y tecnológicos, se ha generado un interés cada vez mayor por seguir entendiendo a niveles más finos el funcionamiento de las células. Actualmente se sabe que la desregulación de procesos vitales para la fisiología celular lleva a estados críticos y anormales, que si se mantienen en el tiempo, pueden ser la causa del desarrollo de algunas enfermedades crónico-degenerativas, entre ellas el cáncer. Dichas alteraciones fisiológicas pueden ser por ejemplo, el estrés oxidativo generado por fuentes tanto medio ambientales, como físicas y químicas, las cuales, si ocurren de manera persistente, tienen diferentes consecuencias^[2]. Este tipo de estrés daña a las macromoléculas existentes en la célula y se sabe que la generación de aductos de ADN, de proteínas y de lípidos, producto de la oxidación, son factores que contribuyen en la patología de este tipo de enfermedades y, por otra parte, activan de manera anormal vías de señalización involucradas en la proliferación y diferenciación celular. Otro tipo de alteración frecuente que también tiene relación con el desarrollo de enfermedades, es la desregulación de procesos epigenéticos como: la modificación post-traduccional de histonas, la metilación del ADN, la actividad de complejos remodeladores de la cromatina ATP-dependientes, la actividad de complejos Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG), los mecanismos de los ARN no-codificantes y la participación de la organización y dinámica nuclear, que se sabe, están involucrados en casi todos los procesos relacionados con la homeostasis celular^[3,4]. Todos estos procesos epigenéticos mencionados ocurren en el núcleo celular en el contexto de la cromatina y, para clarificar su estudio, es necesario empezar por definir a grandes rasgos algunos conceptos básicos.

Para poder entender mejor los procesos vinculados a la regulación epigenética presentamos brevemente una descripción de cómo el genoma se estructura y organiza en cromatina. En las células eucariontes el ADN está enrollado alrededor de un octámero de histonas, dos moléculas de cada una de las histonas H3, H4, H2A y H2B, para formar el nucleosoma, la unidad primaria que conforma la cromatina. Los nucleosomas compactan el genoma y restringen el acceso y reconocimiento del ADN a los factores de transcripción, de tal manera que existe un balance entre un empaquetamiento efectivo del genoma y la accesibilidad de proteínas reguladoras^[5]. A esta regulación contribuyen la actividad de enzimas que reposicionan, reconfiguran o disocian nucleosomas llamadas genéricamente “remodeladores de la cromatina”, así como la actividad de enzimas modificadoras de histonas, llamadas “modificadores de la cromatina”, como las proteínas histona acetiltransferasa (HAT), las proteínas histona metiltransferasa (HMT) las proteínas histona desacetilasa (HDAC) y las proteínas ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b)^[6]. Evidencia de la importancia que tiene la actividad de este tipo de proteínas en procesos celulares es el hecho de que algunas enzimas HMT, forman parte del

complejo represor Polycomb (PcG). Este grupo fue inicialmente descrito en *Drosophila melanogaster* como proteínas reguladoras de los genes homeóticos durante el desarrollo^[7]. Así mismo, un grupo de factores de transcripción que se asocian con las proteínas PcG y que participan en la regulación del ciclo celular son las proteínas de la familia E2F que describiré en la siguiente sección.

Antes de describir los mecanismos de acción de los complejos Polycomb, es necesario recordar algunos conceptos básicos sobre las modificaciones post-traduccionales que sufren las histonas. Como se sabe, algunas de estas modificaciones post-traduccionales son la acetilación, la fosforilación, la ubiquitinación y la metilación, entre otras^[8]. Dichas modificaciones ocurren con mayor frecuencia en los residuos de los extremos amino terminal de las histonas, aunque también se pueden presentar en algunos residuos más internos. La metilación es una de las marcas de histonas relacionadas con PcG, en particular la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), modificación que correlaciona con cromatina transcripcionalmente inactiva. En el genoma esta marca puede presentarse en tres diferentes formas, mono, di y trimetilación (H3K27me1, H3K27me2 y H3K27me3, respectivamente). La abundancia relativa de cada una de estas marcas es diferente, siendo la más abundante la H3K27me2, la cual constituye aproximadamente el 50% de toda la H3K27 metilada *in vivo*. En contraste, la H3K27me1 y la H3K27me3 representan alrededor del 25% y 10%, respectivamente^[9]. Un ejemplo donde la H3K27me3 se encuentra enriquecida, es el proceso asociado a la inactivación del cromosoma X^[10]. De igual forma, H3K27me1 se localiza principalmente en regiones de heterocromatina pericentromérica^[11], aunque existe un estudio genómico de alta resolución en 2007, donde inesperadamente se encontró enriquecida esta marca en mayor proporción en promotores activos que en los silenciados^[12]. Estos hallazgos, aunque parezcan contradictorios, refrendan conceptos como el de que existe un “código de histonas”, lo que significa que en la mayoría de los casos no es sólo una modificación de histonas lo que produce un efecto molecular, sino la combinatoria de más de una modificación en las histonas, aunque sea una la marca representativa de un estado transcripcional específico.

En suma, el objetivo de esta revisión es abordar el aspecto relacionado con la contribución de estas dos familias de reguladores (PcG y E2F) en el control transcripcional a nivel de la cromatina, y entender su relación con el gen supresor de tumores Retinoblastoma, así como su participación en el desarrollo del cáncer.

LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS E2F

El primer paso en la expresión génica es la transcripción. Dicha etapa está regulada a dos niveles, el primero por la estructura y las modificaciones en las histonas presentes en la cromatina, reconocidas por proteínas modificadoras de la cromatina, y

en segunda instancia por los factores de transcripción y sus co-factores y las polimerasas de ARN^[13]. Un grupo importante de factores de transcripción que se ha conservado durante la evolución desde invertebrados, peces y aves hasta mamíferos, son las proteínas E2F y cuya contribución es esencial para la regulación transcripcional de un grupo de genes responsables del control del ciclo celular^[14].

La familia de factores de transcripción E2F (Figura 1), nombrada así por la capacidad para unirse al promotor del gen *E2* de adenovirus, además de regular tanto positiva como negativamente la expresión de genes necesarios para la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, también regula otros genes necesarios para el control del ciclo^[15]. Entoces, la familia E2F está implicada en el control y regulación tanto de procesos celulares, como la mitosis, apoptosis, reparación del ADN y funciona como sensor de los puntos de revisión de daño al ADN, así como en la fisiología del organismo, por ejemplo la regulación de la diferenciación, el desarrollo y tumorigénesis. En general, la habilidad de los miembros de la familia E2F para regular estos

procesos ha sido relacionada a su capacidad para modular la respuesta transcripcional de sus promotores blanco^[16]. Actualmente se sabe que en la gran mayoría de los cánceres en humanos, la actividad de los factores E2F se encuentra desregulada a través de diferentes mecanismos y que, en general, la vía Rb/E2F es uno de los principales blancos. Algunos autores han demostrado lo vital que son estas moléculas a partir de la pérdida funcional de la proteína Rb, el aumento en la transcripción de la ciclina D que fosforila a Rb, la pérdida de p16, el cual es un inhibidor de cinasas dependiente de ciclina que inhibe la fosforilación de Rb, y la expresión de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano que secuestra a Rb e interfiere con la formación del complejo Rb-E2F (Figura 2)^[17,18].

En el genoma de mamíferos, las proteínas E2F están codificadas por ocho genes diferentes que dan lugar a nueve proteínas distintas (Figura 1). El único miembro de esta familia que codifica dos proteínas a través del uso de promotores alternativos, es el factor E2F3^[19]. Todas las proteínas E2F muestran un alto grado de identidad en su dominio de unión al ADN, lo cual se demostró

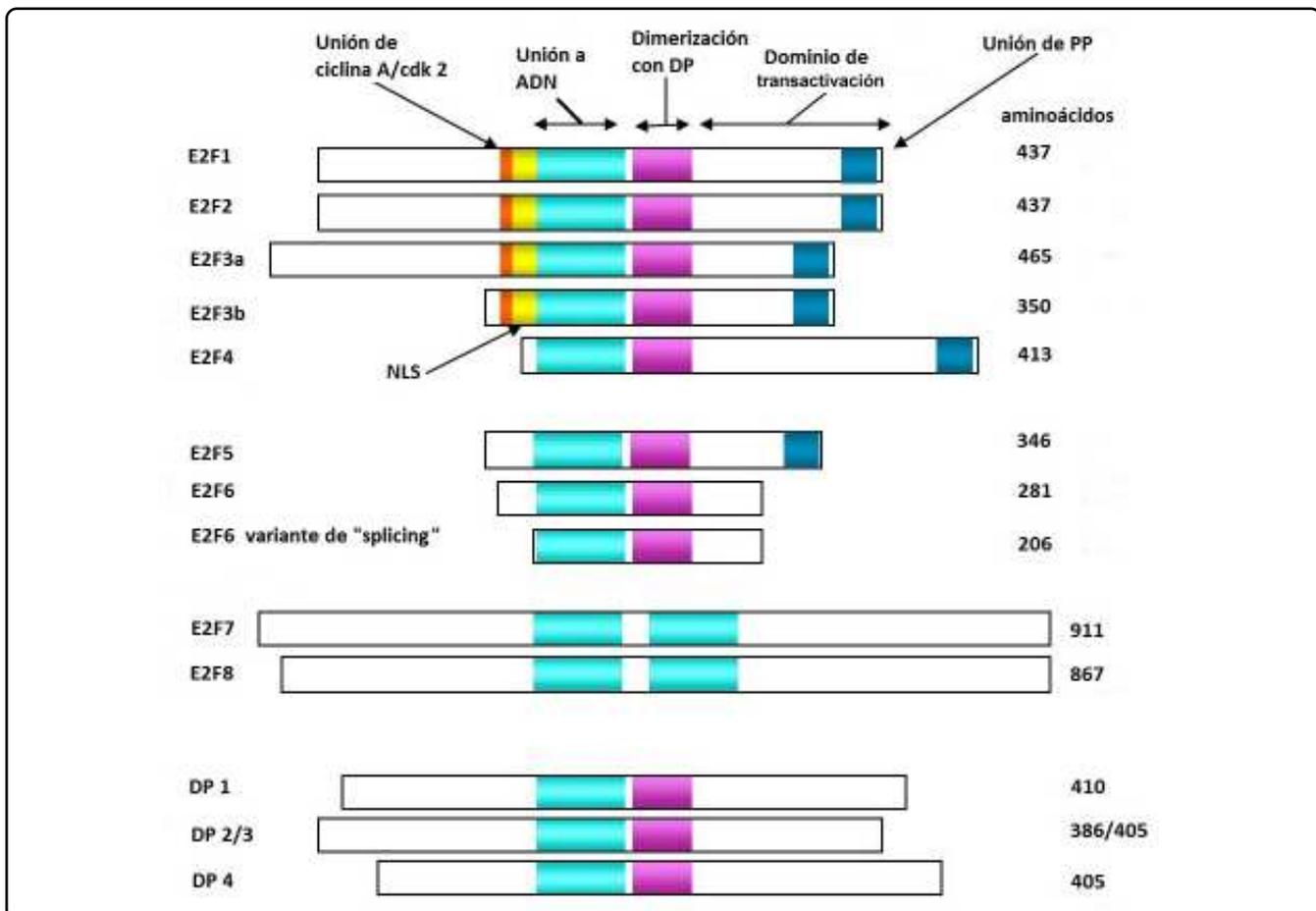


Figura 1. Esquema de la familia de proteínas E2F. En la imagen se muestran los diferentes dominios que se encuentran en cada una de las proteínas, así como su tamaño. NLS: señal de localización nuclear. PP: proteínas "pocket". DP: proteínas compañeras de dimerización. Modificado de De Gregory & Johnson^[14].

con estudios *in vitro*, donde se observó que todos los factores se pueden unir a la secuencia consenso 5'-TTTNNCGC-3' (donde N puede ser G o C).

La afinidad de unión de cada miembro de la familia a la secuencia mencionada, está determinada por la naturaleza de las seis bases centrales que conforman el motivo de unión, por el estado y tipo celular, y por la fase del ciclo en la que se encuentre la célula (parte central de la Figura 2)^[16]. Dicha unión también se ve afectada por la metilación del dinucleótido CpG en la secuencia consenso, interfiriendo con la unión de algunos miembros de la familia E2F y favoreciendo la incorporación de proteínas represoras como MeCP2, convirtiéndose esa región en un blanco de silenciamiento epigenético^[20]. En conjunto, estos aspectos contribuyen a explicar la amplia gama de genes blanco de la familia E2F y cómo es que en distintos momentos celulares los miembros de una misma familia pueden activar blancos incluso antagónicos. Cabe resaltar que algunos miembros de la familia de factores de transcripción E2F son los efectores de la vía del supresor de tumores Retinoblastoma (Figura 2) y se han clasificado de diferentes maneras. Algunas de las clasificaciones se basan en su capacidad para regular la transcripción de genes específicos, en la posibilidad de formar homo o heterodímeros con alguno de los miembros de la familia de proteínas llamadas “compañeros” de dimerización (DP por sus siglas en inglés) (DP1, DP2/3 o DP 4) y, finalmente, por su propiedad de interactuar con las proteínas de la familia “pocket” p105^{RB1}, p107^{RBL1}, p130^{RBL2/RB2}^[18].

Otra clasificación más amplia y general agrupa a los factores E2F como *activadores*, los cuales reclutan complejos que ayudan a relajar la estructura de la cromatina como las HATs que contribuyen a activar genes en la fase S. Las proteínas que pertenecen a este subgrupo son los factores E2F1, 2 y 3a, cuya localización es nuclear e interactúan específicamente con Rb^[19]. Estos factores son liberados del complejo Rb-E2F cuando Rb es hiperfosforilado y, de esta manera, pueden activar a su gen blanco. Así mismo, se sabe que la sobre-expresión de cualquiera de los E2F activadores induce la entrada al ciclo celular proliferativo, mientras que su pérdida genera una disminución total de la proliferación celular^[19].

El otro subgrupo formado por los factores E2F3b, 4 y 5, poseen una función *represora*, aunque algunos autores los consideran propiamente como *activadores débiles*, un aspecto que sigue en debate. Estos factores se localizan en el citoplasma y tienen un dominio de unión a proteínas “pocket”, siendo E2F4 capaz de interactuar con todas ellas^[21]. Además reclutan enzimas modificadoras de la cromatina como las HDACs y las proteínas características de heterocromatina Suv39H1 y HP1. En contraste con los factores E2F con función activadora, la sobre-expresión de estos factores represores no correlaciona o no es suficiente para superar el arresto del ciclo celular e inducir proliferación^[19].

Un subgrupo de factores, también represores, lo conforman las proteínas E2F6, 7 y 8. Se clasifican como represores

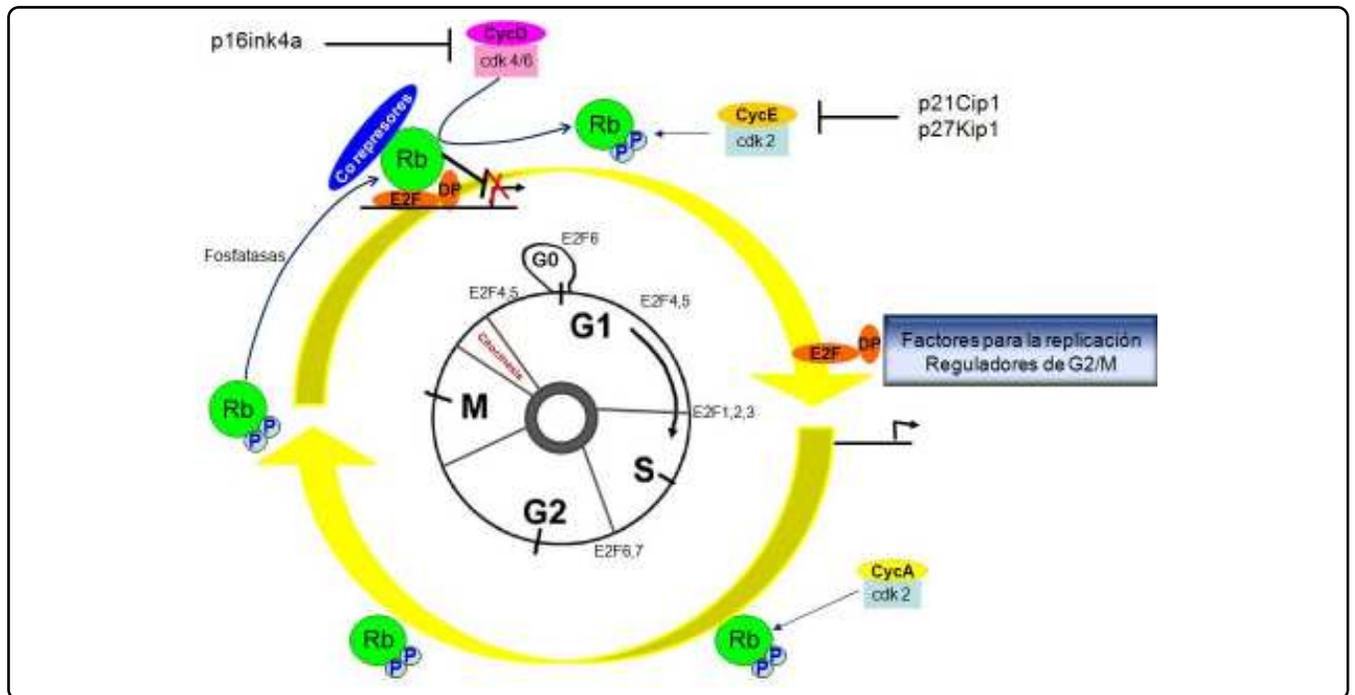


Figura 2. Esquema de la vía p16^{INK4a}/Rb en el ciclo celular y la participación de los factores E2F en cada fase. En la figura central se muestran las fases del ciclo celular y los factores E2F, tanto activadores como represores, presentes en cada fase. En la figura externa se muestra la dinámica de disociación, vía fosforilación/defosforilación del complejo Rb-E2F/DP a través de las fases del ciclo celular.

transcripcionales independientes de la interacción con proteínas “pocket”, dado que carecen de dominio de unión a este dominio peptídico (Figura 1)^[22]. El factor E2F6 ha sido relacionado con complejos proteicos que actúan en etapas específicas del ciclo celular. En particular, se ha demostrado su asociación con las proteínas represoras PcG, un aspecto que se abordará con detalle más adelante y cuya desregulación tiene que ver con el inicio y/o progresión de un proceso tumoral. Por otra parte, aunque se ha demostrado que las proteínas E2F7 y 8 se unen al mismo sitio consenso E2F, se consideran factores E2F atípicos porque en su estructura contienen dos dominios de unión a ADN y, además, esta unión es independiente de la interacción con las proteínas DP^[23,24]. De los factores E2F7 y 8 se ha acumulado poca información, sin embargo, ya se les han atribuido funciones como represores en la proliferación celular, la apoptosis, se ha descrito que se induce su expresión en respuesta al daño al ADN, incluyendo procesos carcinogénicos.

Es posible considerar y hacer la analogía de que para llevar a cabo procesos celulares, como la regulación de la expresión génica en el contexto cromatínico, existan tres niveles o jerarquías de acción, es decir, en principio estarían todas aquellas proteínas encargadas de “escribir las instrucciones”. En segunda instancia estarían las proteínas que “leerían” dichas instrucciones y las transmitirían. Es en estos dos niveles donde actuarían las proteínas represoras del grupo PcG. Finalmente, en el tercer nivel, todas las proteínas encargadas de “ejecutar o procesar” dichas instrucciones. En esta etapa estarían todas las proteínas efectoras, por ejemplo, las de la familia E2F.

LA FAMILIA DE PROTEÍNAS REPRESORAS POLYCOMB (PcG)

Cada vez hay más evidencia que sustenta la participación de las proteínas del grupo Polycomb (PcG) en la regulación transcripcional de genes implicados en la mayoría de procesos celulares importantes, tales como el control del ciclo celular, la diferenciación y el desarrollo, entre otros^[25]. Por lo que en esta sección se explicará la relevancia de esta familia de proteínas. Los genes del grupo represor PcG y del grupo activador Trithorax (trxG) codifican para co-reguladores epigenéticos antagónicos. Las proteínas PcG en un inicio se identificaron genéticamente en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, como factores requeridos para mantener la expresión correcta en tiempo y espacio de los genes homeóticos a través del desarrollo^[7]. La familia Polycomb consiste de alrededor de 20 proteínas, las cuales pueden formar distintos complejos multiprotéicos que tienen la capacidad de influir en la estructuración de la cromatina vía un arreglo de distintas actividades modificadoras de las histonas^[26,27]. Se ha demostrado que se asocian entre ellas para formar diferentes tipos de complejos represivos, de los cuales a la fecha se ha reportado que existen los que contienen a la proteína Polycomb (Pc), llamados genéricamente: complejo represor Polycomb 1 (PRC1 y PRC1-like), también conocido como complejo de mantenimiento del silenciamiento. De estos

complejos se ha predicho que en vertebrados existen al menos sesenta combinaciones posibles entre las proteínas que conforman PRC1^[28]. También existen los que contienen a la proteína Enhancer de Zeste (E(z)), llamados genéricamente complejo represor Polycomb 2 (PRC2) o complejo de inicio del silenciamiento^[29]. Algunas de las proteínas PcG de *Drosophila* tienen homólogos en humano y en otras especies que incluyen desde plantas, nemátodos, peces hasta aves. En la Tabla I se muestra un compendio de estas proteínas y algunas de sus funciones. El mecanismo de acción de estos complejos se describirá con detalle más adelante, pero de manera muy general se ha demostrado que estos complejos tienen que ser atraídos en forma secuencial a su sitio blanco. El PRC2 es el primer complejo que se recluta y el que inicia el proceso de silenciamiento marcando dicha zona genómica con la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3). Esta marca es “leída” por el complejo represor PRC1 el cual modifica la lisina 119 de la histona H2A para reforzar el silenciamiento, y además favorecer interacciones con otras proteínas represoras como HP1, DNMTs y HMTs^[30].

Además de la regulación de los genes homeóticos, se ha descrito que estas proteínas tienen diversas funciones reguladoras en el control génico de distintos organismos^[31], como en *Drosophila*^[32], mamíferos^[33] y en *Arabidopsis*^[28], donde regulan la proliferación y la diferenciación celular, la capacidad de auto-renovación de las células madre y hasta en los procesos que determinan los distintos linajes celulares. La participación de las proteínas PcG en el mantenimiento de la pluripotencialidad y de la memoria celular, se demostró generando ratones mutantes para estas proteínas y se observó que en estos animales no se formaban adecuadamente las células troncales, o bien, las células ya establecidas mostraban una fisiología y diferenciación celular deficiente^[34]. Del mismo modo, se ha demostrado que las proteínas PcG participan en el control de la transcripción, en el desarrollo, en la organogénesis, la estabilidad genética, la herencia epigenética de los programas de regulación transcripcional y en enfermedades como el cáncer^[25,35]. De hecho, existen varios reportes en la literatura donde estudian a miembros específicos de PcG tales como Bmi1, EZH2 y CBX, en los cuales se demostró que se encuentran desregulados en cáncer presentando una expresión anormal^[36-38], hecho por el que EZH2 y Bmi1 se han ganado el calificativo de oncogenes.

En *Drosophila*, se han caracterizado secuencias en el ADN responsables de reclutar *in vivo* las proteínas PcG que son conocidos como elementos de respuesta a Polycomb o PRE (por sus siglas en inglés: Polycomb Response Element). Se piensa que estos elementos tienen un papel central en el silenciamiento génico y una vez ya establecido, en el mantenimiento de éste a través de las generaciones celulares^[39]. Hasta el año 2007 no se había descrito la existencia de secuencias PRE en mamíferos o en algún otro organismo. La primera evidencia en mamíferos fue descrita por Ku y colaboradores, en 2008, quienes realizaron un

análisis de alta resolución a nivel genómico en células troncales. En este estudio se demostró que los complejos Polycomb están distribuidos generalmente en regiones de genes involucrados en el control del desarrollo. En particular se determinó que el 97% de los blancos de PcG corresponden a islas CpG o regiones ricas en CG, lo cual sugirió que podrían ser sitios de acumulación de los complejos PcG con la capacidad de funcionar como los elementos de respuesta similares a los descritos en *Drosophila*^[40]. Estas evidencias sugieren que proteínas que reconocen y se unan a regiones ricas en CpGs, pueden contribuir al reclutamiento de PcG. No obstante estas regiones carecen de una secuencia determinada que sea recurrente, lo cual podría ser útil para identificar otros candidatos como reclutadores de PcG. En suma, aún es difícil identificar regiones similares a los PREs de *Drosophila* que tengan en los mamíferos la función de reclutar a PcG a sus genes blanco, más aún, es difícil definir las condiciones en las que Polycomb es atraído a secuencias blanco específicas, ya que éstas varían de acuerdo al tipo y contexto celular^[41]. Actualmente existen únicamente tres artículos, incluyendo el de Simon y Kingston, en 2009, que mediante diferentes estrategias

experimentales han definido más claramente la posibilidad de que en mamíferos^[42] y otras especies^[43] existan estas secuencias de reclutamiento de PcG y que además participen en la regulación transcripcional de los genes blanco de PcG. En resumen, este aspecto resulta relevante dado que el definir secuencias tipo PRE pudiera permitir reconocer sitios de acción del complejo Polycomb en el genoma de diversos mamíferos.

Sin embargo, por la información existente sobre la relación entre las familias PcG y E2F, lo cual profundizaré más adelante, y por datos experimentales generados en nuestro laboratorio, sabemos que E2F6 se une al promotor del gen *Rb* y reprime su actividad [Dávalos-Salas *et al.*, datos no publicados], por tal razón, hemos pensado que E2F6 puede ser un fuerte candidato reclutador de PcG hacia sus blancos de acción, en particular, a genes supresores de tumores y contribuir de esta manera a la desregulación génica fundamental en procesos carcinogénicos.

A continuación, se describirán brevemente algunas características de las proteínas que forman cada uno de los dos

Subunidades de PcG en <i>Drosophila melanogaster</i>	Subunidades de PcG en humanos	Complejo al que pertenecen	Dominios identificados en la proteína	Funciones bioquímicas
Polycomb	CBX2(PC1), CBX4 (PC2), CBX6, CBX7 y CBX8(PC3)	PRC1	Cromodominio y dominio 'shadow'	Se une a la H3K27me3
Polyhomeotic	PH1 y PH2 BMI1, MEL18	PRC1	Dominio SAM y dedos de zinc C2-C2	Interacciones de alto orden
Posterior Sex combs	(PCGF2) y NSPC1 (PCGF1)	PRC1	Dedos RING (dedos de zinc C3HC4)	Cofactor de la enzima E3 ubiquitina ligasa y ayuda a compactar polinucleosomas
Sex combs extra	(RING) RING1 y RING1B (RNF2)	PRC1	Dedos RING (dedos de zinc C3HC4)	Enzima E3 ubiquitina ligasa de la H2AK119
Enhancer of Zeste	EZH1 y EZH2	PRC2	Dominio SET, dominio CXC y dominios de homología I y II	Histona metiltransferasa con especificidad para la H3K27
Suppressor of Zeste 12	SUZ12	PRC2	Dedos de zinc C2-H2 y dominio VEFS	Estimula a la Histona metiltransferasa con especificidad para la H3K27
Extra Sex combs and Extra Sex combs-like	EED (variantes con diferentes extremos amino-terminal)	PRC2	Repetidos WD	Estimula a la Histona metiltransferasa con especificidad para la H3K27
Nucleosome remodeling factor 55 (p55 and CAF1)	RBAP48 (RBBP4) y RBAP46 (RBBP7)	PRC2	Repetidos WD	Se une a las histonas
Polycomb-like	PHF1 (PCL1), MTF2 (PCL2) y PHF19 (PCL3)	Une a PRC2	Dos dedos PHD y un dominio Tudor	Estimula la trimetilación de H3K27 y recluta a PRC2

Tomado de Simon & Kingston^[41].

Tabla 1. Funciones de las proteínas Polycomb en *Drosophila* y humano y los complejos que forman.

complejos represores de Polycomb, esto con la finalidad de entender mejor cómo se induce la formación de cromatina inactiva o compacta.

Complejo de inicio del silenciamiento o complejo represor Polycomb 2 (PRC2)

Como se mencionó antes, el primer grupo de proteínas Polycomb, el cual inicia el proceso de silenciamiento es el complejo represor Polycomb 2 (PRC2) o complejo de inicio del silenciamiento. El PRC2 está conformado por diferentes proteínas de la familia PcG (Figura 3), sin embargo, la proteína central de este complejo es Enhancer de zeste 2 (EZH2), que es una metiltransferasa de histonas específica de lisina (HKMT), que cataliza principalmente la trimetilación de la lisina 27 (H3K27me3)^[44]. Así mismo, EZH2 también cataliza la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) y la metilación de la lisina 26 de la histona H1 (H1K26), marcas de cromatina cerrada, aunque en menor proporción que la H3K27me3^[45].

En el complejo PRC2, además de EZH2, existen otras proteínas que forman parte del núcleo del complejo y que son esenciales para su actividad catalítica, como Supresor de Zeste 12 (SUZ12), la proteína de desarrollo del ectodermo embrionario (EED) y las proteínas de unión a histonas RBAP46/ RBAP48^[46]. Algunos de estos componentes regulan a EZH2, por ejemplo EED es una proteína que contiene un dominio repetido WD40, motivo de triptófano y aspartato que favorece la interacción proteína-proteína, de la cual existen diferentes isoformas. Cada una de estas isoformas le confieren a EZH2 especificidad por el sustrato^[47]. Así mismo, recientemente se descubrió que SUZ12 ocupa una porción importante de promotores de genes necesarios para la diferenciación de las células troncales, donde también se encontró la variante de histona H2A.Z. De esta manera, se estableció que la colocalización de las proteínas, EZH2 y SUZ12 con H2A.Z resulta en la formación de cromatina especializada

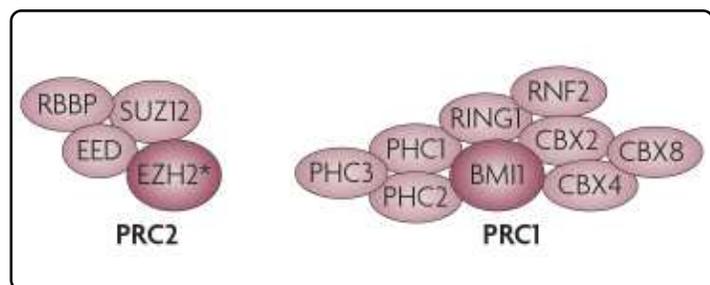


Figura 3. Representación gráfica de los componentes peptídicos que conforman a los complejos represores Polycomb. Del lado izquierdo se muestran las proteínas que conforman el núcleo del complejo represor 2. RBBP: Proteína de unión a Retinoblastoma, también conocida como NURF55 o RBAP48. SUZ12: Supresor de zeste. EED: Proteína del desarrollo embrionario del ectodermo. EZH2: "Enhancer" de zeste homólogo 2. Del lado derecho se muestran las proteínas del complejo represor 1. RNF2: Proteína 2 con dominio "ring finger". RING1: Proteína 1 con dominio "ring finger". PHC: Proteína homóloga de "polyhomeotic". CBX: Proteína homóloga "chromobox". BMI1: "BMI1 polycomb ring finger oncogene". Tomado de Mills⁴⁸.

con una señalización epigenética específica, necesaria para la ejecución apropiada de los programas de expresión durante el desarrollo^[49].

El siguiente paso en todo el proceso de silenciamiento iniciado por PcG es llevado a cabo, como se mencionó antes, por otro conjunto de proteínas de esta misma familia, el complejo de mantenimiento PRC1.

Complejo de mantenimiento o complejo represor Polycomb 1 (PRC1)

En mamífero, las cuatro subunidades que forman el núcleo de PRC1 son PHC, CBX, BMI1 y RING1 que en *Drosophila melanogaster* son los homólogos de Ph, Pc, Psc, y dRing, respectivamente (Figura 3). Así mismo, en mamíferos hay al menos cuatro parálogos de la proteína con dominio "Ring finger" Psc, que son: BMI1, Mel18, MBLR y NSPc1. Un aspecto relevante es que éstas interactúan con otras proteínas PcG para formar subtipos de complejos PRC1, por ejemplo NSPc1 y RING1B son parte del complejo represor BCOR^[50], mientras que MBLR y RING1B están relacionados con E2F6 con funciones represoras^[51]. Cabe resaltar que la importancia de que se formen diferentes sub-complejos de PcG radica en que de esta manera se asegura una diversificación de blancos de Polycomb. En la Tabla I se describen más funciones de cada una de estas proteínas.

Otra de las funciones que se le han atribuido al complejo PRC1 y sus variantes, es la actividad de monoubiquitinar la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119Ub), una modificación relacionada con cromatina cerrada o compacta y que contribuye en el proceso de silenciamiento. Aunque existen cuatro proteínas del complejo PRC1 con dominios "Ring finger", se ha demostrado que sólo RING1A y RING1B son las que llevan a cabo la ubiquitinación de proteínas histonas^[52] y la auto-ubiquitinación para su propia regulación^[53]. También se sabe que RING1B participa en la regulación de genes que controlan la embriogénesis, el desarrollo y la inactivación del cromosoma X, donde una de las modificaciones características es la H2AK119ub1^[54,55], además existen evidencias que sugieren que esta participación puede ser vía ARNs no-codificantes^[56].

Por otra parte, datos bioquímicos sugieren que la familia de proteínas CBX, homólogos de la proteína Pc de *Drosophila*, las cuales contienen un cromodominio, son clave para la función del complejo PRC1 dado que reconocen y se unen diferencialmente a las histonas con las marcas H3K27me3 y H3K9me3. En consecuencia, esta acción contribuye a destinar a los complejos PRC1 a diferentes blancos de acción y así mantener el silenciamiento iniciado en estas regiones^[57].

Dada la relevancia de PcG y la creciente participación de los ARNs no-codificantes en la mayoría de los procesos

celulares, es importante resaltar que tanto PRC1 como PRC2 pueden interactuar con estos ARNs no-codificantes y ser dirigidos a sus sitios blanco. Recientemente se ha demostrado que SUZ12 interactúa con el ARN no-codificante llamado HOTAIR^[58] y que EZH2 interactúa a través de un dominio específico identificado recientemente llamado ncRBD1^[59]. Así mismo, se demostró que un complejo EED-EZH2 se une al ARN no-codificante Kcnq1ot1 para silenciar regiones específicas del genoma durante el desarrollo embrionario^[60].

En conclusión, resulta importante resaltar la existencia de diferentes combinaciones peptídicas de los complejos Polycomb que son atraídos a sus sitios blanco a través de diferentes factores de transcripción como las que se mencionan aquí, en particular E2F6 o incluso por ARNs no-codificantes, confiriendo al grupo PcG su especificidad y diversidad de blancos involucrados en una amplia gama de procesos celulares.

El mecanismo de acción de los complejos Polycomb

En mamíferos, a diferencia de lo que ocurre en *Drosophila*, ninguna de las proteínas del complejo PcG tiene dominio de unión al ADN, por lo que el complejo PRC2 necesita ser atraído a su sitio blanco. Existen varios estudios donde se relaciona a proteínas como el factor Yin Yang (YY1), OCT4, SOX2 y NANOG y co-factores asociados como potenciales reclutadores del complejo PcG^[61,62], sin embargo, los datos bioquímicos son insuficientes para asignarles por completo el papel de reclutadores de los complejos Polycomb. En lo particular, una asociación de PcG que ha sido mejor investigada es la que ocurre con el factor E2F6. De manera importante se ha demostrado que E2F6 puede reclutar a BMI1^[19], RING1A, RING1B^[63] y EPC1-EZH-2^[64]. Con las evidencias señaladas de que en mamíferos existen factores específicos que son capaces de atraer a PcG a sus sitios de acción, en especial con la capacidad de E2F6 de unirse a varias proteínas PcG, se puede especular sobre lo importante que es, por un lado, que un solo factor, el cual interviene en múltiples procesos y etapas celulares, sea el que dirige o determine los genes que podrían regularse. Por otra parte, no se sabe o aún no se tiene claramente definido el dominio de interacción entre E2F6 y PcG, pero es muy atractivo pensar o sugerir que PcG también pueda unirse a otros miembros de la familia E2F, dada la similitud entre todos los factores E2F (Figura 1). Lo cual ayudaría a explicar la participación temporal del grupo PcG en diversos procesos específicos durante el desarrollo. A continuación integraremos lo que se sabe de las familias E2F y Polycomb con los mecanismos más generales involucrados en la regulación del silenciamiento génico.

CONTRIBUCIÓN DE LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS AL SILENCIAMIENTO GÉNICO

La relación entre E2F6 y las proteínas del grupo Polycomb

El gen *E2F6* está localizado en el cromosoma 2 en la región p25.1, está constituido por nueve exones que pueden generar seis

variantes que oscilan entre 770 y 1050 pares de bases (pb) como consecuencia de diferencias en el procesamiento del ARN mensajero. La proteína E2F6 carece de los dominios homólogos amino- y carboxilo-terminal presentes en los factores E2Fs 1 al 5 (Figura 1), los cuales contienen a su vez los dominios de unión con los miembros de la familia Rb, es decir, no se une con las proteínas “pocket”, además de los dominios de transactivación o represión^[16]. Algunas de las modificaciones que se pueden presentar en la variante más común de la proteína son el cambio de ciertos aminoácidos que podrían modificar las características fisicoquímicas de la proteína, teniendo consecuencias en su papel como factor represor en la vía de p16/Rb (Figura 2), aunque esto todavía no ha sido probado experimentalmente.

Recientemente se ha demostrado que la actividad represora de E2F6 es independiente de la asociación con proteínas de la familia de Rb y que ocurre principalmente en genes regulados específicamente en la transición de fases del ciclo celular G1 a S, donde el factor E2F6 es sobre expresado. Además inhibe la entrada y salida de la fase S del ciclo celular^[65]. Este efecto, opuesto al de los otros miembros de la familia, es la manera en la cual E2F6 contribuye a la regulación adecuada del ciclo^[66] y en los procesos de diferenciación y quiescencia, reprimiendo genes específicos necesarios para el mantenimiento de la fase G₀^[19]. En un estudio donde se apoya el papel de E2F6 en la diferenciación y progresión a través del ciclo, se demostró que parte del mecanismo por el cual E2F6 funciona como represor transcripcional es debido a su asociación con PcG^[67]. Datos que apoyan lo anterior demuestran que E2F6 se encuentra co-existiendo con un complejo llamado hPRC-H que se forma específicamente en la fase G₀ del ciclo celular, asociación que se pierde en el desarrollo de un osteosarcoma^[68]. También se ha demostrado la relación con otras proteínas como supresor de variegación 3-9 homólogo 1 (Suv39H1)^[50], proteína 6 del grupo polycomb con dominio “ring finger” (PCGF6 o MBLR), factor 2 asociado a YY1 (YAF2)^[63] y metiltransferasas de histonas (HMT), aunque el mecanismo preciso y su función biológica todavía no se entiende completamente^[64,67]. Cabe resaltar que todas estas interacciones están relacionadas con el silenciamiento génico a nivel epigenético en ciertas etapas del ciclo celular. No obstante, E2F6 se expresa durante todo el ciclo, lo cual sugiere que además podría tener un papel funcional en otras etapas del ciclo celular que a la fecha no han sido investigadas^[19,50]. Por ejemplo, hay estudios que involucran a E2F6 en procesos celulares como la meiosis, donde se demostró que el motivo de unión de E2F6 está presente en la región proximal de los promotores del 79.2% de genes específicos de meiosis y que su unión contribuye en la regulación de la expresión de estos genes^[69].

En resumen, toda esta serie de evidencias a nivel epigenético muestran la relevancia del grupo PcG y su relación con el factor E2F6. A su vez, se ejemplifica como su desregulación tiene consecuencias en el desarrollo de procesos críticos de la fisiología celular. Además, existen evidencias claras de su participación en

procesos tumorigénicos, donde la proliferación celular y el control de la expresión génica están totalmente desregulados, contribuyendo así al desarrollo y progresión del cáncer.

EL GEN SUPRESOR DE TUMORES *Rb* Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE CÁNCER

Además de las evidencias claras ya mencionadas del grupo PcG y el factor E2F6 con la desregulación del ciclo celular y, consecuentemente, con el desarrollo de cáncer, existe otro grupo de proteínas íntimamente ligadas al control del ciclo celular, estas son las proteínas supresoras de tumores, por ejemplo, la proteína Retinoblastoma (Rb). En particular, nos interesa resaltar el papel del gen Retinoblastoma (*Rb*), cuyo silenciamiento a nivel epigenético parece estar involucrado en el desarrollo de procesos tumorales. Por tal motivo, es necesario poner en contexto la importancia *Rb*. El gen *Rb* es uno de los genes supresores de tumores más estudiados. Está localizado en el cromosoma 13 en la posición 13q14.2, en la Figura 4 se muestra un panorama del contexto genómico en el que se encuentra *Rb*. Se sabe que las mutaciones que ocurren en el gen *Rb* son claves en el desarrollo de cáncer infantil de retina, además se ha visto que en el 90% de los casos de cánceres humanos la proteína Rb es inactiva o en casos extremos no se sintetiza^[19,70]. El hecho de identificar al gen *Rb* inactivo, llevó a describirlo como un regulador de la proliferación celular. Por otra parte, el descubrimiento de que la sobre-expresión de la proteína Rb ocasionaba que las células fueran arrestadas en la fase G1 del ciclo, mientras que las células deficientes de Rb mostraban una acelerada transición por la fase G1, apoyó fuertemente la idea de que el gen *Rb* era un inhibidor del ciclo celular^[71]. En los casos clínicos de retinoblastoma familiar, se hereda una mutación en *Rb* en la línea germinal, y los individuos afectados desarrollan tumores en la retina cuando se inactiva genéticamente el segundo alelo, lo que se considera como el paso limitante en el desarrollo de cáncer. El estudio de

muchos casos como éste, llevó a Knudson a postular la hipótesis de los “dos hits” la cual establece que se produce un primer evento “primer hit” en la línea germinal que inactiva uno de los dos alelos. Y que la pérdida del segundo alelo “segundo hit” debe ocurrir en un tejido somático para que ahí se desarrolle el tumor^[72]. Actualmente sabemos que la pérdida de cualquiera de los dos alelos se puede producir de diversas maneras, tanto por mutaciones, como por cambios epigenéticos como la metilación^[73-75].

Participación de la interacción de Rb, E2F6 y el grupo PcG en el desarrollo de cáncer

La actividad mejor conocida y más estudiada de la proteína Rb es la capacidad de reprimir la transcripción de los genes regulados por la familia de factores E2F. En la mayoría de las plantas y animales, los miembros de la familia Rb proveen un freno importante en la actividad de los factores E2F, en consecuencia, la ausencia de esta restricción coloca a las células en un estado permisivo para proliferar y preparadas para responder a señales pro-proliferativas. Las proteínas de la familia Rb bloquean la transcripción promovida por los factores E2F activadores (E2F1, 2 y 3) y activan la transcripción de aquellos blancos en complejo con los E2F represores (E2F3b, 4 y 5)^[21]. En la Figura 2 se muestra el papel de la proteína supresora de tumores Rb y de algunos componentes de la vía, lo que en el pasado explicaba que la pérdida de función, básicamente ocurría a nivel de proteína o por mutaciones de su gen. Sin embargo, ahora se sabe, y es lo que queremos resaltar en esta revisión, que la pérdida de función supresora de tumores puede ocurrir mediante acciones epigenéticas orquestadas por Polycomb, los factores E2F (en particular E2F6) y por el mismo Rb, así como por la interrelación con otros factores epigenéticos como HDACs, HMTs, DNMTs y la proteína HP1. Dos ejemplos de la actividad epigenética de la proteína Rb son: el primero, un estudio del locus p16^{INK4A} en

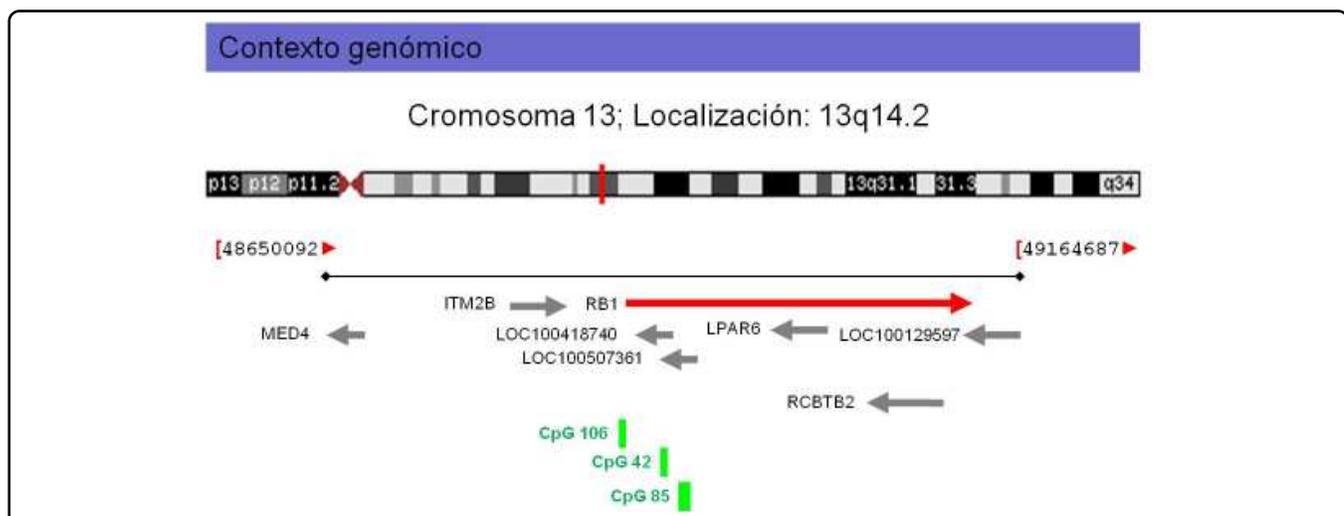


Figura 4. Paisaje genómico del gen *Rb*. Se muestra de arriba hacia abajo la localización genómica de *Rb* y genes adyacentes y las islas CpG asociadas al gen [modificado de <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>].

2007, donde se demostró que la incorporación de la marca H3K27me3 llevada a cabo por PRC2, no ocurría o disminuía en ausencia de proteínas funcionales de la familia Rb^[76]. El otro ejemplo es el descrito por Longworth donde demostró que Rb está involucrado en los procesos de compactación de la cromatina que ocurre en la mitosis, en la senescencia y la formación y/o redistribución de heterocromatina, es decir, Rb y los otros miembros de la familia participan en la formación y organización de dominios transcripcionales^[77].

Sin embargo, como se mencionó, la pérdida de función no sólo ocurre a nivel de la proteína Rb, incluso el gen *Rb* mismo, puede ser desregulado epigenéticamente, lo cual ha sido tema del interés del grupo y es actualmente una de las áreas de investigación. De hecho existen resultados que demuestran que uno de los mecanismos de regulación epigenética del promotor del gen *Rb*, es llevado a cabo por el factor CTCF^[74]. No obstante, existen otros factores que pueden contribuir a esta regulación. Basados en esta hipótesis, realizamos un análisis bioinformático de la secuencia del promotor *Rb* y se identificó un sitio de unión a factores E2F en el cual, en teoría, todos los miembros de esa familia se pueden unir. Sin embargo, sabemos por resultados experimentales, que en particular en el promotor del gen *Rb*, preferentemente E2F6, es el que se une. Así mismo, se investigó el efecto de la sobre-expresión del factor E2F6 sobre la actividad del promotor *Rb* y se encontró que ésta disminuye [Dávalos-Salas *et al.*, datos no publicados]. Integrando las evidencias experimentales que hemos descrito, es factible predecir una interrelación entre las tres familias (Figura 5). Es decir, E2F6 y PcG interactúan y se ha demostrado que esta relación tiene efectos en la expresión de genes y que, en algunos casos, además tiene consecuencias en el desarrollo de cáncer. Por otra parte, la actividad de E2F6 y *Rb* están aparentemente relacionadas, y con estas evidencias podemos postular una posible relación o interrelación Rb-E2F6-PcG, que no sólo explicaría la pérdida de función y/o actividad de *Rb*, sino de otros genes, supresores de tumores o no, que en su región promotora tenga sitios de unión a factores E2F, específicamente E2F6.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Dados los diversos procesos en los que participan los genes regulados por las proteínas de la familia E2F, resulta necesario seguir profundizando en lo relevante de su función dentro de la fisiología celular y, en particular, en la regulación del ciclo celular. La especificidad de los factores E2F por el gen blanco está dada por el subtipo de factor E2F (activador o represor) y por la unión con alguna proteína DP particular. Por otra parte, los factores E2F no clásicos (E2F6, 7 y 8), hasta ahora son los menos estudiados y en los cuales habrá que profundizar más para conocer con mejor detalle su mecanismo de acción y su participación en la represión transcripcional, dado que no interaccionan con las proteínas de la familia Rb, como los E2F clásicos. Así mismo, faltan más estudios para empezar a entender la relación entre reguladores epigenéticos con familias como Polycomb y los diversos

mecanismos de silenciamiento epigenético de los genes supresores de tumores. En particular es necesario profundizar en las relaciones de E2F6 además de PcG, con otros componentes epigenéticos como los ARNs no-codificantes, los complejos remodeladores dependientes de ATP, las HDACs, HMTs y HATs, con la finalidad de enriquecer el conocimiento de sus mecanismos de acción.

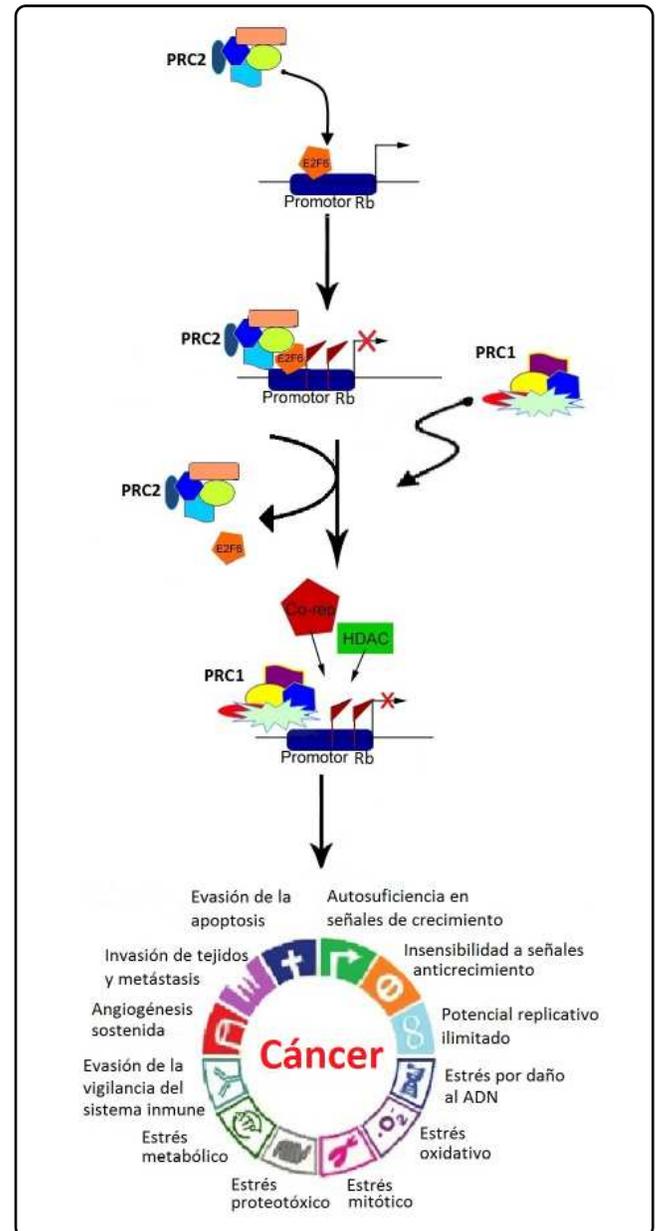


Figura 5. Modelo de un posible mecanismo de inactivación del gen supresor de tumores *Rb*. En la parte superior de la figura se muestra la participación de las proteínas PcG y E2F6 en la inactivación del promotor *Rb*. En la parte inferior de la figura se resumen los posibles cambios que ocurren en el metabolismo y fisiología celular, así como las seis capacidades que adquieren las células transformadas que al acumularse son responsables del desarrollo de tumores.

En relación al grupo Polycomb, se demostró con los ejemplos que se citan, que participa en funciones esenciales en el silenciamiento génico. Uno de los ejemplos más conocidos es la inactivación del cromosoma X. PcG también participa en la organización nuclear y la formación y mantenimiento de dominios de heterocromatina^[31,78], así como su reciente relación con los ARNs no-codificantes y su implicación en la regulación de la expresión génica^[27,79], procesos celulares cruciales que no se abordaron en esta revisión, pero que se deben tomar en cuenta. Es claro que aún queda mucho por conocer acerca de todas las funciones de esta familia de proteínas, en particular su relación con la regulación epigenética.

Respecto a Rb, además de las funciones mejor conocidas como supresor tumoral, en esta revisión se resaltan dos aspectos relativamente nuevos. Primero, la proteína Rb participa como regulador epigenético de algunos genes. Segundo, la inactivación del gen *Rb*, paso crítico en la tumorigénesis, involucra múltiples componentes epigenéticos, entre los que se incluyen las familias E2F y PcG. Aquí proponemos un posible mecanismo de cómo podría ocurrir. Sin embargo, hasta ahora sólo conocemos la punta del “iceberg”, por lo que se debe profundizar aún más en este campo del conocimiento.

En resumen, hemos tratado de sintetizar parte de la información relevante de las funciones que estas tres familias de proteínas, E2F, PcG y “pocket”, desempeñan en un proceso que, si bien no se podría categorizar como el más importante, sí se puede pensar como básico para la conservación de la homeostasis celular, y nos referimos en particular a la regulación de la expresión génica. Sobre todo, quisimos contextualizar su importancia en situaciones celulares anormales, tal como lo es el desarrollo de cáncer. Evidentemente se generan más “¿cómo?” y “¿por qué?” que eventualmente necesitarán ser contestados. Es preciso empezar a profundizar en los campos del conocimiento que recién están emergiendo, como es la participación de los ARNs no-codificantes sean pequeños y largos, en casi todos los ámbitos celulares. Por esta razón, no es difícil pensar que pueden estar relacionados no sólo con la regulación epigenética de la expresión génica, sino además ser el vínculo entre las grandes familias de reguladores epigenéticos, muy probablemente orquestando los principales procesos celulares a través de una fina red de interacciones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (IN214407y IN203811) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: 58767 y 128464). Mercedes Dávalos Salas es becaria del CONACyT (162257) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México (DGEP) y al Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

REFERENCIAS

1. Sherr, C.J. Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235-246 (2004).
2. Luo, J., Solimini, N.L. & Elledge, S.J. Principles of cancer therapy: oncogene and nononcogene addiction. *Cell* **136**, 823-837 (2009).
3. Weinberg, R.A. Tumor suppressor genes. *Science* **254**, 1138-1146 (1991).
4. Spitale, R.C., Tsai, M.C. & Chang, H.Y. RNA templating the epigenome: Long noncoding RNAs as molecular scaffolds. *Epigenetics* **6**, 539-543 (2011).
5. Cairns, B.R. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* **461**, 193-198 (2009).
6. Saha, A., Wittmeyer, J. & Cairns, B.R. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **7**, 437-447 (2006).
7. Maeda, R.K. & Karch, F. The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* **133**, 1413-1422 (2006).
8. Sarma, K., & Reinberg, D. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2), 139-149 (2005).
9. Peters, A.H., *et al.* Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell* **12**, 1577-1589 (2003).
10. Rougeulle, C., *et al.* Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5475-5484 (2004).
11. Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D., & Heard, E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* **303**, 644-649 (2004).
12. Barski, A., *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823-837 (2007).
13. Wasserman, W.W., & Sandelin, A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet* **5**, 276-287 (2004).
14. DeGregori, J., & Johnson, D.G. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr. Mol. Med.* **6**, 739-748 (2006).
15. Dimova, D.K., & Dyson, N.J. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **24**, 2810-2826 (2005).
16. Xu, X., *et al.* A comprehensive ChIP-chip analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members. *Genome Res.* **17**, 1550-1561 (2007).
17. Sherr, C.J., & McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103-112 (2002).
18. Polager, S., & Ginsberg, D. E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* **18**, 528-535 (2008).
19. Oberley, M.J., Inman, D.R., & Farnham, P.J. E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on lysine 9. *J. Biol. Chem.* **278**, 42466-42476 (2003).
20. Di Fiore, B., *et al.* Cytosine methylation transforms an E2F site in the retinoblastoma gene promoter into a binding site for the general repressor methylcytosine-binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* **27**, 2852-2859 (1999).
21. Trimarchi, J.M., & Lees, J.A. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* **3**, 11-20 (2002).
22. Storre, J., *et al.* Silencing of the meiotic genes SMC1beta and STAG3 in somatic cells by E2F6. *J. Biol. Chem.* **280**, 41380-41386 (2005).
23. Christensen, J., *et al.* Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-

- cycle regulated repressor of E2F-activated transcription, *Nucleic Acids Res.* **33**, 5458-5470 (2005).
24. Logan, N., *et al.* E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* **24**, 5000-5004 (2005).
 25. Schwartz, Y.B., & Pirrotta, V. Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 266-273 (2008).
 26. Pien, S., & Grossniklaus, U. Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis, *Biochim. Biophys. Acta* **1769**, 375-382 (2007).
 27. Margueron, R., & Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343-349 (2011).
 28. Whitcomb, S.J., Basu, A., Allis, C.D., & Bernstein, E. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet.* **23**, 494-502 (2007).
 29. Cao, R., & Zhang, Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol. Cell* **15**, 57-67 (2004).
 30. Blomen, V.A., & Boonstra, J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 27-44 (2011).
 31. Lagarou, A., *et al.* dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes Dev.* **22**, 2799-2810 (2008).
 32. Schwartz, Y.B. *et al.* Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genet.* **38**, 700-705 (2006).
 33. Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., & Helin, K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.* **20**, 1123-1136 (2006).
 34. Vincenz, C., & Kerppola, T.K. Different polycomb group CBX family proteins associate with distinct regions of chromatin using nonhomologous protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 16572-16577 (2008).
 35. Wu, J.I., Lessard, J., & Crabtree, G.R. Understanding the words of chromatin regulation. *Cell* **136**, 200-206 (2009).
 36. Honig, A., *et al.* Overexpression of polycomb protein BMI-1 in human specimens of breast, ovarian, endometrial and cervical cancer. *Anticancer Res.* **30**, 1559-1564 (2010).
 37. Suvà, M.L., *et al.* EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res.* **69**, 9211-9218 (2009).
 38. Zhang, X.W., *et al.* Oncogenic role of the chromobox protein CBX7 in gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**, 114 (2010).
 39. Müller, J., & Verrijzer, P. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 150-158 (2009).
 40. Ku, M., *et al.* Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* **4**, e1000242 (2008).
 41. Simon, J.A., & Kingston, R.E. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 697-708 (2009).
 42. Woo, C.J., Kharchenko, P.V., Daheron, L., Park, P.J., & Kingston, R.E. A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. *Cell* **140**, 99-110 (2010).
 43. Liu, Y., Shao, Z., & Yuan, G.C. Prediction of Polycomb target genes in mouse embryonic stem cells. *Genomics* **96**, 17-26 (2010).
 44. Cao, R., *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039-1043 (2002).
 45. Chen, H., Tu, S.W., & Hsieh, J.T. Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* **280**, 22437-22444 (2005).
 46. Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* **16**, 2893-2905 (2002).
 47. Nekrasov, M., Wild, B., & Müller, J. Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of *Drosophila* PRC2. *EMBO Rep.* **6**, 348-353 (2005).
 48. Mills, A.A. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 669-682 (2010).
 49. Creighton, M.P., *et al.* H2AZ Is Enriched at Polycomb Complex Target Genes in ES Cells and Is Necessary for Lineage Commitment. *Cell* **135**, 649-661 (2008).
 50. Gearhart, M.D., Corcoran, C.M., Wamstad, J.A., & Bardwell, V.J. Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6880-6889 (2006).
 51. Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M., & Nakatani, Y. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**, 1132-1136 (2002).
 52. Buchwald, G., *et al.* Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J.* **25**, 2465-2474 (2006).
 53. de Bie, P., Zaaroor-Regev, D., & Ciechanover, A. Regulation of the Polycomb protein RING1B ubiquitination by USP7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**, 389-395 (2010).
 54. de Nápoles, M., *et al.* Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell* **7**, 663-676 (2004).
 55. Schoeftner, S., *et al.* Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J.* **25**, 3110-3122 (2006).
 56. Alder, O., *et al.* Ring1B and Suv39h1 delineate distinct chromatin states at bivalent genes during early mouse lineage commitment. *Development* **137**, 2483-2492 (2010).
 57. Bernstein, E., *et al.* Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2560-2569 (2006).
 58. Hung, T., & Chang, H.Y. Long noncoding RNA in genome regulation: Prospects and mechanisms. *RNA Biol.* **7**, 582-585 (2010).
 59. Kaneko, S., *et al.* Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev.* **24**, 2615-2620 (2010).
 60. Wu, H.A., & Bernstein, E. Partners in imprinting: noncoding RNA and polycomb group proteins. *Dev. Cell* **15**, 637-638 (2008).
 61. Thomas, M.J., & Seto, E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* **236**, 197-208 (1999).
 62. Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G.E., & Sartorelli, V. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* **18**, 2627-2638 (2004).
 63. Sánchez, C., *et al.* Proteomics analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbx110/Jhdml1B histone demethylase and the Bcl6 interacting corepressor. *Mol. Cell.*

- Proteomics* **6**, 820-834 (2007).
64. Attwooll, C., *et al.* A novel repressive E2F6 complex containing the polycomb group protein, EPC1, that interacts with EZH2 in a proliferation-specific manner. *J. Biol. Chem.* **280**, 1199-1208 (2005).
65. Giangrande, P.H., *et al.* A role for E2F6 in distinguishing G1/S- and G2/M-specific transcription. *Genes Dev.* **18**, 2941-2951 (2004).
66. Lyons, T.E., Salih, M., & Tuana, B.S. Activating E2Fs mediate transcriptional regulation of human E2F6 repressor. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **290**, C189-C199 (2006).
67. McLaughlin-Drubin, M.E., Huh, K.W., & Münger, K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *J. Virol.* **82**, 8695-8705 (2008).
68. Deshpande, A.M., *et al.* PHC3, a component of the hPRC-H complex, associates with E2F6 during G0 and is lost in osteosarcoma tumors. *Oncogene* **26**, 1714-1722 (2007).
69. Kehoe, S.M., *et al.* A conserved E2F6-binding element in murine meiosis-specific gene promoters. *Biol. Reprod.* **79**, 921-930 (2008).
70. Hanahan, D., & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
71. Classon, M., & Harlow, E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 910-917 (2002).
72. Knudson, A.G. Jr. Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm. *Semin. Oncol.* **5**, 57-60 (1978).
73. Macleod, K. Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 81-93 (2000).
74. DeLaRosa-Velázquez, I.A., Rincón-Arano, H., Benítez-Bribiesca, L., & Recillas-Targa, F. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res.* **67**, 2577-2585 (2007).
75. Dávalos-Salas, M., *et al.* Gain of DNA methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human *retinoblastoma* gene promoter. *BMC Cancer* **11**, 232 (2011).
76. Kotake, Y., *et al.* pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev.* **21**, 49-54 (2007).
77. Longworth, M.S., & Dyson, N.J. pRb, a local chromatin organizer with global possibilities. *Chromosoma* **119**, 1-11 (2010).
78. Bantignies, F., *et al.* Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in *Drosophila*. *Cell* **144**, 214-226 (2011).
79. Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., & Shimizu, K. MicroRNAs and Epigenetics. *FEBS J.* **278**, 1598-1609 (2011).