



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN
DEL RNA NO CODIFICANTE DEL SATÉLITE α Y SU
ASOCIACIÓN CON LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL
CENTRÓMERO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NANCY GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ



DIRECTOR:

BIÓL. RODRIGO GONZÁLEZ BARRIOS DE LA PARRA

MÉXICO, DF

FEBRERO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Gutiérrez
Hernández
Nancy
59 34 84 88
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
307111375

2. Datos del Asesor

Biól.
Rodrigo
González Barrios
de la Parra

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Víctor Manuel
Valdés
López

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Luis Alonso
Herrera
Montalvo

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Alejandro
Zentella
Dehesa

6. Datos del Sinodal 4

Dr.
Juan
Miranda
Ríos

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de la expresión y localización del RNA no codificante del satélite α
y su asociación con la regulación epigenética del centrómero.

66 p
2015

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis, a cargo del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología bajo la tutela del Biól. Rodrigo González Barrios de la Parra; con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (182997), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IN213311), y el apoyo otorgado por el Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) durante la realización de la tesis.

A mis padres, Ofelia y Ezequiel.

A mis hermanos, Luis, Karla y Brenda.

A Demian.

A mi tía Gloria.

A mis abuelos.

Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma.

- *Julio Cortázar*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor Rodrigo González Barrios de la Parra, por haberme aceptado como parte de su vida académica y haber depositado su confianza en mí. Por su infinita paciencia y enseñanza, por presentarme ante el complejo e increíble mundo de la epigenética.

Al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, por haberme permitido formar parte de su laboratorio y por todo su apoyo brindado.

A cada uno de los integrantes de mi jurado: Dr. Víctor Manuel Valdés López, Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, Dr. Alejandro Zentella, Dehesa, Dr. Juan Miranda Ríos, por sus revisiones y acertados comentarios sobre el trabajo.

A Clementina Castro, una persona que además de tener una paciencia infinita y vocación por enseñar, está llena de calidad humana. Gracias Clemen no solo por todos los consejos que me ayudaron a desarrollar mejor mi trabajo sino por todo el apoyo brindado.

Al Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, por todas sus observaciones y aportaciones al proyecto. Por siempre tener un momento para discutir. Por ser cómplice en mi gusto por la epigenética.

Al M. en C. Víctor Falconi, por su apoyo en los inicios de mi trabajo de tesis.

A Manuel Flores León, quien me facilitó los RNAs aislados de diferentes líneas celulares de cáncer.

A todos los integrantes del laboratorio de Carcinogénesis, por compartir conmigo, su conocimiento, tiempo y amistad. Por hacer divertidos mis días de estancia en el laboratorio.

Al Dr. Dreyfus, a Tere y Javier del 222N, por iniciarme en el mundo de la ciencia.

A mis amigos, mis gentes: Ara, Nancy, Ilse, Diana, Sergio, Martín y Adolfo. A Isai. A Vanessa. A todos ustedes gracias por compartir conmigo el fandango de la vida, por su incomparable apoyo, cariño y confianza.

A todas las buenas personas que me he encontrado hasta hoy, y que han contribuido a la forma en que percibo el mundo.

A mis padres, Ezequiel y Ofelia, por ser mi principal motor, aliento y guía. Por su incondicional e infinito apoyo y amor. Estoy y estaré eternamente agradecida con ustedes porque a ustedes les debo lo que soy hoy.

.A mis hermanos Luis, Karla y Brenda, por siempre estar, porque son quienes me levantan y me extienden la mano para ayudarme a seguir avanzando. A Demi, porque llegaste a llenar mi vida con sonrisas y esperanza.

A mi tía Gloria, mi infancia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Genética y epigenética del centrómero	3
HP1 y su importancia en la estabilidad cromosómica	10
Los RNA no codificantes	13
Antecedentes directos	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	17
Objetivos particulares	17
MÉTODO	17
RESULTADOS	27
Expresión de los transcritos centroméricos en líneas celulares estables y con inestabilidad cromosómica	27
Efecto dosis respuesta del tratamiento con TSA en la viabilidad celular y en la expresión del ncRNA del satélite α	30
Localización celular de los transcritos centroméricos	32
Predicción de la unión de la proteína HP1 α a RNA	38
Interacción de los transcritos centroméricos con la proteína HP1 α	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
PERSPECTIVAS	45
REFERENCIAS	46
ANEXO I	54
MÉTODO EN EXTENSO	54

ABREVIATURAS

ACA: Anticuerpo anti-centrómero

CAD: CENP-A distal.

CAF1: Chromatin Assembly Factor 1

CBX: Chromobox homolog

CCAN: Constitutive Centromere- Associated Network o Red constitutiva asociada al centrómero.

CENP-A: Proteína centromérica A

CENP-C: Centromere

CID: Drosophila CENP-A homolog

HJURP: Holliday Junction Recognition Protein

HORs: Repetidos de orden más alto

HP1: Proteína de Heterocromatina 1

INCENP: Inner Centromere Protein

MALAT1 Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript

NAC: Nucleosome associated Complex Complejo asociado al nucleosoma

ncRNA: RNA no codificante

RIP: Inmunoprecipitación de RNA

RNA-FISH: Hibridación fluorescente *in situ* de RNA.

SetDB1: SET domain Bifurcated 1

Suv39h1: Supressor of variegation 3-9 homolog 1.

TSA: tricostatina A

RESUMEN

El centrómero es el locus del cromosoma donde se ensambla el cinetocoro. Se ha observado que el mantenimiento de la cromatina de dicha región es esencial para una adecuada segregación cromosómica durante la división celular. Se ha descrito la transcripción de RNAs no codificantes (ncRNA) a partir de secuencias repetidas del centrómero, los cuales presentan una función importante en el ensamblaje del cinetocoro y su desregulación se ha asociado a errores en la segregación de los cromosomas. El objetivo de este trabajo fue observar la expresión y la localización del ncRNA satélite α , así como su asociación con la proteína HP1 α . Encontramos una transcripción diferencial en las líneas de distintos tipos celulares tanto cromosoma específico como a nivel global. Observamos una sobre-expresión significativa del ncRNA satélite α específico del cromosoma 1 y también a nivel global en la línea celular HCT116 en comparación con la línea no tumoral WI-38. Estas diferencias encontradas sugieren que la transcripción de este ncRNA es tejido específico y cromosoma específico. Con el fin de entender si la cromatina centromérica regula la transcripción de dicho ncRNA, se realizaron curvas de tratamiento dosis-respuesta con tricostatina A (TSA) y observamos una sobre-expresión del ncRNA a 16 y 24 h, lo que sugiere que la transcripción se favorece cuando las desacetilasas de histonas son inhibidas, asociándose a un estado de cromatina hiperacetilada. Por otra parte, evaluamos la localización celular de estos transcritos mediante RNA-FISH y observamos una localización nucleolar en la línea celular WI-38, mientras que en las células HCT116 se observó principalmente una localización citoplasmática y en menor proporción, nuclear. Este patrón de localización no cambió en condiciones de tratamiento con TSA 500 nM por 24 h, a diferencia del cambio observado en la localización de HP1 α y CENP-A analizado

mediante RNA-FISH e inmunofluorescencia. Finalmente, encontramos la interacción de la proteína HP1 α con el ncRNA satélite α mediante inmunoprecipitación de RNA (RIP). Estos resultados en conjunto sugieren que la transcripción del ncRNA satélite α podría estar regulada por la acetilación de las histonas. Estas modificaciones post-traduccionales de las histonas, podrían a su vez provocar una remodelación de la cromatina, evidenciada por el cambio que observamos en la localización de HP1 α y CENP-A. Por otra parte, la interacción de HP1 α con dicho ncRNA indica que este transcrito podría estar involucrado en la formación y estabilidad de la cromatina centromérica y pericentromérica.

INTRODUCCIÓN

El centrómero es una región característica de los cromosomas eucariontes donde se forma el cinetocoro, un complejo proteico al cual se anclan los microtúbulos que median el movimiento de los cromosomas lo que lo hace esencial para asegurar una correcta segregación de las cromátidas hermanas durante la división celular (Cleveland et al., 2003). La identidad de esta región está dada por la sinergia de la secuencia del DNA y las modificaciones epigenéticas presentes que le confieren función, estructura y estabilidad (Plohl et al., 2014; Stellfox et al., 2012; Sullivan y Karpen, 2004).

Genética y epigenética del centrómero

Aunque evolutivamente la función del centrómero está conservada en los organismos, la secuencia de DNA ha evolucionado rápidamente por lo que es especie-específica e incluso varía de cromosoma a cromosoma (Hayden, 2012; Plohl et al., 2014). En seres humanos, el centrómero está conformado por arreglos complejos de secuencias repetidas ricas en adeninas y timinas, cuya unidad básica es el satélite α , el cual está constituido por un monómero de 171 pb que se repite en tándem formando unidades más grandes denominadas HORs (higher-order repeat o repetidos de orden más alto), las cuales se expanden hasta 5 Mb a lo largo del centrómero (Figura 1) y cuyos monómeros son 97-100% idénticas. Existen otros tipos de satélites α que son altamente divergentes (~70% de identidad entre monómeros) y se encuentran con poca frecuencia, llamados monómeros. También hay secuencias repetidas diferentes a las del satélite α como elementos L1 y elementos *Alu* (Hayden, 2012; Rudd y Willard, 2004; Manuelidis y Wu, 1978; Manuelidis, 1978; Willard y Wayne, 1987).

entre los cromosomas acompañados por múltiples eventos de amplificación, pudieron haber originado estos complejos arreglos en las secuencias centroméricas (Alexandrov et al., 1988).

Tabla 1. Clasificaciones de familias del satélite α y distribución en los cromosomas humanos.

Familia supracromosomal (Alexandrov et al., 1991)	Cromosomas	Familia (Hayden, 2012)	Cromosomas
1	1, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 16 y 19	J1/J2	1, 3, 5, 6, 10, 12, 16, 19
2	2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 18, 20, 21 y 22	D1/D2	2, 4, 8, 9, 13, 14, 15 18, 20, 21, 22
3	1, 11, 17 y X	W1-5	1, 11, 17, X
		M	7, 13, 14, 21, Y
		R1/R2	5, 13, 14, 19, 21

J1/J2 familia dimérica 1, D1/D2: familia dimérica 2; W1-5: familia pentamérica; M: familia monomérica 4; y R1/R2: familia irregular 5.

Otra de las características de los centrómeros humanos es que los monómeros de la familia I tienen embebida una secuencia de 17 pb denominada caja CENP-B la cual es reconocida por la proteína CENP-B; proteína indispensable para el ensamblaje de proteínas del centrómero como CENP-C y CENP-E, así como la formación *de novo* de la cromatina centromérica (Ando et al., 2002; Masumoto et al., 1989; Ohzeki et al., 2002).

A pesar de que la secuencia del DNA en el centrómero no está conservada, existe una proteína como común denominador en el centrómero de todos los eucariontes: una variante de la histona 3 conocida como CID en *Drosophila melanogaster*, Cse4 en *Saccharomyces cerevisiae* y CENP-A (CENTromere Protein-A) en mamíferos. Lo que diferencia a CENP-A de la histona 3 (H3) es el extremo N- terminal en donde existe la mayor divergencia en la secuencia de aminoácidos de la proteína; comparado con el extremo C-terminal donde comparten el 60% de los aminoácidos (Sullivan et al., 1994).

Los nucleosomas que contienen CENP-A se asocian principalmente con secuencias de la familia I del satélite α (Ando et al., 2002). Estos nucleosomas a su vez se encuentran formando dominios intercalados con dominios de nucleosomas que contienen a la histona 3 (Blower et al. 2002). Tal posicionamiento, confiere un arreglo peculiar en los cromosomas mitóticos, en el que los nucleosomas con CENP-A quedan hacia el exterior del cromosoma, donde se ensambla el cinetocoro, y los nucleosomas que contienen H3 quedan hacia el interior del cromosoma. Este arreglo podría definir los bordes de la cromatina centromérica que contiene CENP-A y evitar que se expanda a las regiones adyacentes (Blower et al., 2002).

Se ha propuesto que el centrómero se determina epigenéticamente ya que se ha observado la formación *de novo* de centrómeros (neocentrómeros) en regiones que carecen de repetidos del satélite α (Barry et al., 1999; Choo, 1997) y se ha reportado a CENP-A como un elemento epigenético clave para el ensamblaje del precinetocoro en donde se reclutan proteínas del CCAN (Constitutive Centromere-Associated Network o red constitutiva asociada al centrómero) para el ensamblaje del cinetocoro (Hooser et al., 2001; Hori et al.,

2008; Warburton et al., 1997). El CCAN es un complejo que tiene una función de andamiaje siendo el centro estructural en donde se ensamblan las proteínas del cinetocoro (Hori et al., 2012). El CCAN está compuesto por 16 proteínas: CENPs -C, -H, -I, -K hasta la -U, -W y -X (McAinsh y Meraldi, 2011) y se dividen en dos sub-complejos con respecto a CENP-A: NAC (nucleosome associated complex o complejo asociado al nucleosoma) conformado por CENP-M, -N, -U, -T, -C y -H y CAD (CENP-A distal) conformado por CENP-I, -K, -L, -Q, -R, -S, -O y -P. (Foltz et al., 2006; Mellone et al., 2006).

Recientemente se describió otro complejo compuesto por las proteínas CENP-T-W-S-X, el cual genera un heterotetrámero parecido a un nucleosoma que envuelve alrededor de 100 pb de DNA, la presencia de éste es importante para la formación del cinetocoro teniendo una función de andamiaje (Nishino et al., 2012). Mediante inmunofluorescencias en fibras de cromatina y microscopía de alta resolución, Abreu y colaboradores (2010) observaron que CENP-T se intercala entre los dominios de CENP-A. Por otra parte, se ha descrito con tratamientos de cromatina con MNasa e inmunoprecipitaciones, una asociación de CENP-W y CENP-T con H3 pero no con CENP-A. Esto sugiere que los complejos CENP-T-W-S-X se intercalan con los nucleosomas CENP-A asociándose con los complejos H3, brindando una unión directa con la cromatina para el establecimiento de cinetocoro (Hori et al., 2008).

La cromatina del centrómero tiene otras peculiaridades debidas a la presencia de modificaciones post-traduccionales de histonas tanto de eucromatina como de heterocromatina (Sullivan y Karpen, 2004). Entre estas se encuentran la H3K4me2, H3K9me2, H3K36me2, la hipometilación en las histonas 3 y 4 durante interfase y mitosis

y H3T3ph, H3S10ph solo durante mitosis (Bergmann et al., 2011; Hendzel et al., 1997; Lam et al., 2006; Sullivan y Karpen, 2004) (Figura 2).

CENP-A presenta diferentes modificaciones post-traduccionales en los aminoácidos del extremo N-terminal: fosforilación de la serina 7 (CENP-AS7ph) por la cinasa Aurora B (Zeitlin et al., 2000; 2001), fosforilación de la serina 16 y 18 (CENP-AS16ph y CENP-AS18ph) y trimetilación de la glicina 1 (CENP-AG1me3) (Bailey et al., 2013). Se ha reportado que la fosforilación en el N- terminal de CENP-A es importante para la segregación de los cromosomas (Bailey et al., 2013) y para la citocinesis (Zeitlin et al., 2001), lo que resalta la importancia del mantenimiento de las características únicas que hay en la cromatina del centrómero.

El centrómero se encuentra flanqueado por la región pericentromérica cuya integridad es importante para la estabilidad del genoma y la propia segregación de los cromosomas (Kellum y Alberts, 1995; Peters et al., 2001). Está formada por secuencias repetidas en tándem de los satélite 1, 2 y 3, así como β y γ (Figura 1) (Barry et al., 1999). La cromatina de esta región se diferencia de la centromérica porque está enriquecida con metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de las histonas H3K9me2/3, H4K20me3, hipoacetilación de histonas H3 y H4 y la presencia de la proteína de heterocromatina 1 α y β (HP1 α y HP1 β) (Figura 2) (Jeppesen et al., 1992; Maison y Almouzni, 2004; Maison et al., 2002). Otro componente fundamental para la formación y mantenimiento de la heterocromatina es la proteína HP1 cuyo parálogo HP1 α SUMOilada, interactúa con transcritos de la cadena sentido de los repetidos del satélite mayor en murinos y esta

interacción conlleva a la deposición *de novo* en la heterocromatina pericentromérica (Maison et al., 2011).

Estas modificaciones crean un ambiente de heterocromatina que, a pesar de ser muy compacta, se ha reportado transcripción de RNAs no codificantes a partir de las secuencias repetidas en diferentes organismos y estos transcritos están implicados en la formación y el mantenimiento de la heterocromatina (Eymery et al., 2009; Grewal y Elgin, 2007; Lehnertz et al., 2003; Lu y Gilbert, 2007; Probst et al., 2010; Volpe et al., 2002). La proteína HP1 y los RNAs no codificantes centroméricos serán descritos a detalle en los siguientes subtemas.

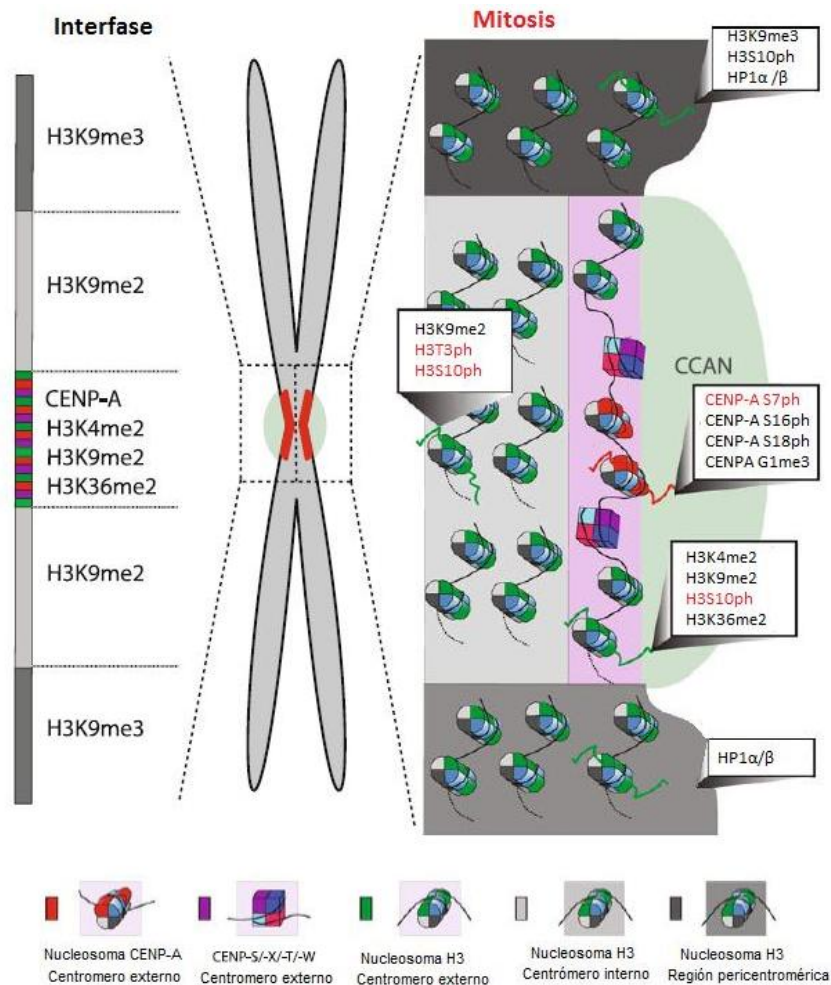


Figura 2. Epigenética del centrómero. El centrómero tiene elementos epigenéticos que lo caracterizan del resto de la cromatina. Tiene nucleosomas con CENP-A intercalados con nucleosomas H3 y complejos proteicos CENP-S-X-T-W que forman heterotetrámeros parecidos a nucleosomas. Las histonas H3 tienen las modificaciones post-traduccionales H3K9me2, H3K4me2 y H3K36me2 en interfase y mitosis además de H3T3ph y H3S10ph solo en mitosis. CENP-A también presenta modificaciones post-traduccionales en el extremo N-terminal: CENP-A S7ph, S16ph, S18ph y G1me3. Así como la presencia de las proteínas HP1 α/β . El centrómero está flanqueado por la región pericentromérica que está enriquecida por H3K9me2/3, HP1 α/β , hipacetilación de las histonas y metilación de DNA. Imagen modificada de Stellfox, Bailey, y Foltz, 2013.

HP1 y su importancia en la estabilidad cromosómica

HP1 (Heterochromatin Protein 1) es una proteína conservada en los organismos eucariontes que, como lo indica su nombre, se encuentra en regiones de heterocromatina propagándola y manteniéndola (Loyola et al., 2009; Maison y Almouzni, 2004). En seres humanos hay tres parálogos: HP1 α , HP1 β y HP1 γ , las cuales son codificadas por los genes CBX5 (ID: 23468), CBX1 (ID: 10951) y CBX3 (ID: 11335), respectivamente. Estas proteínas están conservadas en secuencia y en estructura; sin embargo, tienen diferencias en su localización celular. Las tres se han visto en la heterocromatina: HP1 α se asocia principalmente a las regiones pericentroméricas; sin embargo, HP1 γ también se asocia a eucromatina (Maison y Almouzni, 2004; Minc et al., 2000; Nielsen et al., 2001).

Las proteínas HP1 son muy abundantes en la célula y se han asociado con muchas funciones. Reprimen zonas transcripcionalmente activas que están en regiones de eucromatina y de heterocromatina (Eissenberg et al., 1990; Hwang et al., 2001; Nielsen et al., 2001) además, hay evidencia de que podría intervenir en la organización nuclear

mediante el secuestro de zonas transcripcionalmente inactivas hacia la periferia nuclear (Hiragami y Festenstein, 2005; Kourmouli et al., 2000). Por otra parte, está implicado en la regulación de la unión de complejos de cohesina a las cromátidas hermanas en levaduras pero no en seres humanos (Nonaka et al., 2002; Serrano et al., 2009). La diversidad en las funciones y sitios a los que se puede unir esta proteína se debe, además de las diferencias de la secuencia de aminoácidos entre los parálogos de HP1 y las modificaciones post-traduccionales de estos residuos, a la flexibilidad de la conformación de HP1 dada por las proteínas a las cuales se une (Canzio, et al., 2014).

HP1 tiene dos dominios, el dominio cromosombra en el extremo C-terminal y el cromodominio en el extremo N-terminal los cuales se encuentran unidos por la región bisagra (Singh y Georgatos, 2003). El dominio cromosombra es específico de estas proteínas; el cromodominio se encuentra en otras proteínas que participan en la organización de la cromatina y en la regulación génica como Suv39h1 y las proteínas Polycomb (Jones, Cowell, y Singh, 2000). A través del cromodominio, HP1 interacciona con la cromatina uniéndose a la marca de histona H3K9me_{2/3} (Bannister et al., 2001; Lachner, 2001), aunque recientemente se ha visto que la región bisagra y el dominio cromosombra también participan en el reconocimiento de la metilación de la lisina 9 (Mishima et al., 2013). Mientras que el dominio cromosombra puede formar homodímeros o unirse a distintas proteínas formadoras de heterocromatina (Lechner et al., 2005; Maison y Almouzni, 2004). Por su parte, la región bisagra se ha visto que *in vitro* interactúa con DNA, RNA y cromatina (Maison y Almouzni, 2004; Meehan et al., 2003; Muchardt et al., 2002; Sugimoto et al., 1996) (Figura 3).

La formación de la heterocromatina mediada por las proteínas HP1, se da gracias a las múltiples interacciones con otras proteínas a través de su dominio cromosombra. HP1 α forma complejos con CAF1; el cual es un complejo proteico que se encarga de depositar las histonas H3 y H4, actuando de manera acoplada con la síntesis del DNA (Tagami et al, 2004). Asimismo, HP1 interacciona con SetDB1, la cual es una metiltransferasa de la H3, que permite asegurar el mantenimiento de la heterocromatina durante la replicación, en el que tras la deposición de la histona H3 por la chaperona CAF1, SetDB1 monometila la lisina 9 que es sustrato para la trimetilación de la lisina por la metiltransferasa de histonas Suv39h (Loyola et al., 2009). HP1 se une entonces a las lisinas trimetiladas por Suv39h y propaga la heterocromatina uniéndose a otras HP1 por medio de su dominio cromosombra y a metiltransferasas de DNA (Fuks, 2003; Maison y Almouzni, 2004). CENP-C se describe en la siguiente sección.

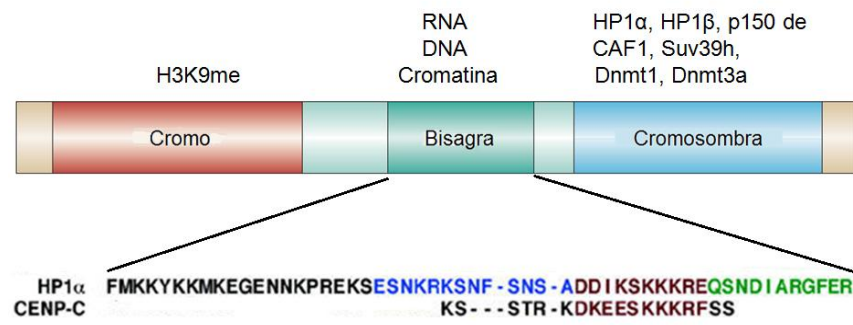


Figura 3. Proteína de Heterocromatina 1. HP1 tiene dos dominios conservados, el cromodominio y el dominio cromosombra que son separados por la región bisagra. En la región bisagra, tiene actividad de unión a RNA y en su secuencia de aminoácidos están conservados los que están en la secuencia con la cual CENP-C interactúa con el RNA. Mediante el cromodominio se une a H3K9me3 y a través del dominio cromosombra se une a otras proteínas HP1, a p150, una subunidad de CAF1, proteína depositadora de H3 y H4, a proteínas DNA metiltransferasas y

Suv39h, una metiltransferasa de histonas. Imagen modificada de Maison y Almouzni, 2004; Muchardt et al., 2002.

Los RNA no codificantes

Los ncRNAs se clasifican de acuerdo con su tamaño y función. Por su tamaño se dividen en pequeños cuando son < 200 nucleótidos y largos cuando son > 200 nucleótidos. Los ncRNA pequeños incluyen microRNAs, siRNAs, snoRNAs, entre otros. Mientras los ncRNA largos (lncRNA) comprenden la mayor parte del genoma en los mamíferos y están involucrados en diversas funciones biológicas. En cuanto a su función se clasifican en ncRNA de señalización, andamiaje, guía y señuelos (Wang y Chang, 2011). Se han descrito diversas funciones de los lncRNA, un ejemplo es el ncRNA Xist que regula la inactivación de uno de los cromosomas X en las hembras de mamíferos (Lee, 2012). Por otra parte, el lncRNA HOTAIR tiene un mecanismo de acción de guía y andamiaje en el que se asocia con los complejos PRC2 y LSD1 los cuales reprimen o activan una región en *trans*, respectivamente (Tsai et al., 2010).

Actualmente han sido reportados ncRNAs que se transcriben a partir de regiones repetidas, como el caso de TERRA (telomeric repeat-containing RNA) que se transcribe en los telómeros (Azzalin et al., 2007), también de la región pericentromérica (Probst et al., 2010) y del centrómero (Chan et al., 2012).

La compactación de la heterocromatina pericentromérica y centromérica representaron durante muchos años un paradigma, debido a que se pensaban transcripcionalmente inactivos. Sin embargo, ahora se ha descrito en dichas regiones, e incluso posibles funciones a los ncRNAs que se generan. Al igual que los transcritos pericentroméricos, los

ncRNAs centroméricos tienen un papel importante en la célula, pues se han visto implicados en la formación del cinetocoro en diferentes especies (Chan et al., 2012; Quenet y Dalal, 2014; Topp et al., 2004). En seres humanos se ha observado que la desregulación de estos transcritos conlleva a cambios en la morfología de la célula y defectos durante la mitosis en donde se observan cromosomas rezagados y husos mitóticos multipolares (Chan et al., 2012; Quenet y Dalal, 2014).

Los ncRNA del satélite α son lncRNAs transcritos por la RNA polimerasa II y su transcripción ocurre principalmente en mitosis y G1 temprana (Chan et al., 2012; Quenet y Dalal, 2014). Recientemente, se observó la interacción de estos transcritos con HJURP (Holliday Junction Recognition Protein), la proteína depositadora de CENP-A, proteína que también interactúa con este ncRNA. A su vez, observaron que el ncRNA satélite α asociado a la interacción con HJURP mide 1.3 kb (Quenet y Dalal, 2014; Wong et al., 2007). Una explicación que se ha dado a las fallas en la segregación tras la inhibición de los ncRNAs del satélite α , es la pérdida de la integridad del centrómero por el reclutamiento deficiente de HJURP y la consecuente falta de deposición de CENP-A al centrómero (Quenet y Dalal, 2014).

Por otra parte, estos transcritos se han visto asociados con las proteínas CENP-C e INCENP (Inner Centromere Protein) en el nucléolo durante interfase y en el centrómero durante mitosis (Wong *et. al.*, 2007). CENP-C interacciona con el ncRNA del satélite α y se sugiere que de esta forma es reclutada hacia el centrómero durante mitosis (Wong *et al.*, 2007). La región bisagra de la proteína HP1, presenta una gran identidad en secuencia con la proteína del centrómero CENP-C en la secuencia **KKSSTRKDKEESKKKRF** (Muchardt *et. al.* 2002) (Figura 3). También, se ha comprobado, que la bisagra de la

proteína HP1 α tiene un motivo de unión a RNA, necesario para formar un complejo riboprotéico en la heterocromatina pericentromérica (Muchardt et al., 2002).

Antecedentes directos

Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado la presencia de la proteína HP1 α en el centrómero de células HCT116 tras tratamiento con tricostatina A (TSA), un inhibidor de desacetilasas de histonas clase I y II (Figura 4), a pesar de la ausencia de la marca H3K9me3, a la cual se une HP1, por lo que se ha sugerido al RNA como un posible mecanismo de andamiaje que mantenga a la proteína en el centrómero. Por otra parte, se ha visto que al hacer tratamiento de 1 mM con este fármaco, aumentan los niveles de expresión de tales transcritos, lo cual podría sugerir que la regulación de su transcripción pudiese ser dependiente de las modificaciones post-traduccionales de las histonas.

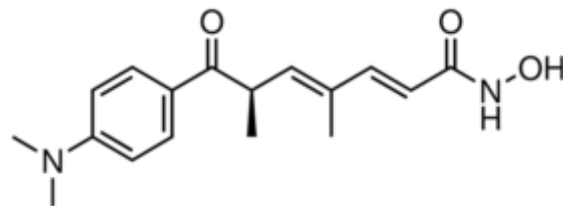


Figura 4. Estructura química del fármaco tricostatina A (TSA).

Lo anterior nos sugiere la importancia que tienen los ncRNAs del satélite α en el correcto ensamblaje del cinetocoro y el mantenimiento de la integridad del centrómero, por lo que creemos que es importante el estudio de la regulación de su transcripción, su localización y la posible asociación con la proteína HP1 α en el centrómero para conocer el mecanismo por el que HP1 puede reconocer específicamente el centrómero, diferenciándolo de otras regiones de heterocromatina constitutiva.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a los errores en la segregación cromosómica que se han observado cuando hay una desregulación en la expresión de los transcritos centroméricos nos interesa saber si en líneas celulares con inestabilidad cromosómica hay una mayor transcripción del ncRNA satélite α que en las líneas celulares estables. Por otra parte, no se encuentra descrito el mecanismo que regula la transcripción del ncRNA satélite α y por antecedentes del laboratorio se sabe que a dosis de 1 mM de TSA ocurre un aumento en la transcripción del satélite α , por lo que nos es de importancia conocer si la expresión del ncRNA satélite α es dosis dependiente al utilizar cantidades nM de TSA, lo que nos permitiría entender más sobre la regulación de su transcripción. También, se ha observado una localización nucleolar del ncRNA satélite α durante interfase; a nosotros, nos interesa examinar también su localización y saber si hay diferencias entre una línea celular no neoplásica y en una neoplásica, abordando la pregunta con un método diferente, así como observar si hay cambios en la localización del ncRNA tanto del transcrito como de las marcas asociadas a heterocromatina. Finalmente, los antecedentes del laboratorio demostraron que al hacer tratamientos con TSA y evaluar la presencia de HP1 α en centrómero, ésta proteína se encuentra presente, aunque hay una disminución de la H3K9me3, marca a la cual se une HP1 α a la cromatina. Ésto, y los estudios realizados en ratón, nos llevan a preguntarnos si HP1 α se une al ncRNA satélite α , funcionando este ncRNA como andamiaje.

HIPÓTESIS

La expresión del ncRNA satélite α en las líneas celulares con inestabilidad cromosómica será mayor que en las líneas celulares estables, y aumentará de manera dosis dependiente

al haber una exposición a cantidades nanomolares de tricostatina A. Por otra parte, en las células HCT116, la localización de dichos transcritos en condiciones sin tratamiento será nuclear y nucleolar durante interfase y se encontrarán en el centrómero durante mitosis, asociados con la proteína HP1 α . Sin embargo, bajo tratamiento con TSA se fomentará su localización nuclear, mientras que HP1 α y H3K9me3 se localizarán en la periferia nuclear.

OBJETIVO GENERAL

Observar la expresión y la localización del ncRNA satélite α en células HCT116 no tratadas y tratadas con tricostatina A, así como su asociación con la proteína HP1 α .

Objetivos particulares

- 1) Evaluar la expresión del ncRNA satélite α en líneas celulares estables y con inestabilidad cromosómica.
- 2) Observar el efecto dosis respuesta del tratamiento con TSA en la viabilidad celular, así como en la expresión del ncRNA satélite α .
- 3) Determinar la localización del ncRNA satélite α y su posible relación con las marcas asociadas a heterocromatina en células tratadas y no tratadas con TSA.
- 4) Examinar la unión del ncRNA satélite α con la proteína HP1 α .

MÉTODO

El material y método en extenso se encuentra en el anexo I.

Cultivos celulares

Los experimentos se realizaron con la línea celular HCT116 (derivada de carcinoma colorrectal) y con la línea celular no cancerosa WI-38. Las células se cultivaron en un ambiente con 5% CO₂ y a 37 °C. La línea HCT116 se cultivó con medio McCoy's, mientras que la línea WI-38 se cultivo con medio EMEM, suplementado con suero fetal bovino (Gibco) al 10% y se agregaron antibióticos (Gibco) al 1%.

Extracción de RNA y análisis de expresión

Se extrajo RNA total de las líneas celulares mediante Trizol (Ambion, USA, 15596-026) . El RNA obtenido fue tratado con DNasa I (Fermentas, USA, #EN021) para quitar los posibles remanentes de DNA. Se hizo la reacción de retrotranscripción utilizando 500 ng de RNA para la curva de expresión de todas las líneas celulares y empleamos 1 µg de RNA para la curva de expresión tras tratamiento con TSA. Se utilizó el Kit GeneAmp (Applied Biosystems, USA, N808-0143) y oligos hexaméricos para obtener el cDNA a partir del cual se hicieron las PCRs en tiempo real. Los resultados fueron analizados mediante el método de $\Delta\Delta CT$ (Livak y Schmittgen, 2001) y se utilizó a GAPDH como gen calibrador.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Satélite α cromosoma 1 (ab85782, Abcam). Tm: 58°C

Sentido 5' AAG GTC AAT GGC AGA AAA GAA 3'

Anti-sentido 5' CAA CGA AGG CCA CAA GAT GTC 3'

Satélite α global. Tm: 61°C

Sentido 5' CTC ACA GAG TTG AAC CTT CC 3'

Anti-sentido 5'GAA GTT TCT GAG AAT GCT TCT G 3'

GAPDH Tm: 62°C

Sentido 5'TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC 3'

Anti-sentido 5'GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG 3'

Tabla 2. Líneas celulares estables y con inestabilidad cromosómica de diferentes tejidos utilizadas en el análisis de transcripción.

Estables	Características	Inestables	Características
WI-38 (ATCC CCL-75)	Tejido: Pulmón Tipo celular: Fibroblastos Morfología: Fibroblasto Enfermedad: Normal Edad: feto de tres meses de gestación Género: femenino Cariotipo: normal diploide	HT29 (ATCC HTB-38)	Tejido: Colon Morfología: Epitelial Enfermedad Edad: adulto Género: femenino Cariotipo: número modal 71 Rango= 68-72
HCT 116 (ATCC CCL-247)	Tejido: Colon Morfología: epitelial Enfermedad: carcinoma colorrectal Edad: Adulto Género: Masculino	SW480 (ATCC CCL-228)	Tejido: Colon Morfología: epitelial Enfermedad: Dukes' tipo B, adenocarcinoma colorrectal Edad: Adulto Género: Masculino

Cariotipo: número modal 45

Cariotipo: Hipotriploide

SW48	Tejido: Colon	OVCAR-3	Tejido: Ovario
(ATCC	Morfología: epitelial	(ATCC	Tipo celular: epitelial
CCL-231)	Enfermedad: Duke's type C, grado IV. Adenocarcinoma colorectal	HTB-161)	Morfología: epitelial
	Edad: 82 años		Enfermedad: adenocarcinoma
	Género: femenino		Edad: 60 años
			Género: femenino
			Cariotipo: Triploide
		MCF7	Tejido: glándula mamaria
		(ATCC	Tipo celular: epitelial
		HTB 22)	Morfología: epitelial
			Enfermedad: adenocarcinoma
			Edad: 69 años
			Género: femenino
			Cariotipo: número modal = 82; rango = 66 to 87.
		SKBR-3	Tejido: glándula mamaria
		(ATCC	Tipo celular: epitelial
		HTB-30)	Morfología: epitelial
			Enfermedad: adenocarcinoma
			Edad: 43 años
			Género: Femenino
			Cariotipo: Hipertriploide número modal 84.

Secuenciación del satélite α y diseño de las sondas del RNA-FISH

Con el objetivo de tener una secuencia específica a partir de la cual diseñar sondas para el RNA-FISH, se secuenció un monómero del satélite α proveniente del cromosoma 1 de la línea celular HCT116. Para este fin, se hizo una PCR punto final utilizando los oligonucleótidos específicos del satélite α del cromosoma 1. El producto obtenido se corrió en un gel de agarosa al 2% y se purificó la banda del gel correspondiente a 171 pb mediante perlas. Posteriormente, se hizo una ligación del producto extraído utilizando el vector de clonación pGEM T-easy (Promega, USA, AI360) (Figura 5).

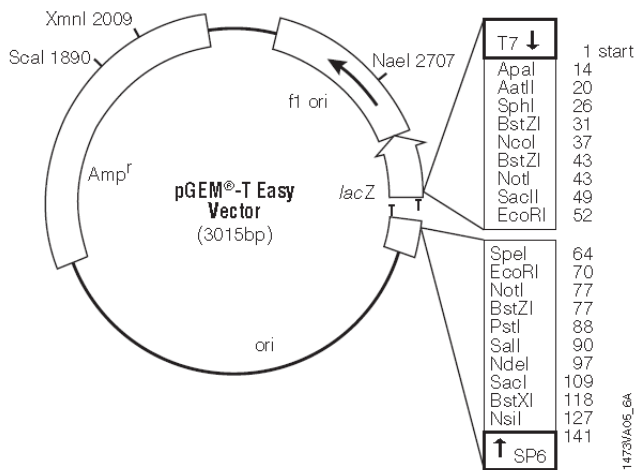


Figura 5. Vector de clonación pGEM - T Easy.

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 α por choque térmico y se sembraron en placas de LB que contenían 100 μ g/ mL de ampicilina, posteriormente se seleccionaron seis clonas de las cuales se purificó el plásmido mediante el método de lisis alcalina por columnas y finalmente se mandaron a secuenciar utilizando el oligonucleótido T7 (Figura 6).

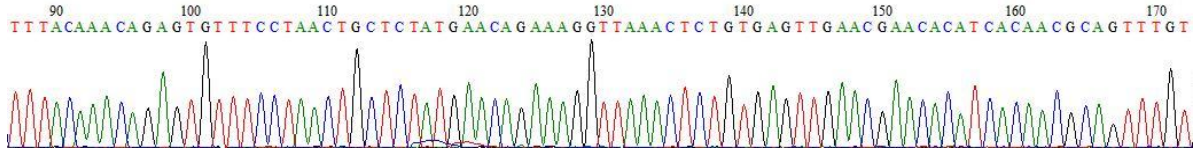


Figura 6. Cromatograma de la secuenciación de una clona del satélite α del cromosoma 1.

A partir de las secuencias obtenidas, se realizó un alineamiento múltiple en la base de datos que pertenece al NCBI para comparar con las reportadas en la base de datos y verificar que nuestras secuencias son específicas del satélite α . Se observó un alto porcentaje de identidad con secuencias del satélite α de humano (Figura 7), lo cual confirmó que las secuencias a partir de las cuales se diseñarían las sondas para el ensayo de hibridación fluorescente *in situ* de RNA (RNA-FISH) son específicas del satélite α . Posteriormente, se diseñaron 25 sondas en el programa ofrecido por la compañía *Biosearch Technologies* (USA), la cual fue proveedora de la producción de las sondas Stellaris®.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Homo sapiens alpha satellite DNA	318	537	100%	1e-83	98%	AJ717298.1
Human alpha satellite DNA, clone pC1.8	313	313	100%	6e-82	97%	M26919.1
Human alphoid repeat (alpha-RI-DNA), clone alpha-72	307	307	100%	3e-80	97%	M18120.1
Human DNA sequence from clone RP11-453B6 on chromosome 1, complete sequence	302	725	100%	1e-78	96%	BX248407.26
Homo sapiens alpha satellite, pZ5.1 probe	274	274	100%	3e-70	94%	AJ295044.1
Homo sapiens alpha satellite DNA, clone H5IFR-21	263	263	90%	7e-67	95%	AM409265.1
Homo sapiens 3'5'EcoRI alpha satellite DNA, clone Me2d2006	241	241	100%	3e-60	90%	AM235767.1
Human alpha satellite DNA, clone pC1.8	235	454	98%	1e-58	97%	M26920.1
Homo sapiens alpha satellite DNA, subclone E1BEcoRI-2	231	231	98%	2e-57	90%	AM409268.1
Homo sapiens chromosome 19 clone LLNLR-255F4, complete sequence	231	1387	100%	2e-57	90%	AC010517.3
Homo sapiens DNA, flanking sequence of putative initiation site for DNA replication, clone: D5_E04	228	443	98%	2e-56	90%	AB761968.1
Homo sapiens alpha satellite DNA, subclone E1BEcoRI-3	228	228	97%	2e-56	90%	AM409269.1
Homo sapiens isolate L4 satellite ALR/Alpha sequence, and retrotransposon MLT1K, complete sequence	226	226	98%	9e-56	89%	KF898897.1
Human alphoid repeat (alpha-RI-DNA), clone alpha-B3	226	226	98%	9e-56	89%	M21871.1
Human alphoid repeat (alpha-RI-DNA), clone alpha-B2	226	226	98%	9e-56	89%	M18123.1
Human alphoid repeat (alpha-RI-DNA), clone alpha-B3	226	226	98%	9e-56	89%	M18122.1
Human alphoid repeat (alpha-RI-DNA), clone alpha-32	226	226	98%	9e-56	89%	M18121.1
Human centromere tandem repetitive DNA	220	220	98%	4e-54	89%	K00901.1

Figura 7. Alineamiento de las secuencias obtenidas del satélite α con la base de datos NCBI.

Localización celular del ncRNA del satélite α

Se estableció el protocolo de RNA-FISH en el cual se utilizaron sondas que tienen acoplado en el extremo 5' el *Quásar*® 570, cuyo espectro de absorción es 548 nm y el de emisión es 566 nm, es decir que tiene una fluorescencia en la región amarillo-naranja del espectro visible. Dichas sondas están mezcladas en un vial y tienen como objetivo unirse al RNA blanco en serie y de esta manera se puede identificar la fluorescencia de múltiples sondas. Como control de la técnica se adquirió una mezcla de sondas para el ncRNA humano MALAT1 (*Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript*) (Stellaris®, Biosearch Technologies, USA, SMF-2035-1). MALAT1 es un lncRNA que se localiza en el núcleo, específicamente en los *speckles* nucleares y participa en la regulación del *splicing* alternativo (Hutchinson et al., 2007; Tripathi et al., 2010).

Para la estandarización de nuestras sondas se hicieron pruebas con diferentes concentraciones (700, 625, 500, 375, 250, 125, 100, 50 y 31.25 nM), tres diferentes temperaturas de hibridación (33, 35 y 37 °C) y dos diferentes tiempos de hibridación (4 y 16 h) en células HCT116 y WI-38. Una vez establecidas las condiciones, se estandarizó la técnica con inmunofluorescencia utilizando como control MALAT1 125 nM y ACA 1:50 (Antibodies Inc., USA, 15-235-F), un anticuerpo anti-centrómeros que tiene acoplado el fluoróforo FITC (Figura 8). En este experimento no se observó co-localización de MALAT1 y ACA, como se esperaba.

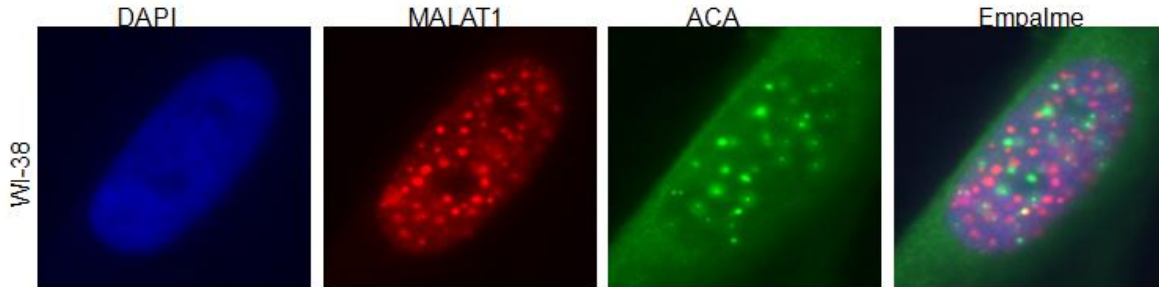


Figura 8. Caracterización de la localización de MALAT1 por RNA-FISH e inmunofluorescencia con el anticuerpo ACA. RNA-FISH utilizando a sondas para MALAT1 el anticuerpo anti-centrómero (ACA).

Para los experimentos de localización y co-localización, las condiciones de hibridación utilizadas fueron de 16 h de incubación a 33°C, utilizando una concentración final de 50 nM de sondas del satélite α y de 125 nM de MALAT1. En los ensayos de inmuno-RNA-FISH se utilizaron los anticuerpos anti-C23 1:50 (Santa-Cruz , US (MS-3) Sc-8031), anti-HP1 α 1:50 (Abcam, UK, Ab77256) y anti-H3K9me3 1:100 (Abcam, UK, Ab8898). Los experimentos se hicieron en células sin tratar y tratadas con TSA 500 nM por 24 h.

Tratamientos con TSA

Se hicieron curvas de tratamientos con TSA (Sigma, USA, T1952-200 μ L) a células HCT116 sembradas en cajas de 96 pozos para el ensayo de viabilidad celular y en cajas p60 para la expresión del RNA. Al concluir el tiempo de tratamiento, se fijaron con etanol en el primer caso y en el segundo caso se extrajo el RNA por el método de Trizol.

Curva de viabilidad

Para medir la viabilidad de las líneas celulares tras el tratamiento con el fármaco TSA (Sigma) se sembraron células en placas de 24 pozos y se realizó un tratamiento de 8 y 16 h

con TSA a una dosis de 50, 100, 200 y 500 nM. Transcurrido el tiempo de cultivo, se fijaron con etanol frío al 70% dejándolas a -20°C durante 10 min. Se retiró el etanol y se dejaron secar. Posteriormente, se agregaron 200 µL de cristal violeta en cada pozo y se dejaron agitando durante 10 min. Se lavó el cristal violeta y se dejaron secar toda la noche. Después, se agregó 200 µL de ácido acético al 33% y se agitó durante 10 min. Se tomaron 100 µL de cada pozo y se pusieron en una placa de 96 pozos la cual fue leída a 595 nm. La densidad óptica (DO₅₉₅) se interpretó en porcentaje de viabilidad.

Curva de dosis respuesta de la expresión del satélite α en células HCT116 tratadas con TSA

Se sembraron células HCT116 en cajas p60 y cuando tenían una confluencia de ~60%, se hizo el tratamiento con TSA a las dosis de 50, 100, 200 y 500 nM durante 8, 16 y 24 h. Transcurrido el tiempo, se extrajo RNA y se siguió el método descrito anteriormente para el análisis de expresión del satélite α .

Predicción de la unión de la proteína HP1 α a RNA

Se hizo un análisis de predicción de unión de residuos a RNA con el programa BindN+ (<http://bioinfo.ggc.org/bindn+/>) con una especificidad definida de 85% (Wang et al., 2010). Se utilizó la secuencia de HP1 α (NP_001120794.1). El programa BindN+ hace la predicción con base en dos criterios: las características bioquímicas y la información evolutiva. Las características bioquímicas que evalúa son el índice de hidrofobicidad, el valor de pKa de las cadenas laterales de los aminoácidos y la masa molecular. Por otra parte, para obtener la información evolutiva, el programa hace un PSI-BLAST de tres iteraciones contra la base de datos UniProtKB. Con estos criterios, el programa nos permite conocer los residuos de aminoácidos que tienen una posible unión a RNA.

Interacción de los transcritos centroméricos con la proteína HP1 α

Se hizo el ensayo de inmunoprecipitación de RNA (RIP) utilizando 10 millones de células HCT116 por inmunoprecipitación a las cuales se les extrajo la cromatina por el método de (Sun y Lee, 2006). Se agregó formaldehído a una concentración final de 1% para llevar a cabo el entrecruzamiento de las interacciones de las proteínas y los ácidos nucleicos y posteriormente se detuvo la reacción con glicina 125 mM. El botón de células se lavó con PBS y se agregó una mezcla de inhibidores de proteasas (Cell Signaling) para evitar la degradación de las proteínas. Se lisaron las células resuspendiendo en la solución amortiguadora A (5 mM PIPES (pH 8.0), 85 mM KCl, 0.5% NP40, 1X mezcla de inhibidores de proteasas, inhibidor de RNasa Superase.In (50U/mL) (Ambion, USA, AM2696), se centrifugó la fracción nuclear y se lavó con solución amortiguadora A sin NP-40, posteriormente se resuspendió en solución amortiguadora B (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH (8.1), inhibidor de proteasas e inhibidor de RNAsas). En esta solución amortiguadora se sonicó la cromatina y se diluyó 10 veces en solución amortiguadora IP (0.01% SDS, 1.1% Tritón X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris (pH 8.1), 167 mM NaCl, inhibidor de proteasas e inhibidor de RNAsas) y se separó 1 mL por cada IP en tubos de 1.5 mL. A cada tubo se agregaron 4 μ g de anticuerpo anti-HP1 α (Abcam, Ab77256) o 8 μ g de anticuerpo anti-CENP-A (Abcam, Ab13939) y 1 μ g de anti-IgG y se dejaron rotando durante 16 h para permitir la formación de los complejos inmunes. Transcurrido el tiempo, se recuperaron los complejos con 50 μ l de perlas A/G y se lavaron cinco veces con el siguiente orden de soluciones amortiguadoras:

1: Lavado Low-salt: (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 150 mM NaCl). 2: Lavado High-salt: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20

mM Tris-HCl (pH 8.1), 500 mM NaCl). 3: Lavado LiCl: 0.25M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.1)). 4: TE pH 8 (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA) 5: TE pH 8.

Se eluyeron los complejos en solución amortiguadora de elución (1% SDS, 0.1M NaHCO₃, Inhibidor de RNAsa (50 U/ml)) y se revirtió la reacción de entrecruzamiento con NaCl y se hizo tratamiento con proteinasa K. Se extrajo el RNA y se detectó mediante RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos del satélite α .

Análisis estadísticos

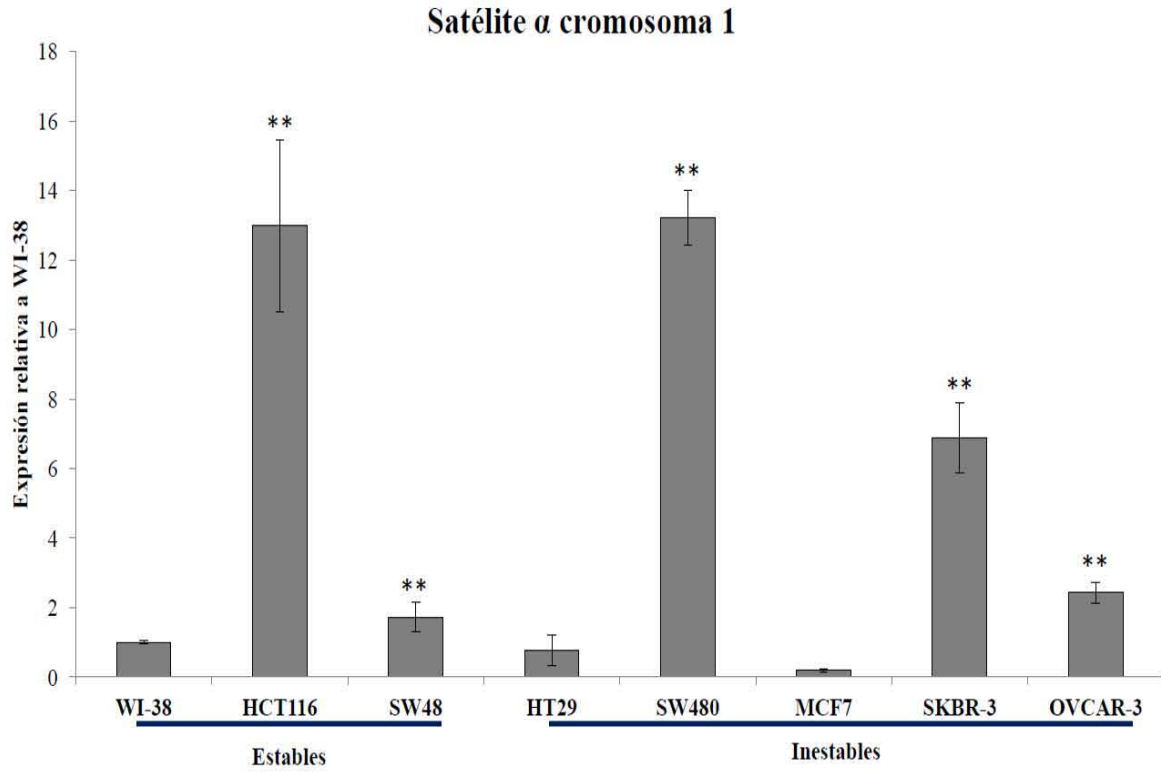
Para determinar si había igualdad de varianzas entre los grupos a comparar, se hicieron pruebas de Levene. Para determinar si había diferencias significativas se hicieron pruebas *T de student* comparando a WI-38 con cada una de las líneas, en el caso de la expresión de las líneas celulares, mientras que en la expresión del satélite α tras tratamiento con TSA se compararon los controles sin tratamiento con cada una de las dosis con un valor de significancia $p \leq 0.05$. Las pruebas estadísticas se hicieron con el programa *SPSS Statistics 21*.

RESULTADOS

Expresión de los transcritos centroméricos en líneas celulares estables y con inestabilidad cromosómica

Dado a los reportes que hay sobre la desregulación del satélite α y el consecuente error en la segregación cromosómica, nos preguntamos si al analizar la expresión del satélite α en diferentes líneas celulares de cáncer estables e inestables (Tabla 2), habría diferencias entre

éstas. Realizamos un análisis de expresión utilizando oligonucleótidos específicos del cromosoma 1 y oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia consenso (Figura 9).



Satélite α global

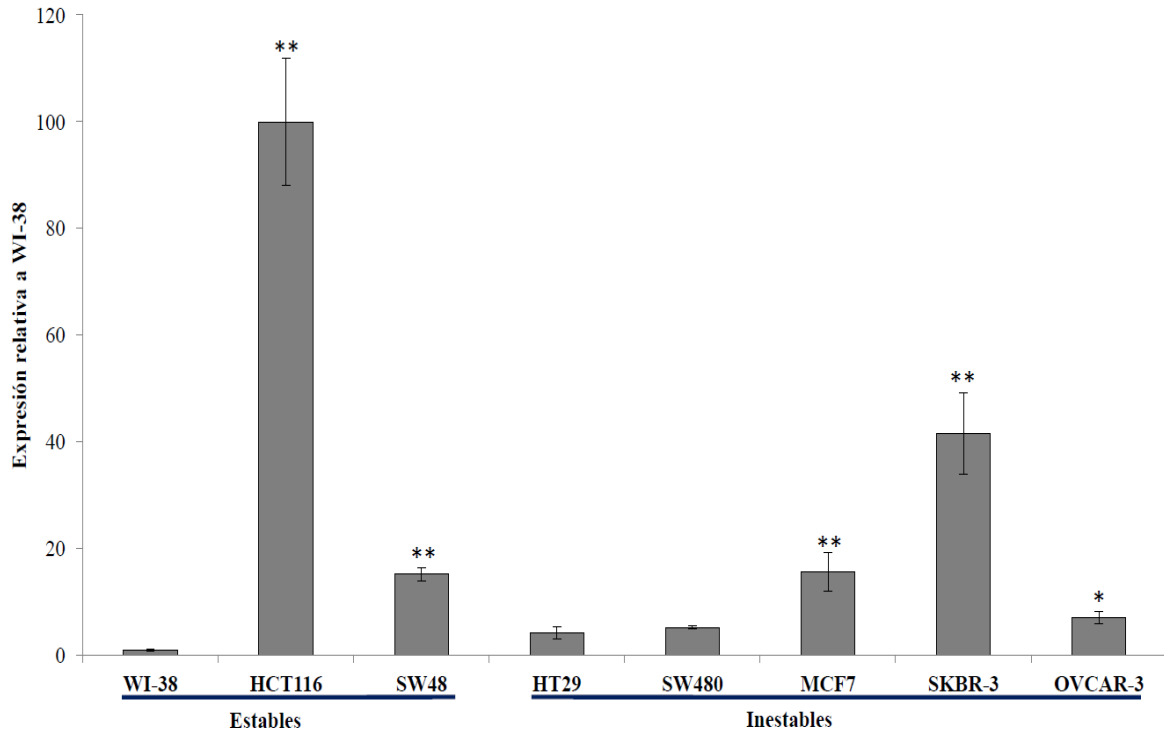


Figura 9. Expresión del satélite α en líneas celulares estables y con inestabilidad cromosómica. El análisis se realizó a partir de triplicados biológicos de cada línea celular y los valores que se muestran indican la expresión relativa a la línea celular normal WI-38 que tiene un valor de 1. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para el satélite α del cromosoma 1 y α global. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. Las barras indican el error estándar.

Con el análisis del satélite α observamos que hay una mayor expresión específica del cromosoma 1 en las líneas HCT116, SW48, SW480, SKBR-3 y OVCAR-3 comparada con la expresión de la línea celular normal WI-38 ($p \leq 0.01$), sin embargo, no se observó ningún patrón de expresión relacionado con el tejido de origen ni con la estabilidad o inestabilidad cromosómica. Incluso se encontraron diferencias entre las líneas celulares que provienen del mismo tejido. Las líneas HCT116 y SW480 se expresan 12 y 13 veces

más que WI-38, mientras que SW48 se expresa 1.7 veces más y HT29 se expresa menos que WI-38.

Al evaluar la expresión del satélite α global se encontraron diferencias significativas en SW48, MCF7, SKBR-3 ($p \leq 0.01$) y OVCAR-3 ($p \leq 0.05$). La expresión global del satélite α tampoco es específica de las líneas celulares estables o inestables y es diferente entre líneas celulares.

Estos resultados nos sugieren que la expresión del satélite α tanto a nivel global como a nivel cromosoma específico es diferente en cada tipo de tejido. Por otra parte, no se observa una expresión diferencial entre líneas celulares estables e inestables cromosómicamente, lo cual sugiere que la sobre expresión del satélite α no está relacionada con la inestabilidad cromosómica.

Efecto dosis respuesta del tratamiento con TSA en la viabilidad celular y en la expresión del ncRNA del satélite α .

La presencia de transcritos en el centrómero o la transcripción del centrómero *per se* son componentes esenciales de la cromatina centromérica. Se ha visto que su desregulación conlleva a errores en la segregación cromosómica (Chan et al., 2012; Quenet y Dalal, 2014). A pesar de la importancia de estos transcritos, se ha estudiado poco sobre la regulación de su transcripción por lo que nos propusimos observar el efecto del fármaco TSA, primero en la viabilidad celular y luego en la transcripción del satélite α . El TSA es un inhibidor de las desacetilasas de histonas y se ha utilizado en estudios de actividad transcripcional (Schlake et al., 1994). Se ha reportado que este fármaco inhibe a las desacetilasas de histonas en concentraciones nanomolares (Yoshida et al., 1990a), por lo

que hicimos tratamientos en células HCT116 con concentraciones nM, utilizando 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM y 1000 nM durante 8, 16 y 24 h (Figura 10). Observamos que la TSA tiene un efecto dosis y tiempo dependiente en la viabilidad celular. A las 8 y 16 h de tratamiento se observa un efecto similar en la viabilidad celular, la cual disminuye alrededor de 20%. En cambio, a las 24 h se observa una disminución del 34-37% a excepción de la dosis de 500 nM en donde disminuye aproximadamente 44%. Cabe resaltar que con ninguna de estas dosis se alcanza el IC50.

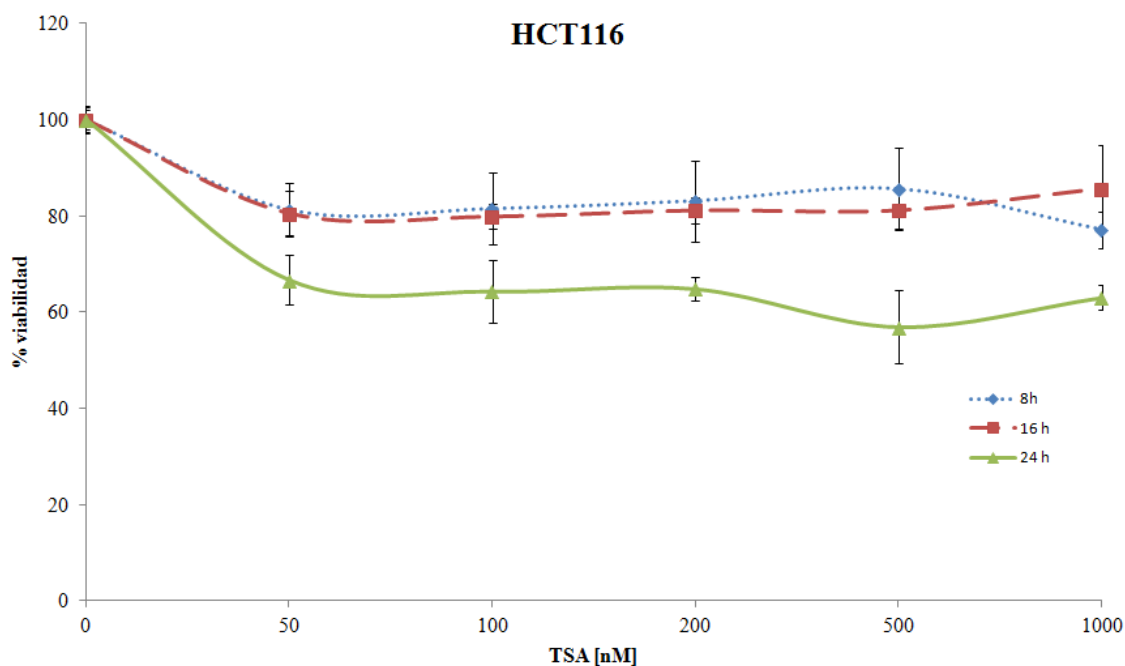


Figura 10. Curva de viabilidad de la línea celular HCT116 utilizando dosis sub-letales de TSA (50, 100, 200, 500 y 1000 nM) durante 8, 16 y 24 h. El ensayo se hizo por triplicado biológico y las barras indican el error estándar.

Por otra parte, se observó que en las células HCT116 hay un aumento significativo en la expresión del ncRNA satélite α tras la exposición a 50, 100 y 500 nM de TSA durante 16 h

y a 50, 100 y 200 nM durante 24 h (Figura 11). Encontramos, en estas dosis, el efecto de la inhibición de HDACs en la regulación de la expresión del ncRNA satélite α .

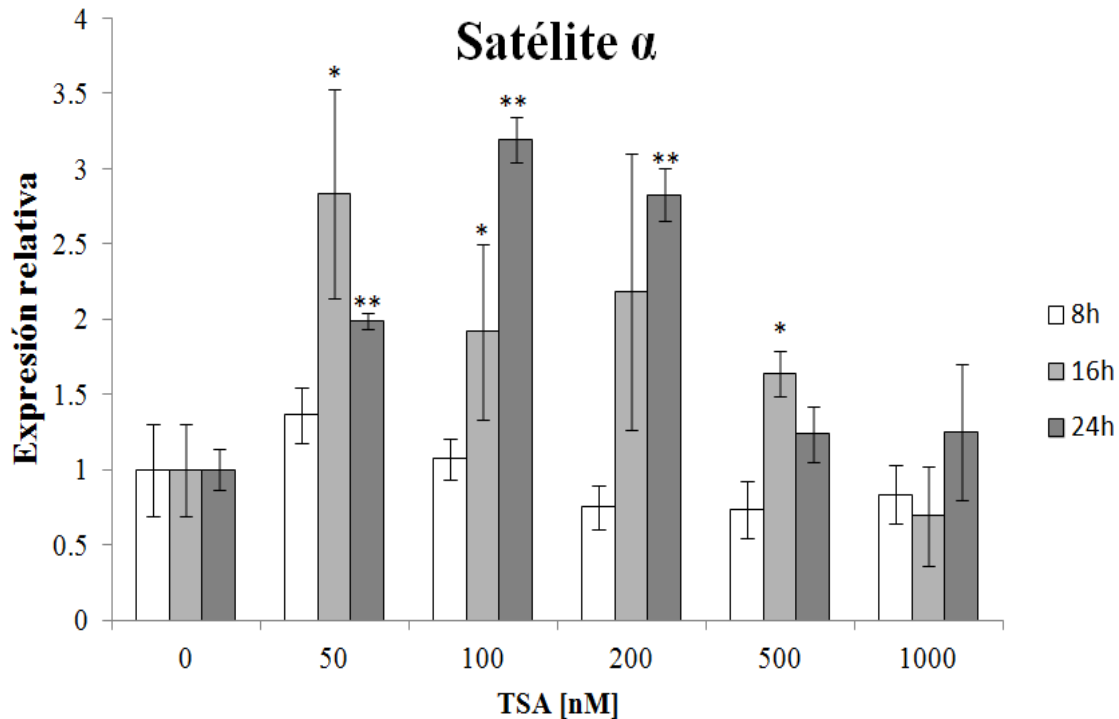


Figura 11. Curva dosis-respuesta de la transcripción del satélite α en células HCT116. Se hicieron pruebas de T para muestras independientes para comparar cada dosis con su control. Las barras de error muestran la desviación estándar (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

Estos resultados nos sugieren que la transcripción del satélite α podría estar regulada por las modificaciones post-traduccionales de las histonas, especialmente la acetilación de dichas proteínas, sin embargo, también podría estar regulada por otros mecanismos epigenéticos tales como la metilación del DNA o incluso, por el mismo RNA.

Localización celular de los transcritos centroméricos

Aunque se ha abordado el estudio de la localización de RNAs del centrómero de cromosomas específicos usando sondas biotiniladas (Wong et al., 2007), nosotros nos

propusimos detectar la localización de estos transcritos con sondas que diseñamos específicamente a partir de clonas secuenciadas del cromosoma 1, las cuales tienen acoplado en el extremo 5' el Quásar 570.

En las células HCT116, se encontraron tres diferentes patrones de localización. En el primero se observa una señal homogénea por todo el núcleo, en el segundo patrón se observan señales discretas en el citoplasma y en el núcleo y el último se observa una señal homogénea en el núcleo y señales discretas en el citoplasma (Tabla 3). El patrón de localización que se encontró con mayor frecuencia es el citoplasmático (61%) (Tabla 3). Por otro lado, en la línea celular WI-38 se observó un enriquecimiento en el nucléolo (Figura 12) consistente con lo observado por Wong y colaboradores (2007).

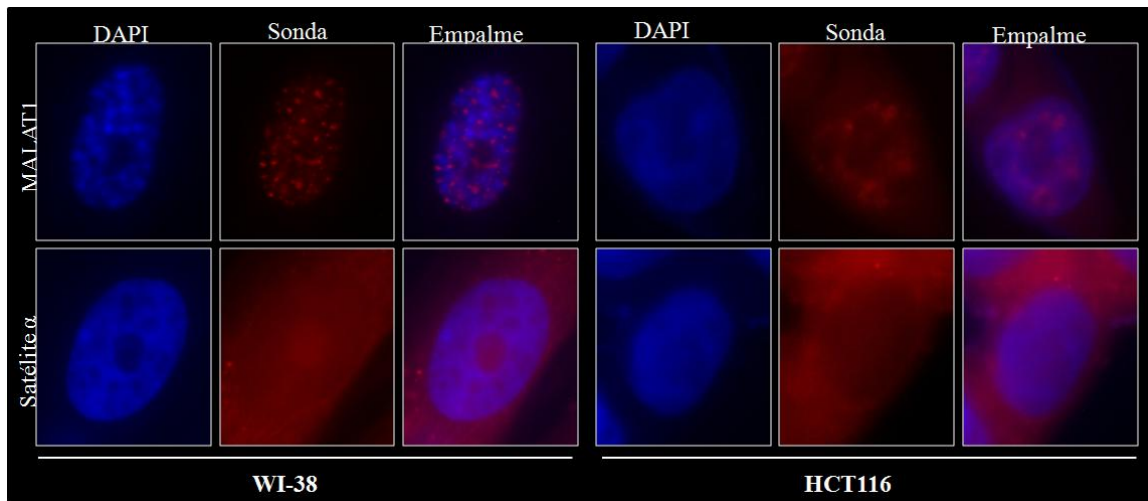


Figura 12. Localización de los ncRNAs MALAT1 y satélite α en las líneas celulares WI-38 y HCT116.

El efecto del TSA en la expresión del satélite α nos llevó a preguntarnos si habrían diferencias en los patrones de su localización entre células tratadas y no tratadas. Por otra

parte nos propusimos comprobar si la localización del satélite α observada en WI-38 era nucleolar. Para este objetivo, se hicieron tratamientos con TSA 500 nM durante 24 h, dosis en la cual no se sobre-expresa el ncRNA satélite α , y se hicieron inmunofluorescencias con el anticuerpo anti-C23 ya que C23 es una proteína que se encuentra en nucléolo asociada al RNAr en la región densa (Ginisty et al., 1999). Se observó una co-localización en el nucléolo en las células WI-38 tanto tratadas como sin tratar. Por otra parte, en las células HCT116 no tratadas, se observó una localización principalmente citoplasmática, mientras que en las tratadas se observó una mayor señal en el núcleo (Figura 13).

Tabla 3. Localización del satélite α en la línea celular HCT116

Localización	%
1.- Nuclear y citoplasmática	31
2.- Nuclear	8
3.- Citoplasmática	61

Estos resultados indican que en la línea celular HCT116 los transcritos del satélite α tienen una localización nuclear y citoplasmática principalmente, mientras que en la línea celular WI-38 es nucleolar cuando son tratadas con TSA y en condiciones sin tratamiento.

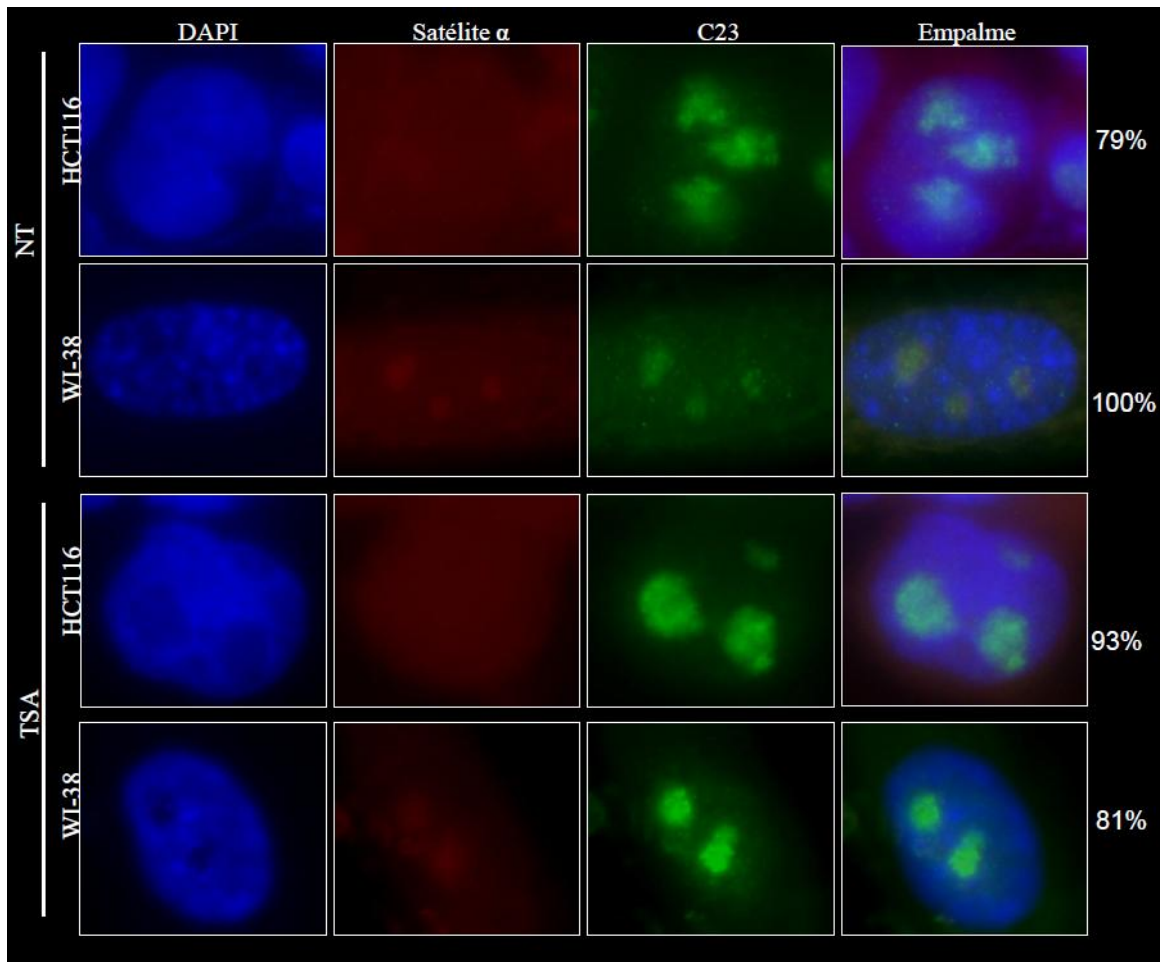


Figura 13. Localización del satélite α y la proteína C23 de las líneas celulares HCT116 y WI-38 sin tratamiento (arriba) y expuestas a TSA 500 nM durante 24 h (abajo). En las células WI-38 se observa una co-localización del RNA y C23 en el nucléolo. Las imágenes representan la distribución del RNA más común después de analizar 100 células (%)

Al mismo tiempo, como control se hizo el RNA-FISH para MALAT1 en células HCT116 tratadas con TSA 200 nM y 500 nM durante 24 h y se observó un mayor número de señales de la sonda comparado con las células sin tratamiento, lo cual sugiere que hay una mayor transcripción de este RNA (Figura 14).

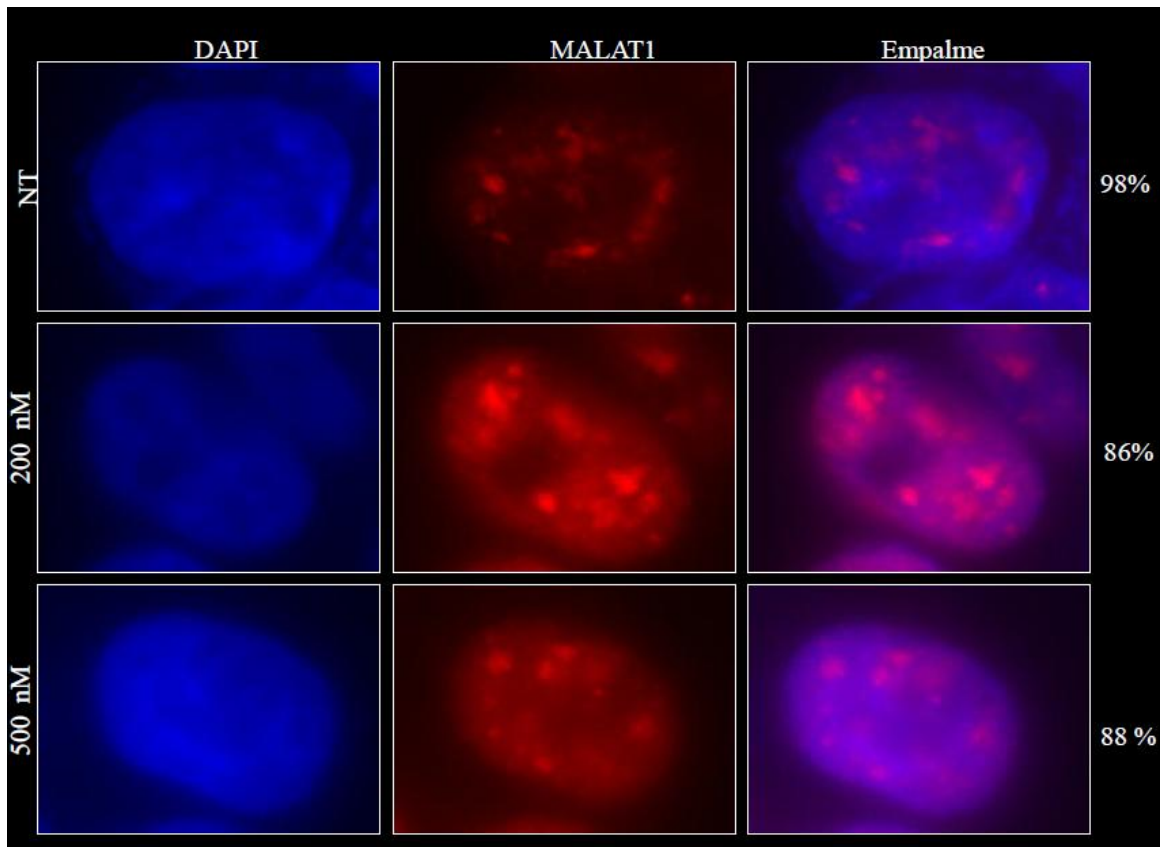


Figura 14. Localización de MALAT1 tras tratamiento con diferentes dosis de TSA durante 24 h en la línea celular HCT116. NT. No tratadas. Las imágenes presentadas representan la distribución más común del ncRNA después de analizar 100 células (%).

Por otra parte, se ha reportado que con la exposición a TSA durante un amplio periodo conlleva a la relocalización de la heterocromatina pericentromérica hacia la periferia nuclear y a la disociación de la proteína HP1 de dichos dominios (Taddei et al., 2001). Por esta razón, se realizaron tratamientos con TSA 500 nM durante 24 h para resolver si al aumentar la abundancia del transcrito, la unión de las sondas podría ser más específica y determinar si existe una co-localización con la proteína HP1 α . Sin embargo, no se observó co-localización de los transcritos del satélite α con la proteína HP1 α debido a que no se observan señales discretas del satélite α por el núcleo que se pudiesen determinar co-

localizando con la proteína HP1 α . Sin embargo, se observó que la localización de dicha proteína tras el tratamiento con TSA cambia y se observa por todo el núcleo, mientras que la marca H3K9me3, a la cual se une HP1 α , se encuentra principalmente en las regiones perinucleolares y cerca de la envoltura nuclear después del tratamiento con TSA (Figura 15).

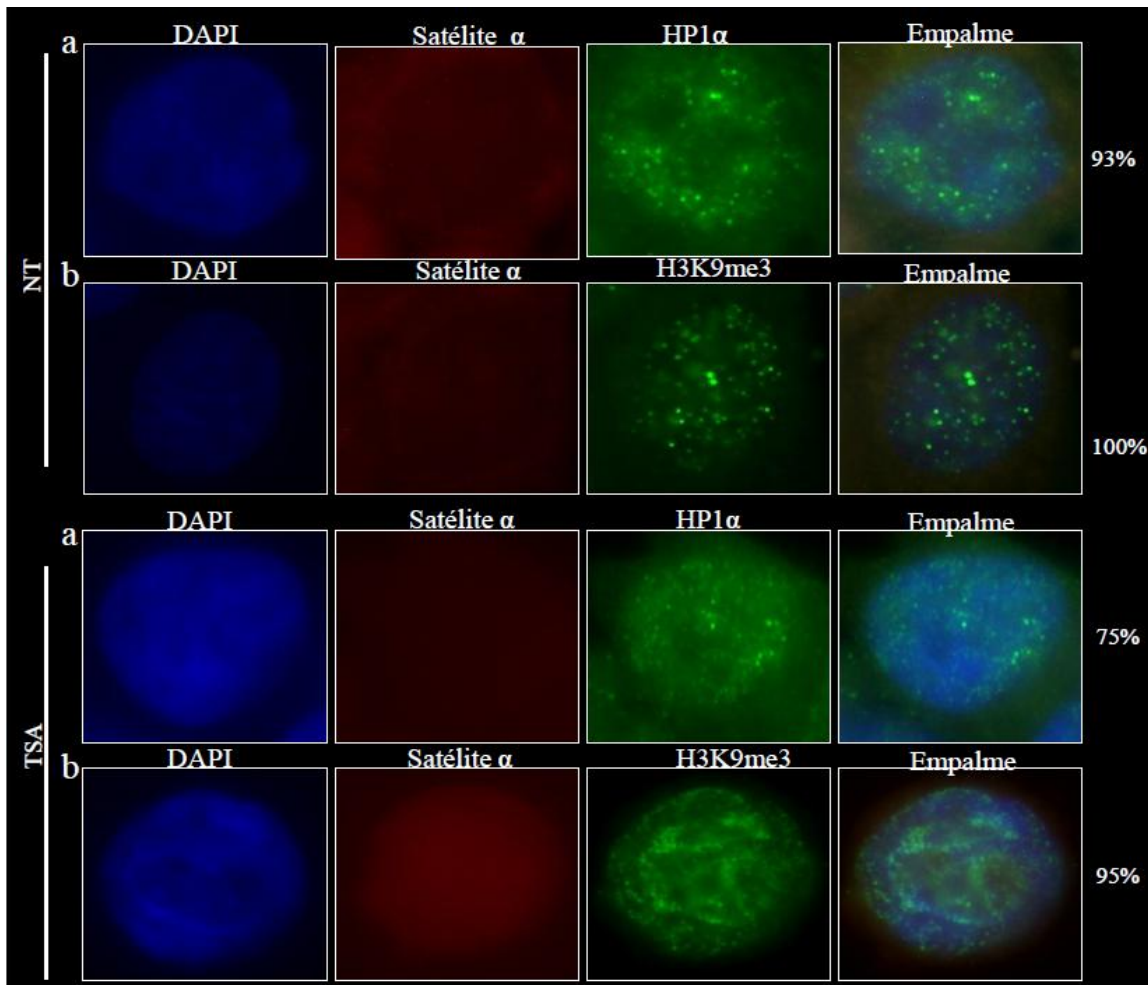


Figura 15. Localización del satélite α y de la proteína de heterocromatina HP1 α (a), y la modificación post-traducciona de la histona 3 H3K9me3 (b) en células HCT116 no tratadas (NT) o expuestas a TSA 500 nM durante 24 h. Las imágenes presentadas

representan la distribución más común del ncRNA y la proteína después de analizar 100 células (%).

Predicción de la unión de la proteína HP1 α a RNA

De acuerdo con el análisis *in silico* que realizamos con el programa BindN⁺ (Wang et al., 2010b) HP1 α tiene 51 aminoácidos con capacidad de unión a RNA de los cuales, los residuos 103-107 que están en la bisagra, están conservados en la región a través de la cual CENP-C se une al RNA (Figura 4).

Resumen

Secuencia: gi|188035910|ref|NP_001120794.1| chromobox protein homolog 5
[Homo sapiens]

Longitud de la secuencia: 191 aminoácidos

Sitios de unión predichos: 51 residuos

Especificidad: 85.00 %

Secuencia: MGKKT⁺KR⁺TADSSSE⁺DEEE⁺YVVEK⁺VLD⁺RR⁺VV⁺KG⁺QVE⁺YLLK⁺WK⁺GF⁺SEE⁺HT⁺WE⁺PE⁺KN⁺LDC⁺P

Predicción: +++++-+-----+--+--+-----

Secuencia: ELISEFMK⁺KYK⁺MMKEG⁺EN⁺KN⁺KPRE⁺KSE⁺SN⁺KR⁺KS⁺SN⁺FS⁺NS⁺ADD⁺IK⁺SK⁺KK⁺RE⁺QS⁺ND⁺IARG⁺F⁺ER⁺G

Predicción: -----+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

Secuencia: LEPE⁺K⁺II⁺GAT⁺DSC⁺GDL⁺MFL⁺MK⁺WK⁺DT⁺DEAD⁺LVL⁺AKE⁺AN⁺V⁺K⁺CP⁺Q⁺I⁺VI⁺A⁺F⁺YE⁺ER⁺LT⁺WH⁺AY⁺PE⁺D

Predicción: ----+-----+-----+

Secuencia: AENKE⁺KE⁺TAK⁺S

Predicción: ----+--+--+

*** Predicción: Los residuos de unión están señalados con '+' y en rojo; los residuos que no se unen están marcados con '-' y en verde.

Interacción de los transcritos centroméricos con la proteína HP1 α

Se realizó un ensayo de RIP, con el fin de determinar si hay una asociación entre HP1 α y los transcritos centroméricos. Se inmunoprecipitaron las proteínas HP1 α y a CENP-A como control positivo pues está reportado que interacciona con estos ncRNA (Quenet y Dalal, 2014). Por otra parte, se utilizó el anticuerpo inespecífico IgG como control interno, cuyo valor de inmunoprecipitación se utilizó para normalizar los valores de HP1 α y CENP-A. Con el análisis mediante RT-qPCR se encontró un enriquecimiento de tres veces del control positivo CENP-A y de 0.4 veces de HP1 α . Este resultado sugiere una asociación directa o indirecta entre HP1 α y los transcritos de satélite α (Figura 16).

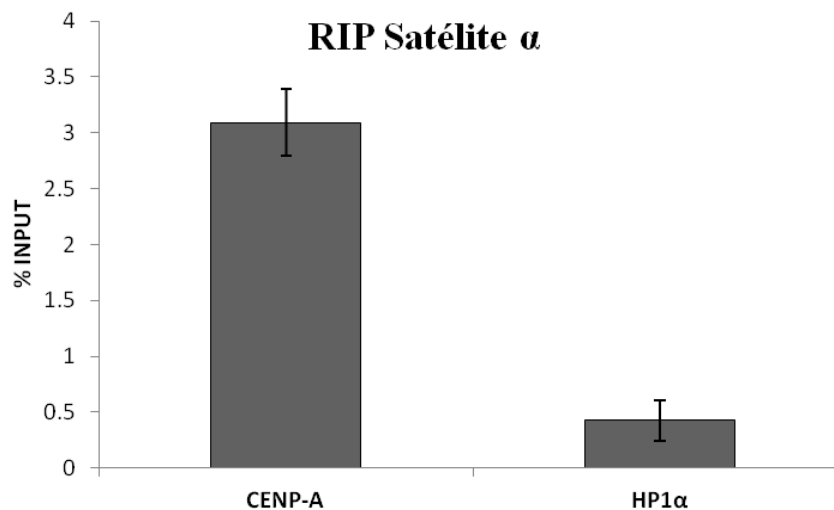


Figura 16. Inmunoprecipitación de las proteínas CENP-A y HP1 α asociadas al ncRNA satélite α en células HCT116. El ensayo se hizo con la fracción nuclear. Las barras muestran el error estándar del triplicado técnico. Se normalizó el valor de IP con el anticuerpo inespecífico IgG.

DISCUSIÓN

Los ncRNA centroméricos tienen una importante función en el ensamblaje del cinetocoro ya que participan en el reclutamiento hacia el centrómero de las proteínas CENP-C e INCENP, las cuales forman parte del cinetocoro durante mitosis, mientras que durante interfase las mantienen localizadas en nucléolo (Wong et al., 2007). Estos ncRNAs también están involucrados en la estabilidad cromosómica debido a que su desregulación conlleva a rezagos cromosómicos durante la división celular y a la presencia de husos mitóticos multipolares (Chan et al., 2012; Quenet y Dalal, 2014). Dada la reciente importancia que se ha descrito sobre la transcripción del satélite α para la estructura y función del centrómero, es relevante el estudio de la regulación de su transcripción, localización y función en el mantenimiento de la cromatina centromérica.

Un estudio sobre el transcriptoma del centrómero y la región pericentromérica en líneas celulares de ser humano reporta la ausencia de transcripción del centrómero en las células IMR90, HeLa o HCT116 (Eymery et al., 2009). En cambio, al analizar 21 diferentes tejidos normales en este mismo estudio, encontraron expresión de ncRNA centroméricos en ovario, hígado embrionario y placenta. Por otra parte, observaron acumulación de estos transcritos en tejidos de tumor provenientes de pulmón (Eymery et al., 2009). A diferencia de estos resultados, nosotros observamos una mayor expresión en la línea celular HCT116 tanto en el cromosoma 1 como a nivel global; así como en líneas celulares provenientes de mama, ovario y colon. Estos resultados indican que la transcripción de estos RNAs es tejido-específica; sin embargo, las diferencias encontradas en la línea celular HCT116 podrían deberse a que la técnica con la que se cuantificó el RNA difiere, pues nosotros utilizamos RT-qPCR, mientras que Eymery y colaboradores (2009) utilizaron un

macroarreglo y sondas marcadas radioactivamente. Aunado a ésto, se utilizaron oligonucleótidos distintos a los nuestros. Las diferencias también podría deberse a que las células se encontraban en diferentes etapas del ciclo celular y sincronizarlas en G1 temprana y mitosis, donde se ha reportado la principal actividad transcripcional (Chan et al., 2012; Quenet y Dalal, 2014). Debido a lo anterior, esto podría habernos arrojado datos más representativos en la expresión de este ncRNA.

A pesar de la importancia de estos transcritos en la estabilidad y función del centrómero, a la fecha no se ha caracterizado completamente la regulación de su transcripción. Se ha reportado que en respuesta a choque térmico no hay expresión del centrómero en células HeLa y tampoco con tratamientos con TSA 330 mM ni con 5-azacitidina 5 μ M (Eymery et al., 2009). Por nuestra parte, bajo tratamientos con TSA, observamos en primer lugar que con nuestras dosis no se alcanza el IC50, por lo que los tratamientos con estas dosis nanomolares tienen un efecto en la expresión del RNA y las células no están siendo sometidas a dosis letales, consistente con lo reportado sobre la actividad de inhibición de las desacetilasas de histonas en dosis nanomolares (Yoshida et al., 1990). La sobre-expresión observada a las 16 y 24 h nos indica que la transcripción del centrómero se da en un ambiente de eucromatina. Sin embargo, podrían existir otros mecanismos epigenéticos que regulen la expresión de los transcritos, como la metilación del DNA, las modificaciones post-traduccionales de histonas como la acetilación de las histonas H3 y H4, y el efecto del mismo ncRNA que podría estar actuando en *cis* regulando su misma transcripción al reclutar componentes represivos, como la proteína HP1 α , en un mecanismo parecido al de la heterocromatina pericentromérica en ratón (Maison et al., 2011).

La localización celular de los transcritos centroméricos se ha reportado en nucléolo y se sugiere que los componentes del centrómero como CENP-C, INCENP y el ncRNA están localizados en esta estructura y hay una liberación oportuna para el ensamblaje de los cinetocoros durante mitosis (Wong et al., 2007). La localización del ncRNA en el nucléolo de las células WI-38 y la localización nuclear y citoplásmica en las células HCT116 que observamos en los ensayos de RNA-FISH nos sugiere que la localización de los transcritos es dependiente del tipo celular. La presencia de estos ncRNA en citoplasma es concordante con los resultados del trabajo realizado por Heesch y colaboradores (2014), en donde se secuenciaron los lncRNA asociados a ribosomas y los compararon con la fracción nuclear, encontrando un mayor enriquecimiento en el citosol y en fracciones ribosomales (Heesch et al., 2014). Aunque la función que pudieran estar llevando a cabo en el citoplasma sigue siendo desconocida.

El aumento de la señal de MALAT1 en el RNA-FISH tras tratamiento con TSA 500 nM durante 24 h en comparación con el control sin tratar nos sugiere que hay una mayor transcripción de este ncRNA. En contraste, no se observó lo mismo con ncRNA satélite α utilizando la misma dosis. Aunado a esto, tampoco se detectó sobreexpresión del ncRNA lo cual podría indicarnos que la región del centrómero se regula de manera diferente a la región de donde se transcribe MALAT1 que podría ser dependiente de acetilación. Además, si en general los tratamientos con TSA se asocian con el aumento en la actividad transcripcional en la célula, la transcripción de MALAT1 quizá aumente también debido a una posible remodelación de la cromatina consecuente por la inhibición de las HDACs.

Se ha observado que al realizar tratamientos con TSA en células L929 de ratón, hay un movimiento de la heterocromatina pericentromérica y de la cromatina centromérica hacia

la periferia nuclear, sin modificar la metilación del DNA de la región pericentromérica. También se ha reportado la pérdida de la localización de HP1 cuando hacen tratamientos con TSA a largo plazo (Taddei et al., 2001). El cambio en la localización de la proteína HP1 α y de la marca H3K9me3 tras tratamientos con TSA observado en nuestro trabajo, muestra consistencia con estos resultados. Esto indica que la inhibición de las HDACs podría tener un efecto remodelando la cromatina que a su vez, podría afectar la transcripción de la región centromérica. Se ha sugerido que la acetilación de las histonas tienen un papel crucial en la compartimentalización en el núcleo de la heterocromatina pericentromérica, en la contribución en la función del centrómero y en su asociación con HP1 (Taddei et al., 2001). Para saber si existe un aumento en la acetilación en el centrómero tras tratamientos con TSA, podrían hacerse ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina utilizando anticuerpos específicos para marcas de histonas acetiladas y amplificando con oligonucleótidos de la zona centromérica de la línea celular HCT116.

Por otra parte, no observamos cambios en la localización del ncRNA satélite α tras los tratamientos con TSA. Sin embargo, dado a que parte de la señal que observamos del ncRNA satélite α mediante el ensayo de RNA-FISH es pobre, sería necesario diseñar sondas a partir de una secuencia más larga del satélite α con el objetivo de tener una señal más específica de nuestro ncRNA, debido a que las sondas utilizadas en este trabajo fueron diseñadas a partir de un monómero de 171 pb del cromosoma 1. Aunque un diseño a partir de una secuencia más larga podría ayudarnos, probablemente la señal que observemos no sería cromosoma específico debido a la similitud que hay entre las secuencias centroméricas de los cromosomas. Otra solución sería el diseño de las sondas a partir de la secuencia del ncRNA reportada recientemente por Quenet y Dalal (2014). Por otra parte,

podría utilizarse la técnica utilizada por Wong et. al. (2007) en el que utilizaron satélites α de doble cadena biotinilados para los ensayos de RNA-FISH.

El ncRNA satélite α podría tener tres funciones de acuerdo con la clasificación de Wang y Chang (2011). 1) La función de guía al reclutar a CENP-C al centrómero durante mitosis y al nucléolo durante interfase (Wong et al., 2007), 2) la función de andamiaje al mantener a la proteína HP α en el centrómero a pesar de la ausencia de H3K9me3, como lo indican nuestros resultados en conjunto con antecedentes del laboratorio, 3) como reconocimiento inicial para la posterior estabilización al reconocer a H3K9me3 como sucede en la heterocromatina pericentromérica en ratón (Maison et al., 2011).

Estos datos en conjunto proporcionan un panorama acerca de la posible regulación epigenética de la región centromérica, así como la importancia de la función del ncRNA satélite α al unirse con una proteína formadora de heterocromatina como HP1 α .

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontró una transcripción del ncRNA satélite α que difiere entre líneas del mismo tipo celular tanto en el cromosoma 1 como a nivel global sin asociarse con una mayor expresión en las líneas celulares con inestabilidad cromosómica. La transcripción de este RNA se favorece cuando hay una inhibición de las desacetilasas de histonas utilizando dosis nanomolares de TSA. La localización del ncRNA satélite α es principalmente nucleolar en la línea celular WI-38 mientras que en la línea HCT116 se observa en citoplasma y también en núcleo en células no tratadas y tratadas con TSA, así como un cambio en la localización de HP1 α por todo el núcleo y H3K9me3 hacia la

periferia nuclear. Finalmente, se observó una interacción del ncRNA satélite α con la proteína HP1 α en la línea celular HCT116. Estos resultados en conjunto, nos permiten conocer más sobre la regulación epigenética del centrómero y la función del ncRNA satélite α .

PERSPECTIVAS

Debido a los resultados obtenidos en cuanto a la unión de HP1 α con el ncRNA satélite α , sería interesante seguir el estudio de la función de dicho transcrito en condiciones de inducción de su expresión mediante tratamientos con TSA y determinar si al haber un aumento en la expresión, también incrementa la interacción con la proteína comparado en condiciones sin tratamiento. Otro aspecto interesante sería determinar si en células no neoplásicas se observa un comportamiento similar.

Por otra parte, dado a que no observamos un aumento dosis dependiente de la transcripción del satélite α al hacer tratamientos con TSA, se debe seguir estudiando el mecanismo de regulación de la expresión del ncRNA satélite α utilizando otros fármacos como el adenosin dialdehído que inhibe a las metil transferasas de histonas, con el objetivo de observar el efecto que tiene en la transcripción del centrómero y la posible implicación de la metilación en la regulación de la transcripción de esta región.

Es importante diseñar nuevas sondas para la localización del transcrito, basándonos en la secuencia consenso del satélite α o diseñar sondas específicas para otros cromosomas. Sin embargo, debido a la complejidad que representa el centrómero en cuanto a secuencia,

considero importante utilizar otro método para localizar el ncRNA que no implique el uso de una mezcla de sondas como lo hicimos en el presente trabajo.

Evaluar si los ncRNAs que se transcriben de la región pericentromérica a partir de secuencias repetidas como el satélite II y III tienen una función y regulación similar a la del ncRNA satélite α .

Sería interesante también, evaluar el efecto en la estabilidad cromosómica al inhibir la expresión del ncRNA del satélite α

REFERENCIAS

- Abreu, S., Vagnarelli, P., Dong, Y., Hori, T., Mcewen, B. F., y Fukagawa, T. (2010). A super-resolution map of the vertebrate kinetochore. *PNAS*, 107 (23): 10484-10489.
- Alexandrov, I. A., Mashkova, T. D., Akopian, T. A., Medvedev, L. I., Kisselev, L. L., Mitkevich, S. P., y Yurov, Y. B. (1991). Chromosome-specific alpha satellites: two distinct families on human chromosome 18. *Genomics*, 11(1), 15–23.
- Alexandrov, I. A., Medvedev, L. I., Mashkova, T. D., Kisselev, L. L., Romanova, L. Y., y Yurov, Y. B. (1993). Definition of a new alpha satellite suprachromosomal family characterized by monomeric organization. *Nucleic Acids Res*, 21(9), 2209–2215.
- Alexandrov, I. a, Mitkevich, S. P., y Yurov, Y. B. (1988). The phylogeny of human chromosome specific alpha satellites. *Chromosoma*, 96(6), 443–453.
- Ando, S., Yang, H., Nozaki, N., Okazaki, T., y Yoda, K. (2002). CENP-A, -B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells. *Mol Cell Biol*, 22(7), 2229–2241.
- Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoriantuli, L., Giulotto, E., y Lingner, J. (2007). Telomeric Repeat-Containing RNA and RNA surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science*, 318: 798–801.
- Bailey, A. O., Panchenko, T., Sathyan, K. M., Petkowski, J. J., Pai, P.-J., Bai, D. L., Russell D. H., Macara I. G., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Black, B. E., y Foltz, D. R. (2013). Posttranslational modification of CENP-A influences the conformation of centromeric chromatin. *PNAS*, 110(29), 11827–11832.

- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., y Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, *410*, 2–6.
- Barry, A. E., Howman, E. V, Cancilla, M. R., Saffery, R., y Choo, K. H. A. (1999). Sequence analysis of an 80 kb human neocentromere. *Hum Mol Genet*, *8*(2), 217–227.
- Bergmann, J. H., Rodríguez, M. G., Martins, N. M. C., Kimura, H., Kelly, D. A., Masumoto, H., Larionov, V., Jansen, L. E. T., y Earnshaw, W. C. (2011). Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J.*, *30*(2), 328–340.
- Canzio, D., Larson, A., y Narlikar, G. J. (2014). Mechanisms of functional promiscuity by HP1 proteins. *Trends in Cell Biology*, *24*(6), 377–386.
- Chan, F. L., Marshall, O. J., Saffery, R., Kim, B. W., Earle, E., Choo, K. H. A., y Wong, L. H. (2012). Active transcription and essential role of RNA polymerase II at the centromere during mitosis. *PNAS*, *109*(6), 2–7.
- Choo, K. H. A. (1997). CHROMATIN DYNAMICS ' 97 Centromere DNA Dynamics : Latent Centromeres and Neocentromere Formation. *Am. J. Hum. Genet.*, *61*, 1225–1233.
- Cleveland, D. W., Mao, Y., y Sullivan, K. F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, *112*(4), 407–421.
- Eissenberg, J. C., James, T. C., Foster-hartnett, D. M., Hartnett, T., Ngan, V., y Elgin, S. C. R. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, *87*: 9923–9927.
- Eymery, A., Horard, B., El Atifi-Borel, M., Fourel, G., Berger, F., Vitte, A.-L., Van den Broeck, A., Brambilla, E., Fourinier, A., Callanan, M., Gazzeri S., Khochbin, S., Rousseauz, S., Gilson, E., y Vourc'h, C. (2009). A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res*, *37*(19), 6340–6354.
- Foltz, D. R., Jansen, L. E. T., Black, B. E., Bailey, A. O., Yates, J. R., y Cleveland, D. W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol*, *8*(5), 458–469.
- Fuks, F. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, *31*(9), 2305–2312.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., y Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, *112*:761–772.

- Grewal, S. I. S., y Elgin, S. C. R. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, 447(7143), 399–406.
- Hayden, K. E. (2012). Human centromere genomics: now it's personal. *Chromosome Res*, 20(5), 621–633.
- Heesch, S. Van, Iterson, M. Van, Jacobi, J., Boymans, S., Essers, P. B., Bruijn, E. De, Hao, W., MacInnes A. W., Cuppen E. y Simonis, M. (2014). Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes. *Genome Biol*, 15(R6):1–12.
- Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. a., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P., y Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106(6), 348–360.
- Hiragami, K., y Festenstein, R. (2005). Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 2711–2726.
- Hooser, A. A. Van, Ouspenski, I. I., Gregson, H. C., Starr, D. A., Yen, T. J., Goldberg, M. L., Yokomori, K., Earnshaw, W. C., Sullivan, K., F., y Brinkley, B. R. (2001). Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J Cell Sci*, 114(19), 3529–3542.
- Hori, T., Amano, M., Suzuki, A., Backer, C. B., Welburn, J. P., Dong, Y., McEwen B., F., Shang, W-H., Suzuki E., Okawa K., Cheeseman I. M., y Fukagawa, T. (2008). CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell*, 135(6), 1039-1052.
- Hori, T., Shang, W.-H., Takeuchi, K., y Fukagawa, T. (2012). The CCAN recruits CENP-A to the centromere and forms the structural core for kinetochore assembly. *J Cell Biol*, 200(1), 45–60.
- Hutchinson, J. N., Ensminger, A. W., Clemson, C. M., Lynch, C. R., Lawrence, J. B., y Chess, A. (2007). A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics*, 8(39):1-16.
- Hwang, K. K., Eissenberg, J. C., y Worman, H. J. (2001). Transcriptional repression of euchromatic genes by *Drosophila* heterochromatin protein 1 and histone modifiers. *PNAS*, 98(20), 11423–11427.
- Jeppesen, P., Mitchell, A., Turner, B., y Perry, P. (1992). Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 101(5-6), 322–332.

- Jones, D. O., Cowell, I. G., y Singh, P. B. (2000). Mammalian chromodomain proteins : their role in genome organisation and expression. *BioEssays*, 22: 124–137.
- Kellum, R., y Alberts, B. M. (1995). Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci*, 108: 1431, 1419–1431.
- Kourmouli, N., Theodoropoulos, P. A., Dialynas, G., Bakou, A., Politou, A. S., Cowell, I. G., Singh, P. B., y Georgatos, S. D. (2000). Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J*, 19(23): 6558-6568.
- Lachner, M. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410: 116-120
- Lam, A. L., Boivin, C. D., Bonney, C. F., Rudd, M. K., y Sullivan, B. A. (2006). Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA. *PNAS*, 103(11):4186-4191.
- Lechner, M. S., Schultz, D. C., Negorev, D., Maul, G. G., y Rauscher, F. J. (2005). The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(4), 929–937.
- Lee, J. T. (2012). Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science*, 338(6113): 1435–1439.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A. H. A., Braunschweig, U., Perez-burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., y Peters, A. H. F. M. (2003). Suv39h - Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Curr Biol*, 13, 1192–1200.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J. P., Imhof, A., Nakatani Y., Dent, Y.R., y Almouzni, G. (2009). The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep*, 10(7): 769–775.
- Lu, J., y Gilbert, D. M. (2007). Proliferation-dependent and cell cycle regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. *J Cell Biol*, 179(3), 411–421.
- Maison, C., y Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4), 296–304.

- Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H. F. M., Quivy, J.-P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., y Almouzni, G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet*, 30(3), 329–334.
- Maison, C., Bailly, D., Roche, D., Montes de Oca, R., Probst, A. V, Vassias, I., Dingli, F., Lombard, B., Loew, D., Quivy, J. P., y Almouzni, G. (2011). SUMOylation promotes de novo targeting of HP1 α to pericentric heterochromatin. *Nat Genet*, 43(3), 220–227.
- Manuelidis, L. (1978). Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma*, 66(1), 23–32.
- Manuelidis, L., y Wu, J. C. (1978). Homology between human and simian repeated DNA. *Nature*, 276: 92–94.
- Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N., y Okazaki, T. (1989). A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol*, 109(5), 1963–1973.
- McAinsh, A. D., y Meraldi, P. (2011). The CCAN complex: linking centromere specification to control of kinetochore-microtubule dynamics. *Semin Cell Dev Biol*, 22(9), 946–952.
- Meehan, R. R., Kao, C., y Pennings, S. (2003). HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J*, 22(12): 3164-3174.
- Mellone, B., Erhardt, S., y Karpen, G. H. (2006). The ABCs of centromeres. *Nat Cell Biol*, 8(5), 427–429.
- Minc, E., Courvalin, J., y Buendia, B. (2000). HP1 γ associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 90, 279–284.
- Mishima, Y., Watanabe, M., Kawakami, T., Jayasinghe, C. D., Otani, J., Kikugawa, Y., Masahiro, S., Kimura, H., Nishimura, O., Aimoto, S., Tajima, S., y Suetake, I. (2013). Hinge and chromoshadow of HP1 α participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *J Mol Biol*, 425(1), 54–70.
- Muchardt, C., Guillemé, M., Seeler, J., Trouche, D., Dejean, A., y Yaniv, M. (2002). Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α . *EMBO Rep*, 3(10), 975–981.
- Nielsen, A. L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J. A., Chambon, P., y Losson, R. (2001). Heterochromatin Formation in Mammalian Cells: Interaction between Histones and HP1 Proteins. *Mol Cell*, 7(4), 729–739.

- Nishino T., Takeuchi K., Gascoigne K. E., Suzuki A., Hori T., Oyama T., Morikawa K., Cheeseman I. M., and F. T. (2012). CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone fold. *Cell*, *148*(3), 487–501.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S. I. S., y Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol*, *4*(1), 89–93.
- Ohzeki, J., Nakano, M., Okada, T., y Masumoto, H. (2002). CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J Cell Biol*, *159*(5), 765–775.
- Peters, A. H. F. M., Carroll, O., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Scho, C., Wipoltshammer K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., y Jenuwein, T. (2001). Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability. *Cell*, *107*, 323–337.
- Plohl, M., Meštrović, N., y Mravinac, B. (2014). Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma*, *123*(4), 313–325.
- Probst, A. V, Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., y Almouzni, G. (2010). A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell*, *19*(4), 625–638.
- Quenet, D., y Dalal, Y. (2014). A long non-coding RNA is required for targeting centromeric protein A to the human centromere. *eLife*, *3*, 1–18.
- Rudd, M. K., y Willard, H. F. (2004). Analysis of the centromeric regions of the human genome assembly. *Trends Genet*, *20*(11), 529–533.
- Schlake, T., Klehr-wirth, D., y Yoshida, M. (1994). Gene Expression within a Chromatin Domain: The Role of Core Histone Hyperacetylation. *Biochemistry*, *33*(14), 4197–4206.
- Serrano, A., Rodríguez-Corsino, M., y Losada, A. (2009). Heterochromatin protein 1 (HP1) proteins do not drive pericentromeric cohesin enrichment in human cells. *PLoS One*, *4*(4), e5118.
- Singh, P. B., y Georgatos, S. D. (2003). HP1 : Facts , open questions , and speculation. *J Struct Biol*, *140*, 10–16.
- Stellfox, M. E., Bailey, A. O., y Foltz, D. R. (2013). Putting CENP-A in its place. *Cell Mol Life Sci*, *70*(3), 387–406.
- Sugimoto K., Yamada T., Muro Y., y Himeno, M. (1996). Human Homolog of Drosophila Heterochromatin-Associated Protein 1 (HP1) Is a DNA-Binding Protein Which

- Possesses a DNA-Binding Motif with Weak Similarity to That of Human Centromere Protein C. *J. Biochem*, 120(1), 153–159.
- Sullivan, K. F., Hechenberger, M., y Masri K.. (1994). Human CENP-A Contains a Histone H3 Histone Fold Domain That Is Required for Targeting to the Centromere. *J Cell Biol*, 127(3), 581–592.
- Sullivan, B. A, y Karpen, G. H. (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol*, 11(11), 1076–1083.
- Sun, B. K., y Lee, J. T. (2006). RNA-chromatin immunoprecipitations (RNA-ChIP) in mammalian cells (PROT28), 28–31.
- Taddei, A., Maison, C., Roche, D., y Almouzni, G. (2001). Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol*, 3(2), 114–120.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. y Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 Complexes Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis. *Cell*, 116, 51–61.
- Topp, C. N., Zhong, C. X., y Dawe, R. K. (2004). Centromere-encoded RNAs are integral components of the maize kinetochore. *PNAS*, 101(45), 15986–15991.
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., Freier, M., Bennett, C. F., Sharma, A., Bubulya, P., A., Blencowe, B. J., y Prasanth, K. V. (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, 39(6), 925–938.
- Tsai, M., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J. K., Shi, Y., Segal, E., y Chang, H. Y. (2010). Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. *Science*, 329 (5992), 689–693.
- Vissel, B., y Choo, K. H. (1991). Four distinct alpha satellite subfamilies shared human chromosomes 13, 14 and 21. *Nucleic Acids Res*, 19(2), 271–277.
- Volpe, T. a, Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. S., y Martienssen, R. A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 297(5588), 1833–1837.
- Wang, K. C., y Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6), 904–914.

- Wang, L., Huang, C., Yang, M. Q., y Yang, J. Y. (2010a). BindN+ for accurate prediction of DNA and RNA-binding residues from protein sequence features. *BMC Syst Biol*, 4 (Suppl 1): S3.
- Warburton, P. E., Cooke, C. A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B. A., Stetten, G., Gimelli, G., Waburton D., Tyler-Smith, C., Sullivan, K. F., Poirier, G. G., y Earnshaw, W. C. (1997). Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol*, 7(11), 901–904.
- Willard, H. F., y Wayne, J. S. (1987). Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. *J Mol Evol*, 25(3), 207–214.
- Willard, H. F., y Wayne, J. S. (1987). Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet*, 3(7), 192–198.
- Wong L. H., Brettingham-Moore K. H., Chan L., Quach J. M., Anderson M. A., Northrop E. L., Hannan R., Saffery R., Shaw M. L., Williams E., y Choo K. H. (2007). Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res*, 17(8), 1146–1160.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., y Beppu, T. (1990a). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A . *J. Biol. Chem.*, 265:17174-17179.
- Zeitlin, S. G., Barber, C. M., Allis, C. D., y Sullivan, K. E. (2000). Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G 2 / M. *J Cell Sci*, 114(4), 653–661.
- Zeitlin, S. G., Shelby, R. D., y Sullivan, K. F. (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol*, 155(7), 1147–57.

ANEXO I

MÉTODO EN EXTENSO

Líneas celulares

WI-38 es una línea celular normal de fibroblastos de pulmón derivados de un embrión humano femenino mientras que la línea HCT116 es derivada de carcinoma colorrectal de un individuo masculino adulto, adquiridas en ATCC.

Extracción de RNA por trizol

Añadir 1 mL de trizol (Ambion, 15596-026, USA) al cultivo por cada 10 cm² de superficie. Transferir la muestra a un tubo e incubar a temperatura ambiente por 5 min. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada mL de trizol utilizado. Mezclar vigorosamente con la mano durante 15 seg. Incubar por 3 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 14 000 rpm por 15 min a 4°C. Remover la fase acuosa y transferirla a un tubo nuevo. Añadir 0.5 mL de isopropanol puro por cada mL de trizol, incubar a temperatura ambiente por 10 min y centrifugar a 14 000 rpm por 10 min a 4°C. Quitar el sobrenadante del tubo, dejando solo el botón de RNA. Lavar el botón con 1 mL de 75%. Agitar brevemente y centrifugar durante 5 min a 4500 rpm a 4°C. Quitar el sobrenadante y dejar secar el botón al aire. Resuspender en 20 µL de agua libre de RNAsas.

Curva de viabilidad celular

Cultivar 40 000 células en cada pozo de una placa de 24 pozos en 500 µL de medio. Hacer el tratamiento con TSA (Sigma-Aldrich, T1952-200µL) durante 8, 16, 24 y 48 h con las concentraciones de 50, 100, 200, 500 y 1000 nM del fármaco.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, retirar el medio y fijar las células con etanol al 70% durante 10 min a -20°C .

Retirar el etanol y dejar secar las células.

Poner 200 μL de cristal violeta y agitar durante 10 min.

Retirar el cristal violeta y lavar con agua destilada hasta quitar todos los restos de cristal violeta. Dejar secar durante una noche.

Adicionar 200 μL de ácido acético al 33% y agita durante 10 min.

Tomar 100 μL de cada pozo y ponerlo en una placa de 96 pozos, leer la placa a 975 nm en el lector de ELISA (Bio-rad iMark Microplate Reader).

Transformación de bacterias por choque térmico y clonación de colonias transformadas

Poner 5 μL de ligación de la banda de 171 pb más 70 μL de bacterias competentes por cloruro de rubidio y mezclarlas.

Colocar los tubos en hielo por 30 min agitando los tubos cada 5 min.

Transcurrido el tiempo, poner los tubos por 60 seg a 42°C .

Poner los tubos 2 min en hielo.

Agregar 1 mL de medio LB que no contenga ampicilina y dejarlo a 37°C por 1 h.

Transcurrido el tiempo, centrifugar por 5 min a 5000 rpm.

Decantar el medio y resuspenderlo con el sobrenadante plaqueando esto en una placa de Petri que contenga antibiótico ampicilina 100 µg/mL y dejar crecer a 37 °C toda la noche. Seleccionar diferentes colonias y sembrarlas nuevamente en una caja LB Ampicilina.

Con un asa estéril, tomar una de las clonas y cultivarla en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina (150 µg/mL). Dejar crecer toda la noche y trascurrido el tiempo centrifugar las bacterias y extraer el plásmido.

Extracción del plásmido

Para la extracción del plásmido se utilizó el Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, 27106). Entre las especificaciones de la secuenciación, se requería una concentración mínima de 100 ng/µL.

Hibridación fluorescente *in situ* de RNA (RNA-FISH)

Las sondas tienen acoplado en el extremo 5' el *Quásar*® 570, cuyo espectro de absorción es 548 nm y el de emisión es 566 nm, es decir que tiene una fluorescencia en la región amarillo-naranja del espectro visible. Dichas sondas están mezcladas en un vial y tienen como objetivo unirse al RNA blanco en serie y de esta manera se puede identificar la fluorescencia de múltiples sondas. Como control de la técnica se adquirió una mezcla de sondas para el ncRNA humano MALAT1 (*Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript*) (Stellaris®).

PROTOCOLO

Reconstitución del stock de sondas y almacenamiento

Adicionar 80 μL de solución amortiguadora TE (10 mM-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) a los *set* de sondas que se encuentren en los catálogos de la compañía, las cuales están liofilizadas, para crear un *stock* 12.5 μM , (en este caso adicioné 80 μL de solución amortiguadora TE a la mezcla de sondas de MALAT1). Pipetear hacia arriba y hacia abajo, agitar y centrifugar brevemente para mezclar bien.

Adicionar 400 μL de solución amortiguadora TE a la mezcla de sondas mandadas a diseñar por el investigador para crear un stock de 12.5 μM (Adicioné 400 μL de solución amortiguadora TE al *set* de sondas que diseñamos para el satélite α). Mezclar de la misma manera.

Congelar las sondas en la oscuridad y a -20°C cuando estarán almacenadas a largo plazo. Para uso a corto plazo, guardar las sondas a 4°C .

Fijación

- 1.- Sembrar células adherentes en cubreobjetos de 18 mm hasta que se tenga una confluencia del ~70-80%.
- 2.- Quitar el medio y lavar las células con PBS 1X.
- 3.- Agregar 1 mL de solución amortiguadora de fijación e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
- 4.- Lavar dos veces con PBS 1X.

5.- Agregar 1 mL de etanol al 70% por lo menos una h a 4°C para permeabilizar. Las células pueden ser guardadas en estas condiciones hasta una semana.

Hibridación

Descongelar las sondas a temperatura ambiente. Agitar y centrifugar brevemente para mezclar.

Agregar 0.5 µL de sonda a 50 µL de solución amortiguadora de hibridación, mezclar y centrifugar en el caso de MALAT-1 para tener una solución final de 125 nM.

Aspirar el etanol al 70% de los cubreobjetos.

Adicionar 1 mL de solución amortiguadora de lavado e incubar a temperatura ambiente por 2-5 min.

Colocar un *parafilm* que cubra la superficie de una cámara húmeda y colocar los 50 µL de solución amortiguadora de hibridación con la sonda en el *parafilm*.

Poner el cubreobjetos en la solución de hibridación con el lado donde están las células hacia abajo.

Incubar en la oscuridad a 33-37 °C para MALAT1 durante 4-16 h y a 33°C durante 16 h para el satélite α .

Colocar los cubreobjetos en la placa de 12 pozos que contengan 1 mL de solución amortiguadora de lavado.

Incubar en la oscuridad durante 30 min a 37 °C o 33 °C de acuerdo con la sonda utilizada.

Aspirar la solución amortiguadora de lavado y después adicionar 1 mL de solución amortiguadora de DAPI (10 ng/mL DAPI en solución amortiguadora de lavado) para teñir el núcleo.

Incubar durante 30 min a 37 °C o 33 °C en la oscuridad.

Aspirar la solución amortiguadora de DAPI y agregar 1 mL de 2X SSC. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.

Agregar 15 µL de Vectashield en una laminilla limpia y colocar el cubreobjetos encima. Limpiar el exceso de Vectashield y sellar con barniz transparente.

Observar las laminillas en el microscopio de epifluorescencia.

RNA-FISH e inmunofluorescencia

Cuando se requiere hacer el RNA-FISH de manera simultánea con inmunofluorescencia, se agrega la cantidad de anticuerpo primario a los 50 µL de solución amortiguadora de hibridación de las sondas de tal manera que el anticuerpo quede en la concentración a la que se haya estandarizado el anticuerpo previamente. Incubar en la oscuridad durante 4-16 h entre 33 °C y 37 °C.

Pasar los cubreobjetos a los pozos y agregar 1 mL de solución amortiguadora de lavado con el anticuerpo secundario 1:200 e incubar durante 1 h a 33 °C – 37 °C en la oscuridad.

Aspirar la solución amortiguadora de lavado y agregar 1 mL de solución amortiguadora de DAPI y continuar con el protocolo.

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

Solución amortiguadora de fijación (50 mL)

5 mL de Formaldehído al 37%

5mL de PBS 10X, libre de RNAsas

Aforar con agua libre de nucleasas a 50 mL

Composición final: formaldehido al 3.7% en PBS.

Solución amortiguadora de hibridación (10 mL)

1 g de dextran sulfato

1mL SSC 20X, libre de nucleasas

1mL de formamida desionizada

Aforar con 1mL de formamida desionizada hasta 10 mL

Composición final: 100 mg/mL de dextran sulfato y formamida al 10% en SSC 2X.

Hacer alícuotas y almacenar la solución amortiguadora de hibridación a -20°C.

Solución amortiguadora de lavado (50 mL)

5 mL de SSC 20X

5mL de formamida desionizada

Aforar con agua libre de RNAsas hasta 50 mL

Composición final: 10% de formamida en SSC 2X

Inmunoprecipitación de RNA (RIP) (Sun y Lee, 2006 modificado)

- 1.- Sembrar células en frascos de 75 cm² hasta tener una confluencia de 70-80 % (el número de cajas depende del número de IP's que se requieran hacer, debido a que se utilizan 10 millones por IP).
- 2.- Lavar las células dos veces con PBS (37 °C) y tripsinizar (8 mL de PBS y 2 mL de Tripsina).
- 3.- Pasar las células a un tubo de 15 mL, centrifugar a 4°C y resuspender en 10 mL de PBS.
- 4.- Agregar formaldehído a una concentración final del 1% (270 µL de formaldehido 37 %) y dejar 10 min en agitación a temperatura ambiente para la reacción de entrecruzamiento.
- 5.- Agregar glicina a una concentración final de 125 mM para detener el entrecruzamiento dejando en agitación durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar.
6. Lavar el *pellet* dos veces con PBS frío adicionado de *cocktail* inhibidor de proteasas. Contar las células antes de hacer el segundo lavado.

Lisis y sonicación (Las cantidades utilizadas son por cada 10 millones de células)

Resuspender el *pellet* en 200 µL de solución amortiguadora A y ponerlo en hielo por 10 min. Centrifugar la fracción nuclear cruda durante 5 min a 5000 rpm a 4°C. Lavar el *pellet*

una vez en solución amortiguadora A sin NP40 y resuspender en 500 μ L de solución amortiguadora B, incubar en hielo por 10 min.

Posteriormente, resuspendier los pellets y juntarlos en un tubo falcon de 15 mL para sonicar. Colocar el tubo en un vaso de precipitados con hielo para evitar que se sobrecaliente la cromatina. Sonicar los lisados tres veces durante 30 seg seguidos. Dejar las muestras a 4°C por lo menos 30 seg entre cada sesión de sonicación para permitir que la solución se enfríe. Posteriormente, dividir en tubos eppendorf de 2mL y centrifugar a 14 000 rpm por 10 min a 4°C para quitar los elementos insolubles.

Juntar el sobrenadante de cada tubo en un falcon de 15 mL y con solución amortiguadora IP llevar a un volumen final en el que se tenga 1 mL por cada IP. Se toma 1mL para tener un INPUT de 100% y se guarda a -80°C hasta que se haga la reacción de reversión del entrecruzamiento.

Inmunoprecipitación

Agregar los anticuerpos en cada tubo (incluyendo una cantidad igual de control normal de IgG) y permitir que los complejos inmunes se formen por mezclado lento en el rotor a 4°C durante 16 h. Aunque las concentraciones de anticuerpos podrían variar, se recomienda empezar dentro de un rango de 0.5-5 μ g/mL.

Para recolectar los complejos inmunes, 50 μ L de perlas A/G fueron agregadas al tubo y se mezclaron lentamente durante 2 h en el rotor. Los complejos imunes se centrifugaron a 1000 rpm por 2 min a 4°C.

Lavados

Lavar cada complejo inmune cinco veces (1mL, 5 min cada uno). Después de cada lavado, centrifugar (1000 rpm, 2 minuto) y aspirar la solución amortiguadora de lavado usando una punta limpia.

- 1.- Lavado Low-salt
- 2.- Lavado High-salt
- 3.- Lavado LiCl
- 4.- TE pH 8
- 5.- TE pH 8

Elución y reversión del entrecruzamiento

Eluir los complejos inmunes agregando 250 μ L de solución amortiguadora de elución, que se prepara fresco en cada ocasión. Agitar las muestras brevemente e incubaron por 15 min en el rotor. Centrifugar (8000 rpm, 2 min) y colectar el sobrenadante. Repetir el proceso de elución y combinar para obtener un total de 500 μ L.

Agregar NaCl en una concentración final de 200 mM (incluyendo las muestras del INPUT) y posteriormente colocarlas a 65°C por dos h para revertir el entrecruzamiento. Posteriormente, agregar 20 μ L de 1M Tris-Cl pH 6.5, 10 μ L de 0.5 EDTA, y 40 μ g de Proteinasa K a cada muestra e incubar a 50°C por 1 hora.

Para aislar el RNA, sujetar las muestras a extracción por fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación con etanol y Glucógeno como acarreador. Centrifugar durante 30 min a 14 000 rpm. Lavar los botones una vez con etanol al 75%, centrifugar a 14000 rpm durante 10 min, secar brevemente al aire y resuspender en 20 μ L de agua tratada con DEPC.

Detección de RNA

Tratar el RNA con DNAsa I (Fermentas) y hacer la reacción de síntesis de cDNA utilizando oligos hexaméricos y finalmente PCR cuantitativa.

Análisis de datos

Para el análisis del ensayo de RIP, se debe comparar el RNA total (Input) con las muestras que se inmunoprecipitaron, utilizando la ecuación 2 en donde la eficiencia de amplificación (AE) se calcula con la pendiente de la curva estándar de los oligonucleótidos del satélite α . En la curva estándar se grafican los valores del logaritmo de las diluciones del Input 0.1%, 1% y 10% y sus respectivos valores CT y se obtiene la ecuación de la gráfica.

$$AE = 10^{\left(-\frac{\Delta}{m}\right)} \quad (1)$$

$$\%Input = AE^{(CT_{Input} - CT_{muestra})} \times Fd \times 100\% \quad (2)$$

Donde:

AE: eficiencia de amplificación

Fd: Factor de dilución

Posteriormente, las veces de enriquecimiento de la proteína en las IPs específicas se obtienen al comparar el % de Input de cada IP específica con el % Input IP inespecífica (Ecuación 3).

$$Veces\ de\ enriquecimiento = \frac{\%Input\ IP\ especifica}{\%Input\ IP\ inespecifica} \quad (3)$$

Donde IP específica se refiere a las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos anti-HP1 α o CEP-A y IP inespecífica se refiere a la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti IgG.

Reactivos

- PBS, pH 7.4
- Solución de Formaldehído (37%)
- 1M glicina
- TE pH 8.0 (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA)
- 1M Tris pH 6.5
- 20% SDS
- 0.5M EDTA
- Fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1)

Soluciones amortiguadoras

Solución		Solución	
Solución amortiguadora A	(con y sin NP40) 5 mM PIPES (pH 8.0) 85 mM KCl 0.5% NP40 1x Roche protease inhibitors cocktail SUPERase•in (50 U/ml)	High-salt wash	0.1% SDS 1% Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) 500 mM NaCl
Solución amortiguadora B	1% SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl pH (8.1) 1x Roche protease inhibitors cocktail SUPERase•in (50 U/ml)	LiCl wash	0.25M LiCl 1% NP40 1% deoxycholate 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl (pH 8.1)
Solución amortiguadora IP	0.01% SDS 1.1% Triton X-100 1.2 mM EDTA 16.7 mM Tris (pH 8.1) 167 mM NaCl 1x Roche protease	Solución amortiguadora de elución	1% SDS 0.1M NaHCO ₃ SUPERase•in (50 U/ml)

	inhibitors cocktail SUPERase•in (50 U/ml)		
Low-salt wash	0.1% SDS 1% Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) 150 mM NaCl		