



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

ALTERACIONES EN LA REGULACIÓN GÉNICA PROMOVIDAS POR CAMBIOS
EN LOS NIVELES DE DAXX Y H3.3 EN LINEAS CELULARES DE COLON

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓLOGA TORRES ARCIGA KARLA MARISA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RODRIGO GONZÁLEZ-BARRIOS DE LA PARRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DR. ERNESTO SOTO-REYES SOLÍS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-U CUAJIMALPA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

ALTERACIONES EN LA REGULACIÓN GÉNICA PROMOVIDAS POR CAMBIOS
EN LOS NIVELES DE DAXX Y H3.3 EN LINEAS CELULARES DE COLON

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓLOGA TORRES ARCIGA KARLA MARISA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RODRIGO GONZÁLEZ-BARRIOS DE LA PARRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DR. ERNESTO SOTO-REYES SOLÍS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-U CUAJIMALPA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/179/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de noviembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **TORRES ARCIGA KARLA MARISA** con número de cuenta **311179464** con la tesis titulada **“ALTERACIONES EN LA REGULACIÓN GÉNICA PROMOVIDAS POR CAMBIOS EN LOS NIVELES DE DAXX y H3.3 EN LÍNEAS CELULARES DE COLON”**, realizada bajo la dirección del **DR. RODRIGO GONZÁLEZ BARRIOS DE LA PARRA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. GUSTAVO ULISES MARTINEZ RUIZ
Vocal: DR. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ
Vocal: DRA. VIVIANA DEL CARMEN VALADEZ GRAHAM
Vocal: DR. ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ GÓMEZ
Secretario: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de febrero de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de maestría dentro de este programa.

De igual manera agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado en el programa de becarios (CVU 1009360) y al Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSSIS, 290041).

A mi tutor principal, el Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra y a los miembros de mi comité tutor, la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y el Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, por los aportes realizados a mi trabajo de investigación.

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, por permitirme ser parte de su laboratorio y los comentarios aportados al proyecto.

A la maestra Clementina Castro Hernández, por el apoyo técnico para la realización de la tesis.

Al Dr. Inti de la Rosa, al Biólogo Erick Navarro y al Dr. Nicolás Alcaraz por su apoyo en la realización y análisis de los RNA-seq.

A mi familia, amigos y miembros de mi laboratorio por su apoyo incondicional.

A los miembros de mi jurado por los comentarios y sugerencias al presente trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
<i>LAS VARIANTES DE HISTONAS PERMITEN ENRIQUECER EL CÓDIGO EPIGENÉTICO</i>	5
<i>H3.3 ES UNA DE LAS VARIANTES MEJOR ESTUDIADAS</i>	7
<i>DAXX ES UNA CHAPERONA DE H3.3 EN HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA</i>	10
<i>LA SUBEXPRESIÓN DE DAXX OCASIONA LA DESREGULACIÓN DE GENES</i>	13
ANTECEDENTES.....	14
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
METODOLOGÍA.....	16
<i>EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ABUNDANCIA DE DAXX EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON</i>	16
<i>DETERMINACIÓN DE LOS GENES DESREGULADOS POR LA SUBEXPRESIÓN DE DAXX</i>	19
<i>SECUENCIACIÓN DE RNA TOTAL (RNASEQ)</i>	19
<i>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO</i>	20
<i>ABUNDANCIA DE H3.3 Y DAXX EN GENES DESREGULADOS POR DAXX KD</i>	20
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</i>	25
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	38
<i>LOS NIVELES DE DAXX VARÍAN A NIVEL PROTEÍNA, PERO NO MRNA EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON</i>	38
<i>LA SUBEXPRESIÓN DE DAXX DESREGULA LA EXPRESIÓN SECUENCIAS REPETIDAS DISTRIBUIDAS A LO LARGO DE TODO EL GENOMA</i>	39
<i>LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE DAXX ALTERA LA EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES</i>	41
<i>LA SUBEXPRESIÓN DE DAXX ALTERA LA EXPRESIÓN DE NUEVE GENES EN TRES MODELOS CELULARES DISTINTOS</i>	42
<i>DAXX Y H3.3 SE ENCUENTRAN ENRIQUECIDOS EN EL PROMOTOR DE LOS GENES SOBREEXPRESADOS COMPARTIDOS</i>	44
CONCLUSIONES.....	46
PERSPECTIVAS.....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	55
GLOSARIO.....	55
PUBLICACIONES.....	59

Índice de abreviaturas

AP-1: Proteína activadora 1.

ATCC: American Type Culture Collection, en inglés.

ATP: Adenosín tri fosfato.

ATRX: Remodelador de la cromatina ATRX.

Cabin-1: Proteína de unión a calcineurina 1.

CAF-1: Factor de ensamblaje de la cromatina 1.

CBP: Proteína de unión a CREB.

CD95 (Fas): Receptor de muerte de superficie celular Fas.

CENPA: Proteína del centrómero A.

ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina.

DAXX: Proteína asociada al dominio de la muerte.

DNMTs: Metiltransferasas del DNA.

ERVs: Secuencias retrovirales endógenas.

ETS1: Proto-oncogen ETS-1.

FOXO1: Caja Forkhead O1.

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

GO: Gene Ontology.

H3K27me3: Trimetilación de la lisina 27 en la histona 3.

H3K4me3: Trimetilación de la lisina 4 en la histona 3.

H3K9me3: Trimetilación de la lisina 9 en la histona 3.

HDACs: Desacetilasas de histonas.

HIRA: Regulador del ciclo celular de histonas.

HP1: Proteína de heterocromatina 1.

IFITM3: Proteína transmembrana inducida por interferón 3.

KAP1: Proteína asociada a KRAB, también llamada TRIM28.

MT2A: Metalotioneina 2A.

PanNETs: Tumores neuroendócrinos pancreáticos.

Pax3/5: Caja pareada 3 y 5.

Pb: pares de bases

PMLs: Cuerpos promielíticos de leucemia.

PTEN: Homólogo de la fosfatasa y la tensina.

RelB: Proto-oncogen RELB, Subunidad NF-KB.

RIN: RNA Integrity Number.

RT2: *RT2 Profiler PCR Arrays*

SETDB1: Histona-lisina N-metiltransferasa con dominio SET bifurcado 1.

SIM: Motivos de interacción con SUMO

siRNA: RNA pequeño de interferencia.

SPOP: Proteína POZ tipo speckle.

STRING: Herramienta de búsqueda para la recuperación de genes/proteínas que interactúan; STRING por sus siglas en inglés.

SUV39H1: Histona-lisina N-metiltransferasa SUV39H1.

Ubn-1: Ubinucleína-1.

Resumen

Los nucleosomas son la unidad estructural y funcional de la cromatina que ayudan a la compactación del genoma. Estos se encuentran conformados por un octámero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y abarcan 146pb de DNA. Sin embargo, para cada una de las histonas canónicas que lo conforman también existen variantes de histonas, codificadas por genes independientes. Las variantes de histonas le confieren diferentes propiedades regulatorias a la cromatina. Dentro de las variantes de histonas más estudiadas en mamíferos se encuentra H3.3.

La chaperona encargada de depositar a H3.3 en heterocromatina constitutiva (regiones pericentroméricas y telómeros) es DAXX (Death Domain Associated Protein 6, en inglés). De manera general, se ha visto que es necesario mantener los niveles de H3.3 en estas regiones para poder conservar la integridad genómica. DAXX además, es capaz de interactuar con una gran cantidad de proteínas asociadas a represión transcripcional. Por lo cual, tanto por su localización como por sus interacciones, se ha etiquetado a DAXX como un represor.

A pesar de esto, de manera indirecta algunos estudios han señalado a DAXX como un posible regulador de genes, aunque no con el suficiente hincapié. Estos estudios incluyen diferentes modelos celulares, como son cáncer de próstata, glioblastoma y tumores neuroendócrinos pancreáticos (PanNETs). Sin embargo, para cada uno de éstos los genes desregulados varían, así como el mecanismo estudiado. Es por ello que el objetivo del presente trabajo es identificar los genes desregulados al disminuir los niveles de DAXX en una línea celular de cáncer de colon y caracterizar el enriquecimiento de H3.3 en genes sobreexpresados por la ausencia de DAXX.

Para ello, elegimos entre tres líneas celulares de cáncer de colon a HCT116 como el mejor modelo celular. Con estas células, realizamos un RNA-seq para determinar que secuencias repetidas y genes se desregulaban al disminuir a DAXX con RNAs de interferencia. Encontramos que dos familias de repetidos se sobreexpresaban: LTR7Y y ACRO1. En cuanto a los genes, 346 genes se desregularon significativamente: 270 genes al alza y 76 a la baja. A continuación, para poder tener una selección más robusta de genes a estudiar, comparamos entre los distintos masivos donde hayan

disminuido a DAXX. De esta forma comparamos que genes se estaban desregulando y cuales se compartían entre los tres modelos.

De los nueve genes desregulados compartidos, sólo uno estaba subexpresado: *DAXX*. Mientras que los 8 genes restantes se sobreexpresaban. De estos ocho, elegimos dos de ellos para comprobar si en sus promotores se encontraba DAXX y H3.3 de manera endógena, previniendo la expresión de estos genes. Así, encontramos por primera vez, que en los promotores de *IFITM3* y *MT2A* hay un enriquecimiento de DAXX y H3.3. Esto plantea que las funciones de DAXX no están restringidas a la heterocromatina constitutiva, sino también a algunos genes codificantes.

Abstract

Nucleosomes are the structural and functional units of chromatin that help compact the genome. These are made up of an octamer of histones H2A, H2B, H3, and H4 and span 146bp of DNA. However, for each of the canonical histones, there are also histone variants, encoded by independent genes. Histone variants confer different regulatory properties to the chromatin. Among the most studied histone variants in mammals, there is H3.3.

The chaperone in charge of depositing H3.3 in constitutive heterochromatin (pericentromeric regions and telomeres) is DAXX (Death Domain Associated Protein 6). In general, it has been seen that it is necessary to maintain H3.3 levels in those regions to conserve genomic integrity. DAXX is also capable of interacting with a big number of proteins associated with transcriptional repression. For this, not only for its localization but also for its interactions, DAXX has been labeled as a repressor.

Despite this, some studies have indirectly pointed to DAXX as a potential gene regulator, although not giving it enough emphasis. These studies include different cellular models such as prostate cancer, glioblastoma, and PanNETs (Pancreatic neuroendocrine tumor). However, each model emphasizes different dysregulated genes according to the different mechanisms that they study. Therefore, the objective of this work is to identify the dysregulated genes when we lower the levels of DAXX in a colon cancer cell line and to characterize the H3.3 enrichment in these upregulated genes by the absence of DAXX.

For this purpose, we chose HCT116, among three different colon cancer cell lines, as the best model to work with. With these cells, we performed an RNA-seq to determine which repeated sequences and genes were dysregulated when we decreased DAXX with siRNAs. We found that two families of repeated sequences were overexpressed: LTR7Y and ACRO1. As to the genes, 346 genes were significantly dysregulated: 270 genes were up, and 76 genes were downregulated. Next, to have a more robust selection of genes to study, we compared the different RNA-seq studies where DAXX had been decreased. In this way, we compared which genes were being deregulated and which were shared between the three models.

Of the nine dysregulated shared genes, only one was downregulated: *DAXX*. While the other 8 shared genes were overexpressed. Of these eight, we chose two of them to check if *DAXX* and H3.3 were found endogenously in their promoters, preventing the expression of these genes. Thus, we found for the first time, that in the promoters of *IFITM3* and *MT2A*, there is an enrichment of *DAXX* and H3.3. This suggests that the functions of *DAXX* are not restricted to constitutive heterochromatin, but also to some coding genes.

Introducción

Las variantes de histonas permiten enriquecer el código epigenético

Se conoce como cromatina a la unión de ciertas proteínas llamadas histonas con el DNA al interior del núcleo celular eucarionte (Annunziato, 2008). Es el nucleosoma, la unidad funcional y estructural que define a la cromatina. Este, además de ayudar a compactar a la cromatina, también participa en la regulación de la replicación del DNA y la activación o represión transcripcional (Felsenfeld & Groudine, 2003). La estructura del nucleosoma se ha mantenido relativamente intacta desde las levaduras hasta los metazoos, y se encuentra conformado por un octámero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 que envuelven y abarcan 146 pb de DNA (Cutter & Hayes, 2015; Gurard-Levin et al., 2014a). A este conjunto se le conoce como nucleosoma canónico (Figura 1).

En general, las histonas son proteínas de tamaño pequeño (11-15 kDa), altamente básicas y con una gran cola amino-terminal que sobresale del nucleosoma (Cutter & Hayes, 2015). Esta región resulta particularmente importante puesto que es aquí donde se llevan a cabo la mayoría de las modificaciones postraduccionales que forman parte del código epigenético, esto es, que ayudan a la regulación de procesos transcripcionales como apertura o compactación de la cromatina.

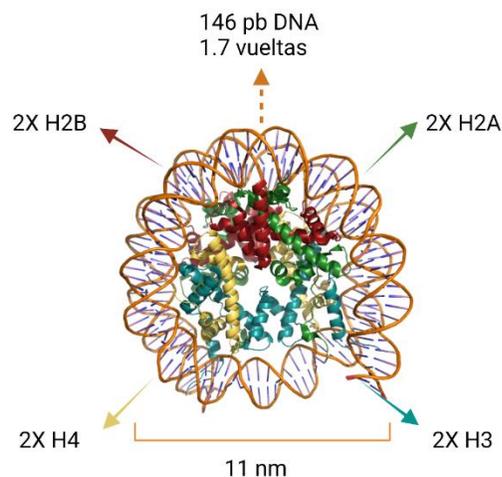


Figura 1. Estructura del nucleosoma. El nucleosoma canónico está compuesto por un octámero de las histonas H2A (verde), H2B (rojo), H3 (azul), H4 (amarillo). Se encuentra envuelto por 146 pares de bases, dando el DNA 1.7 vueltas a su alrededor. Creado con BioRender.com y PyMOL.

En general, las histonas son proteínas altamente conservadas entre los organismos eucariontes. La mutación de cualquier región de las histonas puede resultar en una modificación estructural importante en las mismas o en su integración y participación en el nucleosoma. Las variantes de histonas son un ejemplo de cómo modificaciones en las secuencias, por muy mínimas que sean, pueden alterar la estabilidad de un nucleosoma. Estas se entienden como proteínas histónicas codificadas por genes independientes a las canónicas (Marzluff et al., 2002). Para cada una de las histonas canónicas que conforman un nucleosoma, también existen variantes de histonas (Tabla 1). Estas variantes, además de ser codificadas por genes distintos a las histonas canónicas, tienen una expresión y deposición independiente a la fase S del ciclo celular (Buschbeck & Hake, 2017; Melters et al., 2015) y pueden variar por unos cuantos o muchos aminoácidos, lo que les confiere distintas propiedades como estar sujetas a diferentes modificaciones postraduccionales e interacciones más o menos fuertes con diferentes proteínas y el DNA (Venkatesh & Workman, 2015).

Tabla 1. Variantes de histonas del nucleosoma reportadas en humanos

Histona Canónica	Histona Variante	Función y/o localización	Referencias
H4	H4G	Localizada en nucleolos, ayuda en la regulación de la transcripción del rDNA	(Long et al., 2019)
H2B	TH2B	En testículo, transición histona-protamina	(Buschbeck & Hake, 2017)
	H2B.W	En testículo	(Buschbeck & Hake, 2017)
	H2BE	Enriquecida en neuronas olfatorias	(Santoro & Dulac, 2012)
H2A	H2AZ.1 y H2AZ.2	Distribución global, asociada tanto a la activación como a represión transcripcional	(Brahma et al., 2017)
	MacroH2A	Distribución global, silenciamiento génico y compactación	(Melters et al., 2015)
	H2A.X	Distribución global, señal de respuesta de daño al DNA	(Marzluff et al., 2002)
	Variantes cortas (H2A.B, H2A.L, H2A.P y H2A.Q)	Específicas de testículo, transición histona-protamina. H2A.B también en cerebro, asociada a transcripción y splicing	(Jiang et al., 2020)
H3	H3.Y.1 y H3.Y.2	En testículo y cerebro; asociadas a la	(Zink et al., 2017)

	(H3.X)	activación transcripcional	
	H3.5	Testículo, transición histonas-protaminas	(Urahama et al., 2016)
	H3.3	Distribución global, asociada tanto a eucromatina como heterocromatina constitutiva	(Elsaesser & Allis, 2010)
	CENPA	En centrómeros, para el mantenimiento de los mismos y la estabilidad genómica	(Sharma et al., 2018)

La gran diversidad de variantes de histonas permite ampliar el panorama y regulación epigenética al aumentar la combinatoria de modificaciones postraduccionales en sus colas, conferirle distintas propiedades fisicoquímicas al nucleosoma así como permitir la formación de diferentes complejos proteicos asociados a la cromatina (Martire & Banaszynski, 2020). Un ejemplo de ello es la variante de H3 limitada a la región centromérica: CENPA. Esta, forma un nucleosoma capaz de envolver sólo 123 pb de DNA y contar con modificaciones postraduccionales únicas como la fosforilación de la serina 7 al comienzo de la mitosis, por mencionar algunas características (Sharma et al., 2018). Otro gran ejemplo de la importancia de las variantes de histonas se encuentra en la variante H3.3, la cual tiene una gran relevancia en la regulación génica y estructural de la cromatina.

H3.3 es una de las variantes mejor estudiadas

De entre el universo de variantes de histonas, H3.3 es una de las mejor estudiadas en mamíferos. Es codificada por dos genes distintos, *H3F3A* y *H3F3B*, localizados en los loci 1q42.12 y 17q25.1 respectivamente. Dependiendo de con cuál de las dos histonas H3 canónicas se compare (Figura 2), H3.3 puede variar en cinco aminoácidos (con respecto a H3.1) o en cuatro (si se compara con H3.2) (Melters et al., 2015). La diferencia entre H3.1 y H3.2 es el aminoácido 96, donde H3.1 tiene una cisteína y H3.2 una serina. Aun cuando la variante H3.3 es similar a las canónicas, las proteínas encargadas de su deposición en el genoma, conocidas como chaperonas de histonas, son capaces de diferenciarlas (Gurard-Levin et al., 2014b).

De forma interesante se ha descubierto que, de entre los cinco aminoácidos distintos de H3.3 (Ala87, Ile89, Gly90, Ser96 y Ser31), Gly90 y Ala87 resultan clave para que las dos chaperonas de H3.3 (DAXX y HIRA) las reconozcan (de las cuales

profundizaremos más adelante) (Elsässer et al., 2012; C. P. Liu et al., 2012; Xiong et al., 2018).

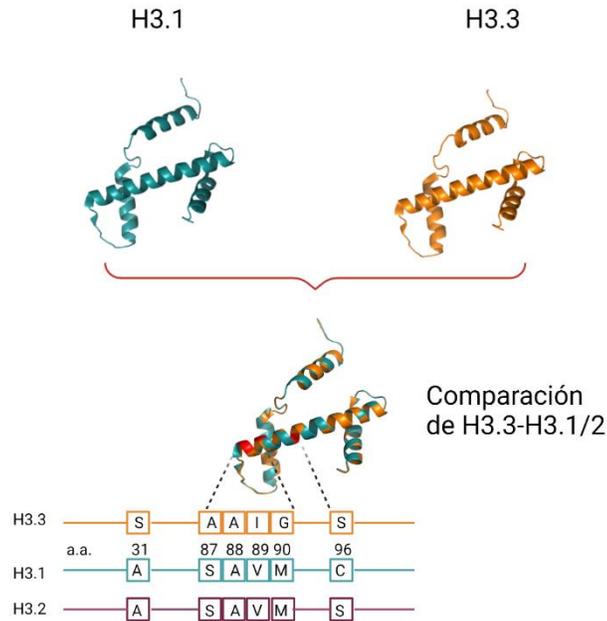


Figura 2. H3 y H3.3 difieren en pocos aminoácidos. Comparación entre las histonas canónicas H3 (H3.1 y H3.2) y la variante H3.3. Son cinco los aminoácidos distintos entre sí, de los cuales se marcan 4 en rojo (en la estructura). Se excluye a la Ser31 puesto que la cristalografía comienza en el aminoácido 38. Creado con BioRender.com y PyMOL.

A la fecha la mayoría de los estudios sobre H3.3 describen su posicionamiento en eucromatina, facilitando la apertura de las regiones donde se depositan (Zhang et al., 2017). Sin embargo, esta variante también puede ser depositada en regiones de heterocromatina constitutiva, cómo son los telómeros y las regiones pericentroméricas de los cromosomas (Voon & Wong, 2015a). Como se mencionó anteriormente, a las proteínas que depositan a las histonas, ya sean variantes o canónicas se les conoce como chaperonas de histonas. Tradicionalmente, se ha considerado a una proteína como chaperona si tiene la habilidad de unirse a histonas y depositarlas en el DNA *in vitro* en ausencia de ATP (De Koning et al., 2007). Sin embargo, hoy en día se considera a las chaperonas de histonas como proteínas con la capacidad específica de unir y proteger a histonas cargadas positivamente de formar interacciones

promiscuas con otras proteínas y el DNA sin la necesidad de la hidrólisis de ATP (Grover et al., 2018).

Tanto las H3 canónicas como la variante H3.3 cuentan con chaperonas específicas (Figura 3). Mientras que las histonas canónicas de H3 son depositadas por el complejo CAF-1 en dímero junto a H4 después de la horquilla de replicación (Elsaesser & Allis, 2010), H3.3 puede ser depositada por dos complejos distintos dependiendo de su localización en el genoma. Si H3.3 debe ser depositada en eucromatina, es decir, en regiones permisivas a activación transcripcional y con una alta abundancia de genes, es el complejo conformado por HIRA (Histone Cell Cycle regulator), Cabin-1 y Ubn-1 quien deposita la variante (Nye et al., 2018; Ricketts & Marmorstein, 2017; Zhang et al., 2017). En estas regiones, se ha visto que la incorporación de H3.3 en los promotores y enhancers de los genes favorece la transcripción de éstos (Jin et al., 2009). Sin embargo, en regiones de heterocromatina constitutiva, es el complejo DAXX/ATRAX quien deposita a H3.3 (Lewis et al., 2010; Rapkin et al., 2015). La heterocromatina constitutiva se caracteriza por una baja o nula abundancia de genes y un silenciamiento transcripcional estable (Saksouk et al., 2015). Este tipo de heterocromatina con una función más bien estructural, ha sido delimitada en gran parte a la región pericentromérica y a los telómeros de los cromosomas, donde hay una alta abundancia de secuencias repetidas (Allis & Jenuwein, 2016). A pesar de que en estas regiones no se registra una alta actividad transcripcional, se ha reportado que es necesario mantener los niveles de H3.3 en dichas regiones para poder conservar la integridad genómica (Jang et al., 2015; Udugama et al., 2015). H3.3 es entonces una variante de histonas principalmente asociada a activación transcripcional en eucromatina, puesto que le confiere al nucleosoma una mayor labilidad. Sin embargo, su deposición en heterocromatina, aunque mucho menos estudiada, también es necesaria para mantener estas regiones.

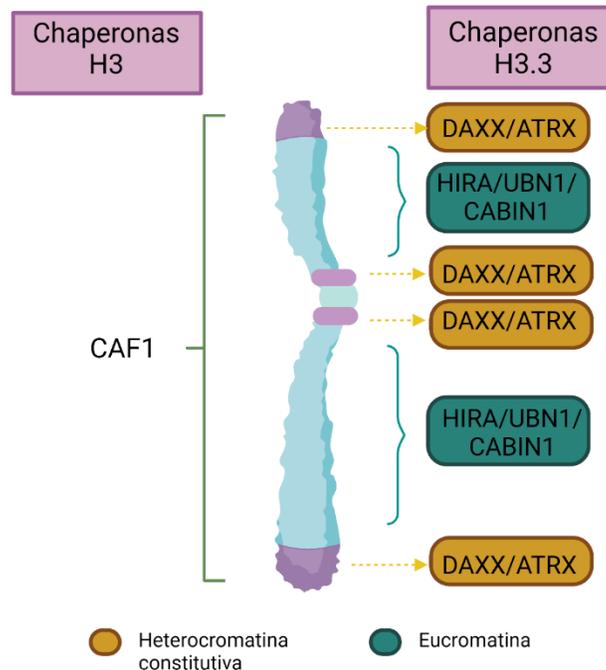


Figura 3. Localización genómica de las chaperonas de H3 y H3.3. Existen chaperonas de histonas específicas tanto para H3 (CAF1) como H3.3 (HIRA/UBN1 y CABIN1; DAXX/ATR) que las depositan en regiones específicas del cromosoma (como en el caso de las chaperonas de H3.3) o a lo largo de todo el genoma, como las canónicas. Creado con BioRender.com.

DAXX es una chaperona de H3.3 en heterocromatina constitutiva

De las proteínas más estudiadas en los últimos años que forman parte del complejo depositador de H3.3 en heterocromatina constitutiva, se encuentra la proteína DAXX (Death Domain Associated Protein, por sus siglas en inglés), que interactúa directamente con esta variante de histona y la deposita (Voon & Wong, 2015a; X. Wang et al., 2017).

Originalmente, DAXX fue descubierta como una proteína pro-apoptótica al estar interaccionando en el citoplasma con el receptor del dominio de la muerte de CD95 (también conocido como Fas)(Pan et al., 2013). Sin embargo, algunos estudios han sugerido que DAXX también podría funcionar como un factor anti-apoptótico, puesto que al disminuir los niveles de DAXX en ratones y células HeLa, aumentan los niveles de apoptosis (Michaelson & Leder, 2003). Esta dualidad de acción de DAXX a nivel apoptosis pareciera estar relacionado con el contexto específico en el que se

encuentre la célula y aún no se encuentra completamente esclarecido. A pesar de esto, la mayoría de los estudios se enfocan a su papel pro-apoptótico.

Sin embargo, recientemente se ha observado que además del citoplasma, DAXX también puede encontrarse en el núcleo, junto a los cuerpos promielóticos de leucemia (PMLs) y regiones de heterocromatina constitutiva depositando a H3.3 (Delbarre et al., 2017) (Figura 4).

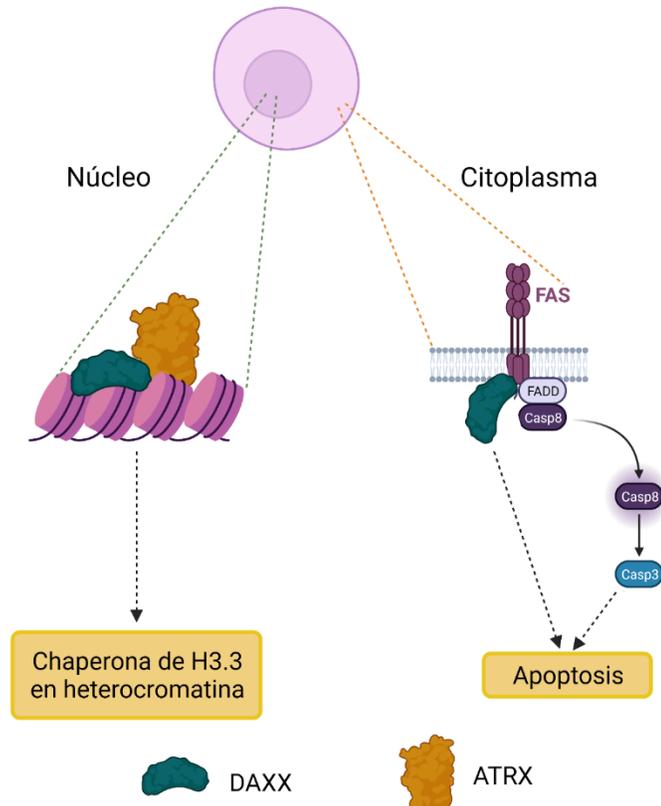


Figura 4. Localización y función de DAXX tanto en el núcleo como en el citoplasma. En el núcleo, DAXX interactúa con ATRX para depositar a la variante H3.3 en heterocromatina constitutiva. En el citoplasma, DAXX se encuentra unido al receptor de la muerte, o FAS, cuya activación conlleva a la apoptosis. Creado con BioRender.com.

El gen *DAXX* se encuentra en el locus 6p21.36 y la proteína para la que codifica está formada por 740 aminoácidos y tiene un peso molecular de 81 373 Da. Evolutivamente, podemos encontrar a DAXX solo en animales, donde se ha sugerido que surgió en los insectos (Santiago et al., 2009). Entre los motivos que conforman a

la proteína encontramos dos motivos SIM en cada extremo. Estos SIM o Motivos de Interacción con SUMO le permiten interactuar con modificadores de ubiquitinación, así como dirigir y mantener a DAXX en los dominios oncogénicos de PMLs (PODs) dentro del núcleo (Santiago et al., 2009). Sin embargo, es el SIM del C-terminal el que resulta crítico para su asociación con PMLs sumoiladas y por consiguiente su localización a los cuerpos nucleares de PML (Mukhopadhyay & Matunis, 2011).

Cercano a la región N-terminal, contiene un dominio de unión a histonas (HBD, por sus siglas en inglés), el cual le permite interactuar con ATRX y con el complejo H3.3-H4. Aunado a esto, del lado C-terminal, contiene un dominio ácido, rico en glutamato y aspartato; así como un segmento rico con serina, prolina y glutamato y otro rico en serina, prolina y treonina (Escobar-Cabrera et al., 2010). Es gracias a este último segmento que DAXX puede interactuar directamente con la proteína p53, reprimiéndola (Wethkamp et al., 2011). Además, resulta interesante que, aún entre las diferentes chaperonas de histonas, estas mantienen en su estructura regiones intrínsecamente desordenadas y dominios ácidos que permiten aumentar la afinidad de unión al dímero H3.3-H4 (Warren & Shechter, 2017).

A pesar de que DAXX no cuenta con un motivo de unión a DNA, la literatura lo señala como un represor transcripcional gracias a su capacidad de interactuar con una gran cantidad de proteínas de la maquinaria de represión, como son DNMT1, HDACs, SETDB1 y SUV39H1 (Mahmud & Liao, 2019). Al respecto de su papel como represor para mantener la heterocromatina, se ha observado que DAXX puede funcionar en dos complejos distintos: con ATRX en telómeros, heterocromatina pericéntrica, y genes improntados y con SETDB1, KAP1 y HDACs en repetidos virales, como ERVs (Hoelper et al., 2017). En el primer complejo, el mecanismo para la remodelación y represión de la heterocromatina mediada por DAXX, comienza cuando la proteína ATRX se posiciona y reconoce la marca de trimetilación de la lisina nueve en la histona tres (H3K9me3) de los nucleosomas adyacentes. La cual es una marca epigenética característica de una región de heterocromatina constitutiva. A continuación, DAXX, quién interactúa directamente con H3.3, deposita la nueva variante de histonas, remplazando la H3 canónica del nucleosoma. Posteriormente, el complejo DAXX/ATRX recluta a la maquinaria de represión de la transcripción, que incluye a HDACs, SUV39H1/2, HP1 y las DNMT3s (Hoelper et al., 2017; Voon & Wong, 2015a). Para el segundo complejo, la función represora e interacción de

DAXX-SETDB1-KAP1-HDAC1 en ERVs es independiente al posicionamiento de H3.3 y su interacción con ATRX (Mahmud & Liao, 2019), sin embargo, depende de su interacción con algunos factores de transcripción para su posicionamiento y represión de la región.

Por otro lado, y de manera menos estudiada y comprendida, se ha descrito que DAXX también puede interactuar con activadores transcripcionales, como son los factores de transcripción Pax 3, Pax 5, ETS1 y CBP, el cual es un activador transcripcional y acetiltransferasa (Agrawal, 2013) (Mahmud & Liao, 2019). Además, mediante experimentos de ChIP seq se ha podido observar que 25% de los picos del posicionamiento de DAXX correlacionan con el del motivo de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 y otro 32.6% con el de FOXO1 (Puto et al., 2015). Esto podría sugerir a DAXX como un posible regulador general, no solo como represor, sino también como activador transcripcional.

La subexpresión de DAXX ocasiona la desregulación de genes

A pesar de que originalmente se ha descrito a DAXX como depositadora de H3.3 en regiones de heterocromatina constitutiva, de manera indirecta diversos estudios han señalado su función como regulador de genes, aunque no con el suficiente hincapié. A la fecha, son pocos los estudios al respecto e incluyen diferentes modelos celulares, como son cáncer de próstata (Puto et al., 2015), glioblastoma (Benitez et al., 2017) y PanNETs (Tumores neuroendócrinos pancreáticos) (Wasylishen et al., 2020). Sin embargo, para cada uno de éstos los genes desregulados varían, así como el mecanismo estudiado. Por ejemplo, para PTEN el mecanismo propuesto es la alteración en la deposición de H3.3 (Benitez et al., 2017), mientras que en PanNETs la desregulación de ERVs (repetidos retrovirales endógenos) ocasionan la alteración en la expresión de algunos genes colindantes (Wasylishen et al., 2020). Por su parte en próstata, se observó que los principales genes desregulados estaban asociados a autofagia, pero no se ahondó en el mecanismo (Puto et al., 2015). Interesantemente, en fibroblastos embrionarios de ratón se observó que algunos genes desregulados por la ausencia de DAXX estaban relacionados con la unión de ésta al factor de transcripción RelB, y que, para poder reprimir a los genes, DAXX debía estar junto con RelB en el promotor de éstos (Puto & Reed, 2008).

Sin embargo, hasta la fecha ninguno de los artículos antes mencionados ha logrado proponer de manera directa y uniforme el mecanismo mediante el cual DAXX podría

estar regulando la expresión de genes, y si esta regulación se mantiene conservada entre distintas líneas celulares o si es específica dependiente del modelo celular.

Antecedentes

Durante mi licenciatura pude observar que la subexpresión de DAXX en HCT116 induce inestabilidad cromosómica, una de las características principales de la mayoría de los tumores sólidos (Bach et al., 2019). Con la finalidad de determinar que la generación de inestabilidad cromosómica observada era atribuida exclusivamente a la pérdida de DAXX, realizamos un panel de expresión RT2 (placas de PCR para medir cambios de expresión de 84 genes distintos). Gracias a este ensayo pudimos observar que la inestabilidad cromosómica observada era por la subexpresión de DAXX, ya que no había ningún gen relacionado con la maquinaria de represión transcripcional desregulado. Sin embargo, en su momento nos sorprendió encontrar que otros genes si se habían desregulado (Torres Arciga, 2019). Considerando el número de genes evaluados, y que se pensaba que la localización de DAXX se limitaba a regiones de heterocromatina, el hecho de encontrar genes que se podrían haber desregulado por la ausencia de DAXX, nos hizo indagar en esta posible función de regulación transcripcional.

Investigando en la bibliografía, encontramos tres artículos, de los cuales ya mencione un poco anteriormente, en donde disminuyeron los niveles de DAXX: en una línea celular de cáncer de próstata (Puto et al., 2015), una de glioblastoma (Benitez et al., 2017) y PanNETs (Wasylishen et al., 2020). En éstos, realizaron RNA-seq y ChIP-seq y cada grupo de trabajo encontró genes específicos del tipo de cáncer desregulados tanto sub como sobreexpresados. Al analizar estos artículos, se enfocan en vías génicas predilectas de los autores y específicas de cada modelo. Es importante recalcar, que dichos estudios no dan importancia al hecho de que DAXX puede regular genes alejados de regiones heterocromáticas y que este no sólo fungió como represor. Los autores tampoco abordan el posible mecanismo de regulación génica de DAXX, por lo que a partir de esto nosotros nos preguntamos ¿Cuáles son los genes regulados por DAXX? Y ¿Cómo se altera el enriquecimiento de H3.3 en genes sobreexpresados al disminuir a DAXX? La importancia del abordaje de estas preguntas recae en entender la función de DAXX en el contexto de la regulación génica, donde de manera novedosa se identificaría una nueva función de DAXX, localizada en regiones nunca antes reportadas. De esta manera, en conjunto nos

podría hablar de una regulación transcripcional con un factor epigenético que tradicionalmente se ha descrito en regiones repetitivas, carentes de genes. Además, el entender un panorama más completo de la capacidad de DAXX en la regulación transcripcional abriría la puerta a futuro para elucidar mejor la importancia de esta proteína en enfermedades como el cáncer.

Hipótesis

La pérdida de DAXX sobreexpresará a genes alejados de regiones de heterocromatina constitutiva al afectar el enriquecimiento de H3.3.

Objetivo General

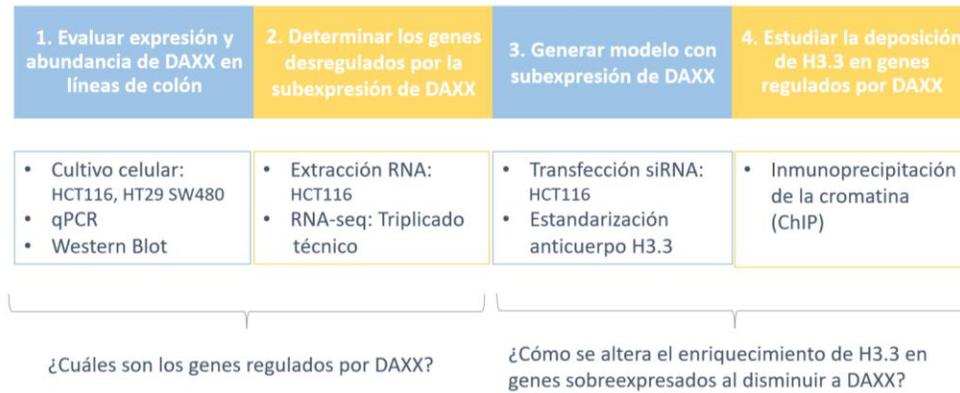
Identificar los genes desregulados al disminuir los niveles de DAXX en una línea celular de cáncer de colon.

Caracterizar el enriquecimiento de H3.3 en genes sobreexpresados por la ausencia de DAXX.

Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión y abundancia de DAXX en líneas celulares de cáncer de colon.
2. Determinar los genes desregulados por la subexpresión de DAXX, mediante RNA-seq en una línea celular de cáncer de colon.
3. Generar un modelo celular H3.3-Flag estable con subexpresión de DAXX.
4. Estudiar la deposición de H3.3 en genes regulados por DAXX.

Metodología



Esquema de diagrama de flujo con la metodología llevada a cabo durante el presente proyecto. En los recuadros de colores superiores, se muestran los objetivos a cumplir, en los recuadros inferiores la metodología empleada para llevarlo a cabo y al final, las preguntas a resolver con esos objetivos y métodos.

Evaluación de la expresión y abundancia de DAXX en líneas celulares de cáncer de colon

Con el fin de determinar el mejor modelo de estudio para mis objetivos, cultivamos tres líneas celulares de cáncer de colon: HCT116, HT29 y SW480 (Tabla 2). A cada línea celular le extrajimos tanto RNA como proteína. El RNA fue extraído mediante el uso de Trizol (Life Technologies, cat. 15596018). Protocolo basado en la separación de fases por centrifugación, donde el RNA queda en la fase superior acuosa. Este se transfiere a un nuevo tubo, donde se precipita con isopropanol seguido de lavados con etanol, para finalmente ser secado y resuspendido en agua libre de RNAsas. A continuación, generamos el cDNA empleando 500 ng de RNA por reacción. Utilizamos el kit High Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, cat. 4368814) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 2. Condiciones de crecimiento de las líneas celulares cultivadas

Línea celular	Origen	Medio Suplementado	Condiciones
HCT116	Carcinoma colorectal	McCoy's 5a (Cat. 16600082, Gibco) Suero Fetal	Aire, 95%; CO ₂ , 5%, 37°C

		Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 10%	
HT29	Carcinoma colorectal	McCoy's 5a (Cat. 16600082, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 10%	Aire, 95%; CO ₂ , 5%, 37°C
SW480	Carcinoma colorectal, Tipo B de Duke	McCoy's 5a (Cat. 16600082, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 10%	Aire, 95%; CO ₂ , 5%, 37°C

A continuación, realizamos una PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el kit "Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix" (Thermo Scientific, K0221) para los oligonucleótidos específicos dirigidos a los genes de *DAXX* y *GAPDH* (Tabla 3). Corrimos la reacción en placas de 96 pozos (Microamp fast optical plate, Applied Biosystems, cat. 4306737) en el termociclador StepOne (Applied Biosystems, cat. 4376357). Analizamos los resultados de expresión diferencial mediante doble delta Ct, usando *GAPDH* como normalizador y la expresión de *DAXX* en HCT116 como calibrador.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos empleados y sus respectivas Tms

Gen/Región	Secuencia de oligonucleótidos	Tm
<i>GAPDH</i>	TGT CAA GCT CAT TTC CTG GT TCT TAC TCC TTG GAG GCC AT	60°C
<i>DAXX (NT)</i>	AAG CCT CCT TGG ATT CTG GT ATC ATC CTC CTG ACC CTC CT	60°C
<i>Satélite Alfa</i>	GAA GTT TCT GAG AAT GCT TCT G	61°C

(Sat Alfa)	CTC ACA GAG TTG AAC CTT CC	
Satélite 2 (Sat 2)	ATC GAA TGG AAA TGA AAG GAG TCA GAC CAT TGG ATG ATT GCA GTC A	61°C
MT2A 1	CGC CTG GAG CCG CAA GTG AC TGG GCA TCC CCA GCC TCT TA	58°C
MT2A 2	TCA GGG AAC TGA CCG CC CGC GGC AAG CAG TGT TTA TAG	60°C
IFITM3 1	TCA GGA ATT TGT TCC GCC CT CGG GTT ACT GGG ATG GTT CTC	60°C
IFITM3 2	ATG AGC CTT GTG CTC CCT TG CGG GTT ACT GGG ATG GTT CTC	60°C

Para medir los niveles proteicos de DAXX, realizamos el ensayo de inmunodetección mediante Western Blot. Para esto, cultivamos las líneas celulares previamente mencionadas hasta conseguir una confluencia cercana al 80%. Después, lisamos las células con el buffer de lisis (Cell Signaling, cat. 9803), en conjunto con coctel de inhibidores de proteasas (Cell Signaling, cat. 5871) y Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma, cat. P7626). A continuación, dejamos los tubos con proteína a -20°C toda la noche para conseguir una buena precipitación. Al día siguiente se cargaron 30 µg de proteína en un gel de acrilamida al 10% para posteriormente ser transferido por 1:30 h a una membrana de PVDF (Millipore, cat. IPVH00010). Teñimos la membrana con rojo Ponceau para confirmar su correcta transferencia, y a continuación bloqueamos con TBS-Tween leche al 5% por una hora, seguido de 4 lavados de 10 minutos con TBS-Tween al 0.1%. Colocamos las membranas en bolsas selladas con sus respectivos anticuerpos primarios disueltos en albúmina al 3%. Utilizamos los anticuerpos: anti-DAXX (Santa Cruz, cat. sc-7152) en una concentración 1:1200 y anti-GAPDH (Santa Cruz, sc-25778) en 1:2500. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, continuamos con 4 lavados de 10 minutos con TBS-Tween (0.1%) e incubamos con TBS-Tween-leche (5%) por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-rabbit 1:2500 (Novus, cat. NB7187). Después, realizamos 4 lavados más con TBS-Tween al 0.1%. Subsecuentemente,

revelamos con quimioluminiscencia (Millipore, cat. S0500) en placas (Carestream biomax, cat. 8761520). Comparamos los resultados mediante densitometría entre las distintas líneas celulares, empleando el software ImageJ.

Determinación de los genes desregulados por la subexpresión de DAXX

Para abatir la expresión de DAXX, transfectamos a la línea celular HCT116 con un pool de dos secuencias de siRNAs distintas contra DAXX (Dharmacon, cat. LQ-004420-00-0010) y utilizando el medio de transfección DharmaFECT 2 (Dharmacon, cat. T-2002-03). Sembramos las células en placas de 6 pozos 24h antes de la transfección, sembrando 50,000 células de HCT116 para un ensayo de 72h con siRNA. A cada pozo le agregamos un volumen total de 2 mL: 1600 μ L de medio completo (con suero), 200 μ L de 50 nM de siRNA (20 μ L de cada secuencia de siRNA y 160 μ L de medio sin suero), y 200 μ L de DharmaFECT 2 (2 μ L de DharmaFECT + 198 μ L de medio sin suero). Seguimos las instrucciones del proveedor para llevar a cabo la transfección.

Al haber transcurrido las 72h de transfección, tripsinizamos las células y cada pozo fue dividido en dos: la mitad de las células fueron destinadas a extracción de proteína y la otra mitad a extracción de RNA. La subexpresión de DAXX fue comprobada mediante inmunodetección con la proteína extraída, mientras que la correcta extracción de RNA fue comprobada mediante el TapeStation (para ver su integridad) y cuantificamos el RNA total obtenido mediante Qubit (Thermo Fisher).

Secuenciación de RNA total (RNAseq)

Con el fin de obtener un análisis del efecto de la disminución de DAXX en la expresión génica, utilizamos el RNA de alta calidad extraído (RIN > 7) para secuenciar el RNA total de 3 muestras control y 3 muestras tratadas con dos secuencias siRNA vs DAXX. Para esto se realizó una librería para RNA-seq con el kit “TrueSeq stranded total RNA” de Illumina, al cual se le removió el RNA ribosomal mediante el Kit Illumina Ribo-Zero Plus depletion. La secuenciación se llevó a cabo por el Dr. Inti Alberto de la Rosa, en el secuenciador Illumina HiSeq2500 de la Red de Apoyo a la Investigación (RAI-UNAM). La secuenciación fue pareada (pair end) y con una profundidad promedio de 36.7 millones de lecturas por muestra.

Análisis bioinformático

Una vez obtenidos los datos de la secuenciación, verificamos la calidad de los datos con FastQC. Para filtrar las secuencias empleamos Trimmomatic, herramienta con la cuál eliminamos tanto los adaptadores de Illumina TruSeq3 como las bases de baja calidad.

A partir de este punto, el análisis fue dividido en un análisis principal y dos alternativos para validar tanto el análisis de genes codificantes como el de elementos repetidos.

En cuanto al análisis principal, realizamos el alineamiento con STAR, la cuantificación (matriz de conteos) con TETranscripts y el análisis de expresión diferencial con DESeq2. Para validar los resultados de genes codificantes obtenidos con TETranscripts, utilizamos a Salmon para el pseudoalineamiento y cuantificación. Mientras que, para validar los resultados de elementos repetidos, empleamos SalmonTE para el pseudoalineamiento y cuantificación. A continuación, para el análisis de expresión diferencial de ambos casos, utilizamos DESeq2.

Finalmente, ya con los genes codificantes diferencialmente expresados, hicimos un análisis de enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO) utilizando el paquete de R ClusterProfiler.

Para un análisis más detallado sobre el flujo de trabajo de estos análisis, revisar (Navarro Delgado, 2021).

Abundancia de H3.3 y DAXX en genes desregulados por DAXX KD

Con el objetivo de medir el enriquecimiento de H3.3 y DAXX llevamos a cabo inmunoprecipitaciones de la cromatina (ChIP), utilizando el kit “One Day ChIP” (Diagenode, cat. No. C01010080) agregando algunas modificaciones como se menciona a continuación.

Obtención y fijación de la cromatina

Crecimos las células en una caja Petri de 150 mm hasta una confluencia del 80% para la línea celular HCT116 y con un volumen total de medio de 18 mL. Cuando las células alcanzaron la confluencia adecuada, añadimos 2 mL de buffer de entrecruzamiento (ver tabla 3) de tal forma que el formaldehído quedara en una concentración final de 1%. Una vez añadido el buffer, dejamos incubando a temperatura ambiente y en agitación por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, detuvimos el entrecruzamiento mediante la adición de glicina 2.5 M, para obtener una

concentración final de 125 mM. Dejamos incubando a las células en agitación por 5 minutos más. Después, retiramos el medio y lavamos tres veces las células fijadas con PBS 1x frío.

A continuación, quitamos el PBS y añadimos 1 mL de buffer de lisis (Tabla 4) con cocktail inhibidor de proteasas (cat. 5817, Cell Signaling) y dejamos incubando a 4°C por 5 minutos. Para después, mediante el uso de un scraper, cosechar a las células y colocarlas en un tubo de 2 mL.

Tabla 4. Preparación de las soluciones para fijación y obtención de la cromatina

Solución	Preparación
Buffer de entrecruzamiento	Formaldehído al 11%: 3.05 mL NaCl 100 mM: 0.2 mL EGTA 0.5 mM: 0.02 mL HEPES 50 mM pH 8: 1 mL
Buffer de Lisis	SDS al 1% EDTA 10 mM pH 8: 0.2 mL Tris-HCl 50 mM pH 8 Cocktail inhibidor de proteasas 1X
Glicina 2.5 M	Por cada 50 mL de agua, pesar 9.38 g de glicina

Sonicación y evaluación de la sonicación

Para sonicar la cromatina, llenamos un vaso de precipitados con hielo y colocamos dentro de éste el tubo de 2 mL con la cromatina abierto. Programamos el sonicador (GENETQ, no. Cat. SOVC505-00) de forma que la sonicación durara 30 segundos ON y 30 OFF, pulso 05-05 y una amplitud de 37%.

Para evaluar la sonicación, apartamos 50 µL iniciales de cromatina sin sonicar y 50 µL de las cromatinas a evaluar. A cada tubo le añadimos dos microlitros de RNasa A e incubamos a 37°C por 30 minutos. Después añadimos 2 µL de proteinasa K y dejamos incubando 1 h a 55°C. A continuación, dejamos 2h a 65°C para que se lleve a cabo el des-entrecruzamiento. Pasado este tiempo, llevamos cada muestra a un volumen final de 300 microlitros con agua y a éste le agregamos 300 microlitros de

fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Agitamos en el vórtex hasta obtener una consistencia lechosa. Centrifugamos 10 minutos a 14,000 rpm a 4°C y recuperamos la fase acuosa (superior). A la fase acuosa le volvimos a poner un volumen de cloroformo frío, agitamos en vortex y centrifugamos a 14,000 rpm a 4°C por 10 minutos. Recuperamos la fase acuosa en un nuevo tubo y precipitamos el DNA con dos volúmenes de etanol al 100% y 0.66 volúmenes de acetato de amonio 5 M dejándolo a -20°C toda la noche (o a -80°C por dos horas). Transcurrido el tiempo, volvimos a centrifugar por 10 minutos a 14,000 rpm y resuspendimos el botón de DNA en 20 µL. Evaluamos el tamaño de los fragmentos de DNA extraído mediante un gel de agarosa al 1%.

Inmunoselección

Una vez comprobado que la cromatina tuviera el tamaño adecuado (alrededor de 200-400 pb), pre-lavamos la cromatina con las perlas “AP binding” (Diagenode). Para ello, tomamos 50 µL de ellas, usando una punta para micropipeta cortada y le agregamos 50 µL de CHIP buffer 1x con cocktail inhibidor de proteasas, en un tubo de 15 mL. Tomamos la cantidad de cromatina total deseada (1,150,000 células por IP), considerando todas las inmunoprecipitaciones y el Input. Después, el tubo de 15 mL con las perlas y la cromatina fue llevado al cuarto frío donde lo incubamos por 10 minutos a 4°C en la rueda giratoria. Transcurrido este tiempo, centrifugamos a 500 g por 1 minuto.

Para la inmunoselección, repartimos en tubos de 1.5 mL previamente etiquetados, el sobrenadante con el número de células deseadas para cada IP. Se apartó en uno de esos tubos el Input (100%; porque tomamos el mismo volumen que para los demás tubos) y éste se guardó a 4°C. Cada tubo tenía un volumen final de 280 µL (completamos el volumen de la cromatina con CHIP buffer 1x con cocktail inhibidor de proteasas y asegurándonos que el volumen final de cromatina no fuera más del 28%). En el cuarto frío, a cada tubo le añadimos la cantidad de anticuerpo deseada (Tabla 5), agitamos ligeramente en vortex, y dejamos incubando de 2 h a toda la noche a 4°C.

Tabla 5. Concentraciones utilizadas de anticuerpo por IP (inmunoprecipitación)

Anticuerpo	Cantidad por IP
H3K9me3 (Diagenode, Cat. No. C15410056)	2.7 µg
DAXX (Abcam, Cat. No. 9091)	3 µg
H3.3 (Abcam, Cat. No. ab62642)	3 µg
IgG (Diagenode, incluido en C01010080)	1 µg

Inmunoprecipitación

Pasado el tiempo de incubación, pusimos a enfriar la centrífuga y lavamos las perlas magnéticas, tomando con una punta cortada 20 µL por inmunoprecipitación (y uno extra para el control de perlas). Las lavamos con ChIP buffer 1x, y las dejamos a 4°C.

Una vez enfriada la centrífuga, tomamos los tubos con anticuerpos y los centrifugamos a 14,000 g por 10 minutos a 4°C. Tomamos el sobrenadante, donde están los complejos cromatina-anticuerpo) sin tocar el pellet y lo pasamos a un nuevo tubo previamente etiquetado. La inmunoprecipitación, consistió en transferir 250 µL del sobrenadante a los nuevos tubos con las perlas magnéticas (Millipore, cat. 16-663). Dejamos incubando en la rueda giratoria estos tubos 30 minutos en el cuarto frío (4°C).

Mientras esto ocurría, volvimos a etiquetar nuevos tubos y sacamos el Input, al cual le añadimos 300 µL de etanol al 100%. Incubamos en hielo 10 minutos y posteriormente centrifugamos 10 minutos a 10,000 g a 4°C. Quitamos el sobrenadante y dejamos secar el pellet, para después resuspender en 100 microlitros de agua.

Al terminar los 30 minutos de la inmunoprecipitación, quitamos los tubos de la rueda giratoria y comenzamos los lavados, también en el cuarto frío. Para lo cual, a cada tubo le añadimos 1 mL de CHIP buffer 1x frío en el rack magnético. Se invirtieron 2 veces cada tubo y los volvimos a poner en la rueda giratoria por cinco minutos. Al cabo de este tiempo, quitamos los tubos de la rueda dándole un bajón con la mano a los tubos para concentrar todo el líquido al fondo. Los colocamos en el rack magnético y esperamos a que las perlas se aglutinaran en una orilla. Tomamos con cuidado el sobrenadante y las burbujas de cada tubo, sin tocar las perlas. A cada tubo le volvimos a poner 1 mL de CHIP buffer 1x y los lavamos 5 minutos en la rueda giratoria, repitiendo los pasos anteriores. En total, realizamos tres lavados.

Purificación del DNA

Previo a este paso, e idealmente mientras llevábamos a cabo los lavados, pusimos agua a hervir. También, sacamos la solución de purificación de DNA y la mantuvimos en suspensión (agitación).

Al terminar los lavados, quitamos todo el CHIP buffer de los tubos y a las perlas le añadimos 100 μ L de solución de purificación de DNA, incluyendo a partir de ahora, al tubo de Input de los pasos anteriores. Mezclamos los tubos por inversión, y aseguramos cada uno con abrazaderas para tubos. Los incubamos 10 minutos en agua hirviendo. Mientras se llevaba a cabo la incubación, programamos el termo bloque a 55°C y etiquetamos nuevos tubos de 1.5 mL.

Una vez finalizada la incubación, sacamos los tubos del agua y esperamos a que se enfriaran. A cada tubo le agregamos dos microlitros de proteinasa K y agitamos ligeramente en vortex. Incubamos los tubos en el termobloque por 30 minutos a 1000 rpm a 55°C. Una vez finalizado este tiempo, volvimos a asegurar los tubos con las abrazaderas e incubamos otros 10 minutos en agua hirviendo. Centrifugamos por 1 minuto e incubamos de nuevo 10 minutos en agua hirviendo. Centrifugamos por un minuto a 14,000 g a 4°C, y sin tocar el botón, transferimos 70 μ L del sobrenadante a los nuevos tubos de 1.5 mL.

A los tubos anteriores (donde quedó el botón), le volvimos a añadir 130 μ L de agua y agitamos en el vortex por 10 segundos. Volvimos a centrifugar por un minuto a 14,000 g a 4°C para después tomar 130 μ L del sobrenadante y los transferimos a los nuevos

tubos junto con los 70 μ L anteriores. De esta forma, el volumen total de cada muestra queda en 200 μ L. Este es el DNA y se almacena a -20°C .

PCR en tiempo real (qPCR)

Para verificar que el CHIP hubiera funcionado, realizamos un PCR en tiempo real como indicamos al inicio de la metodología. Utilizamos los oligos de *Sat2* y *Sat Alfa* como control positivo y *GAPDH* como control negativo (Tabla 3) para el enriquecimiento de DAXX en esas regiones.

Análisis estadísticos

Para la evaluación de la significancia estadística de los experimentos, realizamos la prueba de T de Student, tomándose en cuenta una $p \leq 0.05$ para considerarse como significativa. Por su parte, las gráficas de las Figuras 5, 9 y 10 se realizaron mediante el empleo del software GraphPad Prism5®.

Resultados

Como parte de mi primer objetivo que fue identificar a los genes regulados por DAXX, caractericé los niveles de expresión y abundancia de DAXX. Por ello, se cultivaron tres líneas celulares de cáncer de colon: HCT116, HT29 y SW480. A estas líneas se les extrajo RNA y proteína para realizar RT-qPCR e inmunodetección por Western Blot respectivamente.

Los niveles de mRNA de DAXX indican que tanto HCT116 como HT29 expresan niveles similares, mientras que SW480 tiene una sobreexpresión significativa (Figura 5a). En el caso de los niveles de proteína, observamos que HCT116 es la línea que presenta una mayor abundancia de DAXX, seguida de SW480. HT29 parece tener en muy baja cantidad de esta proteína (Figura 5b y c). A partir de los resultados obtenidos, decidimos continuar utilizando a HCT116 como línea celular de elección, puesto que, a pesar de los altos niveles de proteína, esta línea presenta un cariotipo cuasi diploide, con número modal de 45 cromosomas. Mientras que SW480 es hipotriplode, con una moda de 57-58 cromosomas, y HT29 hipertriploide (68-72 cromosomas) (Knutsen et al., 2010). Decidimos entonces quedarnos con la línea celular HCT116, puesto que para los siguientes objetivos es necesario hacer knock down y/o knock out de los alelos de DAXX. De utilizar las otras dos líneas celulares, tendríamos aún más alelos que silenciar, lo que resultaría aún más complicado.

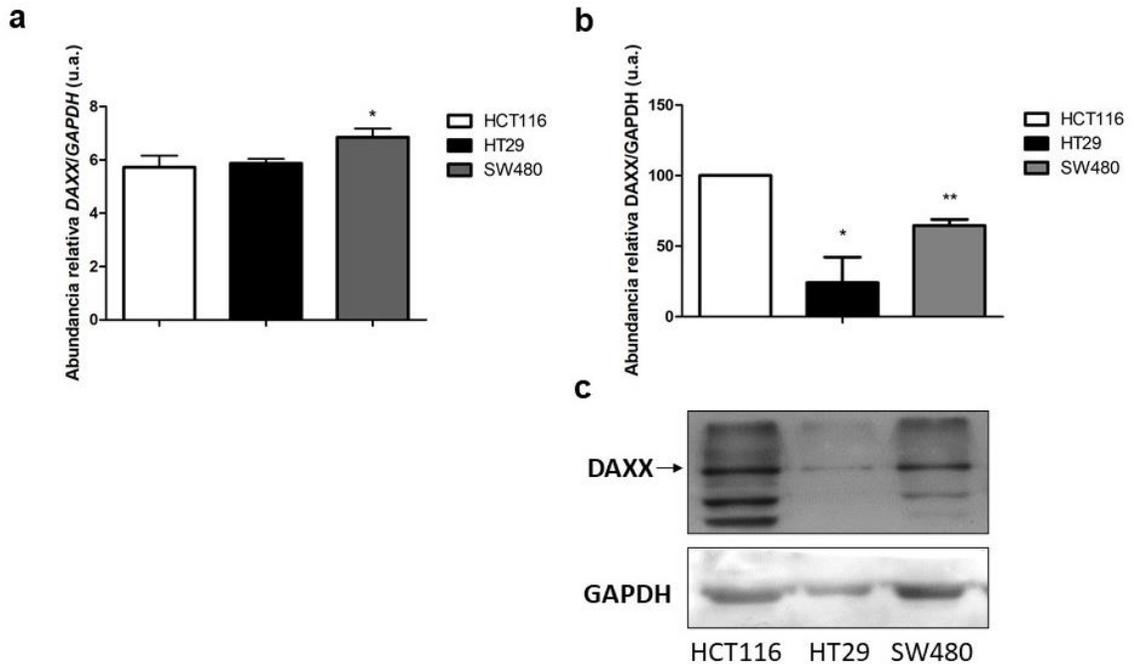


Figura 5. Expresión y abundancia de DAXX en líneas celulares de cáncer de colon. (A) Expresión de *DAXX* a nivel RNA evaluado por RT-qPCR, empleando como normalizador a *GAPDH*. (B) Abundancia relativa de la proteína DAXX, utilizando como control de carga a *GAPDH*. En cada gráfica se muestra la media y la desviación estándar. u.a.= unidades arbitrarias, *= $p \leq 0.05$ **= $p \leq 0.005$. (C) Western blot de DAXX y GAPDH. Donde en la membrana de DAXX, la banda indicada con una flecha corresponde a la proteína canónica (de 119 kDa) y las de menor peso molecular probablemente a isoformas. Los experimentos se realizaron por triplicado biológico (n=3).

A continuación, para identificar los genes que alteran su expresión al disminuir los niveles de DAXX, realizamos un RNA-seq de la línea HCT116 con DAXX disminuido mediante siRNAs (Figura 6). Como primer abordaje decidimos evaluar qué estaba sucediendo con la expresión de las secuencias repetidas, puesto que ya se había demostrado que DAXX deposita a H3.3 en estas regiones, sugiriendo su implicación en la regulación de estas. Así realizamos un análisis de la expresión diferencial de estas secuencias y encontramos que, al disminuir a DAXX en HCT116, sólo dos familias de repetidos se desregulan significativamente (Figura 7a). En ambos casos se sobreexpresan. Uno de los repetidos desregulados es ACRO1 (Figura 7b), el cual es un repetido satélite de 147 pb. Éste, de acuerdo con la literatura, se encuentra

principalmente en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (Yandlm & Karakülah, 2019), cercano a las regiones organizadoras del nucleolo (genes de rRNAs). La otra es LTR7Y, que presenta una expresión controlada durante los primeros estadios embrionarios, específicamente en las células internas del blastocisto (Chen et al., 2017; Yandlm & Karakülah, 2019) y se encuentra ampliamente distribuida en el genoma humano (Figura 7c).

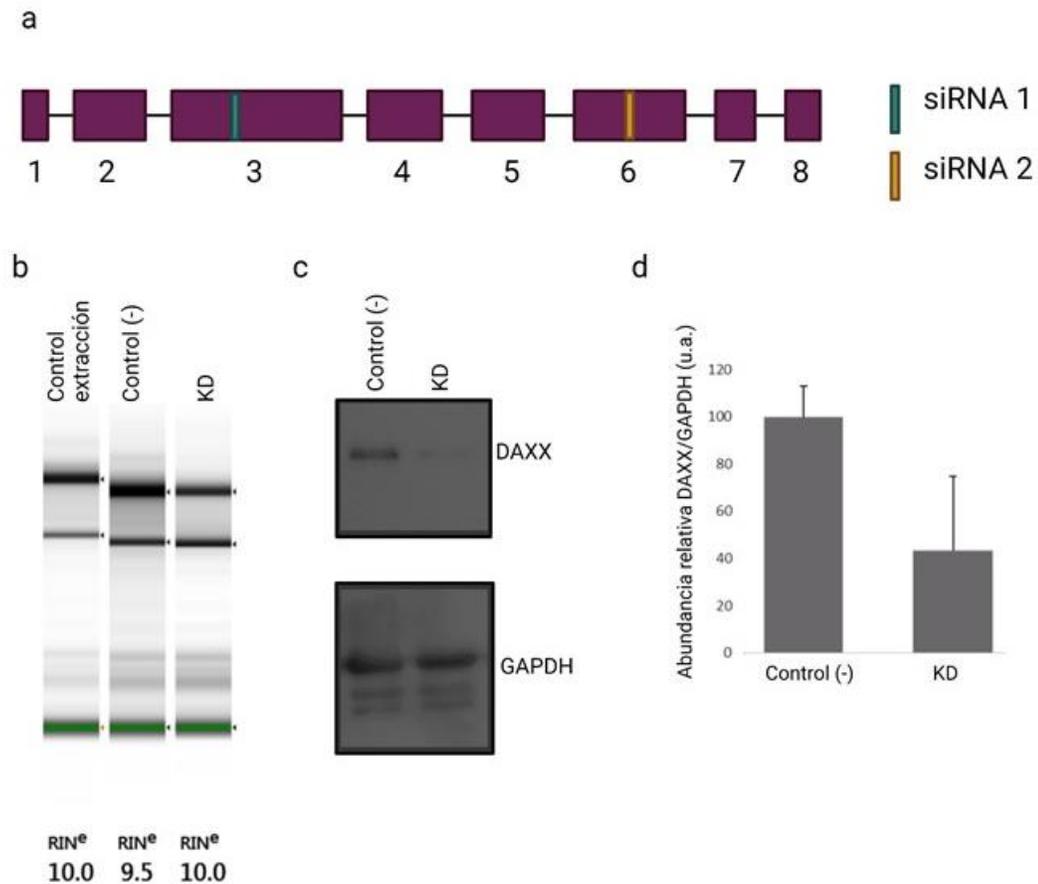


Figura 6. La utilización de dos siRNAs distintos disminuye reproduciblemente a DAXX. a) Esquema de las regiones en los exones donde las dos secuencias de siRNA son complementarias a DAXX para su inhibición. b) Electroforesis digital del RNA de HCT116 tanto en su control negativo (-) como con la subexpresión de DAXX (KD). C) Western blot de DAXX y GAPDH en DAXX WT y KD. D) Cuantificación de los niveles de DAXX en condiciones WT y KD (n=2) La gráfica muestra la media y desviación estándar. RIN: RNA Integrity Number, u.a.= unidades arbitrarias.

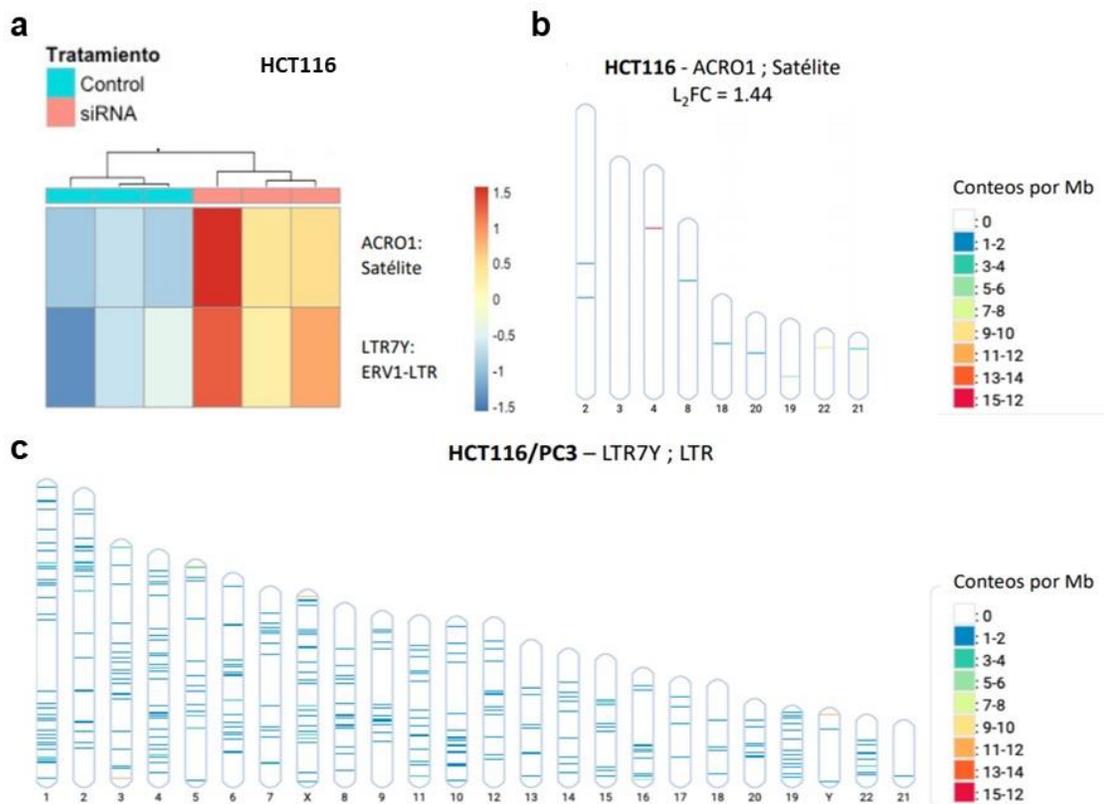


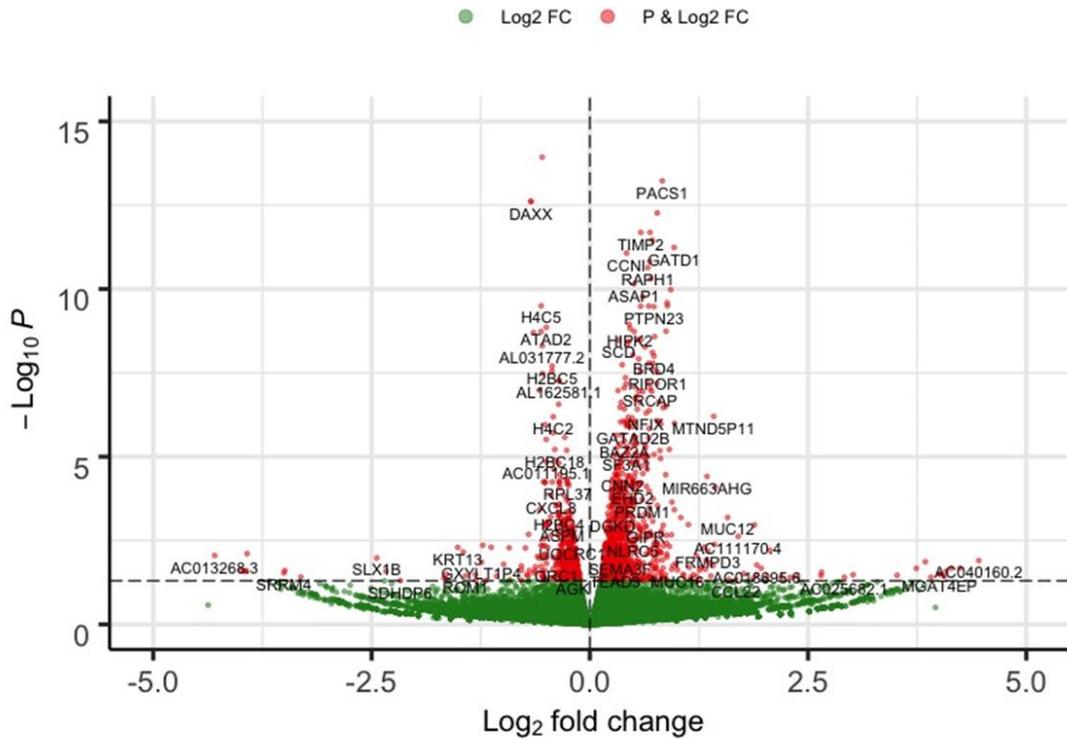
Figura 7. La subexpresión de DAXX causa la sobreexpresión de dos secuencias de repetidos. a) Mapa de calor con la tasa de cambio de las dos principales familias de repetidos desreguladas al subexpresar DAXX. En ambos casos hay una sobreexpresión de los repetidos. b y c) Cariogramas de la distribución en el genoma de los repetidos ACRO1 (b) y LTR7Y (c). El color de las bandas indica el número de copias por megabase presentes en esa región.

Posteriormente, de acuerdo con los resultados previos con el panel RT2 (Torres Arciga, 2019), decidimos enfocarnos en el análisis de la expresión diferencial de genes codificantes (Figura 8), con el cual encontramos un total de 346 genes significativamente desregulados ($p \leq 0.05$). De éstos, la mayoría (270 genes) se sobreexpresaron. Esto concuerda con la literatura, puesto que se sabe que DAXX puede funcionar como represor (Mahmud & Liao, 2019). Sin embargo, otros setenta y seis genes se subexpresaron (Figura 8a), sugiriendo otra función poco conocida

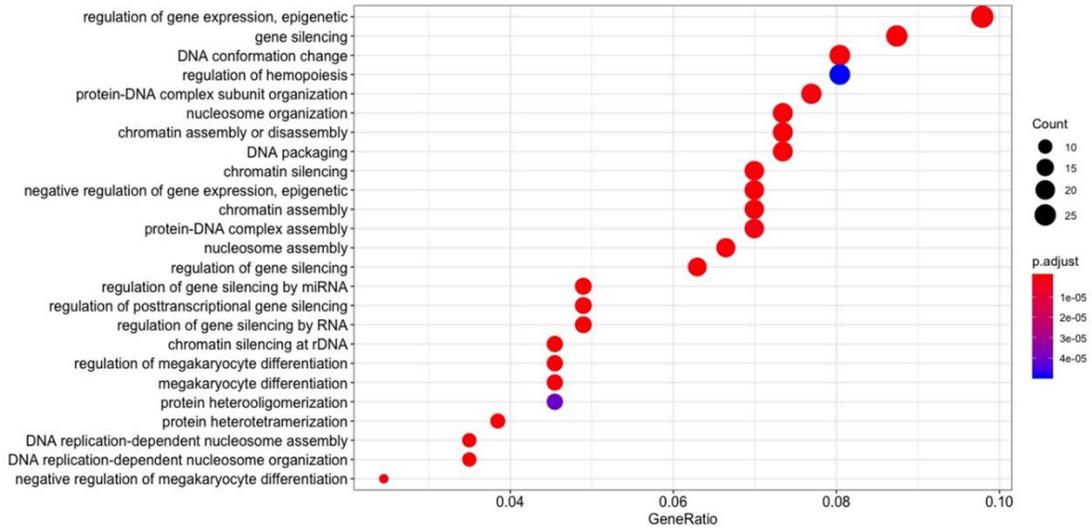
donde DAXX puede actuar directa o indirectamente para alterar la expresión génica. Al respecto de esta última función, es poco lo que se sabe, habiéndose reportado que DAXX puede interactuar con HDACs y CBP y de esta forma posicionarse en regiones abiertas a transcripción (Mahmud & Liao, 2019). Sin embargo, la importancia del posicionamiento de DAXX en estas regiones es desconocida, dejando abierta la posibilidad a en un futuro estudiar por qué DAXX podría estar en eucromatina.

A continuación, realizamos un análisis de Gene Ontology (GO) con la finalidad de observar cuáles eran las principales vías a las que pertenecen los genes desregulados al disminuir a DAXX. El utilizar GO nos permite enfocarnos en la función de los genes y sus productos para así catalogar y relacionar los genes desregulados que encontramos. Como se observa en la Figura 8b, la mayoría de los genes están relacionados con regulación de la expresión génica, silenciamiento génico y mantenimiento de la cromatina. Por su parte, realizamos un mapa de enriquecimiento de vías, a partir de los datos de los genes diferencialmente expresados. Esto nos permite comprobar que todos los genes desregulados significativamente participan en estas vías relacionadas (Figura 8c). Donde se destaca que el nodo central, con mayor número de interacciones es el de la regulación del silenciamiento génico. Esto último concuerda con la literatura, puesto que es bien conocido que DAXX interacciona con la maquinaria de represión transcripcional, lo que lo hace ser considerado como un represor (Mahmud & Liao, 2019). A su vez, el que todos los nodos estén conectados entre sí nos habla de que todos los procesos están relacionados, involucrando principalmente vías epigenéticas. Estos resultados, por lo tanto, parecen validar la función represora de DAXX y su participación en mecanismos epigenéticos para el mantenimiento de la cromatina.

a



b



C

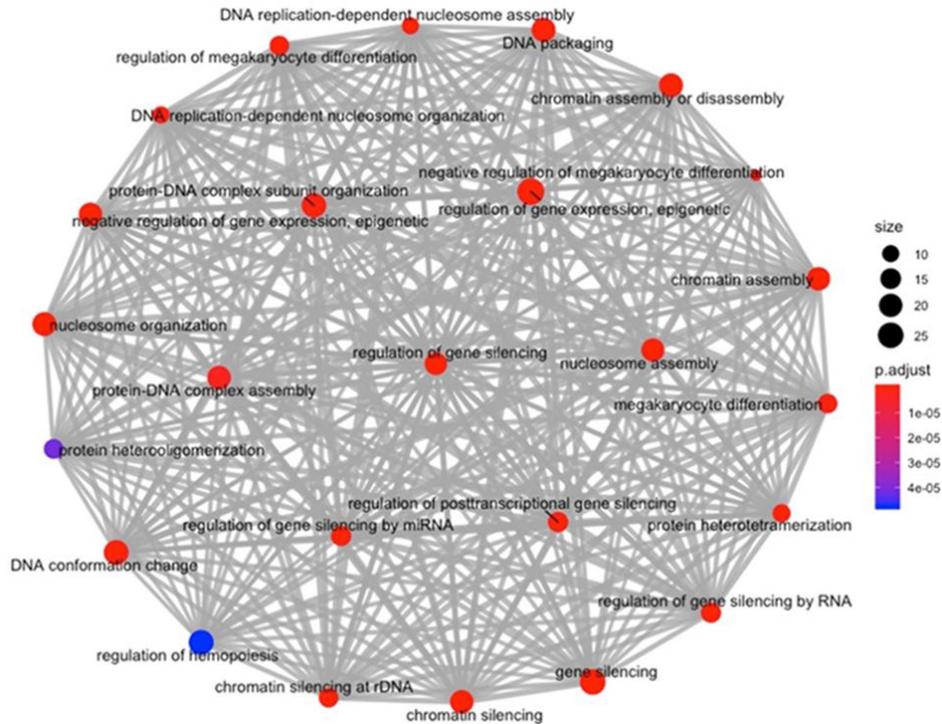


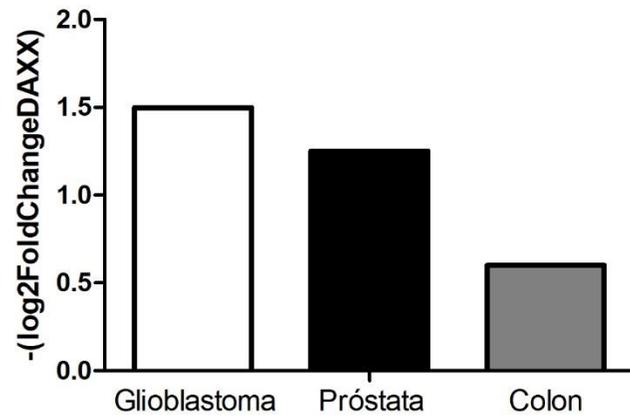
Figura 8. DAXX actúa mayoritariamente como represor y la mayoría de las vías desreguladas al subexpresarlo están relacionadas. a) Volcano plot de los genes diferencialmente expresados al subexpresar a DAXX en HCT116. Del total de genes desregulados significativamente (346 genes con $p \leq 0.05$), 270 se sobreexpresan (lado derecho en rojo) y 76 se subexpresan (lado izquierdo en rojo). b) Dot Plot de Gene Ontology de las principales vías enriquecidas donde están catalogados los genes desregulados al subexpresar a DAXX. c) Mapa de enriquecimiento de Gene Ontology para identificar si los genes significativamente desregulados están relacionados. La imagen muestra que todos los genes pertenecen a términos se encuentran relacionados, siendo el nódulo central el de regulación del silenciamiento génico. Tanto para el inciso b como c, se empleó una p ajustada ≤ 0.05 .

Una vez que habíamos observado los genes y las vías que se desregulaban al abatir a DAXX en HCT116, y con el fin de determinar la función de DAXX en la regulación de la expresión génica, proseguimos a realizar una comparación entre los genes encontrados desregulados en los tres modelos que hasta la fecha han subexpresado a DAXX y realizado un RNA-seq: uno en próstata (Puto et al., 2015), uno en glioblastoma (Benitez et al., 2017) y el nuestro en colon. Para esto, primero nos preguntamos cual era el nivel de abatimiento de DAXX en los diferentes modelos,

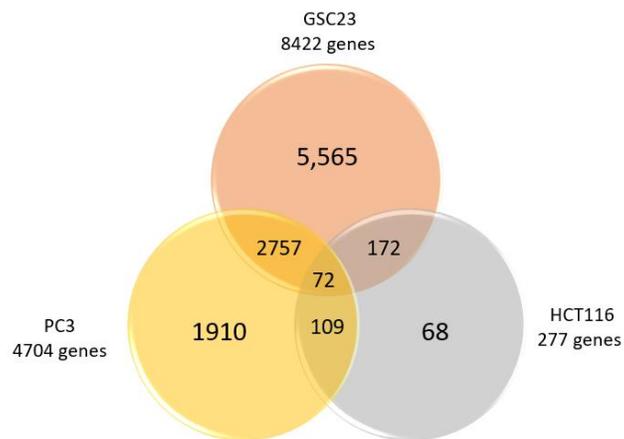
donde puede observarse en la Figura 9a, el modelo que logró disminuir más a DAXX fue el de glioblastoma, seguido de próstata y en menor cantidad el nuestro (logrando disminuir a DAXX en 70%, 60% y 37% respectivamente). Es importante mencionar que los abordajes de cada uno fueron distintos. Tanto en glioblastoma (GSC23) como en próstata (PC3), emplearon partículas lentivirales para lograr la inhibición. Mientras que nosotros utilizamos siRNAs para conseguirlo. Es por esto que nuestra transfección resulta menos estable y con un menor porcentaje de inhibición (logramos disminuir a DAXX en alrededor de un 30-40%).

A continuación, analizamos la cantidad de genes desregulados compartidos, siendo que los tres modelos comparten 72 genes con expresión diferencial (Figura 9b). Considerando el total de genes desregulados para cada modelo (277 para HCT116, 4704 para PC3 y 8422 para GSC23) podemos notar que son pocos los genes compartidos entre los tres modelos. Esto nos hace pensar que la mayoría de los genes desregulados están relacionados con vías específicas de cada línea celular. Sin embargo, con el fin de centrarnos en el estudio de genes desregulados compartidos sin importar el modelo, nos enfocamos en los genes que además de desregulados, compartieran la dirección de cambio, es decir, que en los tres modelos se subexpresaran o se sobreexpresaran. De esta manera encontramos nueve genes, y de estos, sólo uno se subexpresa al disminuir a DAXX: DAXX mismo. Los otros ocho genes restantes se encuentran significativamente sobreexpresados en los tres modelos (Figura 9c). Mediante un análisis de STRING (Herramienta de búsqueda para la recuperación de genes/proteínas que interactúan), pudimos observar que ninguna de las proteínas codificadas por esos genes interacciona entre sí. Es por eso, que decidimos consultar en la literatura lo que se conoce de cada uno de estos genes. Esto con la finalidad de escoger los genes donde se evaluaría la segunda parte del proyecto, cuyo objetivo es caracterizar el enriquecimiento de H3.3 en genes sobreexpresados por la ausencia de DAXX.

a



b



c

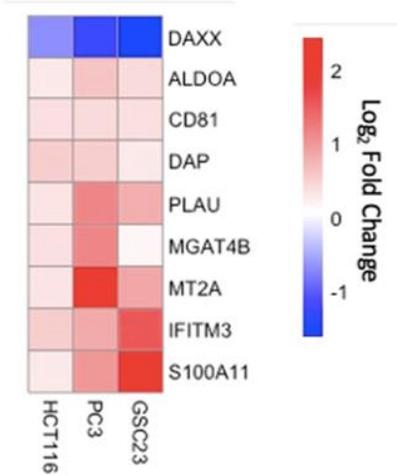


Figura 9. La subexpresión de DAXX en tres modelos distintos desregula ocho genes de manera constante. a) Nivel de disminución de DAXX en los tres modelos DAXX KD. De acuerdo con los datos obtenidos en los RNA-seq, glioblastoma presenta la mayor inhibición de DAXX, seguida de próstata y en menor medida colon. b) Diagrama de Venn que muestra la cantidad de genes desregulados compartidos entre los modelos celulares. c) Mapa de calor de los genes desregulados en los tres modelos de DAXX KD, donde se compara la tasa de cambio de los genes cuando se subexpresa DAXX (KD) versus condiciones normales (WT). Con excepción de DAXX, los otros ocho genes constantes y significativos entre los tres modelos se encuentran sobreexpresados. PC3; línea celular de cáncer de próstata, HCT116; línea celular de cáncer de colon, GSC23; línea celular de glioblastoma.

Para asegurarnos que los genes a evaluar no fueran tejido o modelo específico, sino más bien regulados directamente por DAXX sin importar el tipo celular, decidimos escoger genes que estuvieran dentro de la lista compartida entre los tres modelos. Para seleccionar dentro de esta lista a nuestros dos genes de estudio, además, se buscó en la literatura si estos pudieran estar involucrados en la generación de cáncer o en la progresión, o en la generación de un fenotipo más maligno. De esta forma, por las características previamente mencionadas, decidimos estudiar a los siguientes dos genes:

MT2A. La expresión de esta metalotioina se ha visto desregulada en cáncer (Gomulkiewicz et al., 2010; Wülfing et al., 2007), y su sobreexpresión se ha relacionado con una mayor capacidad de invasión y migración en cáncer de mama (Kim et al., 2011). A su vez, en cáncer gástrico se ha propuesto como un biomarcador pronóstico (Si & Lang, 2018).

IFITM3. A pesar de que este gen ha sido primordialmente estudiado por su función para conferir inmunidad contra infecciones virales (Spence et al., 2019), se ha visto que su sobreexpresión promueve la proliferación celular y metástasis en distintos tipos de cáncer como próstata y hepatocelular (Min et al., 2018).

Para cada uno de estos dos genes se identificó su región promotora, basándonos tanto en la literatura como mediante el empleo de visores de ENCODE como Genome

Browser y WashU (Allen et al., 2017; Starska et al., 2015). Dentro de estos genes, buscamos las modificaciones postraduccionales de histonas enriquecidas en la región promotora como son H3K4me3 y H3K27ac. Además, se buscaron islas CpG altas (regiones con alta frecuencia de pares de base CpG) dentro de estas zonas para ver si sus promotores están sujetos a silenciamiento por metilación. Una vez identificados los promotores, se descargaron las secuencias y se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para el promotor de cada gen (Tabla 3).

Con el objetivo de observar si la regulación de estos genes por DAXX es promovida por su actividad como chaperona de H3.3, analizamos la deposición de H3.3 en los genes seleccionados. Para esto realizamos en primera instancia una ChIP con 1,150,000 millones de células por IP para determinar si tanto DAXX como H3.3 están enriquecidos de manera normal en los promotores de los genes previamente escogidos (Figura 10). Como controles positivos de presencia de DAXX y de H3K9me3 empleamos las regiones del satélite 2 y el satélite alfa (Drané et al., 2010; González-Barrios et al., 2014; Saksouk et al., 2015), mientras que como control negativo utilizamos la región promotora de *GAPDH*. Por su parte, para cada gen (*IFITM3* y *MT2A*), diseñamos dos pares distintos de oligos en diferentes regiones del promotor de cada gen. A cada par de primers los nombramos P1 y P2 respectivamente.

Como era de esperarse, en los controles positivos (Figura 10a; Satélite Alfa y 2), encontramos tanto a DAXX como a H3.3, mientras que ocurrió lo opuesto en el promotor de *GAPDH* (Figura 10a). Por su parte, dentro de los promotores de los genes *IFITM3* (Figura 10b y c) y *MT2A* (Figura 10d y e) también encontramos enriquecimiento de DAXX y H3.3. Esto no había sido reportado previamente y nos lleva a pensar que DAXX no sólo se encuentra restringida a regiones de heterocromatina.

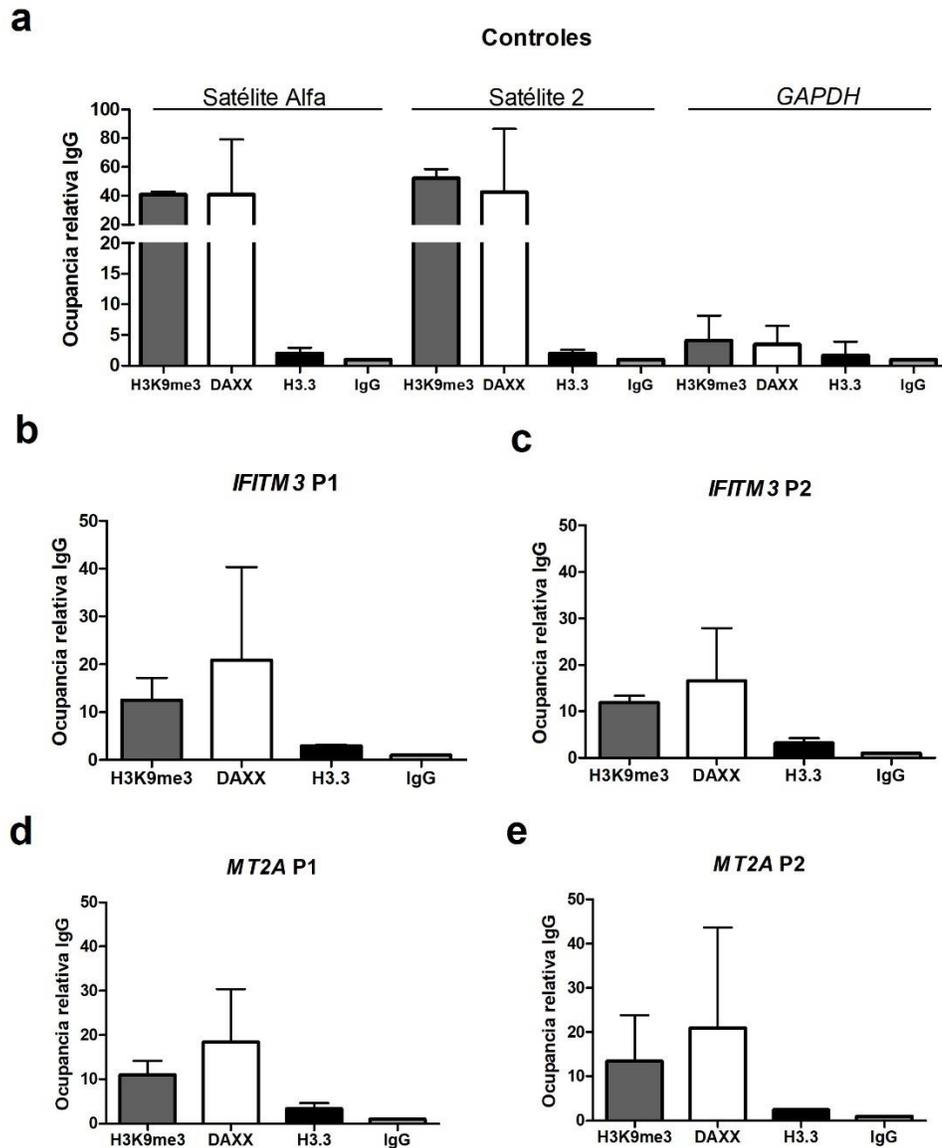


Figura 10. DAXX se encuentra enriquecido en los promotores de los genes *IFITM3* y *MT2A*. ChIP-qPCR con el kit One Day ChIP kit en diferentes regiones del genoma para evaluar la presencia de DAXX. Se emplearon como controles positivos a Sat Alfa (a) y Sat2 (a), como control negativo al promotor de *GAPDH* (a) y como regiones de interés dos regiones distintas de los promotores (denotados como P1 y P2) de *IFITM3* (b y c) y *MT2A* (d y e), n=2. En cada gráfica se muestra la media y la desviación estándar.

Discusión

Los niveles de DAXX varían a nivel proteína, pero no mRNA en distintas líneas celulares de cáncer de colon

De acuerdo con el proyecto GENIE de AACR (<https://www.mycancergenome.org/content/gene/daxx/#ref-3>), DAXX se encuentra alterado en alrededor del 1.45% de todos los tipos de cáncer, siendo el adenocarcinoma de colon uno de los de mayor prevalencia por detrás de PanNETs y adenocarcinoma de pulmón. Al comparar los diferentes niveles de DAXX en las líneas celulares de cáncer, observamos que el nivel de mRNA varía poco en comparación a proteína. Esto podría sugerirnos una regulación pos-transcripcional del gen, sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que propongan un mecanismo específico para regular la transcripción y degradación del mRNA. En cambio, lo que sí se sabe es que la abundancia de la proteína DAXX está regulada por degradación mediada por ubiquitinación, siendo SPOP (proteína POZ tipo Speckle) una de las ligasas de ubiquitina que promueven su degradación proteosomal (Mahmud & Liao, 2019). Si ésta última se encuentra mutada, compromete la degradación de DAXX, por lo que sería interesante evaluar el estado de SPOP en nuestras líneas celulares para ver si pudo haber influido en la abundancia de DAXX. Otras proteínas que regulan la estabilidad y degradación de la proteína DAXX y que también sería interesante evaluar su estado son Pcd4 (Kumar et al., 2013), Mdm2 y Hausp (Tang et al., 2010).

En este sentido, Liu et al. (2020) compararon la expresión génica y la abundancia proteica de DAXX en diferentes líneas celulares de cáncer de colon, entre ellas HCT116 y HT29. De acuerdo con su estudio, HT29 tiene una tendencia a mayores niveles de mRNA de DAXX con respecto a HCT116, sin embargo, no es significativo. A nivel proteína, ambas líneas celulares tienen niveles parecidos. Esto contrasta con lo que nosotros observamos, sin embargo, esto podría deberse a los medios de cultivo en el que las células fueron crecidas. Nosotros sembramos todas en el medio McCoy 5A suplementado con 10% SFB a 37°C y 5% CO₂ como lo recomienda ATCC (American Type Culture Collection, en inglés), mientras que Liu et al. (2020) cultivaron estas dos líneas en DMEM de alta glucosa suplementado con 10% SFB a 37°C y 5% CO₂. Al respecto, se ha demostrado previamente que el utilizar diferentes medios de crecimiento puede alterar su polaridad (Polak-Charcon et al., 1989) y también su perfil transcripcional (Pirsko et al., 2018). Por otro lado, ellos no utilizaron SW480, mientras que nosotros la crecimos bajo las mismas condiciones que HCT116 y HT29. A pesar de esto, ATCC recomienda

crecerlas en medio Leibovitz L-15, con 10% SFB, 37°C y 0% CO₂. Por lo cual es posible que, de encontrar estudios donde hayan utilizado esta línea celular, no podamos compararlos. Sin embargo, al crecerlas en las mismas condiciones podemos comparar las tres líneas celulares bajo las mismas condiciones de crecimiento, dándonos un menor sesgo entre condiciones. Aunque probablemente afectando el perfil transcripcional de SW480 previamente descrito.

Aunque en algunos modelos como cáncer de ovario (Pan et al., 2013) y próstata (Shing Kwan et al., 2013) esté bien establecido que la sobreexpresión y abundancia de DAXX promueven la progresión del cáncer, en cáncer de colon parece ser al contrario. Aquí, la pérdida de DAXX ha sido asociada a metástasis (Liu et al., 2020) y progresión del ciclo celular de estas células cancerosas (Tzeng et al., 2006). Estudiar el efecto de la disminución de los niveles de DAXX en una línea celular cromosómicamente estable como es HCT116, nos permite tener un mayor control de los efectos de su disminución y de los genes desregulados.

La subexpresión de DAXX desregula la expresión secuencias repetidas distribuidas a lo largo de todo el genoma

El silenciamiento de regiones de heterocromatina constitutiva, así como de las secuencias repetidas, resulta primordial para el mantenimiento de la estabilidad genómica. En particular, la represión de las secuencias repetidas restringe la actividad de copias potencialmente funcionales y previene la activación aberrante de genes aledaños a estas secuencias (Groh & Schotta, 2017). Es ampliamente aceptado y se ha demostrado que DAXX actúa como chaperona en regiones de heterocromatina constitutiva y secuencias de repetidos de DNA (Elsaesser & Allis, 2010; Voon & Wong, 2015b). A pesar de esto, y de manera sorprendente, la importancia de DAXX en la regulación transcripcional de elementos repetitivos ha sido pobremente estudiada a nivel transcriptómico. Por esta razón, nosotros decidimos analizar qué secuencias repetidas son desreguladas al disminuir los niveles de DAXX. En nuestros resultados, identificamos que para la línea celular HCT116, se desregulan de manera significativa dos principales subfamilias de repetidos: ACRO1 y LTR7Y. El primero corresponde a un repetido satélite de 147 pb encontrado principalmente en los brazos cortos de cromosomas acrocéntricos, cercanos a las regiones organizadoras del nucléolo. De manera normal, se ha reportado que ACRO1 se expresa primordialmente durante los primeros estadios del desarrollo, teniendo un pico en el estadio de 4 células (Yandlm & Karakulah, 2019). Sin embargo, este repetido permanece silenciado el resto del tiempo en condiciones normales. En cambio en cáncer,

Ting et al. (2011) evaluaron la expresión de diferentes clases de satélites en adenocarcinoma ductal pancreático y observaron que en comparación con el tejido normal, en el tumor tanto ACRO1 como otros grupos de satélite, se encontraban sobreexpresados. Si bien encontraron que la desrepresión de estos elementos en general puede afectar el silenciamiento de las regiones de heterocromatina, no se sabe qué efecto puede tener la desrepresión exclusiva de ACRO1, cuya distribución se encuentra cercana a regiones de gran importancia como son las regiones organizadoras del nucleolo.

Por otro lado, se encuentra LTR7Y, el cual es un repetido de la familia HERVH/LTR7 disperso a lo largo de los cromosomas. A pesar de usualmente encontrarse silenciados, se ha visto que tiene un pico de expresión en estadio de blastocisto (Göke et al., 2015). En enfermedades como cáncer, también se ha observado que existe una desregulación de esta secuencia. Particularmente, Kong et al. (2019) encontraron que en ciertos tipos de cáncer, entre los que destaca adenocarcinoma de colon, varias familias de elementos transponibles entre ellos LTR7Y, se encuentran desregulados. Si bien ellos asociaron la expresión de estos elementos a estimulación del sistema inmune, la desregulación particular de LTR7Y no ha sido abordada hasta ahora.

A pesar de que hasta ahora no hay estudios que aborden el efecto de la desrepresión particular de ACRO1 y LTR7Y, lo que sí se sabe es que, de manera general, cuando una célula ya está completamente diferenciada es indispensable mantener a este tipo de secuencias reprimidas. Su desrepresión puede ocasionar inestabilidad genómica, transcripción aberrante de RNAs a partir de algunos elementos transponibles, así como alteración en el perfil transcripcional, al afectar la expresión de genes cercanos o embebidos en estas regiones (Groh & Schotta, 2017).

Estas dos clases de repetidos se sobreexpresan significativamente al disminuir los niveles de DAXX, lo cual podría sugerir que DAXX estaría promoviendo la represión de estas secuencias. Este resultado concuerda con lo reportado en la literatura, donde posicionan a DAXX en estas regiones (Drané et al., 2010; Lewis et al., 2010). Es importante mencionar que existe sólo un artículo (Wasylishen et al., 2020) donde evaluaron las secuencias retrovirales endógenas (ERVs) desreguladas al disminuir a DAXX y mutar al gen *Men1*, en un modelo de páncreas de ratón y PanNETS. Sin embargo, la desregulación de ERVs al disminuir a DAXX no ha sido abordada con estudios masivos en humanos, además de que los ERVs desregulados identificados en ratones son

distintos a los encontrados por nosotros en HCT116, por lo que esta regulación por parte de DAXX podría ser modelo específico y un campo potencialmente novedoso de estudio en la regulación de dichos elementos génicos. Así mismo, Wasylishen et al. (2020) también observaron que la desregulación de algunos ERVs por la pérdida de DAXX causa la alteración transcripcional de genes cercanos a dichas secuencias ERVs. En el presente trabajo, no pudimos evaluar si la alteración de las dos clases de repetidos en HCT116 afectaban la transcripción de genes aledaños, esto debido principalmente al abordaje que hicimos: Nosotros trabajamos a partir de una secuenciación de RNA-seq, y si consideramos que las secuencias repetidas se encuentran dispersas a lo largo del genoma, no nos es posible saber con exactitud la posición y región cromosómica de la cual se está generando la sobreexpresión de estos elementos, y por lo tanto su mapeo a un lugar específico de los cromosomas resulta un reto. De cualquier manera, es relevante considerar esta hipótesis en modelos humanos como un posible mecanismo de regulación novedoso de genes por parte de DAXX para futuros trabajos, abordándolo de manera directa y utilizando técnicas capaces de estudiarlo específicamente.

La disminución de los niveles de DAXX altera la expresión de genes codificantes

Al estudiar la contribución de DAXX en la regulación génica, pudimos identificar distintos genes codificantes, los cuales alteraron su expresión al disminuir a DAXX en HCT116. Esto contrasta con la literatura prevalente, la cual posiciona a DAXX en regiones carentes de genes (heterocromatina constitutiva) (Voon & Wong, 2015). En nuestro modelo de HCT116, se desregularon 346 genes. De ellos, 270 se sobreexpresaron y 76 se subexpresaron. Entre los sobreexpresados destacan genes como *PLAU*, *PACS1* y *SETD1B* mientras que entre los subexpresados están clusters de histonas, *ATAD2* y *TOP2A*. De entre estos genes, la mayoría de ellos se encuentran anotados en Gene Ontology en términos de procesos biológicos relacionados con la regulación de la expresión y el silenciamiento génico, siendo que todas las vías enriquecidas se encuentran relacionadas entre sí, teniendo como nodo central la regulación del silenciamiento génico. Esto parece validar nuestro razonamiento acerca de que DAXX estaría funcionando principalmente como un represor epigenético (ya sea directo o indirecto) en HCT116, sin embargo, harían falta más análisis para poder llegar a una comprobación. Además, esto no explicaría los genes que se subexpresan al abatir a DAXX, los cuales podrían tener un mecanismo distinto, y mucho menos comprendido, a los que hemos mencionado. Además, es importante considerar si el efecto puede ser dependiente o independiente de la sobre expresión de ACRO1 y LTR7Y para la desregulación de genes

codificantes, o si es mediante otro mecanismo. A nuestro conocimiento, nuestro estudio presenta resultados novedosos y pioneros, los cuales contribuyen a sugerir el concepto de DAXX no solo como solo un participante de la regulación de elementos heterocromáticos constitutivos, sino también de genes codificantes. Sin embargo, se requerirán más estudios para elucidar los mecanismos implicados y su importancia en la biología de la célula y en las enfermedades.

La subexpresión de DAXX altera la expresión de nueve genes en tres modelos celulares distintos

El uso de nuevas tecnologías como el RNA-seq han permitido el estudio de manera más amplia y precisa del transcriptoma celular tanto en condiciones normales como bajo diferentes condiciones fisiológicas (Z. Wang et al., 2009). Revisando en la literatura, encontramos que existen dos estudios además del nuestro donde mediante RNA-seq han evaluado algunos efectos de la reducción en los niveles de DAXX (Benitez et al., 2017; Puto et al., 2015). Las líneas celulares donde se llevaron a cabo fueron GSC23 y PC3, de glioblastoma y próstata respectivamente. De los tres modelos, el nuestro tuvo los menores niveles de abatimiento de DAXX, probablemente debido a nuestra elección de utilizar siRNAs para su depleción en comparación con los shRNAs que ellos emplearon. Al respecto, se ha estudiado que la transfección de células con shRNAs es un mecanismo de inhibición más efectivo y duradero en comparación la transitoriedad de los siRNAs (DD et al., 2009), por lo que de haber empleado esta misma tecnología quizás hubiéramos alcanzado mayores niveles de inhibición. Sin embargo, es necesario resaltar que nuestros niveles de inhibición fueron suficientes para observar cambios transcripcionales en HCT116, incluyendo genes desregulados compartidos entre los tres modelos.

Al igual que el nivel de disminución de DAXX fue variable entre los distintos modelos, el número de genes desregulados varió significativamente. En el caso de HCT116 encontramos 276 genes codificantes diferencialmente expresados, mientras que en PC3 y GSC23, 4704 y 8422 respectivamente. De entre todos estos genes, nueve se compartían entre modelos y tenían la misma dirección de cambio entre sí, es decir, sin importar el modelo se sobreexpresaban o subexpresaban. El que sólo nueve genes se hayan compartido en los tres modelos celulares, nos sugiere que la desregulación génica inducida por la pérdida de DAXX pudiese ser tejido específico, sin embargo, es necesario ahondar más al respecto. Además, del total de genes compartidos, DAXX fue el único gen con subexpresión constante, lo cual nos sirve como un control positivo del análisis, puesto

que fue éste en el que los tres modelos disminuyeron sus niveles de mRNA de manera dirigida.

A pesar de que nuestros resultados sugieren que DAXX está involucrado en la regulación génica, ya sea directa o indirectamente, nosotros nos centramos en estudiar con mayor profundidad a los genes compartidos entre los tres modelos celulares. Esto nos da una mayor certeza de estar estudiando un mecanismo basal, o más conservado, de regulación génica, donde en realidad sea DAXX el responsable de alterar la expresión de estos genes.

Un trabajo realizado en mi laboratorio (Navarro, 2021) mediante el empleo del programa computacional STRING, evaluó si estos genes compartidos desregulados participaban e interactuaban entre sí en alguna vía biológica común, sin embargo, no encontraron interacción significativa entre estas proteínas. Esto nos sugiere que no son parte de una misma vía desregulada al disminuir a DAXX, sino que son genes cuya expresión se ve alterada de manera independiente al alterar los niveles de DAXX.

El mecanismo mediante el cual la subexpresión de DAXX altera la expresión de estos genes se desconoce. A la fecha, existen varios estudios donde han explorado posibles mecanismos de regulación de genes diferentes a los nuestros. Entre ellos encontramos la represión de genes como *DAPK1* y *DAPK3* mediante la metilación de sus promotores gracias al reclutamiento de la DNMT1 por DAXX (Puto & Reed, 2008), la interacción de un factor transcripcional como Slug (Lin et al., 2016), la desregulación de ERVs cercanos a genes (Wasylishen et al., 2020) y alteraciones en el enriquecimiento de H3.3 (Benitez et al., 2017). Al respecto de esto último, se ha visto en ratón, que los niveles de H3.3 influyen en la actividad represora de DAXX en ERVs y algunos genes, no por su deposición en estas regiones, sino porque estabiliza los niveles de la proteína DAXX (Hoelper et al., 2017).

Para el presente trabajo nosotros decidimos enfocarnos en estudiar el enriquecimiento de H3.3 y DAXX en los genes desregulados, sin dejar de lado la posibilidad de que los otros mecanismos mencionados también tengan un papel importante en esta regulación transcripcional.

DAXX y H3.3 se encuentran enriquecidos en el promotor de los genes sobreexpresados compartidos

La distribución e incorporación de H3.3 a lo largo del genoma es un proceso altamente regulado, cuya alteración resulta en enfermedades congénitas, cáncer o incluso la letalidad del embrión (Jang et al., 2015). De igual forma, se ha visto que alteraciones tanto en la regulación como mutaciones en sus chaperonas (DAXX y HIRA) se encuentran presentes en distintos tipos de cáncer (Nye et al., 2018). Con el propósito de evaluar si DAXX y H3.3 se encuentran localizados en los genes que se desregularon al disminuir a DAXX, realizamos una inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) evaluando su presencia en los promotores de los genes *IFITM3* y *MT2A*. Elegimos estos genes no sólo por estar desregulados en los tres modelos, sino también por su asociación con cáncer y su localización en los cromosomas. Mientras que *IFITM3* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11, muy cercano a la región telomérica de éste, *MT2A* se encuentra en el cuerpo del brazo largo del cromosoma 16. Así, aun cuando DAXX se encuentre presente en *IFITM3* por la cercanía de su gen con la región telomérica, *MT2A* es un gen no está cercano a ninguna región estructural de heterocromatina constitutiva. De esta forma, la posible explicación de la presencia de DAXX en este gen, no tendría que ver con la posible expansión de la heterocromatina.

El haber encontrado tanto a DAXX como a H3.3 enriquecido en dos regiones distintas del promotor (P1 y P2 respectivamente) de estos dos genes, nos indica que DAXX se encuentra presente en regiones que no sólo son heterocromatina constitutiva en la línea celular HCT116 (Figura 11). Esto resulta importante puesto que la literatura siempre ha descrito que para la variante de histonas H3.3 existen dos complejos diferentes para su deposición en regiones distintas del genoma: HUCA (complejo conformado por HIRA, UBN1 y CABIN1) que la deposita en eucromatina (o regiones ricas en genes y potencialmente activos a la transcripción), y DAXX/ATRAX, que lo hace en heterocromatina constitutiva (Elsaesser & Allis, 2010). Sería además interesante evaluar diferentes estudios masivos como RNA-seq y ChIP-seq de HIRA KD para contrastar lo observado al disminuir a DAXX, y comprobar si efectivamente DAXX y HIRA depositan a H3.3 en regiones mutuamente excluyentes o si pueden posicionarse en algunas regiones compartidas en caso necesario como un mecanismo compensatorio. Por ejemplo, en el caso de que una de las dos chaperonas se encuentre ausente, la otra intente suplir la integración de H3.3 en regiones donde normalmente no actuaría.

Por otro lado, la evaluación de una línea celular no neoplásica nos permitiría ver si el enriquecimiento de DAXX en los promotores de estos genes es un proceso que ocurre de manera normal en las células o si es un proceso único del cáncer como tal. Resulta entonces importante recalcar el papel que desempeñan las chaperonas de histonas en el mantenimiento del epigenoma, teniendo que estar estrictamente reguladas para evitar así su actividad aberrante, y de esta forma permitir el correcto funcionamiento celular.

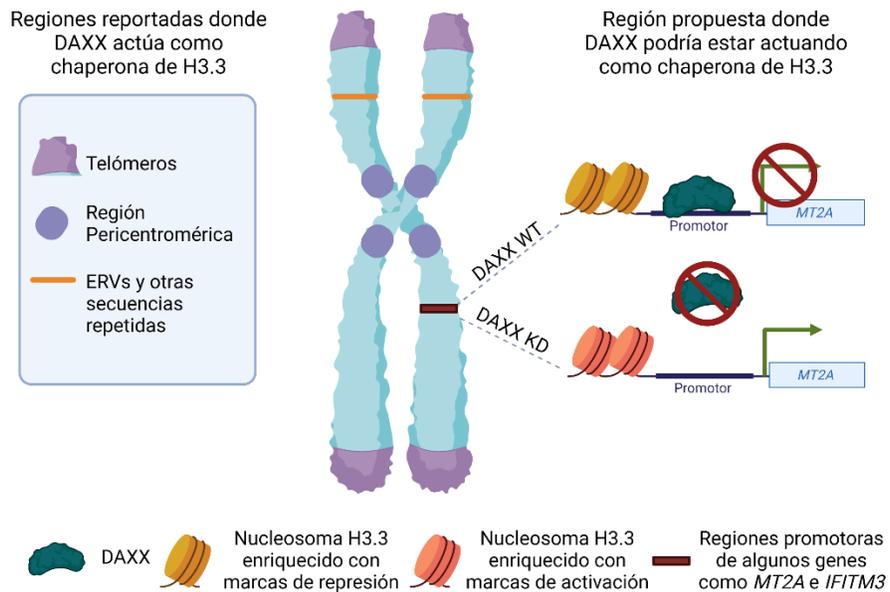


Figura 11. La función y localización de DAXX en los cromosomas podría no estar limitada a heterocromatina. Hasta ahora, los reportes señalan a DAXX como chaperona de H3.3 únicamente en regiones de heterocromatina constitutiva, como son telómeros, la región pericentromérica, ciertos ERVs y algunas secuencias repetidas. Sin embargo, en el presente trabajo se propone que DAXX también puede encontrarse en el promotor de *MT2A* e *IFITM3*, reprimiendo su transcripción (DAXX WT). Y que al disminuir sus niveles (DAXX KD) estos genes se desreprimen. Creado con BioRender.com

Conclusiones

La chaperona de H3.3 en heterocromatina constitutiva, DAXX, se encuentra enriquecida a nivel proteínico en la línea celular HCT116 en comparación con HT29 y SW480. La disminución en los niveles de DAXX en HCT116 ocasiona la desrepresión de dos clases de secuencias repetidas: ACRO1 y LTR7Y, además de la desregulación de 346 genes codificantes, siendo que la mayoría de ellos (270 genes) se sobreexpresan. Esto nos indica que DAXX podría estar participando en la regulación transcripcional de algunos genes, actuando principalmente como represor. Por primera vez se demostró, mediante la técnica de CHIP, la presencia de DAXX y H3.3 en el promotor de los genes *IFITM3* y *MT2A*. Esto abre la puerta al planteamiento de que las funciones de DAXX no se encuentran restringidas a la heterocromatina constitutiva, sino también a algunos genes codificantes.

Perspectivas

- Comparar el enriquecimiento de DAXX y H3.3 en el promotor de *IFITM2* y *MT2A* en condiciones control (-) y KD. Así como en una línea celular epitelial no neoplásica.
- Comparar los niveles de expresión de *IFITM3* y *MT2A* en condiciones control (-) y KD.
- Completar el triplicado biológico del RNA-seq de HCT116 de DAXX KD.
- Comprobar la expresión de LTR7Y y ACRO1 en HCT116 en condiciones DAXX KD.

Referencias bibliográficas

- Agrawal, T. (2013). *The Multifunctional Protein Daxx: Studies of its Biology and Regulation, and Discovery of a Novel Function*. 828.
<http://repository.upenn.edu/edissertations><http://repository.upenn.edu/edissertations/828>
- Allen, E. K., Randolph, A. G., Bhangale, T., Dogra, P., Ohlson, M., Oshansky, C. M., Zamora, A. E., Shannon, J. P., Finkelstein, D., Dressen, A., DeVincenzo, J., Caniza, M., Youngblood, B., Rosenberger, C. M., & Thomas, P. G. (2017). SNP-mediated disruption of CTCF binding at the IFITM3 promoter is associated with risk of severe influenza in humans. *Nature Medicine*, 23(8), 975–983.
<https://doi.org/10.1038/NM.4370>
- Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. In *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
- Annunziato, A. (2008). *DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin | Learn Science at Scitable*. Nature Education.
<https://www.nature.com/scitable/nated/article?action=showContentInPopup&contentPK=310>
- Bach, D. H., Zhang, W., & Sood, A. K. (2019). Chromosomal Instability in Tumor Initiation and Development. *Cancer Research*, 79(16), 3995. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3235>
- Benitez, J. A., Ma, J., D'Antonio, M., Boyer, A., Camargo, M. F., Zanca, C., Kelly, S., Khodadadi-Jamayran, A., Jameson, N. M., Andersen, M., Miletic, H., Saberi, S., Frazer, K. A., Cavenee, W. K., & Furnari, F. B. (2017). PTEN regulates glioblastoma oncogenesis through chromatin-associated complexes of DAXX and histone H3.3. *Nature Communications*, 8(1), 15223. <https://doi.org/10.1038/ncomms15223>
- Brahma, S., Udugama, M. I., Kim, J., Hada, A., Bhardwaj, S. K., Hailu, S. G., Lee, T. H., & Bartholomew, B. (2017). INO80 exchanges H2A.Z for H2A by translocating on DNA proximal to histone dimers. *Nature Communications*, 8(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15616>
- Buschbeck, M., & Hake, S. B. (2017). Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 299–314). <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.166>
- Chen, F., Ji, J., Shen, J., & Lu, X. (2017). When Long Noncoding RNAs Meet Genome Editing in Pluripotent Stem Cells. In *Stem Cells International* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/3250624>
- Cutter, A. R., & Hayes, J. J. (2015). A brief review of nucleosome structure. In *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016>
- DD, R., JS, V., N, S., & J, N. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(9), 746–759.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2009.04.004>

- De Koning, L., Corpet, A., Haber, J. E., & Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nature Structural & Molecular Biology* 2007 14:11, 14(11), 997–1007. <https://doi.org/10.1038/nsmb1318>
- Delbarre, E., Ivanauskiene, K., Spirkoski, J., Shah, A., Vekterud, K., Moskaug, J. Ø., Ove Bøe, S., Wong, L. H., Küntziger, T., & Collas, P. (2017). *PML protein organizes heterochromatin domains where it regulates histone H3.3 deposition by ATRX/DAXX*.
- Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., & Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.566910>
- Elsaesser, S. J., & Allis, C. D. (2010). HIRA and Daxx constitute two independent histone H3.3-containing predeposition complexes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.008>
- Elsässer, S. J., Huang, H., Lewis, P. W., Chin, J. W., Allis, C. D., & Patel, D. J. (2012). DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature*, 491(7425), 560–565. <https://doi.org/10.1038/nature11608>
- Escobar-Cabrera, E., Lau, D. K. W., Giovinazzi, S., Ishov, A. M., & McIntosh, L. P. (2010). Article Structural Characterization of the DAXX N-Terminal Helical Bundle Domain and Its Complex with Rassf1C. *Structure/Folding and Design*, 18, 1642–1653. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.09.016>
- Felsenfeld, G., & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448–453. <https://doi.org/10.1038/nature01411>
- Göke, J., Lu, X., Chan, Y. S., Ng, H. H., Ly, L. H., Sachs, F., & Szczerbinska, I. (2015). Dynamic Transcription of Distinct Classes of Endogenous Retroviral Elements Marks Specific Populations of Early Human Embryonic Cells. *Cell Stem Cell*, 16(2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2015.01.005>
- Gomulkiewicz, A., Podhorska-Okolow, M., Szulc, R., Smorag, Z., Wojnar, A., Zabel, M., & Dziegiel, P. (2010). Correlation between metallothionein (MT) expression and selected prognostic factors in ductal breast cancers. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 48(2), 242–248. <https://doi.org/10.2478/V10042-010-0011-5>
- González-Barrios, R., Soto-Reyes, E., Quiroz-Baez, R., Fabián-Morales, E., Díaz-Chávez, J., del Castillo, V., Mendoza, J., López-Saavedra, A., Castro, C., & Herrera, L. A. (2014). Differential distribution of HP1 proteins after trichostatin a treatment influences chromosomal stability in HCT116 and WI-38 cells. *Cell Division*. <https://doi.org/10.1186/s13008-014-0006-2>
- Groh, S., & Schotta, G. (2017). Silencing of endogenous retroviruses by heterochromatin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017 74:11, 74(11), 2055–2065. <https://doi.org/10.1007/S00018-017-2454-8>
- Grover, P., Asa, J. S., & Campos, E. I. (2018). H3–H4 Histone Chaperone Pathways. *Annual Review of Genetics*, 52(1), 109–130. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet->

120417-031547

- Gurard-Levin, Z. A., Quivy, J.-P., & Almouzni, E. (2014a). Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics. *Annu. Rev. Biochem*, 83, 487–517. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035536>
- Gurard-Levin, Z. A., Quivy, J.-P., & Almouzni, G. (2014b). Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics. *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035536>
- Hoelper, D., Huang, H., Jain, A. Y., Patel, D. J., & Lewis, P. W. (2017). Structural and mechanistic insights into ATRX-dependent and -independent functions of the histone chaperone DAXX. *Nature Communications*, 8(1), 1193. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01206-y>
- Jang, C.-W., Shibata, Y., Starmer, J., Yee, D., & Magnuson, T. (2015). *Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development*. <https://doi.org/10.1101/gad.264150>
- Jiang, X., Soboleva, T. A., & Tremethick, D. J. (2020). Short Histone H2A Variants: Small in Stature but not in Function. In *Cells* (Vol. 9, Issue 4). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9040867>
- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., & Felsenfeld, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. *Nature Genetics*, 41(8), 941–945. <https://doi.org/10.1038/ng.409>
- Kim, H. G., Kim, J. Y., Han, E. H., Hwang, Y. P., Choi, J. H., Park, B. H., & Jeong, H. G. (2011). Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *FEBS Letters*, 585(2), 421–428. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.12.030>
- Knutsen, T., Padilla-Nash, H. M., Wangsa, D., Barenboim-Stapleton, L., Camps, J., McNeil, N., Difilippantonio, M. J., & Ried, T. (2010). Definitive molecular cytogenetic characterization of 15 colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes and Cancer*, 49(3), 204–223. <https://doi.org/10.1002/gcc.20730>
- Kong, Y., Rose, C. M., Cass, A. A., Williams, A. G., Darwish, M., Lianoglou, S., Haverty, P. M., Tong, A.-J., Blanchette, C., Albert, M. L., Mellman, I., Bourgon, R., Grealley, J., Jhunjunwala, S., & Chen-Harris, H. (2019). Transposable element expression in tumors is associated with immune infiltration and increased antigenicity. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13035-2>
- Kumar, N., Wethkamp, N., Waters, L. C., Carr, M. D., & Klemphauer, K. H. (2013). Tumor suppressor protein Pcd4 interacts with Daxx and modulates the stability of Daxx and the Hipk2-dependent phosphorylation of p53 at serine 46. *Oncogenesis* 2013 2:1, 2(1), e37–e37. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2012.37>
- Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K.-M., Stadler, S. C., & Allis, C. D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-

- independent chromatin assembly at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008850107>
- Lin, C. W., Wang, L. K., Wang, S. P., Chang, Y. L., Wu, Y. Y., Chen, H. Y., Hsiao, T. H., Lai, W. Y., Lu, H. H., Chang, Y. H., Yang, S. C., Lin, M. W., Chen, C. Y., Hong, T. M., & Yang, P. C. (2016). Daxx inhibits hypoxia-induced lung cancer cell metastasis by suppressing the HIF-1 α /HDAC1/Slug axis. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13867>
- Liu, C. P., Xiong, C., Wang, M., Yu, Z., Yang, N., Chen, P., Zhang, Z., Li, G., & Xu, R. M. (2012). Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*(12), 1287–1292. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2439>
- Liu, Y., Guo, F., Zhu, X., Guo, W., Fu, T., & Wang, W. (2020). Death Domain-Associated Protein Promotes Colon Cancer Metastasis through Direct Interaction with ZEB1. *Journal of Cancer*, *11*(3), 750. <https://doi.org/10.7150/JCA.34233>
- Long, M., Sun, X., Shi, W., Yanru, A., Leung, S. T. C., Ding, D., Cheema, M. S., MacPherson, N., Nelson, C. J., Ausio, J., Yan, Y., & Ishibashi, T. (2019). A novel histone H4 variant H4G regulates rDNA transcription in breast cancer. *Nucleic Acids Research*, *47*(16), 8399–8409. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz547>
- Mahmud, I., & Liao, D. (2019). DAXX in cancer: phenomena, processes, mechanisms and regulation. *Nucleic Acids Research*, *47*(15), 7734–7752. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz634>
- Martire, S., & Banaszynski, L. A. (2020). The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 9, pp. 522–541). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0262-8>
- Marzluff, W. F., Gongidi, P., Woods, K. R., Jin, J., & Maltais, L. J. (2002). The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes. *Genomics*, *80*(5), 487–498. <https://doi.org/10.1006/GENO.2002.6850>
- Melters, D. P., Nye, J., Zhao, H., & Dalal, Y. (2015). Chromatin Dynamics in Vivo: A Game of Musical Chairs. *Genes*, *6*, 751–776. <https://doi.org/10.3390/genes6030751>
- Michaelson, J. S., & Leder, P. (2003). RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *Journal of Cell Science*, *116*(2), 345–352. <https://doi.org/10.1242/jcs.00234>
- Min, J., Feng, Q., Liao, W., Liang, Y., Gong, C., Li, E., He, W., Yuan, R., & Wu, L. (2018). IFITM3 promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by regulating MMP9 through p38/MAPK signaling. *FEBS Open Bio*, *8*(8), 1299–1311. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12479>
- Mukhopadhyay, D., & Matunis, M. J. (2011). SUMmOning Daax-Mediated Repression. *Molecular Cell*, *42*(1), 4. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.03.008>
- Navarro Delgado, E. (2021). *IDENTIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES Y*

ELEMENTOS REPETIDOS REGULADOS POR DAXX MEDIANTE RNA-SEQ.

- Nye, J., Melters, D. P., & Dalal, Y. (2018). The Art of War: harnessing the epigenome against cancer. *F1000Research*, 7, 141. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12833.1>
- Pan, W.-W., Zhou, J.-J., Liu, X.-M., Xu, Y., Guo, L.-J., Yu, C., Shi, Q.-H., & Fan, H.-Y. (2013). *Death Domain-associated Protein DAXX Promotes Ovarian Cancer Development and Chemoresistance* * □ S. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446369>
- Pirsko, V., Cakstina, I., Priedite, M., Dortane, R., Feldmane, L., Nakazawa-Miklasevica, M., Daneberga, Z., Gardovskis, J., & Miklasevics, E. (2018). An effect of culture media on epithelial differentiation markers in breast cancer cell lines MCF7, MDA-MB-436 and SkBr3. *Medicina (Lithuania)*, 54(2). <https://doi.org/10.3390/medicina54020011>
- Polak-Charcon, S., Hekmati, M., & Ben-Shaul, Y. (1989). The effect of modifying the culture medium on cell polarity in a human colon carcinoma cell line. *Cell Differentiation and Development: The Official Journal of the International Society of Developmental Biologists*, 26(2), 119–129. [https://doi.org/10.1016/0922-3371\(89\)90014-2](https://doi.org/10.1016/0922-3371(89)90014-2)
- Puto, L. A., Benner, C., & Hunter, T. (2015). The DAXX co-repressor is directly recruited to active regulatory elements genome-wide to regulate autophagy programs in a model of human prostate cancer. *Oncoscience*, 2(4). www.impactjournals.com/oncoscience
- Puto, L. A., & Reed, J. C. (2008). Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation. *Genes & Development*, 22(8), 998–1010. <https://doi.org/10.1101/gad.1632208>
- Rapkin, L. M., Ahmed, K., Dulev, S., Li, R., Kimura, H., Ishov, A. M., & Bazett-Jones, D. P. (2015). The histone chaperone DAXX maintains the structural organization of heterochromatin domains. *Epigenetics & Chromatin*, 8, 44. <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0036-2>
- Ricketts, M. D., & Marmorstein, R. (2017). A Molecular Prospective for HIRA Complex Assembly and H3.3-Specific Histone Chaperone Function. *Journal of Molecular Biology*, 429(13), 1924–1933. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.010>
- Saksouk, N., Simboeck, E., & Déjardin, J. (2015). Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. In *Epigenetics and Chromatin* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-8935-8-3>
- Santiago, A., Godsey, A. C., Hossain, J., Zhao, L. Y., & Liao, D. (2009). Identification of two independent SUMO-interacting motifs in Daxx: Evolutionary conservation from *Drosophila* to humans and their biochemical functions. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.8.1.7493>
- Santoro, S. W., & Dulac, C. (2012). The activity-dependent histone variant H2BE modulates the life span of olfactory neurons. *ELife*, 2012(1), 70. <https://doi.org/10.7554/eLife.00070>

- Sharma, A. B., Dimitrov, S., Hamiche, A., & Van Dyck, E. (2018). Centromeric and ectopic assembly of CENP-A chromatin in health and cancer: old marks and new tracks. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1298>
- Shing Kwan, P., Chiu Lau, C., Tuen Chiu, Y., Man, C., Liu, J., Dun Tang, K., Chuan Wong, Y., & Ling, M.-T. (2013). Daxx regulates mitotic progression and prostate cancer predisposition. *Carcinogenesis*, *34*(4), 750–759. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs391>
- Si, M., & Lang, J. (2018). The roles of metallothioneins in carcinogenesis. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0645-x>
- Spence, J. S., He, R., Hoffmann, H. H., Das, T., Thinon, E., Rice, C. M., Peng, T., Chandran, K., & Hang, H. C. (2019). IFITM3 directly engages and shuttles incoming virus particles to lysosomes. *Nature Chemical Biology* *2019* *15*:3, *15*(3), 259–268. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0213-2>
- Starska, K., Bryś, M., Forma, E., Olszewski, J., Pietkiewicz, P., Lewy-Trenda, I., Stasikowska-Kanicka, O., Danilewicz, M., & Krześlak, A. (2015). Metallothionein 2A core promoter region genetic polymorphism and its impact on the risk, tumor behavior, and recurrences of sinonasal inverted papilloma (Schneiderian papilloma). *Tumour Biology*, *36*(11), 8559. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-3616-7>
- Tang, J., Qu, L., Pang, M., & Yang, X. (2010). Daxx is reciprocally regulated by Mdm2 and Hausp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *393*(3), 542–545. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.02.051>
- Ting, D. T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B. W., Akhavanfard, S., Coffman, E. J., Contino, G., Deshpande, V., Iafrate, A. J., Letovsky, S., Rivera, M. N., Bardeesy, N., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2011). Aberrant Overexpression of Satellite Repeats in Pancreatic and Other Epithelial Cancers. *Science (New York, N. Y.)*, *331*(6017), 593. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1200801>
- Torres Arciga, K. (2019). Participación de DAXX en la inducción de inestabilidad cromosómica mediante alteraciones en la heterocromatina constitutiva. (Tesis de Licenciatura, UNAM) Repositorio TESISUNAM.
- Tzeng, S. L., Cheng, Y. W., Li, C. H., Lin, Y. S., Hsu, H. C., & Kang, J. J. (2006). Physiological and functional interactions between Tcf4 and Daxx in colon cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(22), 15405–15411. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601807200>
- Udugama, M., M Chang, F. T., Chan, F. L., Tang, M. C., Pickett, H. A., R McGhie, J. D., Mayne, L., Collas, P., Mann, J. R., & Wong, L. H. (2015). Histone variant H3.3 provides the heterochromatic H3 lysine 9 tri-methylation mark at telomeres. *Nucleic Acids Research*, *43*(21), 10227–10237. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv847>
- Urahama, T., Harada, A., Maehara, K., Horikoshi, N., Sato, K., Sato, Y., Shiraishi, K., Sugino, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., Kagawa, W., Kimura, H., Ohkawa, Y., & Kurumizaka, H. (2016). Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics and*

Chromatin. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0051-y>

- Venkatesh, S., & Workman, J. L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(3), 178–189. <https://doi.org/10.1038/nrm3941>
- Voon, H. P. J., & Wong, L. H. (2015a). New players in heterochromatin silencing: Histone variant H3.3 and the ATRX/DAXX chaperone. In *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw012>
- Voon, H. P. J., & Wong, L. H. (2015b). New players in heterochromatin silencing: Histone variant H3.3 and the ATRX/DAXX chaperone. In *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw012>
- Wang, X., Zhao, Y., Zhang, J., & Chen, Y. (2017). LETTER Structural basis for DAXX interaction with ATRX Protein & Cell Protein & Cell. *Protein Cell*, *8*(10), 767–771. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0462-y>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, *10*(1), 57. <https://doi.org/10.1038/NRG2484>
- Warren, C., & Shechter, D. (2017). Fly Fishing for Histones: Catch and Release by Histone Chaperone Intrinsically Disordered Regions and Acidic Stretches. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 429, Issue 16, pp. 2401–2426). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.06.005>
- Wasylishen, A. R., Sun, C., Moyer, S. M., Qi, Y., Chau, G. P., Aryal, N. K., McAllister, F., Kim, M. P., Barton, M. C., Estrella, J. S., Su, X., & Lozano, G. (2020). Daxx maintains endogenous retroviral silencing and restricts cellular plasticity in vivo. *Science Advances*, *6*(32), eaba8415. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba8415>
- Wethkamp, N., Hanenberg, H., Funke, S., Suschek, C. V., Wetzel, W., Heikau, S., Grinstein, E., Ramp, U., Engers, R., Gabbert, H. E., & Mahotka, C. (2011). Daxx- β and Daxx- γ , Two Novel Splice Variants of the Transcriptional Co-repressor Daxx *. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(22), 19576–19588. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.196311>
- Wülfing, C., van Ahlen, H., Eltze, E., Piechota, H., Hertle, L., & Schmid, K. W. (2007). Metallothionein in bladder cancer: correlation of overexpression with poor outcome after chemotherapy. *World Journal of Urology*, *25*(2), 199–205. <https://doi.org/10.1007/S00345-006-0141-8>
- Xiong, C., Wen, Z., Yu, J., Chen, J., Liu, C. P., Zhang, X., Chen, P., Xu, R. M., & Li, G. (2018). UBN1/2 of HIRA complex is responsible for recognition and deposition of H3.3 at cis-regulatory elements of genes in mouse ES cells. *BMC Biology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0573-9>
- Yandlm, C., & Karakulah, G. (2019). Expression dynamics of repetitive DNA in early human embryonic development. *BMC Genomics*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5803-1>

Zhang, H., Gan, H., Wang, Z., Lee, J.-H., Zhou, H., Ordog, T., Wold, M. S., Zhang, Z., & Blurb, E. (2017). RPA Interacts with HIRA and Regulates H3.3 Deposition at Gene Regulatory Elements in Mammalian Cells HHS Public Access. *Mol Cell*, 65(2), 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.030>

Zink, L.-M., Delbarre, E., Eberl, H. C., Keilhauer, E. C., Onisch, C., Unzeler, S., Bartkuhn, M., Collas, P., Mann, M., & Hake, S. B. (2017). H3.Y discriminates between HIRA and DAXX chaperone complexes and reveals unexpected insights into human DAXX-H3.3-H4 binding and deposition requirements. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx131>

Anexos

Glosario

ACRO1: Secuencia repetida tipo satélite cuya unidad base consta de 147 pb. Se encuentra repartida en algunos cromosomas, principalmente los acrocéntricos y en condiciones normales se encuentran reprimidas.

AP-1: Proteína activadora 1, factor de transcripción. Implicada en regulación de genes involucrados en diferentes procesos celulares como diferenciación, proliferación y apoptosis.

ATP: Adenosín tri fosfato. Nucleótido clave para la obtención de energía celular.

ATRX: Remodelador de la cromatina ATRX. Pertenece a la familia SWI/SNF de remodeladores de la cromatina. Las mutaciones en este gen están asociadas con síndromes ligados al cromosoma X que presentan discapacidades cognitivas, así como el síndrome de alfa-talasemia (ATRX).

Cabin-1: Proteína de unión a calcineurina 1. Ayuda al re-ensamblaje de la cromatina independiente a la replicación. También actúa como regulador negativo de la señalización del receptor de células T (TCR) a través de la inhibición de la calcineurina.

CAF-1: Factor de ensamblaje de la cromatina 1. Chaperona de histonas que regula el primer paso en la formación del nucleosoma al formar los tetrámeros de H3/H4 recién sintetizados y depositarlos en el DNA detrás de la horquilla de replicación.

CBP: Proteína de unión a CREB. Tiene actividad de acetiltransferasa, con el cual acetila tanto a histonas como proteínas no histonas. Está implicada en la co-activación transcripcional de distintos factores transcripcionales.

CD95 (Fas): Receptor de muerte de superficie celular Fas. Este receptor contiene un dominio de la muerte y juega un papel primordial en la regulación de la apoptosis.

CENPA: Proteína del centrómero A. Variante de la histona H3 que sólo se deposita en el centrómero.

ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina, técnica empleada para evaluar la presencia y enriquecimiento de una proteína en una región específica del genoma

DAXX: Proteína asociada al dominio de la muerte. Es una proteína que en citoplasma se asocia al receptor del dominio de la muerte (Fas) y en el núcleo actúa como una chaperona de H3.3 en heterocromatina constitutiva.

DNMTs: Metiltransferasas del DNA. Son proteínas esenciales en el desarrollo que transfieren el grupo metilo a partir de S-adenosil-L-metionina (SAM) a la posición 5 de la citosina del DNA. Dentro de la familia de DNMTs hay cuatro miembros: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L.

ERVs: Secuencias retrovirales endógenas. Son una subclase de los elementos transponibles. Comprenden entre el 5-8% del genoma humano y en su mayoría se encuentran inactivados por mutaciones o reprimidos.

ETS1: Proto-oncogen ETS-1. Factor de transcripción que reconoce la secuencia de DNA consenso GGAA/T. Puede actuar tanto activador como represor transcripcional.

FOXO1: Caja Forkhead O1. Factor transcripcional caracterizado por tener un dominio forkhead. Su actividad transcripcional es dependiente de su estado de fosforilación.

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Enzima de la glucólisis que cataliza la conversión de gliceraldehído 3-fosfato en 1,3-bis-fosfoglicerato. Su gen es considerado constitutivo, lo que lo hace ideal como control.

GO: Gene ontology. Es una iniciativa bioinformática que provee un vocabulario universal que describe el gen y los atributos del producto génico en cualquier organismo, es decir, busca categorizar uniformemente los genes y sus productos sin importar la especie de la que se trate.

H3K27me3: Trimetilación de la lisina 27 en la histona 3. Marca enriquecida en heterocromatina facultativa.

H3K4me3: Trimetilación de la lisina 4 en la histona 3. Marca enriquecida en promotores activos y eucromatina.

H3K9me3: Trimetilación de la lisina 9 en la histona 3. Marca enriquecida en heterocromatina constitutiva.

HDACs: Desacetilasas de histonas. Son enzimas que quitan los grupos acetilo de los residuos de lisina en histonas. En general, se dividen en 4 grupos basados en su función y la similitud de la secuencia de DNA que reconocen.

HIRA: Regulador del ciclo celular de histonas. Chaperona de histonas que deposita a H3.3 en eucromatina. Además, juega un papel importante en la formación de foci heterocromáticos asociados a senescencia.

HP1: Proteína de heterocromatina 1. Represor transcripcional que se une a H3K9me3, y por lo tanto es crítica para el mantenimiento de la heterocromatina constitutiva.

IFITM3: Proteína transmembrana inducida por interferón 3. Proteína cuya función primordial es restringir la entrada a la célula de diversos patógenos virales como los virus de la influenza A, ébola y Sars-CoV-2.

KAP1: Proteína asociada a KRAB, también llamada TRIM28. Proteína de andamiaje de la maquinaria epigenética como metiltransferasas de histonas y HDACs. También puede actuar como represor transcripcional leve.

LTR7Y: Repetido de la familia HERVH/LTR7 disperso a lo largo de los cromosomas. De manera normal se encuentra reprimido, con excepción del blastocisto y distintos tipos de cáncer como adenocarcinoma de colon.

MT2A: Metalotioneína 2A. Pertenece a una familia de proteínas que actúan como antioxidantes, importantes para mantener la desintoxicación de metales pesados en la célula. Su expresión se ve alterada en distintos tipos de cáncer epiteliales.

PanNETs: Tumores neuroendócrinos pancreáticos. Este tipo de tumor presenta una alta frecuencia de mutaciones de los genes MEN1, DAXX y ATRX, presentándose alguna de estas en el 40% de los casos.

Pax3/5: Caja pareada 3 y 5. Miembros de una familia de factores transcripcionales que juegan un papel importante en el desarrollo embrionario. Alteraciones en la expresión de estos genes pueden ayudar a la transformación neoplásica de las células.

PMLs: Cuerpos promielíticos de leucemia. Son estructuras esféricas dentro del núcleo que pueden llegar a medir hasta 1 μm de diámetro. El componente principal de estas estructuras es la proteína PML, y han sido implicadas en procesos celulares como reparación del DNA y alargamiento de los telómeros.

PTEN: Homólogo de la fosfatasa y la tensina. Supresor de tumores mutado en muchos tipos de cáncer. Actúa como fosfatasa de doble especificidad. Por un lado, desfosforila las proteínas en los residuos tirosina, serina y treonina. Por otro lado, actúa como lípido-fosfatasa. Antagoniza la ruta de señalización PI3K-AKT/PKB, modulando la progresión del ciclo celular y supervivencia.

RelB: Proto-oncogen RELB, Subunidad NF-KB. Factor de transcripción pleiotrópico involucrado en gran cantidad de procesos biológicos como inflamación, inmunidad, diferenciación, crecimiento celular, tumorigénesis y apoptosis.

RIN: RNA Integrity Number. Algoritmo utilizado para evaluar la calidad e integridad del RNA eucariote extraído. La escala va del 1 al 10, donde 10 representa una muestra perfecta de RNA sin degradación, mientras que 1 señala una muestra completamente degradada.

RT2 (RT2 Profiler PCR Arrays): Panel para analizar la expresión mediante qPCR de un grupo específico de genes, enfocado en vías en particular y con controles integrados.

SETDB1: Histona-lisina N-metiltransferasa con dominio SET bifurcado 1. Regula la metilación de histonas, el silenciamiento génico y la represión transcripcional. Pone la marca específica de H3K9me3.

SIM: Motivos de interacción con SUMO

siRNA: RNA pequeño de interferencia. Es una molécula de RNA de 20 a 25 nucleótidos, cuya secuencia es altamente específica para la secuencia de su mRNA

diana. Es esta complementariedad y la interacción con el complejo RISC lo que degradan al mRNA, disminuyendo entonces la expresión del gen diana.

SPOP: Proteína POZ tipo speckle. Es una proteína ligasa de ubiquitina que ayuda a la degradación proteosomal de sus proteínas blanco, como DAXX. A su vez, también podría estar modulando la regulación de la actividad represora de DAXX.

STRING: Herramienta de búsqueda para la recuperación de genes/proteínas que interactúan; *STRING* por sus siglas en inglés. Es una base de datos y recurso electrónico que muestra interacciones proteína-proteína conocidas y predecidas.

SUV39H1: Histona-lisina N-metiltransferasa SUV39H1. Proteína que trimetila la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3), lo que resulta en silenciamiento génico. La pérdida de ésta ocasiona la pérdida de heterocromatina constitutiva, lo que origina inestabilidad cromosómica.

Ubn-1: Ubinucleína-1. Proteína que en conjunto con HIRA ayuda a depositar a H3.3 en eucromatina. Está además involucrada en la formación de foci de heterocromatina asociada a senescencia.

Publicaciones

Durante mis estudios de maestría, tuve la oportunidad de colaborar en la realización de experimentos que redituaron en la obtención de las siguientes publicaciones:

Transcriptional Profiles Reveal Dereglulation of Lipid Metabolism and Inflammatory Pathways in Neurons Exposed to Palmitic Acid.

Flores-León M, Alcaraz N, Pérez-Domínguez M, **Torres-Arciga K**, Rebollar-Vega R, De la Rosa-Velázquez IA, Arriaga-Canon C, Herrera LA, Arias C, González-Barrios R. *Mol Neurobiol.* 2021 Sep;58(9):4639-4651. doi: 10.1007/s12035-021-02434-6. Epub 2021 Jun 21. PMID: 34155583.

Saliva is a reliable and accessible source for the detection of SARS-CoV-2.

Herrera LA, Hidalgo-Miranda A, Reynoso-Noverón N, Meneses-García AA, Mendoza-Vargas A, Reyes-Grajeda JP, Vadillo-Ortega F, Cedro-Tanda A, Peñaloza F, Frías-Jimenez E, Arriaga-Canon C, Ruiz R, Angulo O, López-Villaseñor I, Amador-Bedolla C, Vilar-Compte D, Cornejo P, Cisneros-Villanueva M, Hurtado-Cordova E, Cendejas-Orozco M, Hernández-Morales JS, Moreno B, Hernández-Cruz IA, Herrera CA, García F, González-Woge MA, Munguía-Garza P, Luna-Maldonado F, Sánchez-Vizcarra A, Osnaya VG, Medina-Molotla N, Alfaro-Mora Y, Cáceres-Gutiérrez RE, Tolentino-García L, Rosas-Escobar P, Román-González SA, Escobar-Arazola MA, Canseco-Méndez JC, Ortiz-Soriano DR, Domínguez-Ortiz J, González-Barrera AD, Aparicio-Bautista DI, Cruz-Rangel A, Alarcón-Zendejas AP, Contreras-Espinosa L, González R, Guerra-Calderas L, Meraz-Rodríguez MA, Montalvo-Casimiro M, Montiel-Manríquez R, **Torres-Arciga K**, Venegas D, Juárez-González V, Guajardo-Barreto X, Monroy-Martínez V, Guillén D, Fernández J, Herrera J, León-Rodríguez R, Canela-Pérez I, Ruíz-Ordaz BH, Valdez-Vazquez R, Bertin-Montoya J, Niembro-Ortega M, Villegas-Acosta L, López-Castillo D, Soriano-Ríos A, Gastelum-Ramos M, Zamora-Barandas T, Morales-Baez J, García-Rodríguez M, García-Martínez M, Nieto-Patlán E, Quirasco-Baruch M, López-Martínez I, Ramírez-Gonzalez E, Olivera-Díaz H, Escobar-Escamilla N. *Int J Infect Dis.* 2021 Apr;105:83-90. doi: 10.1016/j.ijid.2021.02.009. Epub 2021 Feb 11. PMID: 33581365

Genotoxicity of Marijuana in mono-users

Fabian-Morales E, Fernández-Cáceres C, Gudiño A, Andonegui Elguera MA, **Torres-Arciga K**, Escobar Arrazola MA, Tolentino García L, Alfaro Mora YE, Oliva-Rico DA, Cáceres Gutiérrez RE, Domínguez Ortiz J, Castro Hernández C, Herrera Montalvo LA, Díaz-Negrete DB, Reynoso-Noverón N. *Frontiers in Psychiatry.* 2021 Dec 6;12:753562. doi: 10.3389/fpsy.2021.753562. PMID: 34938210; PMCID: PMC8685240.

Además, colaboré en la escritura de un capítulo de libro:

Erick I. Navarro-Delgado, Marisol Salgado-Albarrán, **Karla Torres-Arciga**, Nicolas Alcaraz, Ernesto Soto-Reyes, Luis A. herrera, Rodrigo González-Barrios.

“Bioinformatics of Transcription Factor Binding Prediction” *Bioinformatics and Human Genomics Research*, edited by: Forero, D. CRC Press. November, 2021.