

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina de la UNAM



**Papel del factor nuclear CTCF en la inducción a
senescencia celular**

Presenta

Cecilia Liliana Gómez Inclán

para obtener el título de:

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

Tutor

Dr. Félix Recillas Targa

Instituto de Fisiología Celular

Departamento de Genética Molecular

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



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.

Agradecimientos académicos

Este trabajo se realizó bajo la dirección y tutoría del Dr. Félix Recillas Targa en el laboratorio 122 norte del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se contó con el apoyo y asesoría del LCG. Rodrigo Gacel Arzate Mejía, la Dra. Karin Meier, el Mtro. en C. Gustavo Tapia Urzúa, el Biol. Josué Cerecedo Castillo y la Biol. Georgina Guerrero Avendaño como apoyo académico. Además se contó con el apoyo de la laboratorista Gianelly Cortés González.

El trabajo contó con el financiamiento de: DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN201114 y IN203917) y CONACYT (220503 y Fronteras de la Ciencia 2015-290).

Finalmente se agradece a los miembros del jurado que revisaron y enriquecieron con sus observaciones este trabajo:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dr. Félix Recillas Targa

Dra. Martha Robles Flores

Dra. Mayra Furlán Magaril

Dra. Aliesha Araceli González Arenas

Índice

Índice	1
Índice de figuras	3
Lista de abreviaturas	4
Resumen	5
Introducción	6
1. Senescencia celular	6
2. Inducción a senescencia	8
3. Características celulares y moleculares del estado senescente	11
Planteamiento	16
Hipótesis	16
Objetivo	17
Objetivos particulares	17
Modelo de estudio	18
Metodología	19
1. Análisis bioinformáticos	19
2. Cultivo celular	20
3. Ensayo de proliferación	20
4. Extracción de ácidos nucleicos y proteína	20
5. <i>Knockdown</i> de CTCF	21
6. Retrotranscripción	22
7. qRT- PCR	22
8. Western-blot	22
9. Ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia	23
10. Inmunoprecipitación de la cromatina	23
11. Diseño y estandarización de oligonucleótidos	24
12. Análisis estadístico	25

Resultados	26
1. Validación del modelo de estudio	26
2. Evaluación de proliferación	27
3. Evaluación de parámetros asociados a la senescencia celular	28
4. Análisis de genes afectados por disminución de CTCF	29
5. Exploración de posible mecanismo de acción de CTCF	31
Discusión	34
Conclusiones	39
Perspectivas	39
Bibliografía	40

Índice de figuras

Figura 1. Efectos pleiotrópicos de las células senescentes.

Figura 2. Vías y proteínas implicadas en la inducción y establecimiento de la senescencia celular.

Figura 3. Características de las células senescentes.

Figura 4. Representación de interacciones del genoma de células proliferativas y senescentes.

Figura 5. Evidencias de disminución de abundancia de CTCF en células senescentes.

Figura 6. Representación de ganancia y pérdida de interacción dentro de una TAD.

Figura 7. Validación de disminución de CTCF.

Figura 8. Ensayo de proliferación.

Figura 9. Ensayo de actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia.

Figura 10. Evaluación de los transcritos de los genes *p21* y *mmp3*.

Figura 11. Ontología de genes regulados por CTCF.

Figura 12. Evaluación del locus del gen *Igfbp5*.

Figura 13. Modelo final.

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ATM: del inglés “Ataxia Telangiectasia Mutated”.

ATR: del inglés “Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein”.

CDK: del inglés “Cyclin Dependent Kinase”.

ChIP: del inglés “Chromatin Immunoprecipitation”.

CLM: del inglés “Chronic Myeloid Leukemia”.

CTCF: del inglés “CCCTC-binding factor”.

ENCODE: del inglés “The Encyclopedia of DNA Elements”.

Hi-C: del inglés “High-throughput sequencing Chromosome Conformation Capture”.

IGFBP5: del inglés “Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5”.

mRNA: del inglés “Messenger RNA”.

PCR: del inglés “Polymerase Chain Reaction”.

PDGF-AA: del inglés “Platelet-derived growth factor-AA”.

qRT-PCR: del inglés “Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction”.

ROS: del inglés “Reactive Oxygen Species”.

SASP: del inglés “Senescence Associated Secretory Phenotype”.

shRNAi: del inglés “short hairpin RNA interference”.

TAD: del inglés “Topologically Associating Domain”.

TGF β : del inglés “Transforming Growth Factor β ”.

Resumen

La senescencia celular es un estado de arresto del ciclo celular irreversible que se presenta durante el desarrollo embrionario, la reparación de heridas y el envejecimiento así como también en patologías como lo es el cáncer. Molecularmente se caracteriza por una elevada secreción de moléculas pro-inflamatorias así como por cambios en la expresión de genes y la estructura de la cromatina. En particular, en las células senescentes se ha reportado que disminuyen los niveles de la proteína arquitectónica CTCF. En mamíferos, CTCF es esencial en la formación de asas de cromatina y en la regulación de la expresión de genes. Sin embargo, se desconoce si la disminución de CTCF es suficiente y necesaria para la inducción a senescencia celular.

En este trabajo evaluamos el papel de CTCF en la inducción a senescencia celular. Para ello, abatimos los niveles de CTCF mediante un shRNAi en la línea celular humana eritroleucémica K562 y se evaluaron parámetros celulares asociados a la senescencia tales como: defectos en proliferación, actividad de β -galactosidasa y cambios en la transcripción de genes asociados al estado senescente. Los resultados obtenidos con este grupo sugieren que la disminución de CTCF es suficiente para inducir la entrada a senescencia celular caracterizada por una menor capacidad proliferativa, incremento en la actividad de β -galactosidasa y un incremento en la transcripción del gen *IGFBP5* cuyo producto se ha reportado como inductor de la entrada a senescencia. De forma importante validamos que CTCF se une al promotor de *IGFBP5* pero que esta asociación se pierde con el abatimiento de CTCF lo cual correlaciona con un incremento en la transcripción de dicho gen. En conjunto, los datos obtenidos sugieren que la disminución de la proteína CTCF provoca el establecimiento de un fenotipo senescente y cambios en la expresión de genes asociados a este estado celular, por lo tanto, CTCF es un regulador negativo de la entrada a senescencia.

Introducción

1. Senescencia celular

La senescencia celular se refiere al arresto *irreversible* del ciclo celular previo a la transición de fase de G1 a S y ha sido observada en diferentes organismos (Lundblad y Szostak, 1989; Margolis y Spradling, 1995). Fue descrita por primera vez en cultivos de fibroblastos humanos (Hayflick, 1965; van Deursen, 2014) y posteriormente validada *in vivo* en diversos tejidos de ratón y humano tanto de individuos jóvenes, adultos y viejos (Dimri et al., 1995; Waaijer et al., 2012). En ambas especies se observó que la población de células senescentes se incrementa de forma progresiva conforme los individuos envejecen, lo cual sugirió que la senescencia celular es un fenómeno asociado al envejecimiento (Figura 1; Dimri et al., 1995; Krishnamurthy et al., 2004; Melk et al., 2004; Waaijer et al., 2012). Por ejemplo, la eliminación de células senescentes en ratón resulta en un incremento en la esperanza de vida y un retraso en la atrofia de tejidos como el músculo cardíaco y la disminución de la función renal, ambos procesos asociados al envejecimiento (Baker et al., 2011; López-Otín et al., 2013; Baker et al., 2016) lo cual sugiere que las células senescentes están implicadas en el envejecimiento.

Actualmente se sabe que la senescencia celular es un fenómeno que no es exclusivo del proceso de envejecimiento (Figura 1). Durante el desarrollo embrionario de ratón se han detectado células senescentes principalmente en la involución de los túbulos del mesonefros, en el saco endolinfático y en la regresión interdigital (Muñoz-Espín et al., 2013, Storer et al., 2013), sin embargo en estos casos la eliminación de las células senescentes no resulta en defectos en la fisiología del organismo, por lo que aún no es claro su papel durante etapas tempranas del desarrollo. En contraste, durante la reparación de heridas y regeneración en tejido somático, las células senescentes tienen un papel importante ya que limitan la formación de tejido fibroso en heridas de la epidermis y el hígado (Krizhanovsky et al., 2008; Jun and Lau, 2010). Las células senescentes en este contexto promueven la degradación de componentes de la

matriz extracelular mediante la secreción de metaloproteasas además de promover la migración y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos a través de la secreción de PDGF-AA durante la reparación de heridas en la epidermis, un factor involucrado en la diferenciación de miofibroblastos (Demaria et al., 2014). Finalmente y de manera relevante, la senescencia celular está relacionada con el cáncer. Se contrapone a esta enfermedad de dos maneras: 1) evitando la proliferación descontrolada por el arresto del ciclo celular en respuesta a estrés; 2) reclutando al sistema inmune a través de la secreción de moléculas proinflamatorias, promoviendo la eliminación tanto de ellas mismas como de células aledañas que podrían estar en el proceso de transformación (Campisi, 2013). En contraste, se ha observado que coinyectar células senescentes con células epiteliales transformadas en ratones inmunocomprometidos, estimula la proliferación de las últimas (Krtolica et al., 2001; Coppé et al., 2006; Liu and Hornsby, 2007; Davalos et. al., 2010). Además, se ha reportado que las células senescentes promueven los procesos de *trans*-diferenciación, proliferación y migración de células premalignas (Laberge et. al., 2012). Por lo tanto, es complicado hacer aseveraciones del papel de las células senescentes en el cáncer ya que parecen evitarlo al inicio de la enfermedad pero al estar más avanzada las células cancerosas parecen tomar ventaja de las mismas.

A manera de conclusión, la senescencia celular es un proceso que se presenta en múltiples contextos, tanto a lo largo del desarrollo del organismo como en patologías como el cáncer. De manera interesante, la senescencia parece tener una papel fisiológico durante el desarrollo embrionario y en la homeostasis tisular somática de individuos jóvenes. Sin embargo, la acumulación progresiva de estas células durante la vida de los organismos parece tener efectos deletéreos, donde el mantenimiento de estas células ocurre a expensas de células funcionales.

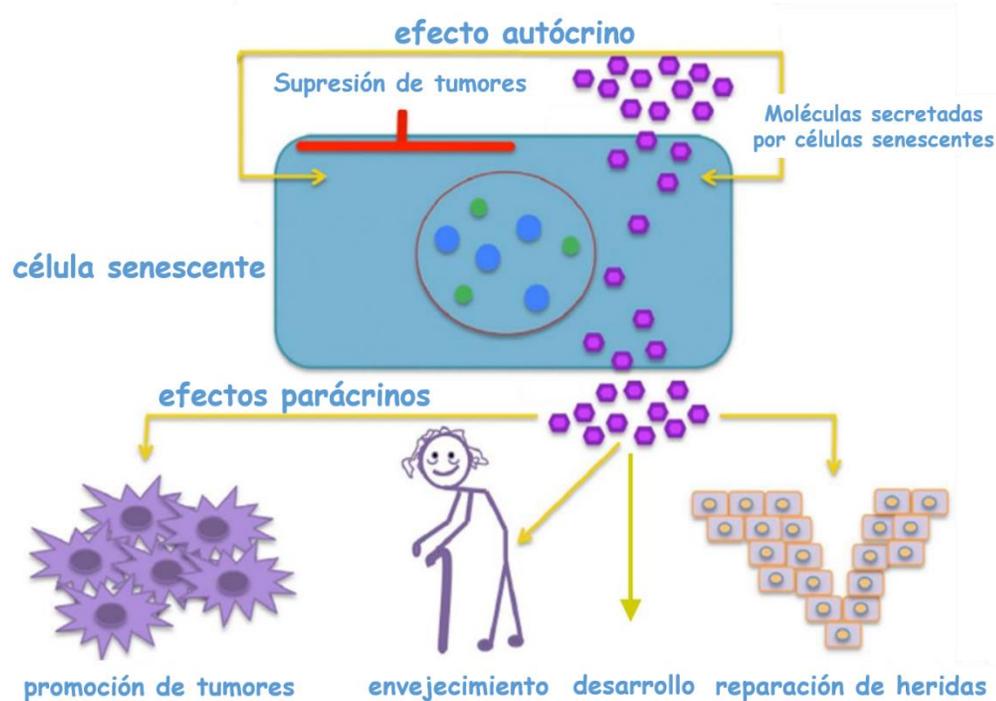


Figura 1. La senescencia celular se observa en distintos procesos biológicos (Modificada de d'Adda di Fagagna, 2013).

2. Inducción a senescencia

La senescencia celular de manera general se induce en respuesta a estrés genotóxico por diversos estímulos ambientales o celulares tales como lo es la exposición a luz UV, la presencia de agentes reductores, el acortamiento de telómeros o está controlada durante el desarrollo (d'Adda di Fagagna F. et al., 2003; Wu L. et. al., 2006). Si bien en todos estos casos el fenotipo senescente resulta en un arresto del ciclo celular, existen diferencias importantes en los mecanismos moleculares detrás de cada uno de ellos y es por esto que a la fecha podemos clasificar los tipos de senescencia en senescencia replicativa o prematura, pudiendo ser esta última, programada o inducida por daño o moléculas pro-inflamatorias secretadas por células senescentes del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, por sus siglas en inglés).

La senescencia replicativa se origina a causa del acortamiento de los telómeros lo cual resulta en la inducción de una respuesta ante daño al ADN que desencadena el fenotipo senescente (von Zglinicki T., 2002; d'Adda di Fagagna F. et al., 2003; Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007). Este tipo de senescencia responde el acortamiento natural de los telómeros con cada división celular lo cual limita la proliferación de las células, lo que se conoce como “Límite de Hayflick” (Hayflick, 1965). Molecularmente, el acortamiento de telómeros se señala mediante la respuesta a daño al ADN donde se activan las cinasas ATM y ATR que promueven la fosforilación de p53, lo que induce la activación de p21. En este tipo de inducción también se ha detectado un aumento en los niveles de p16 que inhibe a las cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK 4,6), contribuyendo al arresto del ciclo celular (Figura 2; Ohtani N, et. al., 2004; van Deursen, 2014). De forma interesante, los niveles de p16 son bajos en tejidos jóvenes pero se incrementan durante el envejecimiento lo cual correlaciona con un incremento de células senescentes. Es por ello que p16 es un marcador molecular ampliamente utilizado para la identificación de células senescentes en células no cancerosas (Ogawa, 1994; Campisi, 2013).

Por otro lado, la senescencia prematura es independiente del acortamiento de telómeros, es decir del número de divisiones celulares. Los inductores de este tipo de senescencia son varios, por ejemplo: el estrés oxidativo, la exposición a luz ultravioleta (Robles and Adami, 1998; Sedelnikova et al., 2004), la activación de oncogenes (Serrano et al., 1997; Deng et al., 2004) y la inactivación de genes supresores de tumores (Chen et al., 2005). En todos estos casos, el fenotipo senescente se puede establecer como una respuesta a daño al ADN, ya sea directo como el provocado por el estrés oxidativo o la luz UV o bien indirecto a consecuencia de la replicación acelerada del genoma ante la activación de oncogenes o bien la pérdida de genes supresores de tumores. Adicionalmente, la producción de moléculas pro- inflamatorias por parte de células senescentes también puede inducir a senescencia a células vecinas, por ejemplo, a través de la secreción de moléculas como TGF β , lo cual resulta en el arresto del ciclo celular

a través de un mecanismo de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y daño a ADN (Muñoz-Espín y Serrano, 2014). La entrada a senescencia prematura también puede ser controlada a través de la modulación de vías de señalización como la de PI3K-AKT (Nogueira et al., 2008) y la vía de MAPK/ERK (Lin et al., 1998). Finalmente, se desconocen los mecanismos moleculares implicados en la inducción a senescencia temprana evidenciada durante el desarrollo embrionario del ratón.

En conjunto, el arresto celular senescente se establece y mantiene principalmente por las vías de supresión de tumores p53/p21 y p16/pRB (Figura 2; Beauséjour et al., 2003). Recientemente, se ha reportado que la estabilización del factor de transcripción GATA4, es decir un aumento en los niveles de la proteína, puede inducir senescencia celular de manera independiente de las vías anteriores (Kang et al., 2015). De manera interesante, estos genes están usualmente mutados en enfermedades como cáncer y en líneas celulares transformadas, sin embargo son células capaces de entrar a senescencia (Fu, 2004; Ewald, 2010; Yang, 2012), lo cual sugiere que existen vías alternas que pueden favorecer la entrada a senescencia.

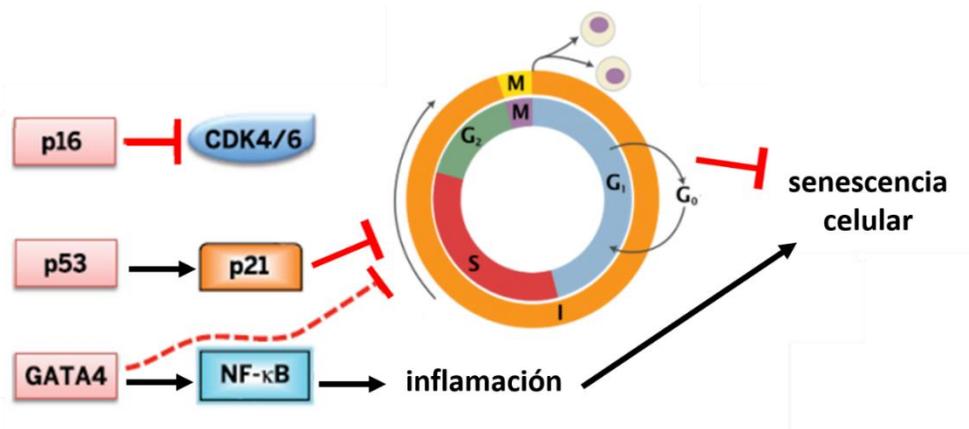


Figura 2. Proteínas implicadas en la inducción y establecimiento de la senescencia celular. Se ha reportado que el arresto del ciclo celular senescente puede estar mediado por tres vías: p16, molécula que inhibe a las cinasas dependientes de ciclina; p53, que promueve la transcripción de los genes *p21* y *GATA4* que puede activar al factor de transcripción NF-κB, promoviendo la transcripción de moléculas pro-inflamatorias o que puede inducir senescencia por mecanismos no completamente entendidos (Modificada de Kang, 2016).

3. Características celulares y moleculares del estado senescente

La senescencia celular se caracteriza por una amplia gama de cambios celulares y moleculares. A nivel celular, la senescencia presenta cambios morfológicos. Por ejemplo, células no adherentes como las células eritroleucémicas K562 al entrar a senescencia incrementan su volumen mientras que los fibroblastos en general presentan una morfología más plana y alargada (Figura 3; Nashio, 2001; Yang, 2012). A nivel molecular, el fenotipo senescente se caracteriza por un incremento en los niveles de las enzimas β - galactosidasa, el establecimiento del SASP que se acompañan de cambios en la transcripción de genes y en la estructura de la cromatina.

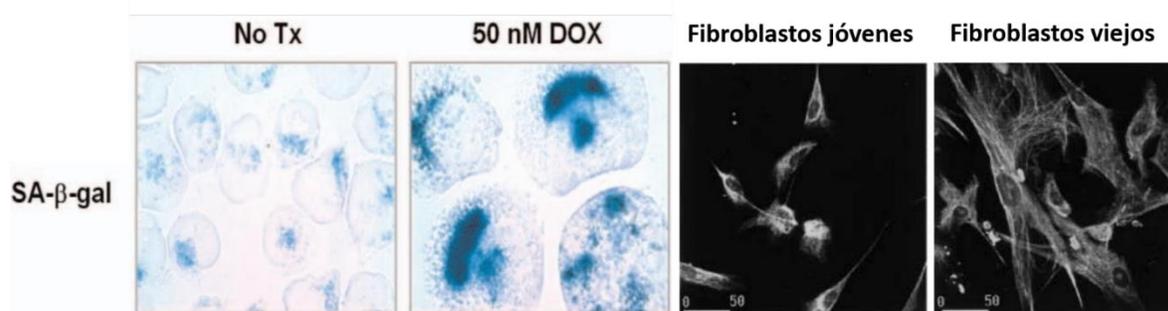


Figura 3. Morfología de células senescentes. **A** Comparación de células K562 proliferativas (No Tx) e inducidas a senescencia con doxorubicina (50 nM DOX). **B** Comparación de cultivos primarios de fibroblastos jóvenes (izquierda) y fibroblastos viejos (derecha).

La actividad β -galactosidasa se encuentra presente en el lisosoma, en condiciones normales, puede ser detectada a un pH de 4. En células senescentes los niveles de transcrito del gen *Glb1* aumentan lo que resulta en un incremento de la enzima β -D-galactosidasa lisosomal (Lee B., et. al., 2006; Dimri G., et al., 1995) y esto permite la detección de su actividad a un pH subóptimo (pH 6) (Kurz et al., 2000), este aumento se puede observar. El ensayo de detección de actividad de β - galactosidasa ha sido la metodología de “oro” para identificar células senescentes y fue la primera en aportar información acerca de la

existencia de células senescentes en distintos tejidos (Dimri G., et al., 1995). Aunque sigue siendo ampliamente usada como marcador de senescencia en tejidos y cultivo celular, recientemente se observó que esta no es una característica exclusiva de las células senescentes ya que células no senescentes pueden ser positivas en este ensayo (Hall B., et al., 2016).

Por otra parte, las células senescentes se caracterizan por una elevada producción y secreción de moléculas pro-inflamatorias o SASP y parece estar directamente promovido por el factor de transcripción NF- κ B que en células senescentes está constitutivamente activa (Coppé J. et. al, 2010), lo que promueve la expresión, traducción y secreción de moléculas en su mayoría proinflamatorias como citocinas, quimiocinas, proteasas, etc. (Purcell M. et. al., 2014; Ozcan S. et. al., 2016). De forma interesante, las moléculas pro-inflamatorias secretadas varían dependiendo del estímulo inductor (Coppé et al., 2008; Purcell M. et. al., 2014; Ozcan S. et. al., 2016).

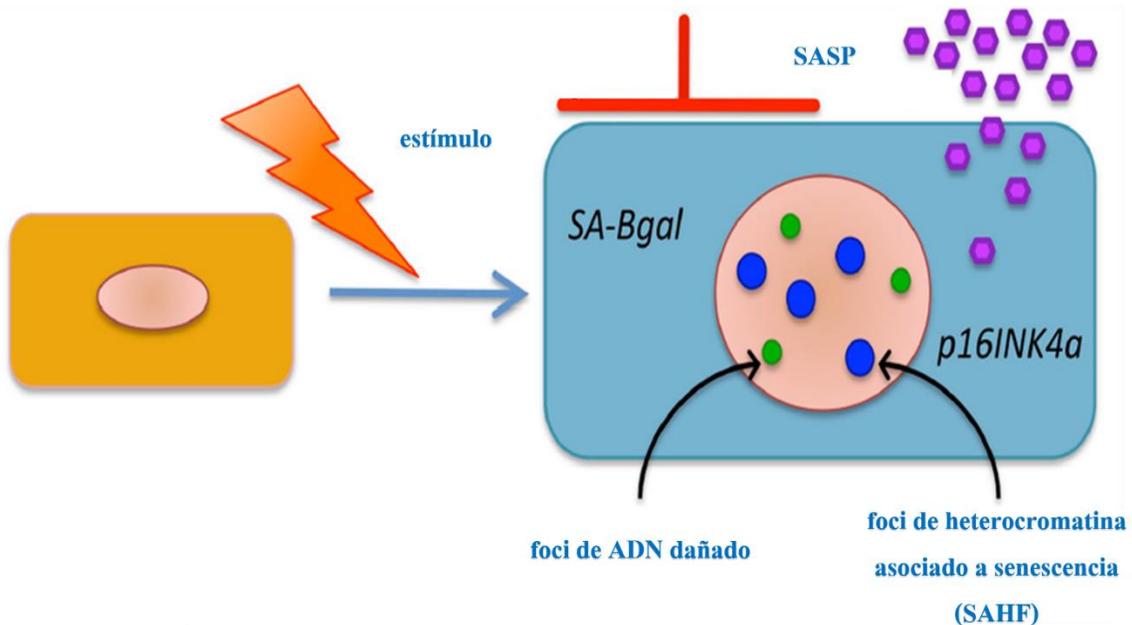


Figura 4. Características de las células senescentes. Las células senescentes presentan arresto del ciclo celular; fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP); actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal); en varios casos la sobreexpresión del locus p16INK4a; focos de ADN dañado y en algunos casos focos de heterocromatina asociada a senescencia (SAHF). (Modificada de d' Adda di Fagagna, 2013)

Los cambios fenotípicos asociados al estado senescente están acompañados por cambios transcripcionales y de la estructura de la cromatina. Por ejemplo, dado que varios de los inductores a senescencia causan daño genómico, es común encontrar foci de ADN dañado dentro del núcleo de células senescentes identificados por la presencia de la variante de histonas γ H2A.X, que se asocia a mecanismos de reparación (Rodier y Campisi, 2011). De manera particular, en la senescencia replicativa, se ha observado que regiones ricas en genes ganan metilación del ADN y esto correlaciona con un decremento en la accesibilidad de la cromatina en esas zonas. De manera antagónica, las regiones de heterocromatina constitutiva se hipometilan y ganan accesibilidad (De Cecco et al., 2013; Hänzelmann et al., 2015) mientras que en la senescencia inducida por activación de oncogenes se pueden observar foci de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF, por sus siglas en inglés; Figura 4), los cuales se caracterizan por estar altamente compactados y estar enriquecidos para la variante de histonas mH2A, la proteína asociada a la heterocromatina, HP1 y las marcas post-traduccionales de histonas asociadas a heterocromatina H3K9me3/H4K20me3 al centro del SAHF y la H3K27m3 en la periferia (Criscione et al., 2016). En cuanto a la organización del genoma al interior del núcleo, se ha observado que hay una pérdida de interacciones cortas locales en los denominados Dominios Asociados Topológicamente (TADs, por sus siglas en inglés) en células senescentes inducidas por activación de oncogenes (Figura 5; Chandra et al., 2015, Parry y Narita, 2016), mientras que en senescencia replicativa se ha observado un decremento en interacciones largas y ganancia de interacciones cortas (Criscione et al., 2016).

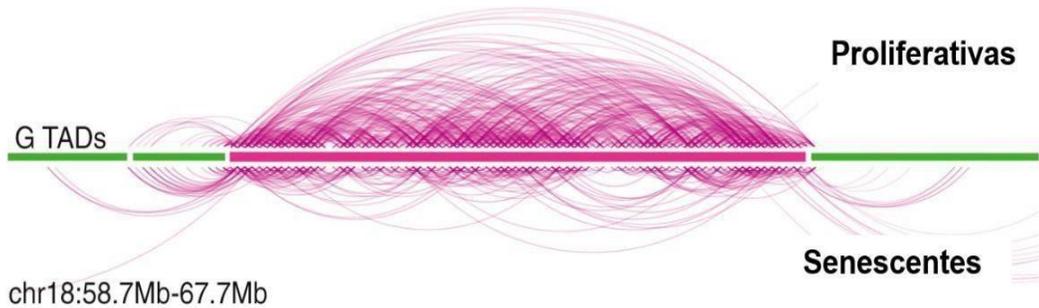


Figura 5. Representación de interacciones del genoma de células proliferativas y senescentes. Línea celular Wi-38 inducidas a senescencia por activación de oncogenes (Chandra et al., 2015). El eje de las abscisas representa un loci de ADN mientras que las interacciones están representadas por líneas curvas rosas.

Las interacciones del genoma en mamíferos están mediadas por proteínas como cohesinas, complejo mediador y CTCF (Phillips-Cremins, 2013). CTCF fue caracterizado como un factor de transcripción (Lobanenkov et. al., 1990; Klenova E. et. al. 1993), posteriormente, se identificó como proteína asociada a *insulators* ya que se observó bloqueando interacciones entre potenciadores y promotores en el locus de los β -globina así como en el locus improntado Igf2/H19 (Chung et. al. 1997; Bell y Fenselfeld G., 2000; Hark et. al., 2000; Kanduri et. al., 2000), así como formando asas de cromatina (Ghirlando R. y Fenselfeld G., 2016). De manera interesante, se ha observado una disminución de CTCF a nivel de transcrito y proteína en células senescentes (Fu et. al., 2004; Hirosue et. al., 2012; Kang et. al., 2015).

En células inducidas a senescencia replicativa así como por tratamiento con el inhibidor de la metilación del ADN, 5-azacitidina, se puede observar una disminución tanto a nivel de transcrito como de proteína en cultivos epiteliales de próstata humanas; adicionalmente, se ha observado el mismo efecto en células senescentes inducidas por la activación del oncogen Ras en la línea celular de fibroblastos humanos IMR90 (Figura 6; Fu X. et al., 2004; Hirosue A. et al., 2012). Por otro lado, se ha reportado que al degradar a CTCF a niveles indetectables durante 4 o más días en células troncales embrionarias de ratón, las células dejan de proliferar (Nora et al., 2017).

La senescencia celular es un proceso complejo en el que las células adquieren distintos patrones de expresión y reorganización de la cromatina con respecto a las células proliferativas. Ya que los cambios transcripcionales podrían ser producto del rearrreglo cromatínico (Narenda, 2015; Lupiañez, 2015), resulta de interés evaluar a factores estructurales y en particular al factor CTCF en la inducción al fenotipo senescente dada su disminución.

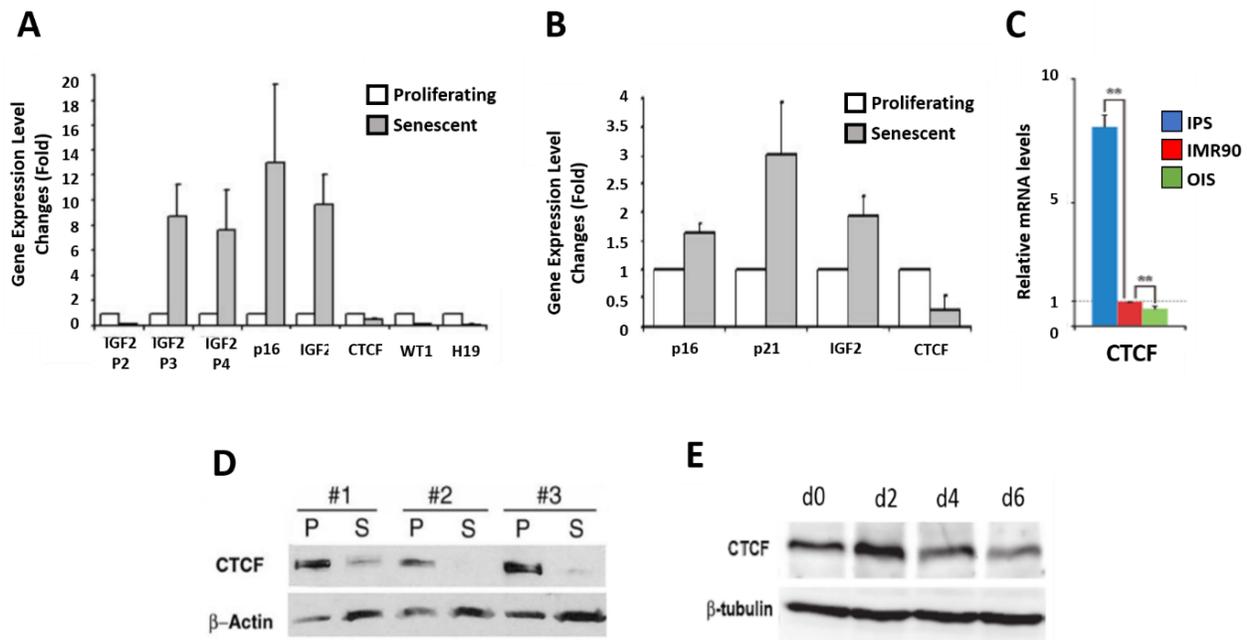


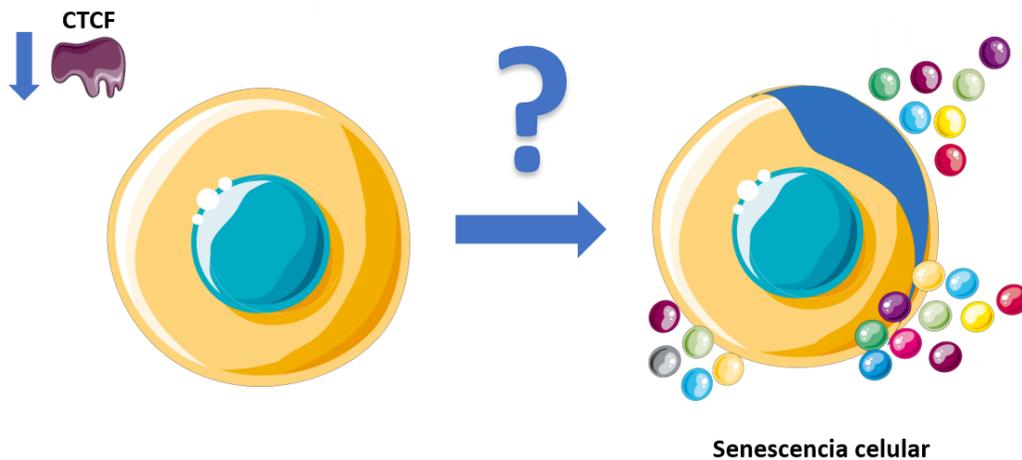
Figura 6. Evidencias de disminución de CTCF en células senescentes inducidas por senescencia replicativa, estrés epigenético y activación por oncogenes. **A** Células epiteliales de próstata inducidas a senescencia replicativa, disminución de transcrito por RT-PCR. **B** Células epiteliales de próstata inducidas a senescencia por estrés epigenético mediante 5-Azacidina, disminución de transcrito por RT-PCR. **C** Fibroblastos humanos IMR90 inducidas a pluripotencia (IPS) e inducidas a senescencia mediante activación de oncogenes (OIS), disminución de transcrito por RT-PCR. **D** Células epiteliales de próstata inducidas a senescencia replicativa, disminución de proteína por western blot, 3 réplicas biológicas. **E** Fibroblastos humanos IMR90 inducidas a senescencia mediante activación de oncogenes (OIS), disminución de proteína por western blot días 0, 2, 4 y 6 de inducción a senescencia (Modificada de Fu X. et. al., 2004 e Hirose A. et. al., 2012).

Planteamiento

Se ha reportado que en la senescencia celular existe un cambio en el patrón de la transcripción, modulación de las interacciones de la cromatina así como la disminución del transcrito y por ende, la concentración de la proteína estructural CTCF. Dado que CTCF puede modular la transcripción de genes y puede formar asas de cromatina resulta de interés evaluar el papel de CTCF en la inducción a senescencia.

Hipótesis

El efecto de la disminución de la proteína CTCF es suficiente para inducir el estado de senescencia en células humanas K562.



Objetivo

Evaluar el papel de CTCF en la inducción a senescencia en células eritroleucémicas K562.

Objetivos particulares

- Evaluar parámetros de marcadores de senescencia en el sistema *knockdown* contra CTCF.
- Analizar los posibles genes afectados por la disminución en los niveles de CTCF en el contexto de una célula senescente.
- Explorar posible mecanismo de inducción a senescencia mediada por la disminución de la proteína CTCF.

Modelo de estudio

La línea celular K562, la cual corresponde a leucemia mieloide crónica (CML) resulta un buen modelo para estudiar la regulación de la senescencia celular ya que se ha validado su capacidad de arrestarse de manera independiente de p53/p21 y p16/Rb (Yang, 2012). Por otro lado, este modelo resulta interesante por el papel que juega la senescencia en la prevención y progresión del cáncer (d'Adda di Fagagna F. et al. 2013). Adicionalmente, desde un punto de vista práctico, el consorcio ENCODE, cuya misión es crear una lista de elementos funcionales en el genoma, ha generado una gran cantidad de datos de diferentes experimentos para las células K562, ya que es considerada prioridad para cualquier experimento que realicen (Dunham et. al., 2012), con lo cual se tiene una vasta información epigenómica sobre estas células. Por último, la línea K562 es fácil de manejar en cultivo.

Metodología

1. Análisis bioinformáticos

Análisis de datos de Inmunoprecipitación de la Cromatina seguida por secuenciación masiva (ChIP- seq)

Los datos de ChIP-seq para CTCF y marcas de histonas usados en este trabajo provienen de los resultados obtenidos por el proyecto ENCODE en diferentes líneas celulares humanas. Estos datos fueron visualizados en el Buscador de Genomas de la Universidad de California (UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu/>).

Identificación de motivos de unión a CTCF

Para corroborar la presencia del motivo de unión a CTCF en los “picos o reads” de enriquecimiento provenientes de los datos de ChIP-seq, se utilizó la base de datos JASPAR (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl) y se usó el identificador de matriz MA0139.1.

Visualización de datos de Captura Conformacional de Cromosomas de Genoma Completo (Hi-C)

Los datos de Hi-C se visualizaron en el software Juicebox 1.5 (<http://www.aidenlab.org/juicebox/>), se utilizaron los datos obtenidos mediante un experimento de Hi-C in situ en la línea celular K562 a una resolución de 1 Kb (Zuin, 2014).

Ontología de genes

Se obtuvo la lista de genes expresados diferencialmente en el artículo de Zuin y se procesó en el software David (<https://david.ncifcrf.gov/>).

2. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de leucemia mieloide crónica K562 (ATCC CCL-243). Las células se cultivaron en cajas de petri de 100 mm con medio ISCOVE suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% y de penicilina/estreptavidina 1%. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en atmósfera de humedad saturada. Para los experimentos se cuantificó y evaluó el número de células mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano en cámaras de Neubauer.

3. Ensayo de viabilidad (proliferación)

Se cuantificaron las células durante los días especificados, partiendo de 100 000 células sembradas en cajas de 6 pozos (34.8 mm). Se hizo una dilución 1:5 con las células y azul de tripano y se cuantificó en microscopio de campo claro.

4. Extracción de ácidos nucleicos y proteína

Extracción de ADN

El ADN se extrajo mediante el método de fenol-cloroformo. Se centrifugaron aproximadamente 3×10^8 células. Se lavó el pellet con PBS 1x y las células se incubaron con MIX I, adicionado con RNasa A (50 µg/mL) a 37°C por 30 min.. Posteriormente se incubaron con amortiguador Mix II adicionado con Proteinasa K (50 µg/mL) a 50°C durante toda la noche. Se agregó un volumen de fenol-cloroformo-ácido isoamílico, se centrifugó y se lavó con un volumen de cloroformo. Posteriormente, se precipitó el ADN con un volumen de etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió con agua inyectable. El ADN extraído se cuantificó en un NanoDrop 2000 y se ajustó la muestra a una concentración de 100 ng/µL.

Extracción de RNA

El RNA de 3×10^6 células se extrajo mediante el método de trizol (1 mL). Posteriormente se agregaron 200 μ L de cloroformo para separar las fases que contiene RNA. Se agregaron 500 μ L de isopropanol y se precipitó durante 10 min. Se centrifugó la muestra y se lavó el pellet obtenido con etanol al 70%. Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y se resuspendió en una cantidad adecuada de agua inyectable. El RNA se cuantificó en NanoDrop-2000. Para determinar la integridad del RNA, se corrieron 2 μ g en un gel desnaturalizante de agarosa al 1.2% con 5% de formaldehído 37%. El gel se corrió durante 30 min. a 80 V y se observó la proporción de las subunidades 28S y 18S. La banda 28S debe ser aproximadamente del doble de tamaño que la 18S.

Extracción de proteína

Se centrifugaron aproximadamente 3×10^8 células K562 y se lisaron a 4°C en amortiguador de lisis RIPA complementado con inhibidores de proteasas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min a 4°C y se recolectaron los sobrenadantes. La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford. La colorimetría se cuantificó por lector de Elisa (Modelo 680).

5. *Knockdown* de CTCF

Se generaron células K562 inducibles para el knockdown de CTCF. El plásmido usado para el *knockdown* contra CTCF es un ARN corto interferente (shRNAi) dirigido contra CTCF diseñado previamente en el laboratorio (González-Buendía et al., 2014), el cual fue clonado en el vector lentiviral PII3.7. Se generaron partículas lentivirales a una concentración de 5 MOI y se infectaron las células K562 (infección hecha por la bióloga Georgina Guerrero Avendaño). El vector utilizado contiene el gen de resistencia a puromicina empleado para seleccionar a las células transducidas (1 μ g/mL cada 24 h. hasta que todas las células control, sin resistencia, mueran). La expresión del shRNAi se indujo con doxiciclina (1

$\mu\text{g/mL}$ cada 24 h. por 7 días). El efecto de la interferencia se evaluó mediante western blot.

6. Retrotranscripción

Para obtener el ADN complementario (cADN) se trataron 2 μg de ARN con DNasa I. Esta mezcla se mantuvo a 37°C durante 30 min. y 15 min. a 65°C al agregar el amortiguador de paro. Posteriormente, se realizó una retrotranscripción (RT) con la enzima AMV de Promega y con 1 μL de oligo dT, manteniendo la muestra a 42 °C durante 1 hr.

7. qRT- PCR

Para realizar la PCR cuantitativa se diluyó el producto obtenido de la retrotranscripción a una concentración 1:5 con agua inyectable. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos para los genes de interés y se agregó SYBR Green para cuantificar los productos de amplificación. Como control se utilizaron oligonucleótidos para el gen constitutivo GAPDH. Para determinar la concentración relativa de los transcritos se utilizó el método comparativo ΔCt . Pares de oligonucleótidos utilizados se encuentran en la tabla suplementaria 2.

8. Western-blot

Los lisados cuantificados se hirvieron 5 min. con amortiguador Laemmli. Posteriormente se hizo electroforesis SDS-PAGE en geles de 7.5% acrilamida y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF en condiciones estándar. Las membranas se bloquearon con TBS-t .1% con 5% leche descremada y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios de CTCF (1:2000) o GAPDH (1:1000) a 4°C toda la noche en agitación. Posteriormente, las

membranas lavadas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, según el caso (anti-mouse IgG o anti-rabbit IgG HRP-conjugado) y se revelaron agregando el sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West pico Chemiluminiscent Substrate).

9. Ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia

Se agregó poli-l-lisina a las placas de cultivo en una dilución 1:10 durante un mínimo de dos h. Los pozos se lavaron con PBS y se agregó la cantidad adecuada de células para formar una monocapa ($\sim 3 \times 10^5$) con medio fresco y se dejaron adherir por 12 h.. Las células pegadas a las placas se lavaron con PBS. Se incubaron en amortiguador de fijación durante 5 min.. Se lavaron las células con PBS y se les agregó amortiguador de tinción con el que se incubaron a 37°C sin CO₂. Se lavaron las células. Se agregó metanol y se dejaron secar. Se observó en microscopio de epifluorescencia.

10. Inmunoprecipitación de la cromatina

La inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) consistió en utilizar un anticuerpo específico contra la proteína de interés seguido de la extracción de ADN. Se sembraron células K562 en cajas de Petri de 20 cm. y se agregaron 2 mL de amortiguador de cross-linking en 20 mL de medio para obtener una concentración de 1% de formaldehído al 37% para fijar interacciones ADN- proteínas que se llevaron a cabo en las células, se fijaron durante 10 min. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS frío. Después, se agregó 1 mL de amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas a las células y se realizó la sonicación de la muestra aplicando 12 pulsos de 30 seg. a 35% de amplitud para obtener fragmentos de aproximadamente 400-800 pb. Para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos se tomó una alícuota de 25 μ L, se extrajo el ADN con fenol-cloroformo que se corrió en un gel de agarosa 1%. Para las

inmunoprecipitaciones se utilizaron 50 µg de ADN. Cada muestra se incubó con 5 µL de un anticuerpo anti-CTCF (Millipore). Como controles se utilizaron muestras con anticuerpo IgG. Para precipitar se utilizaron 30 µL de perlas Proteína G/A. Después, se realizaron 4 lavados con amortiguador de paro I y un lavado con amortiguador de paro II. Finalmente se agregó amortiguador de elución para separar el ADN de las perlas y se realizó una extracción de ADN para realizar la PCR. Las secuencias de ADN inmunoprecipitadas se amplificaron por PCR punto final o PCR tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos de las zonas de interés previamente estandarizados.

11. Diseño y estandarización de oligonucleótidos

Se generaron oligos contra *ctcf*, *p21*, *Mmp3* e *Igfbp5*, mediante el software Primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Las secuencias se alinearon en el Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) para verificar su especificidad. Los oligonucleótidos fueron desalados y se mandaron a diseñar a Sigma. Los oligonucleótidos fueron estandarizados mediante PCR punto final bajo distintas concentraciones de MgCl₂ así como a distintas temperaturas de alineamiento para conocer las condiciones óptimas de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se muestran en la siguiente tabla:

Oligos RT-PCR	Secuencia forward	Secuencia reverse
Ctcf	CTTTGCAGCCACGGAGAG	TCTCCTTTCCCTTTAATAAAAAGTTCG
p21	AAGACCATGTGGACCTGTCACTGT	GAAGATCAGCCGCGCTTTG
Mmp3	CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA	TTCAGCTATTTGCTTGGGAAA
Igfbp5	GTACCTGCCCAATTGTGACC	AAGTCCCCGTCAACGTACTC
Oligos ChIP		
Igfbp5	ATGAGCCTCACAGGCAAGTC	TAACAGCCCACACCAAGTCC

12. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se presentaron como la media S.D. de al menos tres experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno. Posteriormente, se analizaron estadísticamente usando la prueba de t de Student con significancia de $p < 0.05$ en el software de GraphPad Prisma 5.

Resultados

1. Validación del modelo de estudio

En trabajos previos se ha reportado la disminución la proteína y el transcrito de CTCF, proteína capaz de regular la transcripción de genes mediante la formación de asas de cromatina (Fu, 2004; Hirosue, 2012; Kang, 2015). De manera interesante, se ha reportado que la disminución de CTCF induce un arresto del ciclo celular en células embrionarias de ratón (Yang, 2012). Por lo que la disminución de CTCF podría inducir senescencia celular.

Para evaluar esta posibilidad, se utilizó un sistema lentiviral en células K562 (CML) que permite disminuir los niveles de proteína de CTCF mediante la degradación de su transcrito con un shRNA expresado de manera inducible al agregar doxiciclina al medio. Se realizaron western blots contra la proteína CTCF, donde se observa la disminución parcial del producto (Figura 8A). Adicionalmente, los transcritos de su gen fueron evaluados mediante qRT-PCR, donde se observó una disminución de más del 50% del transcrito (Figura 8B).

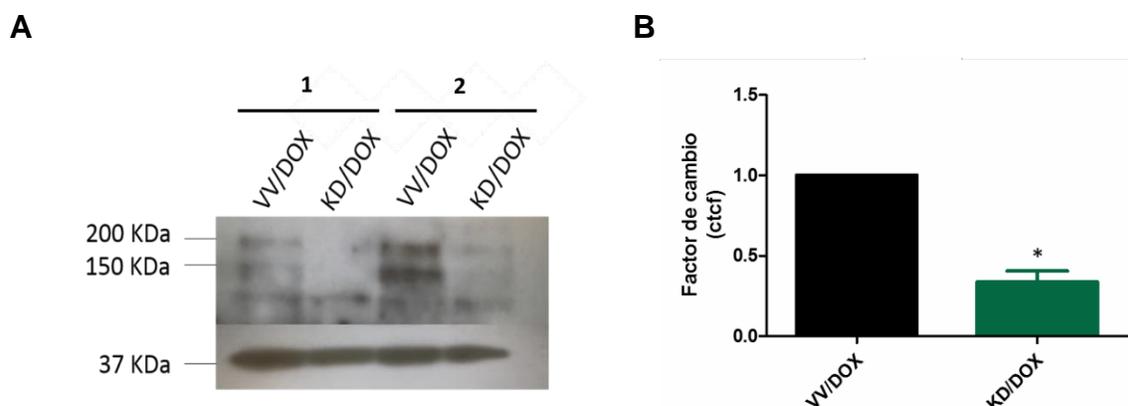


Figura 8. Validación de disminución de CTCF **A** Western blot contra CTCF. Por orden de aparición: vector vacío con doxiciclina (VV/DOX) y vector shCTCF con doxiciclina (KD/DOX), al día 7 de la inducción, 1 y 2 corresponden a distintas réplicas biológicas, n=6. **B** qRT-PCR de CTCF de células tratadas con doxiciclina. Por orden de aparición: vector vacío con doxiciclina (VV) y vector shCTCF con doxiciclina (KD), al día 7 de la inducción, n=6. Se muestra la media \pm desviación estándar (DE), como prueba estadística se utilizó una t de Student pareada, con un intervalo de confianza del 95% *p(valor)= 0.0190.

2. Evaluación de proliferación

Para evaluar el arresto del ciclo celular característico de la senescencia se realizó una curva de viabilidad para evaluar la proliferación. Primero se hizo del día 0 al día 3, tomando como día 0 el día de inducción con doxiciclina (Figura 9A) donde se observó una disminución significativa de la proliferación entre el grupo KD/DOX y VV/DOX a partir del tercer día. Posteriormente, se evaluó si el efecto era transitorio, por lo que se hizo otra curva del día 4 al día 8 de la inducción, donde se observó una disminución en la tasa de proliferación de todos los grupos con respecto al VV, por lo que se decidió tomar al VV/DOX como control, en los siguientes experimentos. Asimismo, se puede observar una disminución significativa en la proliferación a partir del día 5 de la inducción que se mantiene hasta el día 8. Con base en los datos, se decidió mantener el día 7 como día de experimentación para el futuro (Figura 9B). Decisión apoyada por datos de la literatura en la que se demuestra que las características del fenotipo senescente tardan aproximadamente 6 días en aparecer (Campisi J. 2013).

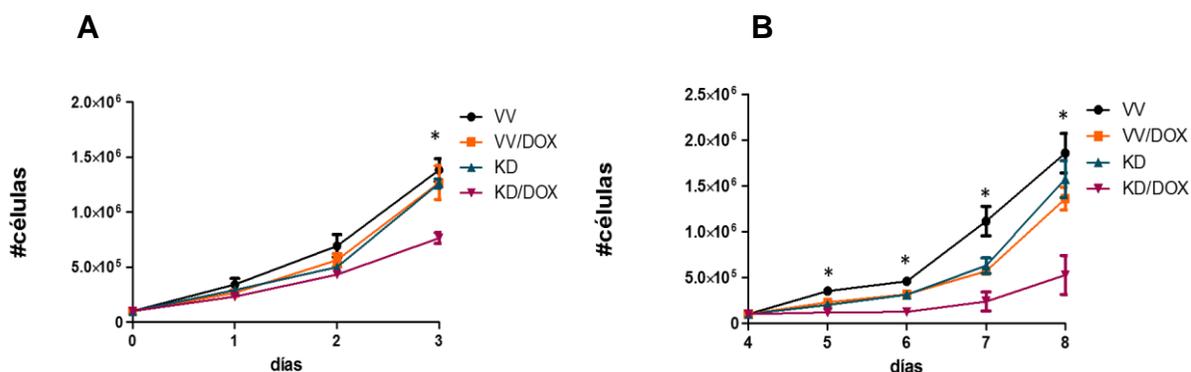


Figura 9. Ensayo de viabilidad (proliferación) **A** Cuantificación mediante azul de tripano de células tratadas con doxiciclina del día 0 al 3 de la inducción. Por orden de aparición: vector vacio sin doxiciclina (VV); vector vacio con doxiciclina (VV/DOX); vector shCTCF sin doxiciclina (KD) y vector shCTCF con doxiciclina (KD/DOX), n=3, p(valor)= 0.0357. **B** Cuantificación mediante azul de tripano, mismas células del día 4-8 de la inducción, n=3, p(valor)= 0.0324; 0.0029; 0.0337 y 0.0279. Se muestra la media ± DE. Los datos fueron analizados con la prueba t de Student no pareada con un intervalo de confianza del 95%.

3. Evaluación de parámetros asociados a la senescencia celular

Con la finalidad de entender el tipo de arresto celular observado, se hizo el ensayo de β galactosidasa asociada a senescencia, técnica ampliamente usada para sugerir la presencia de células senescentes. En las micrografías se puede observar un aumento en la intensidad colorimétrica en células KD/DOX (Figura 10A) y cuantificada (Figura 10B), así como un mayor tamaño en las mismas, como se puede apreciar en el acercamiento (Figura 10C). Por otro lado, en las micrografías no se pueden observar cuerpos apoptóticos ni células necróticas evidentes (Figura 10A).

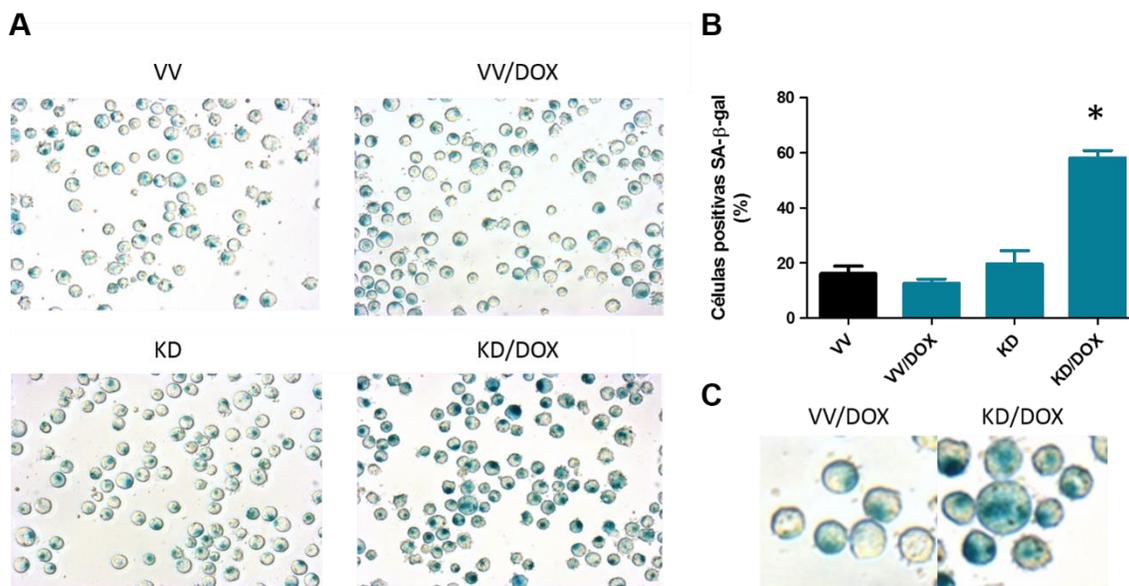


Figura 10. Ensayo de actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia. **A** Micrografías representativas de ensayo de actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia realizado en el día 7 de la inducción 20x. Por orden de aparición: vector vacío sin doxiciclina (VV); vector vacío con doxiciclina (VV/DOX); vector shCTCF sin doxiciclina (KD) y vector shCTCF con doxiciclina (KD/DOX). **B** Cuantificación de micrografías, n=3, p(valor)=0.015. Prueba t de Student no pareada con un intervalo de confianza del 95% comparación entre VV/DOX y KD/DOX, se muestra la media \pm DE. **C** Amplificación de micrografías.

Además, se evaluó la expresión de dos genes usualmente sobreexpresados en senescencia celular, *p21* y *mmp3*. En el primero, se observó de manera inesperada una disminución en las células KD/DOX con respecto al control de alrededor de un 50% (Figura 11A). Mientras que el transcrito del gen *mmp3* parece aumentar alrededor de 5 veces (Figura 11B).

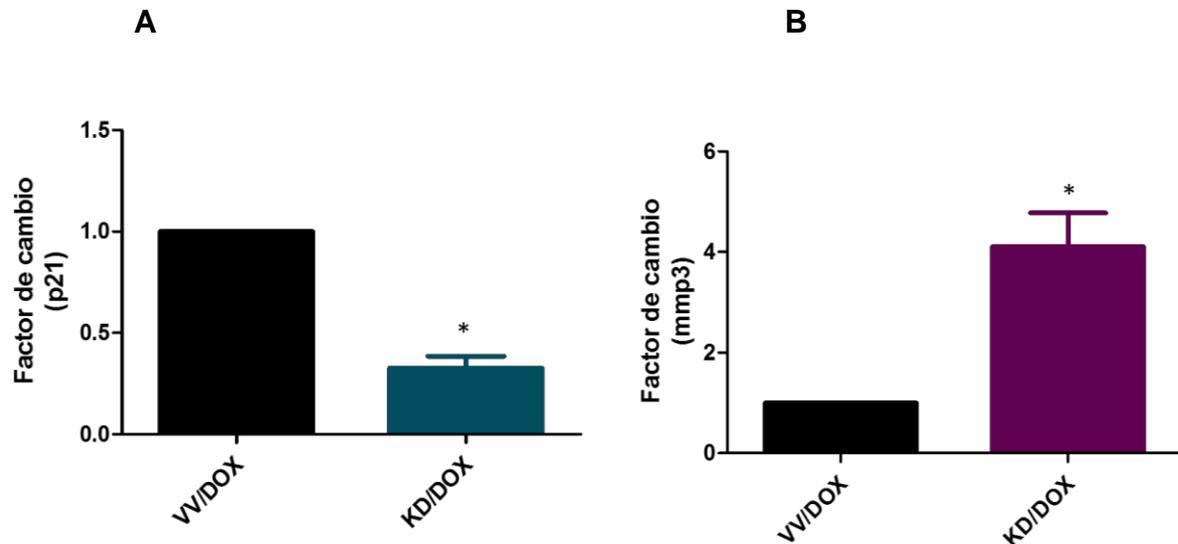


Figura 11. Evaluación de los transcritos de los genes *p21* y *mmp3*. **A** RT-PCR del transcrito del gen *p21* de células inducidas durante 7 días con doxiciclina. Por orden de aparición: vector vacío con doxiciclina (VV) y vector shCTCF con doxiciclina (KD), al día 7 de la inducción, *p(valor) < 0.0001, n=6. **B.** RT-PCR del transcrito del gen *mmp3* en las mismas condiciones, *p(valor)= 0.0340, n=4. Se muestra la media± DE. Se utilizó la prueba estadística t de Student no pareada con un intervalo de confianza del 95%.

4. Análisis de genes afectados por disminución de CTCF

Los resultados anteriores sugieren que la disminución de CTCF es capaz de inducir el fenotipo senescente, por lo que nos pareció relevante explorar posibles mecanismos o vías de acción. Para ello, se obtuvo la lista de genes de expresión diferencial de un RNA-seq de células HEK293 con un *knockdown* contra CTCF (Zuin, J., et.al, 2014). Con ellos, se realizó una ontología de genes, donde se observan 10 categorías significativamente enriquecidas. De manera interesante, las dos mayormente representadas son “reparación durante respuesta

inflamatoria” y “regulación de la proliferación” (Figura 12A), categorías congruentes con el fenotipo senescente.



Figura 12. Ontología de genes regulados por CTCF. Gráfica de categorías representadas significativamente en lista de genes regulados por CTCF. $-\text{LOG}_{10}(0.05) = 1.30$. Los datos utilizados fueron obtenidos de experimentos de RNA-seq en células HEK293 (Zuin, J., et. al., 2014).

Con base en este análisis, se tomaron los genes de la categoría de regulación de la proliferación para buscar literatura asociada a senescencia de cada uno de los 15 candidatos (Tabla 1). Como resultado de esta búsqueda, se encontraron a los genes sobreexpresados *Txnip* e *Igfbp5*, que coinciden con los genes con mayor factor de cambio de esta categoría. Se ha demostrado que los productos de estos genes son capaces de favorecer al fenotipo senescente en células endoteliales bovinas y células endoteliales de vena umbilical humana, respectivamente (Kim, K., et. al., 2007; Rombouts, C. et. al., 2014; Riahi, Y., et. al., 2015). Ya que el gen *Txnip* parece solo favorecer la entrada a senescencia celular mediada por p53 se descartó como candidato. Por su parte, IGFBP5 se ha reportado capaz de inducir senescencia celular mediada por p53 en fibroblastos

humanos y en células endoteliales de vena umbilical. De manera interesante, IGFBP5 (proteína de unión al factor parecido a la insulina, por sus siglas en inglés) compite por el ligando IGF en el espacio extracelular, ocasionando la disminución en la actividad de la vía de señalización PI3K-AKT que como se mencionó previamente, puede inducir el fenotipo senescente. Por último, la actividad de esta vía de señalización inhibe el proceso de autofagia, que se vio involucrada en la entrada a senescencia de la línea celular K562 (Yang, 2012). Por estos antecedentes, IGFBP5 se mantuvo como sujeto de estudio.

Tabla 1. Genes de la categoría que se vincula con la regulación del ciclo celular.

Nombre del gen	Factor de cambio	Nombre del gen	Factor de cambio
F2R	0.269	HES1	5.199
FNTB	0.217	ATF3	5.370
GLI2	0.208	SPHK1	5.370
TNS3	0.194	SOX4	3.801
S100AII	0.173	GJA1	4.178
FLT4	0.125	IGFBP5	6.561
TGFβ1	0.125	TXNIP	8.986
HMOX1	0.051		

5. Exploración de posible mecanismo de acción de CTCF

Para indagar el posible mecanismo por el cual la disminución de CTCF induce senescencia celular, se validó la regulación del gen *Igfbp5* en nuestro modelo

mediante qRT-PCR donde se observó un aumento del transcrito de manera similar al reportado por Zuin y colaboradores (Figura 13A).

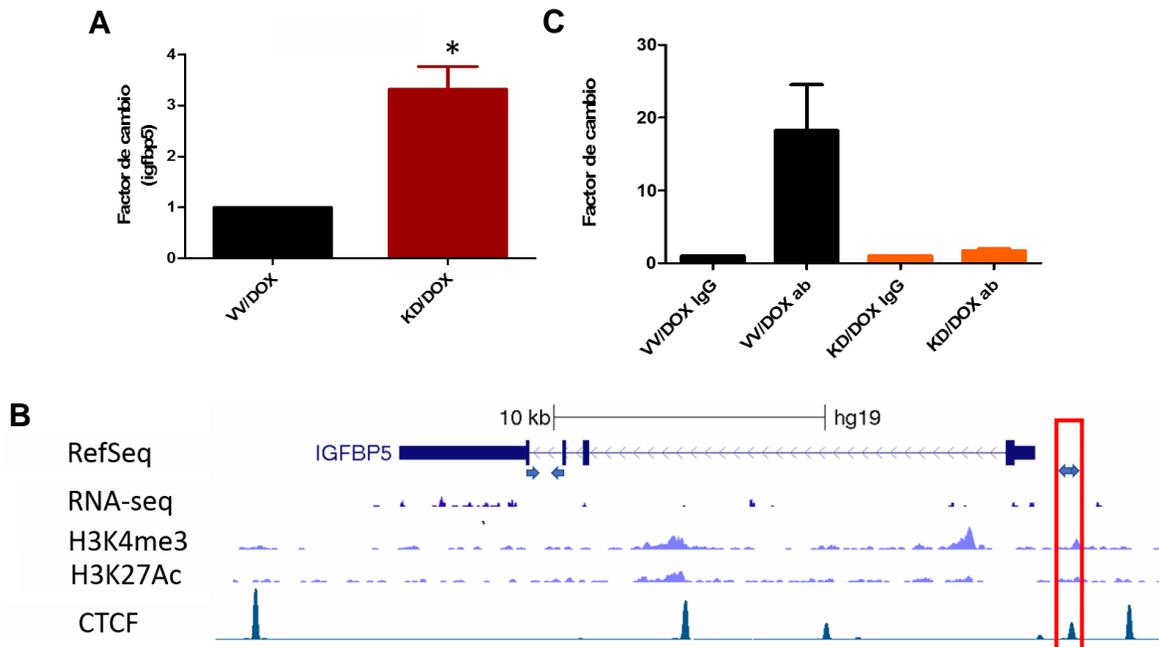


Figura 13. Evaluación del locus del gen *Igfbp5*. **A** RT-PCR del transcrito de *Igfbp5* de células inducidas con doxiciclina durante 7 días, *p(valor)= 0.0002 , n=3. **B** Representación del Consorcio Encode del locus de *Igfbp5*. Flechas indican los oligos usados para ambos experimentos, recuadro rojo indica enriquecimiento evaluado por ChIP. **C** Inmunoprecipitación de la cromatina con un anticuerpo anti-CTCF en el locus de *Igfbp5* n=1.

Posteriormente, se analizó el locus del gen *Igfbp5*, para observar si CTCF participa en la regulación directa del gen. Para ello, se visualizaron los datos de ENCODE en el buscador del genoma de la UCSC (Figura 13B). El locus presenta transcripción anti-sentido en los exones del gen; enriquecimiento de la marca de H3K4me3 (marca asociada a promotores y menos comúnmente a *potenciadores*), indicando la localización del promotor así como de un posible *potenciador* en el primer intrón del gen; enriquecimiento de H3K27Ac (marca asociada a *potenciadores*) en el mismo intrón y 5 picos de enriquecimiento de CTCF, validados mediante la técnica de ChIP en la línea celular K562, distribuidos río arriba y río debajo del sitio de inicio de la transcripción. Ya que en nuestro modelo

se observó un aumento del transcrito del gen *Igfbp5*, resultó de interés analizar en primera instancia los enriquecimientos cercanos al promotor, por lo que se decidió seguir el proyecto con el más cercano de ellos, el segundo (Figura 13B).

Finalmente, se hizo una inmunoprecipitación de la cromatina contra CTCF en las células VV/DOX y KD/DOX y se observó una disminución en la ocupación de CTCF en KD/DOX con respecto a VV/DOX (Figura 13C). Aunque correlativos, los datos obtenidos permiten la construcción del siguiente modelo: Al disminuir los niveles globales de CTCF, su enriquecimiento localizado río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Igfbp5* disminuye, lo que podría inducir la sobreexpresión del último, siendo el posterior incremento de su proteína la causante de la inducción a senescencia celular (Figura 14).

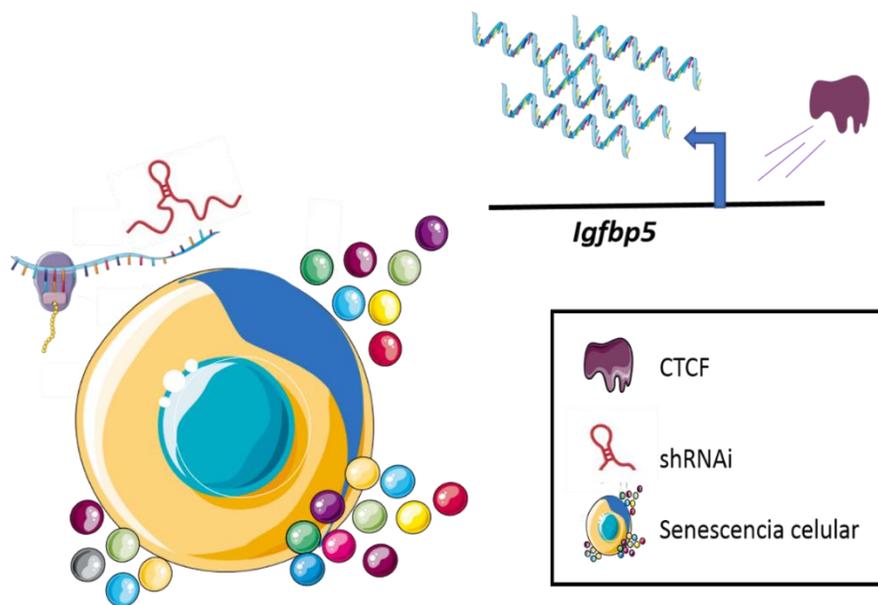


Figura 14. Modelo final. La disminución de CTCF río arriba del sitio de inicio de la transcripción resulta en el aumento del transcrito del gen *Igfbp5*, lo que podría inducir el fenotipo senescente.

Discusión

La senescencia celular es un estado que se podría interpretar como un paso aberrante de diferenciación dado que existen cambios en los patrones de expresión de muchos genes entre ellos factores de transcripción, estos últimos orquestando el proceso. De manera interesante, en la senescencia celular replicativa así como en la prematura inducida por estrés epigenético y activación de oncogenes, se ha reportado una disminución de CTCF, tanto a nivel de proteína como de transcrito (Fu, 2004; Hirosue, 2012; Kang, 2015). De manera interesante, también se ha observado que en senescencia inducida por oncogenes hay una disminución local de interacciones cortas, particularmente en regiones cercanas a la envoltura nuclear, lo que parece promover la formación del SAHF (Chandra T. et. al., 2015) , mientras que en senescencia replicativa, se ha observado un decremento en interacciones largas y ganancia de interacciones cortas (Criscione et al., 2016). Esto es particularmente interesante dado que se reportó que la disminución de CTCF induce la pérdida de interacciones cortas mientras que las largas se enriquecen (Zuin et. al., 2014). Sin embargo, las diferencias entre estos dos fenotipos da paso a pensar que CTCF no se estaría perdiendo de las mismas regiones en estos dos modelos y que esta diferencia podría estar mediada por proteínas que se asocian a CTCF o por características de la entrada a senescencia que hasta el momento no son claras.

Todo lo anterior promueve la idea de que la disminución de CTCF podría ser un inductor del fenotipo senescente, lo que se evaluó en este proyecto. Para evaluar esta posibilidad se utilizó un sistema *knockdown* contra CTCF en la línea celular K562 (CML) que resultó en la disminución parcial tanto de la proteína como de su transcrito lo que resultó un modelo que se consideró adecuado para continuar el proyecto.

Un fenotipo evidente de la senescencia es el arresto del ciclo celular, el cual se evaluó mediante ensayos de viabilidad (proliferación). En estos experimentos se observó que las células KD/DOX proliferan más lento desde el día 3 hasta el día 8 de su inducción (Figura 9). Sin embargo, este fenómeno podría ser explicado no solo por senescencia celular, sino también por quiescencia y muerte celular. La curva de crecimiento fue evaluada en medio de cultivo ISCOVE adicionado con suero fetal bovino al 10% rico en mitógenos, por lo que el efecto observado no podría ser un reflejo de quiescencia celular, arresto reversible en presencia de los mismos. Mientras que la muerte celular queda parcialmente descartada por la falta de cuerpos apoptóticos y células necróticas en las micrografías (Figura 10), para corroborar esta afirmación sería necesario realizar otros experimentos como evaluar por Anexina V la activación de la vía apoptótica.

Posteriormente, se evaluó la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia (Figura 10), actividad no presente en células quiescentes ni postmitóticas. En estas micrografías se pudo observar que de manera basal, las células K562 presentan actividad, sin embargo, las células KD/DOX presentaron un aumento significativo en la intensidad del ensayo, lo que sugiere que el arresto celular observado corresponde a senescencia celular. De manera interesante, se puede observar que no todas las células en el grupo KD/DOX se tiñeron con mayor intensidad, lo que podría sugerir que CTCF promueve el fenotipo senescente y no es suficiente para inducir senescencia celular o que no todas las células son igualmente susceptibles a esta disminución, evento que sucede también en la diferenciación *in vitro*.

Adicionalmente, las células senescentes tienden a aumentar de tamaño con respecto a las proliferativas, propiedad que se hace evidente cuando se realizó un aumento en la imagen (Figura 10C). Para validar la senescencia celular molecularmente, se evaluaron los transcritos de los genes *p21* y *mmp3*, dos genes

normalmente regulados positivamente en senescencia celular. Inesperadamente, se observó que el transcrito del gen *p21* disminuye significativamente en las células KD/DOX con respecto al control (Figura 11A). El gen *p21* es un blanco de p53, proteína trunca inactiva en las células K562 mientras que su locus presenta varios sitios de unión a CTCF por lo que podría estar siendo modulado directamente por el *knockdown*. De manera interesante, se ha visto que la línea celular K562 puede entrar a senescencia celular independientemente de p53, p21 y p16 por lo que se decidió evaluar otro gen. Así, se evaluó el transcrito del gen *mmp3*, que codifica para una metaloproteasa también aumentada en senescencia celular (Demaria, 2014), congruente con lo reportado, se observó un aumento de este transcrito en el grupo KD/DOX con respecto al grupo control (Figura 11B). En conjunto, estos datos sugieren que la disminución de CTCF induce senescencia celular independiente de p53, p21 y p16 en la línea celular K562. Es importante aclarar que en este proyecto no se evaluó la formación de SAFH ni se ha reportado en este modelo, lo que podría ser de interés para evaluar el mecanismo mediante el cuál la disminución de CTCF podría inducir senescencia celular.

El mecanismo por el que la disminución de CTCF induce senescencia celular podría ocurrir a dos niveles: 1) que su disminución global desestabilice al genoma de manera que se active el mecanismo de reparación de daño al ADN. Sin embargo, esta inducción es dependiente de p53, por lo que se descarta esta posibilidad por el modelo de estudio de este trabajo (Campisi, 2013), 2) que la pérdida de CTCF en loci específicos desregule genes que puedan inducir senescencia de manera independiente a p53/p21 y p16. Para evaluar este posible mecanismo de acción, se realizó ontología de genes de los resultados de un RNA-seq de un sistema de *knockdown* de CTCF en la línea celular HEK293 (Figura 12). El análisis de los genes regulados diferencialmente en este sistema evidenciaron el enriquecimiento significativo de 10 categorías. Entre estas categorías fueron de especial interés las dos más significativas: reparación durante respuesta inflamatoria y regulación de la proliferación, ya que el fenotipo

senescente está relacionado con ambas, lo que apoya los datos obtenidos. Posteriormente, se tomaron los genes de la categoría de proliferación celular con la intención de analizar si algunos de estos podrían estar relacionados con la inducción a senescencia celular (Tabla 1). De la lista de 15 genes, dos de ellos se relacionan con este fenotipo en publicaciones previas. El primero es *Txnip*, en células endoteliales bovinas se ha observado que la regulación positiva de su gen y su posterior traducción promueven la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que es capaz de inducir senescencia dependiente de p53 (Riahi, 2015). El segundo es el gen *Igfbp5*, cuya sobreexpresión se ha visto capaz de inducir senescencia en células endoteliales umbilicales humanas. La proteína codificada por este gen es secretada al medio extracelular donde secuestra al factor de crecimiento IGF, disminuyendo la actividad de la vía de señalización PI3K-AKT, que se ha visto implicada en procesos de proliferación y sobrevivencia inhibiendo tanto a la senescencia como a la muerte celular (Kim 2007; Nowicki, 2011; Rombouts, 2014). De manera particular, mTORC1, complejo proteico parte de la vía de señalización a insulina es capaz de inhibir autofagia, proceso que puede inducir senescencia celular, como se observó en el artículo de inducción a senescencia en la línea celular K562 (Yang, 2012). Por último, en esta misma publicación, se sugirió que la disminución de los factores de transcripción SP1 y 14-3-3zeta podría tener un papel causal en la inducción a senescencia. De manera interesante, ambos genes son regulados positivamente por la vía de señalización PI3K-AKT, por lo que se seleccionó al gen *Igfbp5* para análisis posteriores.

Por lo anterior, se evaluó si el gen *Igfbp5* se regulaba diferencialmente en el presente modelo de estudio, donde se validó el aumento del transcrito en las células con el KD/DOX (Figura 12A). Posteriormente, para abordar si el mecanismo mediante el cual la disminución de CTCF promueve la expresión de *Igfbp5* es directo o indirecto, se hizo una visualización en el buscador del genoma de la UCSC. Se observó que el gen *Igfbp5* se transcribe a niveles bajos en células K562 silvestres, dato que se refleja en los enriquecimientos sutiles en las marcas

de histona H3K4me3 y H3K27Ac (Figura 13B). Además, datos provenientes de experimentos de ChIP cargados en esta plataforma permiten la visualización de al menos 5 enriquecimientos evidentes de la proteína CTCF en este locus, distribuidos tanto río arriba como río abajo del sitio de inicio de la transcripción. A partir de ello resultó interesante evaluar la posibilidad de que la disminución de CTCF altere directamente al locus del gen *Igfbp5* por lo que hicimos un ChIP en nuestro sistema (Figura 13C). Como sujeto de estudio se tomó al enriquecimiento más cercano al promotor, donde se observó una clara pérdida del factor CTCF. Esto resulta interesante ya que previamente se ha observado que quitar un sitio de unión de CTCF puede inducir la transcripción de los genes *HOX* caudales en células troncales embrionarias mediante la expansión de la marca H3K4me3 (Narenda, 2015) así como de genes involucrados en la formación de los dedos en el ratón, donde se demostró que al perderse CTCF, el locus interactúa con *enhancers* que inducen su sobreexpresión (Lupiañez, 2015). Por lo que los experimentos correlativos sugieren que la disminución en la unión de CTCF en una región cercana al promotor de *Igfbp5* podría inducir la sobreexpresión del mismo. Para validar esta hipótesis sería interesante remover ese sitio de unión mediante la herramienta de edición CRISPR-Cas. Sus posibles resultados sugerirían de manera más contundente si el efecto es directo y si el aumentar la expresión del gen *Igfbp5* induce el fenotipo senescente en el presente modelo de estudio. De ser así, la sobreexpresión podría estar mediada por la interacción con *enhancers* o incluso promotores que se acerquen por el cambio en la topología de la cromatina inducida por la pérdida de CTCF o por mecanismos de expansión de la marca H3K4me3 por el complejo Thrtorax en un efecto más local. Para poder discernir entre estos eventos sería interesante hacer un 4C para evaluar las interacciones de la cromatina usando como ancla el sitio de unión de CTCF reportado en este proyecto y ChIP para evaluar la posible expansión de marcas de transcripción ya que en este modelo la transcripción es baja.

Conclusiones

- La disminución de CTCF en la línea celular K562 es capaz de inducir senescencia celular independiente de p53/p21 y p16.
- Análisis de resultados de otros trabajos sugieren que el gen *Igfbp5* podría estar implicado en la entrada a senescencia en el modelo de estudio.
- El gen *Igfbp5* se encuentra sobreexpresado en nuestro modelo.
- Un enriquecimiento de CTCF cercano al promotor del gen *Igfbp5* se abate en las células *knockdown* sugiriendo un efecto directo en este último.

Perspectivas

- Evaluar los niveles de la proteína IGFBP5.
- Analizar pérdida o ganancia de interacciones en el locus del gen *Igfbp5* en el presente modelo de estudio.
- Comprobar que la pérdida de CTCF cerca del promotor del gen *Igfbp5* causa la sobreexpresión del mismo gen mediante el sistema de edición CRISPR-CAS9.
- Hacer la sobreexpresión del gen *Igfbp5* para evaluar marcadores de inducción a senescencia celular.
- Evaluar la participación de la vía de señalización PI3K-AKT en el proceso de inducción.
- Evaluar los posibles mecanismos de disminución de los niveles del factor CTCF en un modelo de senescencia celular.

Bibliografía

Allis, C.D., and Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* 17, 487–500.

Audia, J.E., and Campbell, R.M. (2016). Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a019521.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236.

Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., et al. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184–189.

Beauséjour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22, 4212–4222.

Benayoun, B.A., Pollina, E.A., and Brunet, A. (2015). Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 593–610.

Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 685–705.

Campisi, J., and d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.

Chandra, T., Ewels, P.A., Schoenfelder, S., Furlan-Magaril, M., Wingett, S.W., Kirschner, K., Thuret, J.-Y., Andrews, S., Fraser, P., and Reik, W. (2015). Global Reorganization of the Nuclear Landscape in Senescent Cells. *Cell Rep.* 10, 471–483.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730.

Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C.M. (2006). Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence. *J. Biol. Chem.* *281*, 29568–29574.

Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol.* *6*, e301.

Criscione, S.W., Teo, Y.V., and Neretti, N. (2016). The Chromatin Landscape of Cellular Senescence. *Trends Genet.* *32*, 751–761.

Adda di Fagagna F., Reaper P.M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N.P., Jackson S.P. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.*;426(6963):194–198.

De Cecco, M., Criscione, S.W., Peckham, E.J., Hillenmeyer, S., Hamm, E.A., Manivannan, J., Peterson, A.L., Kreiling, J.A., Neretti, N., and Sedivy, J.M. (2013). Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell* *12*, 247–256.

Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., et al. (2014). An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* *31*, 722–733.

Deng, Q., Liao, R., Wu, B.-L., and Sun, P. (2004). High Intensity *ras* Signaling Induces Premature Senescence by Activating p38 Pathway in Primary Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *279*, 1050–1059.

van Deursen, J.M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature* *509*, 439–446.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 9363–9367.

Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF (2010). Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 102(20):1536–46.

Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., and Lobanenkov, V.V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2802–2813.

Fu, V.X., Schwarze, S.R., Kenowski, M.L., LeBlanc, S., Svaren, J., and Jarrard, D.F. (2004). A Loss of Insulin-like Growth Factor-2 Imprinting Is Modulated by CCCTC-binding Factor Down-regulation at Senescence in Human Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 52218–52226.

Hall, B.M., Balan, V., Gleiberman, A.S., Strom, E., Krasnov, P., Virtuoso, L.P., Rydkina, E., Vujcic, S., Balan, K., Gitlin, I., et al. (2016). Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging* 8, 1294–1311.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Hänzelmann, S., Beier, F., Gusmao, E.G., Koch, C.M., Hummel, S., Charapitsa, I., Jousen, S., Benes, V., Brümmendorf, T.H., Reid, G., et al. (2015). Replicative senescence is associated with nuclear reorganization and with DNA methylation at specific transcription factor binding sites. *Clin. Epigenetics* 7, 19.

Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.

Hirosue, A., Ishihara, K., Tokunaga, K., Watanabe, T., Saitoh, N., Nakamoto, M., Chandra, T., Narita, M., Shinohara, M., and Nakao, M. (2012). Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells: Higher-order chromatin signature in senescent cells. *Aging Cell* 11, 553–556.

Jun, J.-I., and Lau, L.F. (2010). Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging* 2, 627–631.

Kadonaga, J.T. (2012). Perspectives on the RNA Polymerase II Core Promoter. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *1*, 40–51.

Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B.A., Campisi, J., and Elledge, S.J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* *349*, aaa5612-aaa5612.

Kim, K., Seu, Y., Baek, S., Kim, M., Kim, K., Kim, J., Kim, J. (2007). Induction of cellular senescence by insulinlike growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell.* *18*, 4543–4552.

Klenova, E.M., Nicolas, R.H., Paterson, H.F., Carne, A.F., Heath, C.M., Goodwin, G.H., Neiman, P.E., and Lobanenko, V.V. (1993). CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 7612–7624.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* *114*, 1299–1307.

Krizhanovskiy, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* *134*, 657–667.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 12072–12077.

Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (β)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* *113*, 3613–3622.

Laberge, R.-M., Awad, P., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2012). Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts. *Cancer Microenviron.* *5*, 39–44.

Li, W., Notani, D., and Rosenfeld, M.G. (2016). Potenciadores as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nat. Rev. Genet.* *17*, 207–223.

Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* *12*, 3008–3019.

Liu, D., and Hornsby, P.J. (2007). Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Res.* *67*, 3117–3126.

Liu, L., Wen, T., Zheng, X., Yang, D.-G., Zhao, S.-P., Xu, D.-Y., and Lü, G. (2009). Remnant-like particles accelerate endothelial progenitor cells senescence and induce cellular dysfunction via an oxidative mechanism. *Atherosclerosis* *202*, 405–414.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* *153*, 1194–1217.

Melk, A., Schmidt, B.M., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D.C., and Halloran, P.F. (2004). Expression of p16 INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int.* *65*, 510–520.

Muñoz-Espín, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 482–496.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez- Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* *155*, 1104–1118.

Nakahashi, H., Kwon, K.-R.K., Resch, W., Vian, L., Dose, M., Stavreva, D., Hakim, O., Pruett, N., Nelson, S., Yamane, A., et al. (2013). A Genome-wide Map of CTCF Multivalency Redefines the CTCF Code. *Cell Rep.* *3*, 1678–1689.

Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.-C., Xu, P.-Z., Chen, M.-L., Tonic, I., Unterman, T., and Hay, N. (2008). Akt Determines Replicative Senescence and Oxidative or Oncogenic Premature Senescence and Sensitizes Cells to Oxidative Apoptosis. *Cancer Cell* 14, 458–470.

Nora E., Goloborodko A., Valton A., Gibcus J., Uebersohn A., Dekker J., Mirny L., Bruneau B. (2017). Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell* 169, 930-944.

Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Investig.*; 51:146–53.

Özcan, S., Alessio, N., Acar, M.B., Mert, E., Omerli, F., Peluso, G., and Galderisi, U. (2016). Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging* 8, 1316.

Paradis, V., Youssef, N., Dargère, D., Bâ, N., Bonvoust, F., Deschatrette, J., and Bedossa, P. (2001). Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum. Pathol.* 32, 327–332.

Parry, A.J., and Narita, M. (2016). Old cells, new tricks: chromatin structure in senescence. *Mamm. Genome* 27, 320–331.

Purcell, M., Kruger, A., and Tainsky, M.A. (2014). Gene expression profiling of replicative and induced senescence. *Cell Cycle* 13, 3927–3937.

Riahi, Y., Kaiser, N., Cohen G., et al., (2015). Foam cell-derived 4-hydroxynonenal induces endothelial cell senescence in a TXNIP-dependent manner. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 19, no. 8, pp. 1887–1899, 2015

Rincón-Arano, H., and Recillas Targa, F (2008). La arquitectura nuclear y su dinámica. *Rev. Educ. Bioquímica* 27, 130–137..

Robles, S.J., and Adami, G.R. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113–1123.

Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* jcb–201009094.

Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6, 168–170.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell* 88, 593–602.

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell* 155, 1119–1130.

Venkatesh, S., and Workman, J.L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 178–189 von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27, 339–344.

Vostrov, A.A., Taheny, M.J., and Quitschke, W.W. (2002). A Region to the N-terminal Side of the CTCF Zinc Finger Domain Is Essential for Activating Transcription from the Amyloid Precursor Protein Promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 1619–1627.

Waaijer, M.E.C., Parish, W.E., Strongitharm, B.H., van Heemst, D., Slagboom, P.E., de Craen, A.J.M., Sedivy, J.M., Westendorp, R.G.J., Gunn, D.A., and Maier, A.B. (2012). The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age: p16INK4a in human skin reflects biological age. *Aging Cell* 11, 722–725.

Wu L., Multani A.S., He H., Cosme-Blanco W., Deng Y., Deng J.M., Bachilo O., Pathak S., Tahara H., Bailey S.M., Deng Y., Behringer R.R., Chang S.(2006) Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell.*126(1):49–62.

Yang MY, Lin PM, Liu YC, Hsiao HH, Yang WC, Hsu JF, et al. (2012). Induction of cellular senescence by doxorubicin is associated with upregulated miR-375 and induction of autophagy in K562 cells. *PLoS One* ; 7: e37205

Zuin, J., Dixon, J.R., van der Reijden, M.I.J.A., Ye, Z., Kolovos, P., Brouwer, R.W.W., van de Corput, M.P.C., van de Werken, H.J.G., Knoch, T.A., van IJcken, W.F.J., et al. (2014). Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 996–1001.