



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Participación de DAXX en la inducción de
inestabilidad cromosómica mediante alteraciones
en la heterocromatina constitutiva**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

KARLA MARISA TORRES ARCIGA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. RODRIGO GONZÁLEZ BARRIOS DE LA
PARRA**

**2019
Ciudad Universitaria, CDMX**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Torres
Arciga
Karla Marisa
55-79-00-27
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311179464

2. Datos del tutor

Dr.
Rodrigo
González Barrios
de la Parra

3. Datos del sinodal 1

Dr. Víctor Julián
Valdés
Rodríguez

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Ernesto
Soto Reyes
Solís

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Luis Alonso
Herrera
Montalvo

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Ma. De la Paz
Sánchez
Jiménez

7. Datos del trabajo escrito

Participación de DAXX en la inducción de inestabilidad cromosómica mediante alteraciones en la heterocromatina constitutiva

71 p
2019

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología, en la unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; bajo la dirección del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, la tutoría del Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra y el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 280148) y el Colegio Mexicano para la Investigación en Cáncer (C-MIC).

Agradecimientos

Al Dr. Rodrigo González Barrios por ser un excelente tutor y persona. Por apoyarme y guiarme en la realización de este proyecto. Gracias por la paciencia y la confianza para con este trabajo.

Al Dr. Luis Alonso Herrera, por permitirme ser parte de su laboratorio y por las críticas constructivas aportadas. Muchas gracias por ayudarme en mi formación como científica.

A la Dra. Clementina Castro, por todo el apoyo brindado tanto a nivel técnico como a nivel personal.

A mis sinodales, por las críticas constructivas y dedicarme de su tiempo para revisar y mejorar mi proyecto de tesis. A los profesores del taller de Epigenética: Dr. Ernesto, Dra. Yessenia, Lissania, Marisol y Manuel, gracias por ayudarme con todas sus opiniones y consejos para forjar este trabajo.

A los investigadores asociados, así como mis compañeros y amigos del laboratorio de Carcinogénesis. Gracias por sus consejos, accesibilidad y amenizar los experimentos.

A mis profesores, a todos aquellos que se han esforzado en compartir su conocimiento conmigo y aportar en mi formación académica, muchas gracias. A la UNAM, por haberme dado la oportunidad de estudiar ahí desde la preparatoria. El haberme forjado en tus aulas ha marcado mi vida para siempre.

Finalmente, a mi familia y amigos. A mis padres que con su amor y confianza me han formado como persona. A mi hermano que con sus ocurrencias casi siempre me hace reír y a mi familia en general por su incondicional apoyo. A mis amigos de la carrera y de la preparatoria, por los buenos momentos, las porras y el aprendizaje.

Índice

Resumen	7
Introducción	9
Composición y niveles de compactación de la cromatina	9
Variantes de histonas y chaperonas de histonas.....	13
Death Domain Associated Protein 6.....	18
Importancia de la heterocromatina constitutiva en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica.....	20
Desregulación de DAXX en cáncer y desarrollo de inestabilidad cromosómica.....	22
Justificación	27
Pregunta de investigación	27
Hipótesis	27
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Estrategia experimental y metodología	29
Caracterización de los niveles de expresión y abundancia de DAXX mediante RT-PCR Y Western Blot.....	29
Generación del modelo KD de DAXX mediante siRNA.....	33
Evaluación inestabilidad cromosómica mediante ensayo de micronúcleos.....	34
Evaluación de la alteración de la heterocromatina constitutiva mediante ensayo de Inmunoprecipitación del DNA metilado.....	36
Evaluación de la presencia de cambio de expresión mediante RT2.....	37
Resultados	38
Discusión	55

Conclusión.....	62
Perspectivas.....	62
Lista de abreviaturas.....	63
Bibliografía.....	65

Resumen

Los nucleosomas son la unidad estructural y funcional de la cromatina que ayudan a la compactación del genoma. Están conformados por histonas, las cuales son depositadas por diferentes complejos de proteínas conocidos como chaperonas de histonas. La chaperona de histonas denominada DAXX deposita la variante de histonas H3.3 en la heterocromatina constitutiva. Este tipo de cromatina cumple diferentes funciones entre las que destaca asegurar una correcta segregación mitótica. Estudios previos demuestran que la pérdida de metilación del DNA y de heterocromatina constitutiva puede inducir inestabilidad cromosómica. DAXX interacciona con la metiltransferasa DNMT1, por lo que podría suponerse que al disminuir los niveles de DAXX también disminuirán los niveles de metilación del DNA en las regiones de heterocromatina constitutiva, por lo cual el objetivo del presente estudio es determinar la asociación de la subexpresión de DAXX con la inducción de inestabilidad cromosómica a través de la pérdida de la metilación del DNA en la heterocromatina constitutiva.

Encontramos que DAXX no es abundante en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario en comparación con HCT116 (Cáncer de colón) y PCS-200 (línea epitelial primaria de queratinocitos). Además, observamos que la disminución de DAXX induce inestabilidad cromosómica a las 72h. A continuación, observamos que la generación de micronúcleos puede ser atribuida a la desmetilación de sitios específicos de heterocromatina constitutiva: telómeros, centrómero y región pericentromérica. Finalmente, encontramos que la disminución de la chaperona de histonas no sólo desregula la metilación del DNA, también afecta la expresión de genes.

En conclusión, nuestros estudios demuestran que la pérdida de DAXX no altera la expresión de las principales enzimas de mantenimiento de la heterocromatina constitutiva ni de genes relaciones con inestabilidad cromosómica. Sin embargo, la disminución de los niveles de DAXX sí

induce inestabilidad cromosómica, la cual podría asociarse a la desmetilación observada en los telómeros, región pericentromérica y el centrómero.

Introducción

Composición y niveles de compactación de la cromatina

El interior del núcleo eucarionte está en su mayoría conformado por DNA y proteínas denominadas histonas. Estas proteínas contienen una carga positiva que facilita la unión a los grupos fosfatos del DNA, los cuales poseen carga negativa ¹. Al complejo de proteínas tanto histonas como otras proteínas y DNA se le conoce como “cromatina” ² y existen diferentes niveles de compactación de la misma (Figura 1). El primer nivel para compactar el DNA desnudo es el nucleosoma, el cual se considera la unidad funcional y estructural de la cromatina ^{3,4}.

El nucleosoma está conformado por un octámero compuesto por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, que envuelve al DNA 1.7 veces, abarcando aproximadamente 146 pares de bases ² (figura 1b). Cada nucleosoma a su vez, se encuentra separado por 20 pares de bases de DNA ^{1,5,6}. Cuando a este octámero de histonas y DNA se le une la histona *linker* H1, este complejo es entonces denominado “cromatosoma” ⁶ y abarca ahora alrededor de 165 pb. Cada nucleosoma está unido a otros mediante un segmento de DNA linker, de aproximadamente otras 20pb y en conjunto forman el denominado “collar de perlas” o fibra de 10nm ⁴ (figura 1c). El siguiente nivel de compactación es una fibra compacta de 30nm de diámetro, conocido como “solenoid”, y el cual se considera el templado para la transcripción. El nivel máximo de compactación de la cromatina es el cromosoma mitótico ^{2,4}.

Cabe mencionar que el nucleosoma no sólo ayuda en la compactación de la cromatina, también regula la activación o represión de genes y la replicación del DNA ⁴. Las histonas que lo conforman están sujetas a diferentes modificaciones postraduccionales (PTM). Éstas permiten

diferentes interacciones entre factores de remodelación, de transcripción y regulación génica, lo que resulta en los diferentes estados de la cromatina que permiten la apertura ó cierre de los distintos *loci*^{7,8}.

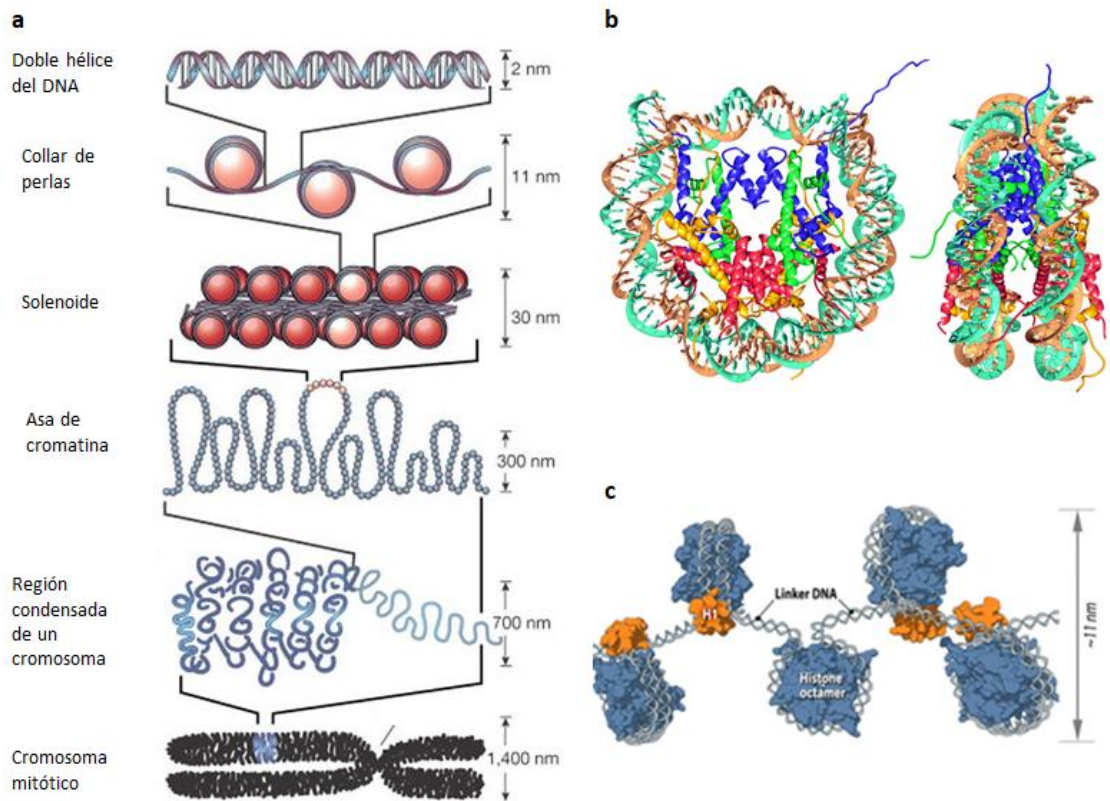


Figura 1. Niveles de compactación de la cromatina y estructura del nucleosoma. **a** Niveles de compactación de la cromatina. **b** Representación tridimensional de un nucleosoma, realizada mediante difracción de rayos-X a una resolución de 2.8 °Å. **c** formación de un cromatosoma, mediante la unión de la histona H1 a un nucleosoma (Figuras modificadas de Felsenfeld & Groudine, 2003; “Homepage – Richmond Group | ETH Zurich,” n.d.; <https://www.mechanobio.info/genome-regulation/what-are-nucleosomes/#what-are-nucleosomes>)

Las modificaciones postraduccionales (PTM) son un mecanismo bioquímico en el cual los residuos de aminoácidos en una proteína son modificados covalentemente¹⁰. Estas modificaciones químicas son en su mayoría posicionadas por diferentes enzimas después de que el polipéptido es

traducido y sale del ribosoma ¹¹. Las PTMs permiten que las propiedades de los aminoácidos se modifiquen sobre la marcha, en respuesta a las necesidades fisiológicas o de desarrollo ¹⁰. Se han identificado más de 200 tipos de PTMs y las diferentes combinaciones de ellas en una proteína generan un gran número de posibles estados moleculares ¹⁰.

Como otras proteínas, las histonas no están exentas de presentar PTMs. Las modificaciones más comunes son la fosforilación en residuos de serina o treonina, acetilación y desacetilación en lisinas, ubiquitinación y sumoilación en lisinas y metilación en lisinas o argininas. Se ha propuesto que las modificaciones en las histonas afectan la estructura y función de los cromosomas, por ejemplo en procesos como transcripción y remodelación de la cromatina ¹².

De manera general la cromatina ha sido dividida en dos estados, conocidos como eucromatina y heterocromatina; siendo la primera el estado que permite la activación transcripcional de la misma. En éste, la cromatina se encuentra descondensada y al teñirse con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) u otros colorantes de cromatina presenta una coloración mucho más ligera en comparación con la heterocromatina (Figura 2) ¹³. La eucromatina además, se encuentra enriquecida en modificaciones epigenéticas como es la trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3) y la acetilación de las histonas, lo cual reduce la carga positiva de las histonas y por lo tanto hace más laxa su unión con el DNA ^{8,13}. Esto facilita entonces la transcripción de las secuencias de genes que ahí se encuentran.

La heterocromatina por su parte, está conformada por regiones altamente compactadas (Figura 2) ¹³. De manera general se distinguen dos tipos de heterocromatina: la facultativa y la constitutiva, siendo la primera específica de cada estirpe celular, y del estadio de la célula. Este tipo de heterocromatina se caracteriza por presentar la modificación epigenética de

trimetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me3)⁸. Por su parte la heterocromatina constitutiva es encontrada en las regiones que requieren de un silenciamiento estable. Este tipo de heterocromatina generalmente se observa en regiones que contienen secuencias repetidas del genoma, o como un sistema de defensa para silenciar secuencias virales que invaden el genoma¹³. Dentro de las secuencias más características se encuentran las regiones pericentroméricas y los telómeros. Las modificaciones postraduccionales epigenéticas más abundantes o características en mamíferos son la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3) y la trimetilación de la lisina 20 en la histona 4 (H4K20me3)^{8,13}.

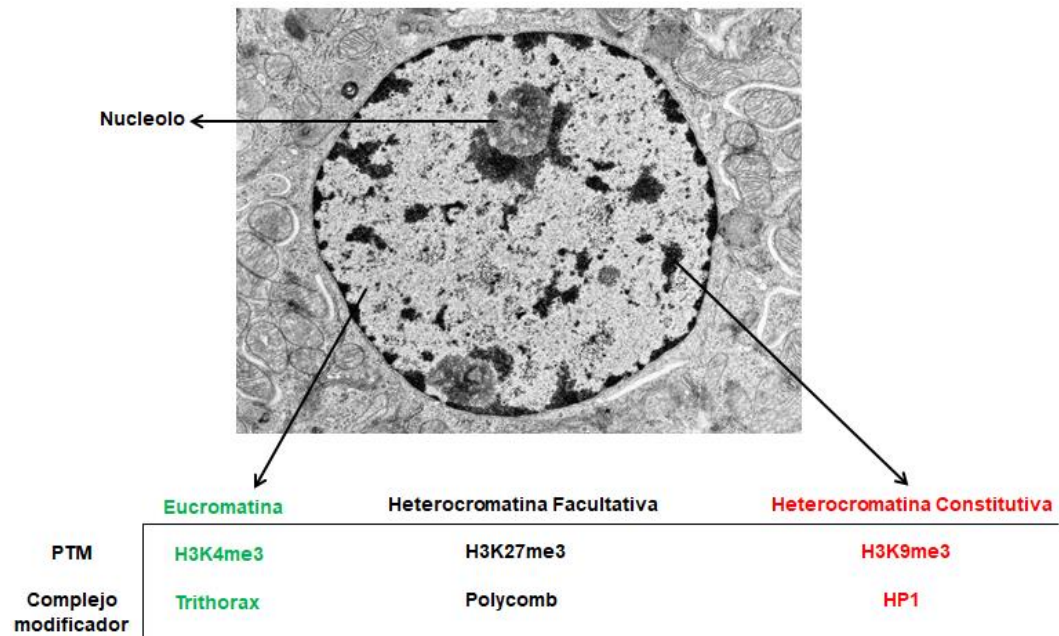


Figura 2. Estados de la cromatina y características epigenéticas. En la imagen de microscopía electrónica de transmisión se distinguen los dos grandes grupos de cromatina: la eucromatina y la heterocromatina. La marca epigenética más abundante en eucromatina es la H3K4me3 posicionada por el complejo Trithorax, mientras que en heterocromatina facultativa es Polycomb la que deposita su marca característica H3K27me3. Finalmente la constitutiva, abundante en la periferia celular y del nucleolo, está enriquecida en H3K9me3, siendo HP1 la proteína que la reconoce (Figura modificada de http://medcell.med.yale.edu/histology/cell_lab/euchromatin_and_heterochromatin.php).

Variantes de Histonas y Chaperonas de Histonas

Las PTMs se llevan a cabo en las histonas. Sin embargo, a pesar de que los nucleosomas están conformados por un octámero de ellas, éstas no siempre son las mismas. De hecho, existen variantes de histonas para cada una de las que se denominan como histonas canónicas o tipo (H3,H4, H2A y H2B), lo cual permite que se puedan generar diferentes combinatorias de histonas que conforman nucleosomas variantes ¹⁴.

Se entiende como una variante de histona, a una proteína tipo histona que es producto de un gen independiente. En el genoma humano existen más de 80 genes que codifican a proteínas histonas, las cuales fueron productos de fenómenos de duplicación a lo largo de la evolución, siendo estos genes similares a los que codifican a las denominadas histonas canónicas ¹⁵. Más allá de la secuencia de aminoácidos, las variantes de histonas se diferencian de las canónicas en varios aspectos (Tabla 1). Ejemplo de ello es que las variantes pueden ser tejido o estadio específico y son codificados por distintos genes que pueden contener intrones ^{12,16}. Independientemente de si son canónicas o variantes, como se mencionó anteriormente, cada histona puede ser codificada por más de un gen. Es decir, existen diferentes genes para codificar una mismo tipo de histona ¹⁷. Una diferencia importante a notar, es que a diferencia de las histonas canónicas cuyos genes vienen agrupados en clusters, los genes de las variantes se encuentran dispersos en diversos cromosomas. Su deposición es independiente al ciclo celular, por lo que su expresión no se encuentra limitada a la fase S del ciclo celular ^{12,16}. Además, los mRNA de las variantes de histonas están poliadenilados, mientras que el mRNA de las canónicas tiene una terminación 3' conocida como terminación tallo-asa, la cual es única para modular su estabilidad, transporte y traducción ¹⁸.

Tabla 1. Principales diferencias entre las histonas canónicas y las variantes de histonas.

Histonas canónicas	Variantes de Histonas
Sus genes están agrupados en clusters. Por ejemplo, en mamíferos el cluster más grande es el HIST1. Se ubica en el cromosoma 6 (6p21-p22) y contiene 55 genes de las diferentes histonas canónicas	Sus genes están dispersos a lo largo del genoma. Por ejemplo, en el caso de H3.3, uno de los genes que la codifican se encuentran en el cromosoma 1 (1q42.12) mientras que el otro gen se encuentra en la región telomérica del cromosoma 17 (17q25.1)
Los genes no contienen intrones	Los genes contienen intrones
Su mRNA tiene una terminación 3' tallo-asa	Su mRNA en su extremo 3', tiene una cola de poliA
Expresión limitada a la fase S del ciclo celular	Su expresión no se encuentra limitada por el ciclo celular
Su posicionamiento se da a lo largo del genoma, después de cada ciclo celular	Pueden ser tejido o estadio específico

El estudio de las variantes de histonas es relativamente nuevo, siendo las más conocidas las de H2A y H3 (Tabla 2). Acerca de esta última, su variante más estudiada es H3.3. En mamíferos esta variante sólo difiere en cinco aminoácidos con respecto a las canónicas H3.1 y H3.2, normalmente englobadas como H3 (Figura 3). H3.3 es codificada por los genes H3F3A y H3F3B, mientras que las canónicas, H3.1 y H3.2 lo son por HIST3H3 y HIST2H3C respectivamente ¹².

Tabla 2. Lista de las histonas canónicas y sus respectivas variantes de histonas conocidas y estudiadas en humanos.

Histona canónica	Variantes de histonas conocidas en humanos
H1	H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 y H1.5, H1t y H1T2, H1.0, H1oo, HILS1, H1x
H2A	H2A.X, H2A.Z.1, H2A.Z.2.1, H2A.Z.2.2., H2A.B, macroH2A1.1, macroH2A1.2 Y macroH2A2
H2B	H2B.W, TSH2B
H3	H3.3, CENP-A, H3.1T, H3.5, H3.X/H3.Y.2, H3.Y/H3.Y.1
H4	Desconocidas en humanos

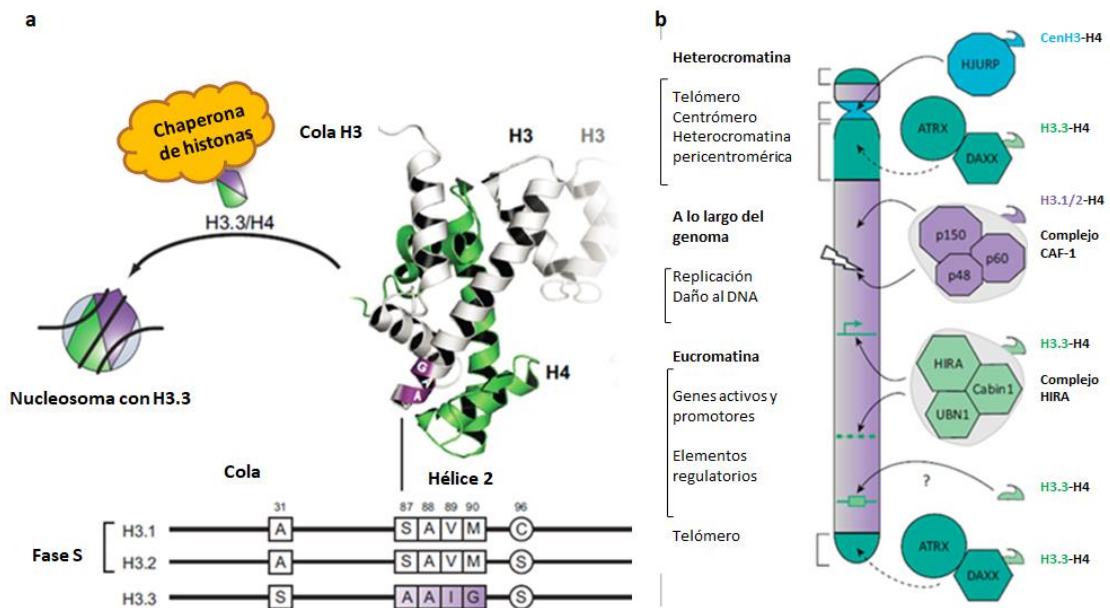


Figura 3. La variante H3.3 es depositada por diferentes complejos de chaperonas. **a** La diferencia entre las proteínas de H3 canónicas y la variante H3.3 radica en cinco aminoácidos ubicados principalmente en la segunda alfa hélice de la proteína, fundamental para la interacción con H4. **b** El complejo CAF-1 deposita las histonas canónicas a lo largo del genoma. El complejo HIRA posiciona a H3.3 en regiones de euromatina, mientras que DAXX/ATRX lo hacen en heterocromatina constitutiva, con excepción del centrómero (figura modificada de ^{19,20}).

Otra diferencia entre las histonas canónicas de H3 y la H3.3 es que diferentes chaperonas participan en su deposición. Las chaperonas son proteínas que se unen a la superficie hidrofóbica de las histonas desnaturalizadas o parcialmente plegadas, para asegurar su correcto plegamiento, además de conferirles estabilidad para evitar su agregación con otras proteínas (promiscuidad) y depositarlas en el lugar adecuado ²¹. Las histonas canónicas de H3 son depositadas en dímero con H4 por el complejo de CAF1 ¹⁹, mientras que H3.3 puede ser depositada por dos complejos de chaperonas distintas; los cuales pueden encontrarse tanto en regiones de eucromatina ²² como en regiones de heterocromatina constitutiva (Figura 3). En el caso de la eucromatina, el complejo proteico conformado por HIRA (*histone cell cycle regulator*), Cabin-1 y Ubn-1, deposita la variante, mientras que el complejo DAXX/ATRX la deposita en heterocromatina constitutiva, como son los telómeros y las regiones pericentroméricas ^{19,23,24}. Existe mucha información de la función de HIRA en la transcripción el cual se puede revisar a detalle en las siguientes revisiones ^{25,26}. Sin embargo, en el presente trabajo nos centraremos en la función del complejo de DAXX en la heterocromatina.

El mecanismo de acción de DAXX/ATRX comienza a la hora en la que una región de heterocromatina constitutiva requiere ser remodelada. A diferencia de H3 que es depositada por detrás de la horquilla de replicación del DNA, la variante H3.3 se posiciona de acuerdo con las necesidades de la célula. ²⁷. Ejemplo de esto se observa cuando H3.3 es depositada para reparar el DNA, delimitar promotores, enhancers y sitios de inicio de la transcripción e incluso delimitar regiones de heterocromatina constitutiva ¹. En este caso, el mecanismo de remodelación de cromatina comienza cuando la proteína ATRX (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) se posiciona y reconoce la H3K9me3 de los nucleosomas adyacentes. Esta es la marca epigenética característica de una región de

heterocromatina constitutiva. A continuación, DAXX, quién interactúa directamente con H3.3, deposita la nueva variante de histonas, reemplazando la H3 canónica del nucleosoma. Posteriormente, el complejo DAXX/ATRAX recluta a la maquinaria de represión de la transcripción, que incluye a HDACs, SUV39H1/2 (*Suppressor of variegation 3-9 homolog 1/2*) y HP1 (*Heterochromatin Protein 1*). Las HDACs son desacetilasas de histonas que removerán las lisinas acetiladas para dar paso a que enzimas como Suv39H1/2 se encarguen de generar la nueva modificación de H3K9me3 en la H3.3 recién incorporada. Este mecanismo sucederá en los nucleosomas variantes de H3.3 los cuales se encuentran ahora incorporados en regiones teloméricas y pericentroméricas (Figura 4) ^{28,29}.

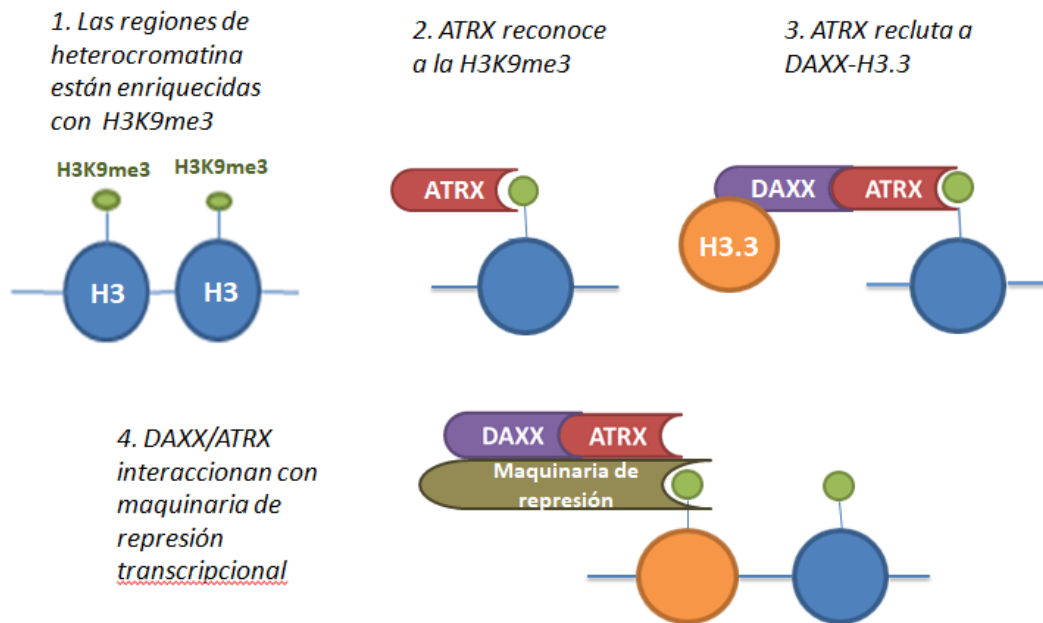


Figura 4. Mecanismo de acción de DAXX/ATRAX. Una de las PTMs más abundantes en heterocromatina constitutiva es la H3K9me3 (1). Cuando una región o nucleosoma en esa área necesita remodelarse, ATRX reconoce esa modificación (2). ATRX y DAXX forman un complejo, pero es DAXX la que interactúa directamente con H3.3 (3). DAXX/ATRAX no sólo depositan la variante de histonas, sino que también interactúan con proteínas de la maquinaria de represión como SUV39H1/2, HP1 y HDACs para volver a establecer las marcas asociadas a heterocromatina (4).

Death Domain Associated Protein 6

La proteína DAXX se considera entonces como una chaperona de histonas de H3.3 en heterocromatina constitutiva. Esta proteína es codificada por el gen *DAXX* ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.36). Funciona como homomultímero, donde cada unidad consta de 740 aminoácidos y un peso molecular de 81 373 Da.

A nivel estructural, la proteína de DAXX cuenta con dos motivos SIM, uno a cada lado terminal, los cuales resultan importantes para su localización subcelular (Figura 5). En la región N-terminal contiene un dominio DHB con el que interacciona con la proteína ATRX mediante su dominio DBM. Sigue después el dominio HBD, siendo este el que interactúa y reconoce a H3.3-H4. Por su parte, el lado C-terminal cuenta con un segmento ácido, enriquecido en Glu/Asp y con el cual interactúa p53, una región SPE rica en Ser/Pro/Glu y una SPT de Ser/Pro/Thr, sirviendo estas dos para la unión de CENPC, Pax3/5, PML, Fas y HDAC II ³⁰⁻³³.

DAXX fue identificada por primera vez en el citoplasma como una proteína pro-apoptótica por su interacción con el receptor del dominio de la muerte de CD95 (también conocido como Fas), por lo que en inglés su nombre hace referencia a *death domain associated protein*. Aquí observaron que DAXX activa la vía de c-JUN NH2-cinasa terminal, que desencadena en apoptosis³⁴. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que puede funcionar como factor anti-apotótico ^{34,35}.

No fue sino hasta el 2010 cuando se demostró que DAXX también se encuentra en el núcleo, adjunto a los cuerpos nucleares promielóticos de leucemia, así como en regiones de heterocromatina, donde funciona como chaperona de la variante H3.3 ^{24,36}. Incluso tiene una función relacionada

con la regulación transcripcional ^{12,24}. Por un lado, reprime la actividad de factores de transcripción como p53, ETS1, Pax3, y c-Met, mientras que por otro interactúa con remodeladores de la cromatina como desacetilasas de histonas (HDACs), metiltransferasas de DNA, e incluso acetil transferasas (CBP) ^{34,35}.

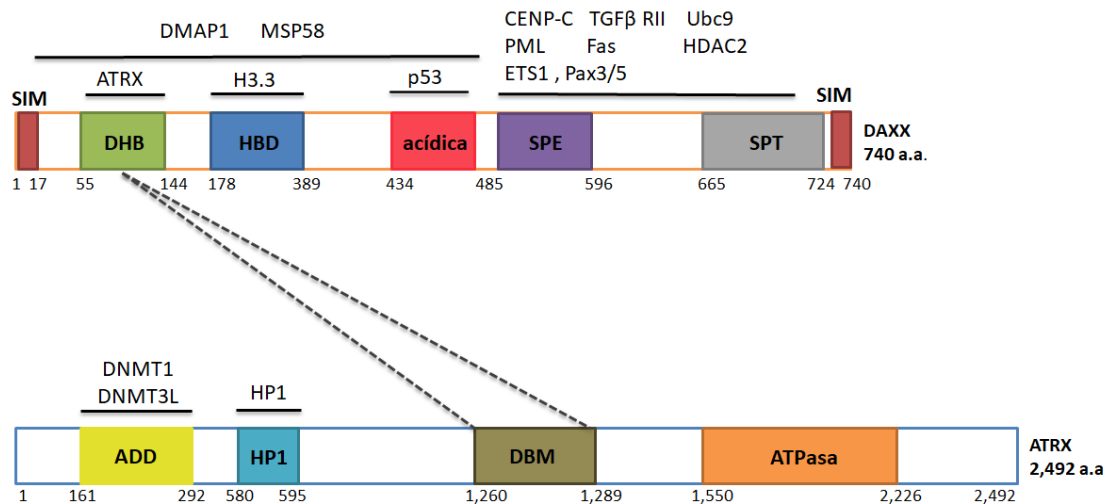


Figura 5. Organización de los dominios de DAXX y ATRX y las proteínas con las que interactúan. SIM, SUMO interacting motifs; DHB, DAXX helical bundle; HBD, histone binding domain; acídica, region acídica rica en Glu/Asp; SPE, segmento rico en Ser/Pro/Glu; SPT, región rica en Ser/Pro/Thr. ADD, ATRX-DNMT1-DNMT3L Domain; HP1, HP1 binding motif; DBM, DAXX binding motif; ATPasa, dominio de ATPasa.

DAXX entonces, resulta un elemento importante en el mantenimiento de heterocromatina. Puesto que, como se mencionó previamente, no sólo deposita la variante de histonas en región pericentromérica y telómeros, también interacciona con enzimas de mantenimiento de la heterocromatina como las metiltransferasas del DNA. Estudios previos han reportado que la disminución en los niveles de DAXX afecta particularmente los sitios de unión de la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1 ³⁸. Como puede observarse en la Figura 5, para DAXX no se conoce un dominio que

interacciona directamente con las DNMTs. Sin embargo para ATRX si se ha descrito que esto ocurre mediante el dominio ADD. A pesar de esto, DAXX sí interacciona con la proteína DMAP1, la cual se sabe es una proteína que activa la DNMT1, actuando como co-represor que mantiene la metilación ³⁹. Un estudio utilizando ChIP-seq, el cual consiste en realizar una inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación masiva con el fin de identificar en el genoma los sitios de unión de factores de transcripción y proteínas de unión a DNA ⁴⁰, demostró que DAXX se encuentra unido en más de 59,000 regiones reguladoras de enhancers y promotores en la línea celular de cáncer de próstata PC3. A su vez observaron que DAXX y la DNMT1 comparten 1174 puntos de unión, y que al disminuir los niveles de DAXX (K/D), el número de sitios que comparten se ve reducido a tan sólo 192, lo que implica que gran parte de los puntos de unión de la DNMT1 dependen de los niveles de DAXX ³⁸. Estos estudios sugieren la posible participación de DAXX en el posicionamiento específico de DNMT1 en el genoma, y por lo tanto la importancia de DAXX en el mantenimiento de la metilación del DNA.

Importancia de la heterocromatina constitutiva en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica

Junto con las DNMTs, existen otros factores remodeladores de la cromatina que constituyen la maquinaria de represión, como lo son las HDACs, HP1, y SUV39H1/2, remodeladores que en conjunto aseguran la conformación de la heterocromatina constitutiva ²⁹. La heterocromatina constitutiva es fundamental de manera estructural, puesto que su compactación ayuda en la correcta conformación y segregación de los cromosomas, por lo que resulta clave en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica ⁴¹.

La inestabilidad genómica hace referencia a una variedad de alteraciones en el DNA que van desde cambios en un solo nucleótido hasta un cromosoma completo ⁴². De manera general se distinguen tres categorías: Inestabilidad de nucleótidos (NIN), inestabilidad microsatelital (MIN o MSI) e inestabilidad cromosómica (CIN; por sus siglas en inglés). La primera se caracteriza por un aumento en la sustitución de bases, deleciones o inserciones de uno o pocos nucleótidos. La MIN es el resultado de defectos en genes de malapareamiento de bases (mismatch repair), lo que ocasiona la expansión o contracción de los microsatélites ⁴².

La CIN por su parte, se define como una alta tasa de pérdida o ganancia de cromosomas completos o fragmentos de ellos, por lo que su consecuencia directa es la generación de aneuploidía ^{43,44}. Este tipo de inestabilidad es la más frecuente en tumores sólidos, estando presente en alrededor del 70-80% de ellos ⁴⁵. Destaca entonces que la generación de inestabilidad cromosómica se considere fundamental en el proceso de transformación de células cancerosas ⁴⁵. El fenotipo inestable por lo tanto, tiene implicaciones en el pronóstico y tratamiento de pacientes con cáncer, específicamente con los agentes terapéuticos a utilizar ⁴².

Por otro lado, diversos estudios demuestran que la alteración de la heterocromatina constitutiva puede inducir inestabilidad cromosómica, ya sea inhibiendo a las HDACs ⁴¹, perdiendo la modificación de H3K9me3 ⁴⁶ o afectando la metilación del DNA ⁴⁷. Resalta además que como se mencionó previamente estos tres factores interaccionen con DAXX, proteína que se ha visto alterada en enfermedades como el cáncer ⁴⁸.

En la actualidad el cáncer representa uno de los más grandes retos de salud a nivel mundial. La Sociedad Americana del Cáncer la define como un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento y propagación incontrolable de células anormales ⁴⁹. A pesar de que existen más de 100

tipos de cáncer, comparten entre sí características denominadas como “hallmarks” del cáncer. Hanahan y Weinberg (2011) enunciaron once características que hasta hoy en día son aceptadas. De entre los hallmarks destaca la inestabilidad genómica, la cual fue abordada previamente.

Por su parte, existe cada vez más evidencia que señala como un mecanismo fundamental y común en cáncer la alteración de mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA, las PTMs y la remodelación de los nucleosomas ⁵¹.

Desregulación de DAXX en cáncer y desarrollo de inestabilidad cromosómica

Con respecto a la remodelación de los nucleosomas, la desregulación no sólo de las chaperonas de histonas, sino también de las variantes de histonas, ha sido asociada a la inducción del cáncer ¹². En el caso de DAXX, tanto la pérdida como su abundancia tienen efectos adversos en la célula (Tabla 3). Rapkin et al. (2015) observaron que en ausencia de DAXX se pierde la correlación entre los dominios de heterocromatina, y la modificación postraduccional de la H3K9me3. Donde observaron que la abundancia de H3K9me se mantiene en niveles constantes, pero ésta deja de delimitar y rodear a la heterocromatina constitutiva, lo cual implica que se encuentre deslocalizada. Esto tiene un gran impacto, puesto que esta modificación resulta indispensable en la generación y mantenimiento de la heterocromatina constitutiva. Aunado a esto, existe evidencia en líneas celulares no neoplásicas de próstata en las que al inducir una sobre expresión de DAXX aumenta el porcentaje de células con un número cromosómico anormal, induciendo CIN ⁵².

Tabla 3. Mutaciones y alteraciones en DAXX/ATRX y H3.3 y sus consecuencias en enfermedades

Proteína afectada	Alteración	Patología	Consecuencia funcional
H3.3 y/o H3.1	Mutación: K27M (cambio del aminoácido (a.a.) 27 de lisina a metionina)	Tumores cerebrales pediátricos (glioblastomas) y de hueso juveniles	Inhibe la actividad de metiltransferasa de la K27 del complejo represor de Polycomb2
	Mutación:G34R (cambio del a.a. 34 de glicina por arginina), G34V (cambio del a.a. 34 de glicina por valina), G34L (cambio del a.a. 34 de glicina por leucina)	Tumores cerebrales pediátricos (glioblastomas) y de hueso juveniles	Función desconocida, pero relacionada con mutaciones en DAXX/ATRX
	Mutación: K36M (cambio del a.a. 36 de lisina a metionina)	Condrioblastoma	Inhibe las metiltransferasas de K36
	Mutaciones	Varios tipos de cáncer, más frecuente en sistema nervioso	Menos frecuentes que mutaciones de ATRX inactivantes

DAXX	Mutaciones	Tumores neuroendócrinos pancreáticos (PanNETs)	43% de los PanNETs presentan una mutación, ya sea en ATRX o DAXX
	Aumento en su expresión	Cáncer de próstata	Crecimiento del tumor e inestabilidad cromosómica
		Cáncer en general	Promueve posicionamiento equivocado de CENP-A lo que genera inestabilidad cromosómica
	Disminución en su expresión	Cáncer de ovario	Promueve proliferación, migración y resistencia
Cáncer de pulmón		Potencia la metástasis a través de SLUG. Los pacientes con subexpresión tienen una supervivencia menor.	
	Mutaciones	Tipos de cáncer del sistema nervioso central y periférico	Mutaciones mayormente inactivantes

ATRX	Mutaciones	α-thalassemia mental retardation X linked syndrome	Subexpresión del gen de α globina
	Mutaciones	Tumores neuroendócrinos pancreáticos (PanNETs)	43% de los PanNETs tienen una mutación, ya sea en ATRX o DAXX

Por su parte, en cáncer de ovario, DAXX se encuentra sobre expresado tanto a nivel mRNA como proteína, ya sea en tumores como en líneas celulares derivadas ³⁴, las cuales se caracterizan, además, por ser altamente inestables en cuanto a cromosomas se refiere. Pan et al. (2013) pudieron constatar que la sobre expresión de DAXX se da en todos los subtipos del cáncer de origen epitelial. Esto a su vez se relaciona con un aumento en el tamaño del tumor debido a una mayor proliferación, una mayor capacidad para invadir otros tejidos (metástasis) y quimioresistencia del tumor (favoreciendo la reparación del DNA).

Por el contrario, en cáncer de pulmón se ha observado que la subexpresión de DAXX, contribuye a un peor pronóstico y menor supervivencia para estos pacientes ⁵³. De manera independiente al nivel de expresión de DAXX, se ha visto que mutaciones en este gen también están asociadas a distintos tipos de cáncer, particularmente los asociados al sistema nervioso y pancreático ⁴⁸.

A pesar de que son muchos los mecanismos alterados en cáncer, la desregulación de mecanismos epigenéticos ha demostrado ser más frecuente de lo que se pensaba. Dentro de éstos se encuentran las

chaperonas de histonas, donde DAXX como depositador de H3.3 es un tema relativamente nuevo y sobre el cual falta mucho por elucidar, sobre todo con respecto a los mecanismos involucrados cuando los niveles de DAXX se alteran.

El hecho de que DAXX participe en el posicionamiento de H3.3 en regiones tan importantes para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica como son las regiones pericentroméricas y teloméricas sugiere que alteraciones en los niveles de esta chaperona podrían desencadenar CIN. Son múltiples los antecedentes donde se ha visto este efecto sobre la desregulación de DAXX. Sin embargo, el mecanismo por el cual DAXX induce CIN no ha sido del todo elucidado. En el caso de la sobreexpresión, se adjudica el posicionamiento fuera del centrómero de CENP-A a la generación de inestabilidad (Tabla 3). En cuanto a su subexpresión, se desconoce si esto induce CIN y cual sería el posible mecanismo que la provoque. Basado en la literatura, suponemos que al disminuir a DAXX, la heterocromatina constitutiva se ve afectada puesto que DAXX/ATRX dejan de posicionar a la maquinaria fundamental en la formación de la heterocromatina, como la DNMT1. Esto ocasionaría que se afectara la metilación en regiones pericentroméricas y teloméricas, las cuales tienen abundancia en marcas represivas como metilación del DNA y H3K9me3. Promoviendo así un estado de cromatina más laxo en dichas regiones estructurales, lo cual podría tener como consecuencia una mala segregación de los cromosomas, así como afectar el silenciamiento de grandes dominios génicos.

Justificación

Existen estudios previos que demuestran que la pérdida de heterocromatina constitutiva puede inducir inestabilidad cromosómica ^{41,46,47}, la cual es una característica de los tumores sólidos. A su vez se ha visto que en condiciones normales DAXX, la proteína chaperona de H3.3 en heterocromatina, interacciona con la DNMT1. Al disminuir los niveles de DAXX, el posicionamiento de la DNMT1 se ve alterado³⁸. A partir de lo anterior, podría suponerse que la disminución de DAXX ocasionará inestabilidad cromosómica al inhibir indirectamente la metilación del DNA de la región pericentromérica (heterocromatina constitutiva). Sin embargo, no existe hasta la fecha reporte alguno que demuestre el mecanismo mediante el cual la pérdida de DAXX genere inestabilidad cromosómica.

Pregunta de investigación

¿La subexpresión de DAXX inducirá inestabilidad cromosómica mediante la disminución de la metilación del DNA en la región de heterocromatina pericentromérica?

Hipótesis

La subexpresión de DAXX conllevará a la inducción de inestabilidad cromosómica mediante la pérdida de metilación del DNA en la región de heterocromatina pericentromérica.

Objetivo General

Determinar la asociación de la subexpresión de DAXX con la inducción de inestabilidad cromosómica a través de la pérdida de la metilación del DNA.

Objetivos Particulares

1. Determinar los niveles de expresión y abundancia de DAXX en líneas celulares de cáncer de ovario (OVCAR3, SKOV3 y SW626), de cáncer de colón (HCT116) y la línea epitelial primaria PCS-200-010.
2. Generar un modelo Knock-Down de DAXX en las líneas celulares HCT116 y PCS-200-010.
3. Evaluar el efecto de la subexpresión de DAXX en la inducción de inestabilidad cromosómica.
4. Establecer el efecto de la subexpresión de DAXX en la pérdida de metilación de la heterocromatina pericentromérica.
5. Evaluar la existencia de cambios en la expresión por la subexpresión de DAXX en enzimas epigenéticas involucradas en la regulación de la cromatina.
6. Evaluar la presencia de cambios en la expresión ante la subexpresión de DAXX en genes asociados a los principales procesos del cáncer.

Estrategia experimental y Metodología

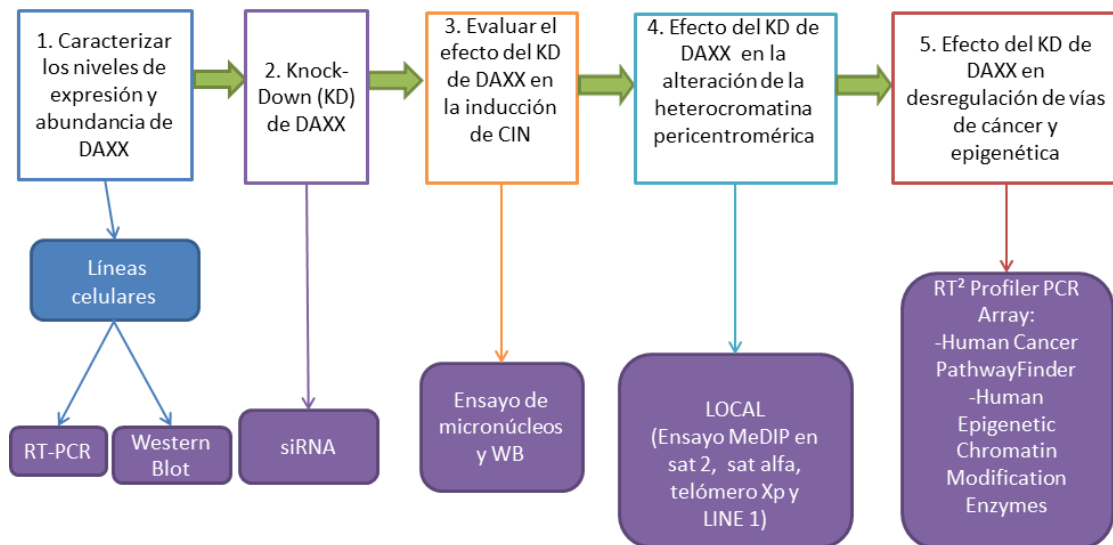


Figura 6. Diagrama de flujo sobre la estrategia experimental llevada a cabo.

Caracterización de los niveles de expresión y abundancia de DAXX mediante RT-PCR y Western Blot

Con el fin de caracterizar los niveles de expresión de DAXX y de esta forma determinar el modelo celular a elegir para realizar el Knock Down, extrajimos RNA de las diferentes líneas celulares de cáncer de ovario (OVCAR3, SKOV3 y SW626) de cáncer de colón (HCT116) y como control de expresión empleamos la línea epitelial primaria de queratinocitos (PCS-200). Las células fueron cultivadas de acuerdo a las especificaciones del proveedor, como se muestra en la Tabla 4. El RNA por su parte, fue extraído mediante el uso de Trizol (Life Technologies, cat. 15596018). Comprobamos la calidad de la extracción mediante un gel desnaturalizante de agarosa al 1.2% y formamida.

Tabla 4. Condiciones de las líneas celulares utilizadas

Línea celular	Tejido	Medio suplementado	Condiciones
PCS-200-010	Prepucio neonatal	Dermal Cell Basal Medium (Cat. PCS-200-030, ATCC) Keratinocyte Growth Kit (Cat. PCS-200-040, ATCC)	Aire, 95%; CO ₂ , 5%, 37°C
HCT116	Carcinoma colorectal	McCoy's 5a (Cat. 16600082, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 10%	Aire, 95%; CO ₂ , 5%, 37°C
OVCAR3	Adenocarcinoma de ovario	RPMI-1640 (Cat. 11875-093, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 20% Insulina Bovina (Cat. I0516-5mL, Sigma) 0.01 mg/mL	Aire, 95%; CO ₂ , 5%, 37°C
SKOV3	Adenocarcinoma de ovario	McCoy's 5a (Cat. 16600082, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 10%	Aire, 95%; CO ₂ , 5%, 37°C
SW626	Adenocarcinoma de ovario (probablemente derivado de metástasis de un tumor primario de colón)	Leibovitz's L-15 (Cat. 11415064, Gibco) Suero Fetal Bovino (Cat. 10500064, Gibco) 10%	Aire, 100%; 37°C

Generamos el cDNA empleando el kit High Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, cat. 4368814) siguiendo las instrucciones del fabricante. 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 5). 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 PCS-200 como calibrador.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos empleados en el presente trabajo y sus respectivas Tms

Gen/ Región	Secuencia de oligonucleótidos	Tm
<i>GAPDH</i>	F 5'-TGT CAA GCT CAT TTC CTG GT- 3' R 5'-TCT TAC TCC TTG GAG GCC AT- 3'	60°C
<i>DAXX</i> (NT)	F 5'- AAG CCT CCT TGG ATT CTG GT-3' R 5'- ATC ATC CTC CTG ACC CTC CT- 3'	60°C
<i>LINE1</i>	F 5'-GGC CAG TGT GTG TGC GCA CCG-3' R 5'-CCA GGT GTG GGA TAT AGT CTC GTG G-3	55°C
<i>Tel Xp</i>	F 5'-GAG TGA AAG AAC GAA GCT TCC- 3' R 5'-CCC TCT GAA AGT GGA CCT AT- 3'	58°C
<i>Sat Alfa</i>	F 5'-GAA GTT TCT GAG AAT GCT TCT G-3' R 5'-CTC ACA GAG TTG AAC CTT CC-3'	61°C
<i>Sat 2</i>	F 5'-ATC GAA TGG AAA TGA AAG GAG TCA-3' R 5'-GAC CAT TGG ATG ATT GCA GTC A-3'	61°C

A su vez, observamos la abundancia de la proteína a través del ensayo de Western Blot. Para conseguirlo, cultivamos las líneas celulares previamente mencionadas hasta conseguir una confluencia aproximadamente del 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 20 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). Se tiñó la membrana con rojo Ponceau para confirmar una 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 GAPDH (Santa Cruz, sc-25778) 1 a 2500. Los blots fueron incubados toda la noche a 4°C.

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: 25,000 (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. 876 1520). Usamos como control negativo la ausencia del anticuerpo primario. Comparamos los resultados mediante densitometría entre las distintas líneas celulares, empleando el software Image J®. Debido a los resultados entre estas elegimos como modelo la línea celular HCT116 ya que es cromosómicamente estable, presenta niveles estables de DAXX y es a nivel técnico más fácil para establecer el modelo de KD-DAXX.

Generación del modelo KD de DAXX mediante siRNAs

Posteriormente transfectamos las líneas celulares de HCT116 y PCS-200-010 con un siRNA para subexpresar a DAXX (Dharmacon, cat. LQ-004420-00-0010) siguiendo las instrucciones del proveedor y utilizando el medio de transfección DharmaFECT 2 (Dharmacon, cat. T-2002-03) y DharmaFECT1 (Dharmacon, cat. T-2001-03) respectivamente para cada línea celular. Sembramos las células en placas de 6 pozos 24h antes de la transfección, sembrando 20,000 células por pozo de queratinocitos y 50,000 de HCT116 para un ensayo de 72h con siRNA. Realizamos dos ensayos de transfección distintos; uno utilizando la mezcla de las cuatro secuencias de siRNA y otro utilizando por separado cada uno.

Para HCT116, a cada pozo le agregamos un volumen total de 2 mL: 1600 μ L de medio completo (con suero), 200 μ L de la concentración elegida de siRNA (Tabla 6) más medio sin suero y 200 μ L de DharmaFECT2 y medio sin suero (2 μ L DharmaFECT+ 198 μ L medio). Por su parte para PCS-200-010, utilizamos 1 μ L de DharmaFECT1 (y 199 μ L de medio), no cambiamos completamente por medio fresco, sino que dejamos 600 μ L del medio con el que sembramos y añadimos 1000 μ L más de medio fresco, para evitar que los queratinocitos se estresaran.

Tabla 6. Volúmenes utilizados para la transfección de siRNA

Línea celular	Medio completo (1600 μ L)	Medio sin suero (400 μ L)
HCT116	1600 μ l de medio fresco	2 μ l de DharmaFECT 2+ 198 μ l de medio sin suero = 200 μ L Concentración de siRNA + medio sin suero= 200 μ L*
PCS-200-010	1000 μ l de medio fresco + 600 μ l del medio con el que se sembraron las células 24 h antes	1 μ l de DharmaFECT 1+ 199 μ l de medio sin suero = 200 μ L Concentración de siRNA + medio sin suero= 200 μ L*
*= 50nM = 20 μ L de cada siRNA 25nM= 10 μ L de cada siRNA 10nM= 4 μ L de cada siRNA		

5nM= 2 μ L de cada siRNA

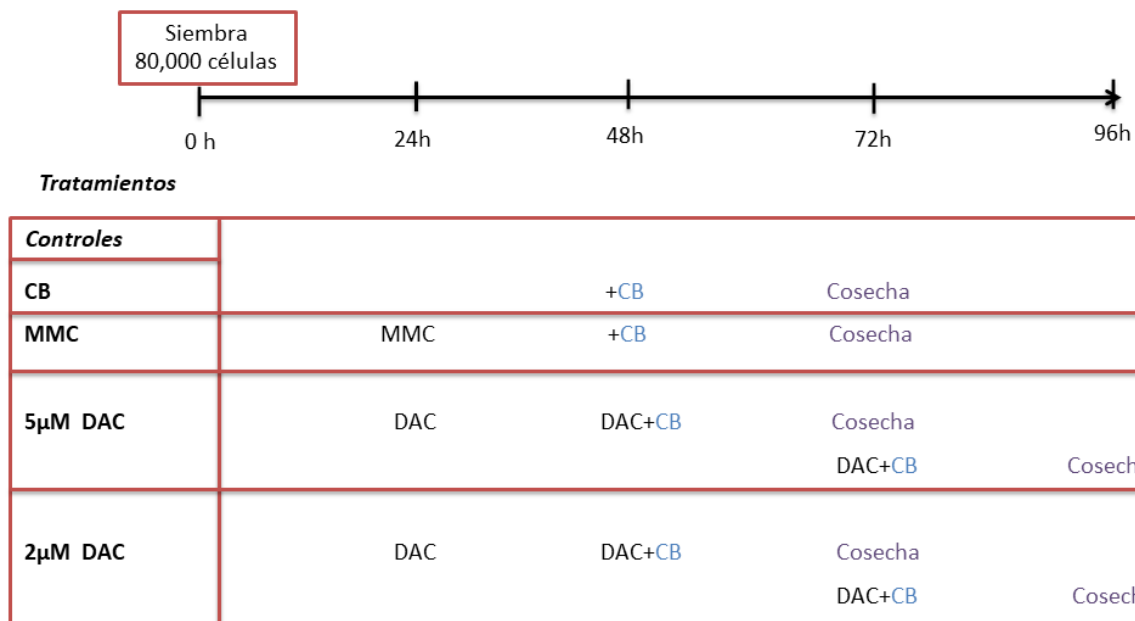
Transcurridas las 72h con el siRNA, comprobamos la efectividad de la inhibición mediante Western Blot, como se describió anteriormente.

Evaluación de inestabilidad cromosómica mediante ensayo de micronúcleos

Una vez estandarizado el KD-DAXX, identificamos si la subexpresión generaba inestabilidad cromosómica mediante el ensayo de micronúcleos. Este ensayo lo realizamos cultivando HCT116 en cajas Petri p60. En cada pozo sembramos 80,000 células y evaluamos dos tiempos: 48h y 72h (Figura 7). A todos los tratamientos les administramos citocalasina B (CB) (3 μ g/mL) (Sigma, cat. C6762) 24 h antes de ser cosechadas, que además nos sirvió como control negativo de la técnica. Como control positivo de micronúcleos utilizamos el clastógeno mitomicina C (MMC) (0.1 μ g/mL) (Sigma, cat. M4287) y como control positivo de desmetilación empleamos 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC) (Sigma, cat. A3656), un inhibidor de las metiltransferasas del DNA, en dos concentraciones: 2 y 5 μ M, las cuales se administraban cada 24 h en medio fresco preparado con las dosis del fármaco señaladas.

Para las células KD-DAXX, transcurridas 24 h después de que las sembramos, las transfectamos con los siRNAs 3 y 4 a 50nM como se describió anteriormente, y 24h antes de ser cosechadas, les añadimos citocalasina B. Nuestro control negativo fue la utilización únicamente del medio de transfección (Dh). Para las células KD-DAXX en combinación con 2 o 5 μ M DAC, realizamos el procedimiento como describimos con KD-DAXX únicamente. 24h después de la transfección, añadíamos la dosis correspondiente de DAC por el tiempo necesario (48 o 72h), renovando el medio con DAC fresco cada 24h.

a



b

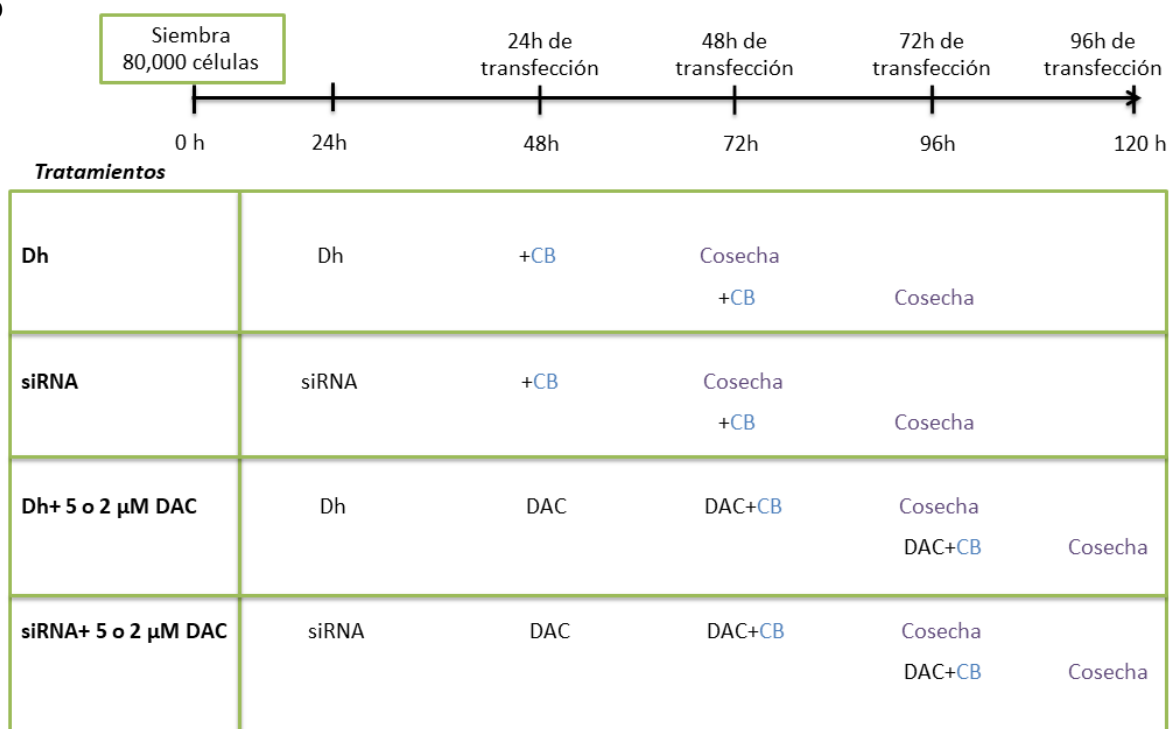


Figura 7. Diagrama explicativo sobre el ensayo de micronúcleos. El esquema muestra los tiempos en que se pusieron los diferentes tratamientos, ya sean controles (a) o KD de DAXX (b).

Transcurrido el tiempo (48 o 72h), cosechamos las células. La cosecha consistió en tripsinizar y centrifugar las células, seguido de un lavado con PBS.

Posteriormente incubamos el pellet con una solución hipotónica (KCl, 0.075 M) por 8 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo realizamos una prefijación con solución de Carnoy-PBS (1:5) y finalmente una fijación con solución de Carnoy (Metanol-ácido acético 3:1). Al día siguiente 40µL de las células fijadas fueron goteadas en porta objetos previamente sumergidos en metanol frío. Una vez secos los porta objetos, los teñimos con hematoxilina-eosina (Millipore, cat. 111661) de la siguiente forma: 30" en eosina, dejamos secar sin enjuagar y pasamos 1" a hematoxilina. A continuación las dejamos 1" en agua bidestilada e inmediatamente después 1" en etanol al 70%. Una vez secas, las observamos al microscopio 40x. Por cada laminilla se contaron a doble ciego 1000 células binucleadas y de esas cuantas tenían micronúcleos.

Evaluación de la alteración de la heterocromatina constitutiva mediante ensayo de inmunoprecipitación del DNA metilado

Con el fin de determinar si la subexpresión de DAXX ocasionaba inestabilidad cromosómica mediante alteraciones en la heterocromatina, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación del DNA metilado (MeDIP) (Diagenode, cat. C02010021) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cultivamos células HCT116 como se mencionó anteriormente. Una vez alcanzada la confluencia del 80% fijamos las células con 1% de formaldehído por 10 minutos, transcurrido ese tiempo se detuvo el entrecruzamiento con agregando glicina 2.5M e incubando por 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron las células con PBS frío para remover el formaldehído. Posteriormente lisamos las células con buffer de lisis (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, e inhibidores de proteasas (Cell Signaling, cat. 9803) y purificamos el DNA con el método de fenol-cloroformo. Cuantificamos el DNA utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000c, para asegurar que se usara 1µg para cada IP. Una vez realizado esto, sonicamos el DNA hasta dejarlo en un rango de 100 a 500pb. Realizamos la inmuno selección empleando el anticuerpo anti-5mC (Diagenode). Seguido por la inmunoprecipitación, al emplear una incubación de 1 hora con perlas magnéticas A/G (Diagenode) en el cuarto frío.

Utilizamos como controles positivo y negativo DNA metilado *in vitro* y DNA no metilado que incluye el Kit.

A continuación realizamos un PCR tiempo real como se describió anteriormente. Para balancear las diferencias en las cantidades de IP y de Input en el qPCR, la eficiencia de amplificación se calculó utilizando el 10% del input. Calculamos el nivel de enriquecimiento de la comparación con la amplificación del input al 10% de los amplicones experimentales específicos, menos la observada en los IPs por 100. Los resultados del IP fueron amplificados por triplicado mediante qPCR en placas de 96 pozos (Microamp fast optical plate, Applied Biosystems, cat. 4306737). Utilizamos oligonucleótidos de regiones específicas de heterocromatina constitutiva como el centrómero (satélite alfa), región pericentromérica (satélite 2), repetido LINE1 y el telómero del brazo corto del cromosoma X (Tabla 5). A su vez el protocolo incluía dos oligonucleótidos dirigidos a los genes TSH2B (control de metilación) y GAPDH (control no metilado). Incluimos DNA obtenido de células tratadas con DAC como control positivo de desmetilación pasiva. Los resultados obtenidos son representativos de los experimentos con duplicados independientes que fueron usados para calcular la desviación estándar.

Evaluación de la presencia de cambios de expresión mediante RT2

Finalmente con el fin de elucidar si los efectos encontrados por KD-DAXX eran causados por pérdidas en la expresión de las enzimas involucradas en la formación de la heterocromatina, así como que si la subexpresión de DAXX no sólo afectaba la metilación del DNA en las regiones de heterocromatina, sino también la expresión de genes involucrados en distintas vías del cáncer. Llevamos a cabo la preparación de placas de análisis de expresión RT2 (QIAGEN, cat. PAHS-033Z y cat. PAHS-085Z) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Se analizaron 84 genes correspondientes a enzimas que participan en la remodelación epigenética y 84 genes de relevancia en las principales vías del cáncer, así como 12 controles normalizadores constitutivos de expresión por placa. La técnica consistió en una vez extraído el RNA, realizamos la retrotranscripción y obtención de cDNA. A continuación el cDNA de las células KD

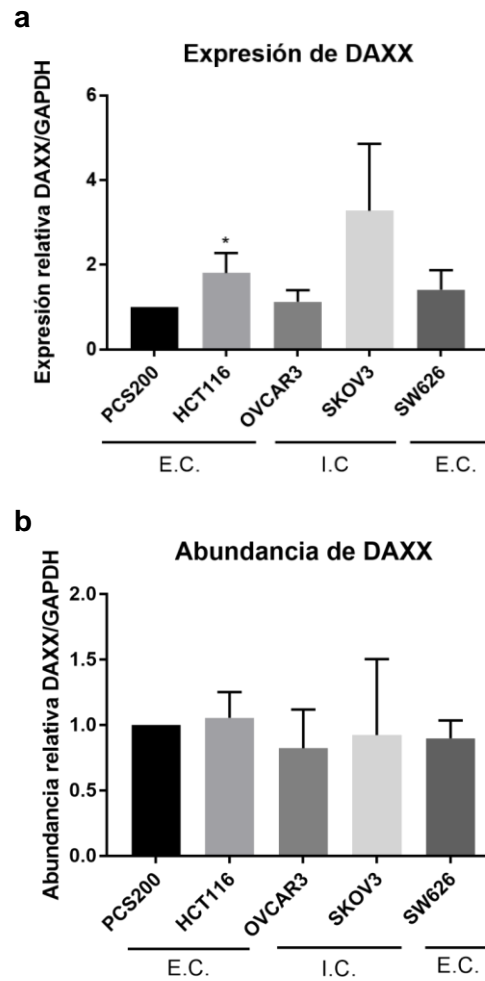
de DAXX y las control, fueron cargadas en placas independientes, las cuales contenían los oligos de genes específicos ya sea de enzimas epigenéticas o de vías del cáncer y corrimos un PCR tiempo real por cada placa. Tanto las KD como las control fueron evaluadas por triplicado (tres placas independientes de RT2), tanto para las enzimas epigenéticas como para las vías de cáncer. Utilizamos el software digital que ofrece Qiagen para su análisis bioinformático y estadístico (<https://www.qiagen.com/mx/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>).

Evaluamos los resultados de los experimentos mediante la prueba estadística de t de Student, tomándose en cuenta una $p \leq 0.05$ para considerarse como significativa. Las gráficas fueron realizadas mediante el software GraphPad Prism5®.

Resultados

Con el fin de identificar el modelo celular más adecuado para contestar nuestros objetivos, caracterizamos en un principio los niveles de DAXX tanto a nivel mRNA como a nivel proteína en diferentes líneas celulares (Figura 8). Cultivamos tres líneas celulares cromosómicamente estables (PCS-200-010, HCT116 y SW626) y dos con inestabilidad cromosómica (SKOV3 Y OVCAR3). Utilizamos como control normalizador para el estudio a la línea celular PCS-200-010, la cual es una línea primaria epitelial no neoplásica de queratinocitos neonatales. En cuanto a la expresión del gen (Figura 8a), DAXX se encuentra sobreexpresado 0.8 veces en HCT116 ($p \leq 0.05$), mientras que en las otras líneas no hubo cambios significativos. De manera similar, la abundancia de la proteína DAXX (Figura 8b) no varía entre las líneas, sin importar el tejido del que provengan o si son inestables o estables. Teniendo en consideración lo anterior se escogió a HCT116 como el modelo de estudio; ésta no sólo presenta a DAXX tanto en mRNA como proteína, también es cromosómicamente estable, y más fácil de transfectar que los queratinocitos. Lo

que nos permitió observar el efecto de la subexpresión de DAXX en la inducción de CIN.



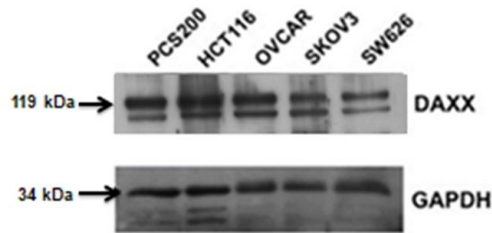


Figura 8. Expresión y abundancia de DAXX en líneas celulares con y sin inestabilidad cromosómica. Los análisis fueron realizados mediante el empleo de triplicados biológicos de las líneas celulares PCS-200-010, HCT116, OVCAR, SKOV3, SW626. Empleamos como normalizador al gen GAPDH y como calibrador la línea celular no neoplásica PCS-200-010, por lo que se determinó que está última tiene un valor de expresión y abundancia igual a uno. **a** Los niveles del transcrito de DAXX fueron evaluados mediante RT-qPCR. **b** Los niveles de abundancia de proteína fueron cuantificados mediante Western Blot. $*=p\leq 0.05$. Las barras muestran la desviación estándar. E.C.=estabilidad cromosómica, I.C.= inestabilidad cromosómica.

Una vez determinado el modelo celular, estandarizamos la transfección del siRNA para lograr una buena disminución de DAXX (Figura 9). En primera instancia determinamos cual era la mejor concentración de siRNAs a utilizar (Figura 9a y 9b). Utilizamos tanto HCT116 como PCS-200-010, puesto que desconocíamos si alguna de las dos líneas era mejor de transfectar que la otra. HCT116 resultó ser más conveniente para la transfección puesto que por su velocidad de crecimiento y el tamaño de sus células, obteníamos un botón de mayor tamaño para la extracción de proteína. Esto se tradujo en una mayor concentración de proteína. A partir de lo obtenido, elegimos la concentración de 50 nM para futuros ensayos puesto que disminuyó los niveles de proteína en ambas líneas celulares. Si bien la disminución no es significativa, si fue la que logró la mayor inhibición.

A continuación, puesto que el kit de siRNA consistía en 4 secuencias distintas, cada una en un tubo por separado, probamos si el efecto de inhibición era mayor con algún siRNA en específico o con la combinación de todos (Figura 9c). La utilización de los siRNAs por separado logró una mayor inhibición con respecto a la mezcla. Destacan los siRNAs tres, con una inhibición del 90%, y cuatro (70% de

inhibición). Por lo anterior, decidimos emplear a partir de entonces, estos dos siRNAs para lograr disminuir eficazmente a DAXX.

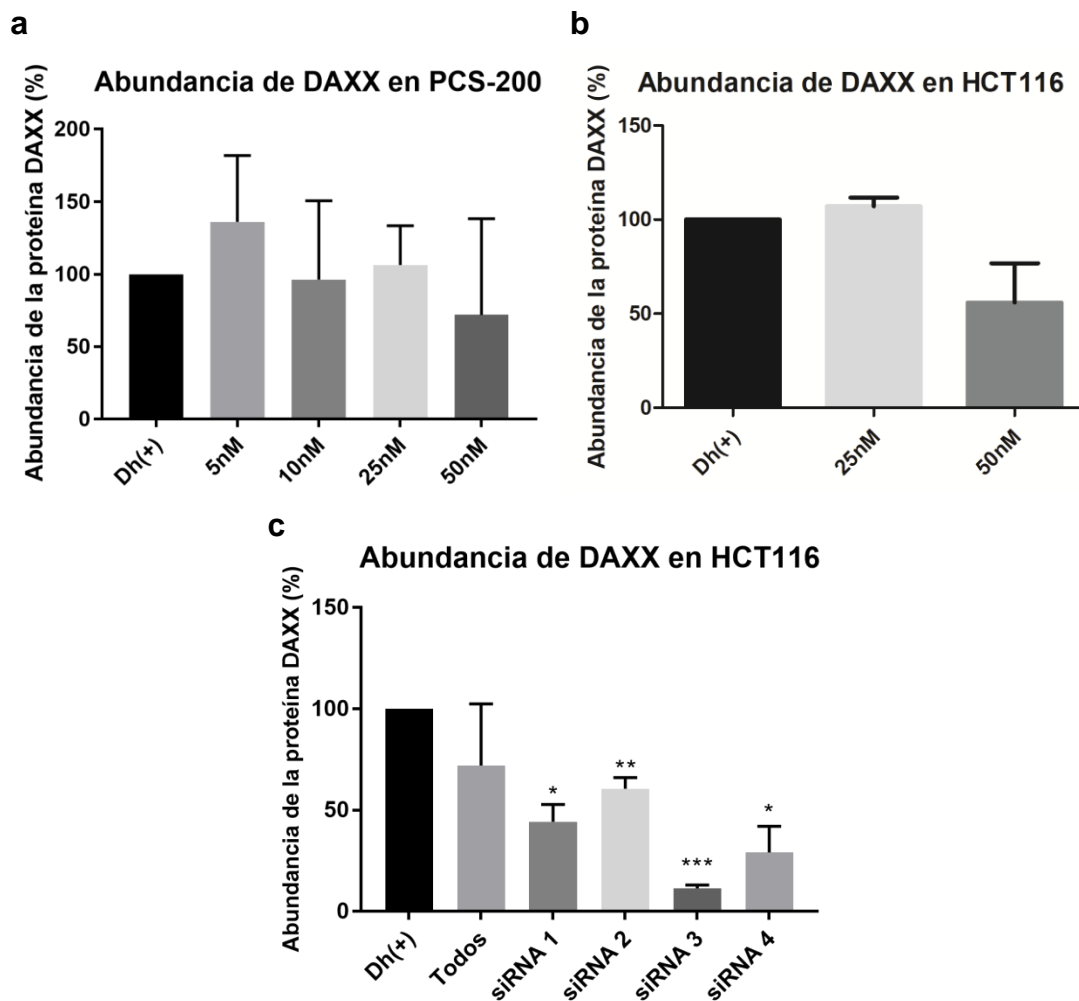


Figura 9. Estandarización de los siRNAs para el silenciamiento de DAXX. Para la estandarización se emplearon dos líneas celulares cromosómicamente estables: PCS-200-010 y HCT116. La efectividad de inhibición fue evaluada mediante un Western Blot a las 72h. **a** Curva de concentración en la línea celular PCS-200-010 utilizando el conjunto de cuatro siRNAs. **b** Curva de concentración en la línea celular HCT116 volviendo a

utilizar los cuatro siRNAs. **c** Inhibición de DAXX utilizando los siRNAs por separado en HCT116. *= $p \leq 0.05$, **= $p \leq 0.01$ y ***= $p \leq 0.001$. Las barras muestran la desviación estándar.

Una vez determinada la mejor condición para el KD de DAXX, proseguimos a evaluar si ésta generaba CIN mediante el ensayo de micronúcleos. Por su parte, con el fin de conocer el efecto de la pérdida de la metilación en la inducción de CIN, fue necesario estandarizar la dosis del fármaco control positivo de desmetilación, 5-Aza-2'-desoxicitidina (DAC). Por lo que realizamos un ensayo de viabilidad mediante la técnica de MTT (Figura 10). Empleamos tres concentraciones distintas del fármaco, basándonos en las reportadas para otros ensayos de metilación en la literatura ⁵⁴. La 5-aza-2'-desoxicitidina es un fármaco derivado de la 5-aza-2'-acitidina, análogo de la citosina. El cual se incorpora durante el ciclo celular en vez de la citosina y tiene como blanco la unión a la citosina metilada del DNA con el sitio catalítico de las DNMTs, lo que ocasiona la inhibición de estas enzimas, atrapándolas e impidiendo su funcionamiento ⁵⁵. De esta forma, al no poder mantenerse la marca de metilación durante la división celular, el DNA se va desmetilando de manera pasiva cada vez que la célula se divide. Con el conocimiento de que HCT116 tiene una división (ciclo celular) cada 18 horas, consideramos que 72h o 4 divisiones, era el tiempo adecuado para observar un efecto desmetilante en el DNA. Por lo tanto realizamos un ensayo de viabilidad con MTT a 72h utilizando 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC) (Figura 10) la cual tiene una vida media muy corta por lo que tenía que ser añadida cada 24 horas ⁵⁶. Encontramos que tanto 5 μ M y 2 μ M DAC mantenían más del 70% de la viabilidad celular en comparación con el 60% de 10 μ M; sin embargo se desconocía cuál de los dos lograba una mayor desmetilación, por lo que para los futuros experimentos utilizamos ambas concentraciones.

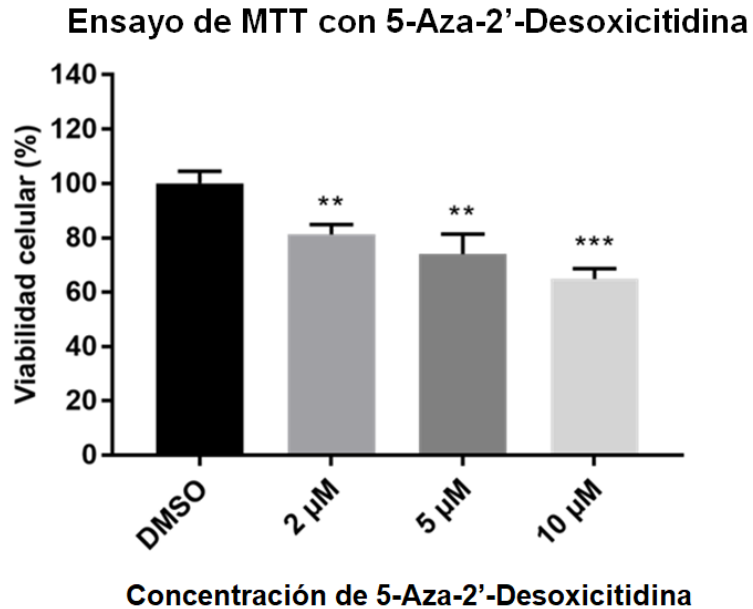


Figura 10. Ensayo de viabilidad con 5-Aza-2'Desoxicitidina. Se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT empleando tres concentraciones distintas de 5-Aza-2'Desoxicitidina por 72 h en HCT116. Los análisis fueron realizados por triplicado biológico. $*=p\leq 0.05$, $**=p\leq 0.01$ y $***=p\leq 0.001$. Las barras muestran la desviación estándar.

Proseguimos a realizar el ensayo de micronúcleos a 2 tiempos diferentes: 48h y 72h (Figura 11). Empleamos como control negativo de la técnica citocalasina B y como control positivo el tratamiento con mitomicina C. Ésta es un clastógeno conocido que induce una gran generación de micronúcleos. A las 48h (Figura 11a), las células DAXX-KD en combinación con 2μM de DAC y el medio de transfección (Dh) no indujeron micronúcleos, en comparación con los distintos tratamientos con DAC. DAXX-KD induce la generación de micronúcleos a partir de la 48h. Después de 72h, todos los tratamientos incluyendo al KD-DAXX, producen micronúcleos en comparación con los controles negativos de la técnica. En conjunto esto nos indicó que la subexpresión de DAXX es capaz de generar CIN. Sin embargo aunque induce micronúcleos, no observamos un efecto sinérgico con el KD-DAXX y el tratamiento con DAC (Figura 11b).

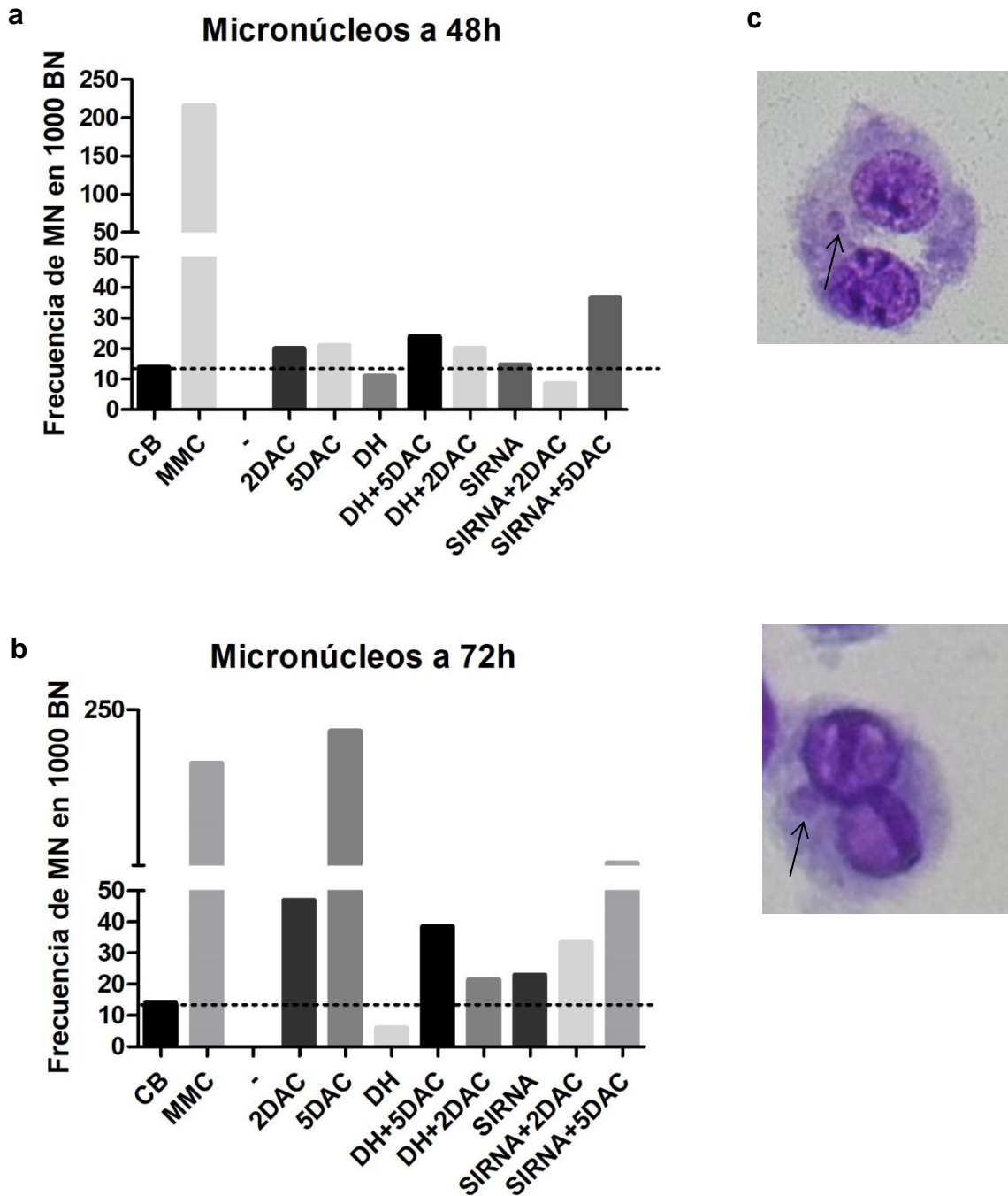


Figura 11. La inhibición de DAXX genera inestabilidad cromosómica en HCT116. Se empleó la mitomicina C como control positivo. La línea punteada indica el umbral a partir del cual se consideró se genera inestabilidad cromosómica. a Ensayo de micronúcleos a 48h. **b** Ensayo de micronúcleos a 72h. **c** Imágenes de lo que fue considerado como célula binucleada con micronúcleo. Las flechas señalan los micronúcleos.

Una vez demostrado que la inhibición de DAXX ocasionaba CIN, realizamos un ensayo de MeDIP. Con el fin de demostrar que nuestros resultados son confiables utilizamos primers contra diferentes regiones controles, donde se conoce el estado de metilación. Primero se corrieron las muestras control provistas por DIAGENODE con un DNA procarionte metilado *in vitro* y otro completamente desmetilado (meDNA y uDNA) (Figura 12a). También utilizamos la región promotora de los genes TSH2B y GAPDH como controles metilado y no metilado respectivamente (Figura 12a). Nuestros controles demuestran que se pudo diferenciar claramente regiones metiladas y no metiladas del genoma. También realizamos los experimentos con los tratamientos 2 y 5 μ M DAC, como se esperaba el tratamiento con DAC disminuyó los niveles de metilación del promotor de TSH2B, aunque no de forma significativa, mientras que en GAPDH se encontró un aumento de metilación de DNA en su promotor, producto del tratamiento con DAC (Figura 12a).

Posteriormente, mediante el empleo de primers específicos para distintas regiones de heterocromatina, evaluamos el estado de metilación de esas áreas. En primera instancia se realizó el PCR para LINE1, ésta es una familia de secuencias repetidas dispersas a lo largo del genoma. Aproximadamente el 99% de las 500,000 copias se encuentran inactivas y metiladas, por lo que las consideramos como un posible blanco de desmetilación por el KD de DAXX. Como se observa en la Figura 12b, el KD de DAXX desmetila la región, sin embargo esa disminución no parece ser significativa, al igual que la dosis 2 μ M DAC. Por el contrario, todos los demás tratamientos con DAC, ya sea con o sin KD-DAXX o Dh, bajaron los niveles de metilación de los repetidos LINE1.

Por su parte, en las regiones donde se sabe que DAXX ejerce su función de chaperona de histonas, es decir los telómeros (Figura 12c) y la región pericentromérica (Figura 12d), el KD de DAXX causó la desmetilación de esas áreas, siendo más pronunciada la desmetilación en el telómero. En

ambos casos, todos los tratamientos causaron una pérdida de metilación significativa.

De manera inesperada encontramos que el KD de DAXX también afecta la metilación del centrómero (Figura 12e), así como nuestros controles positivos. La desmetilación del centrómero fue incluso más pronunciada que la de la región pericentromérica.

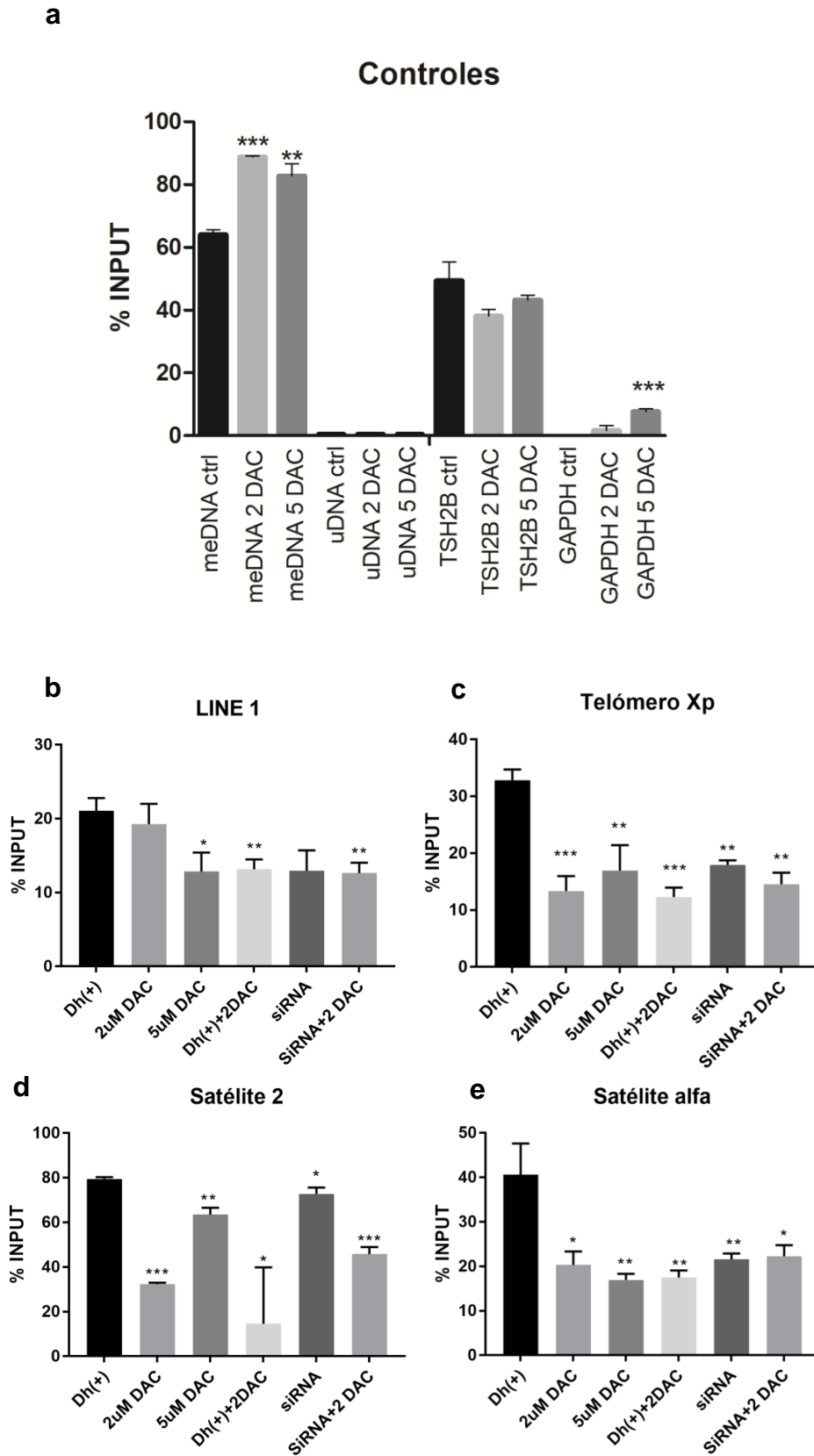


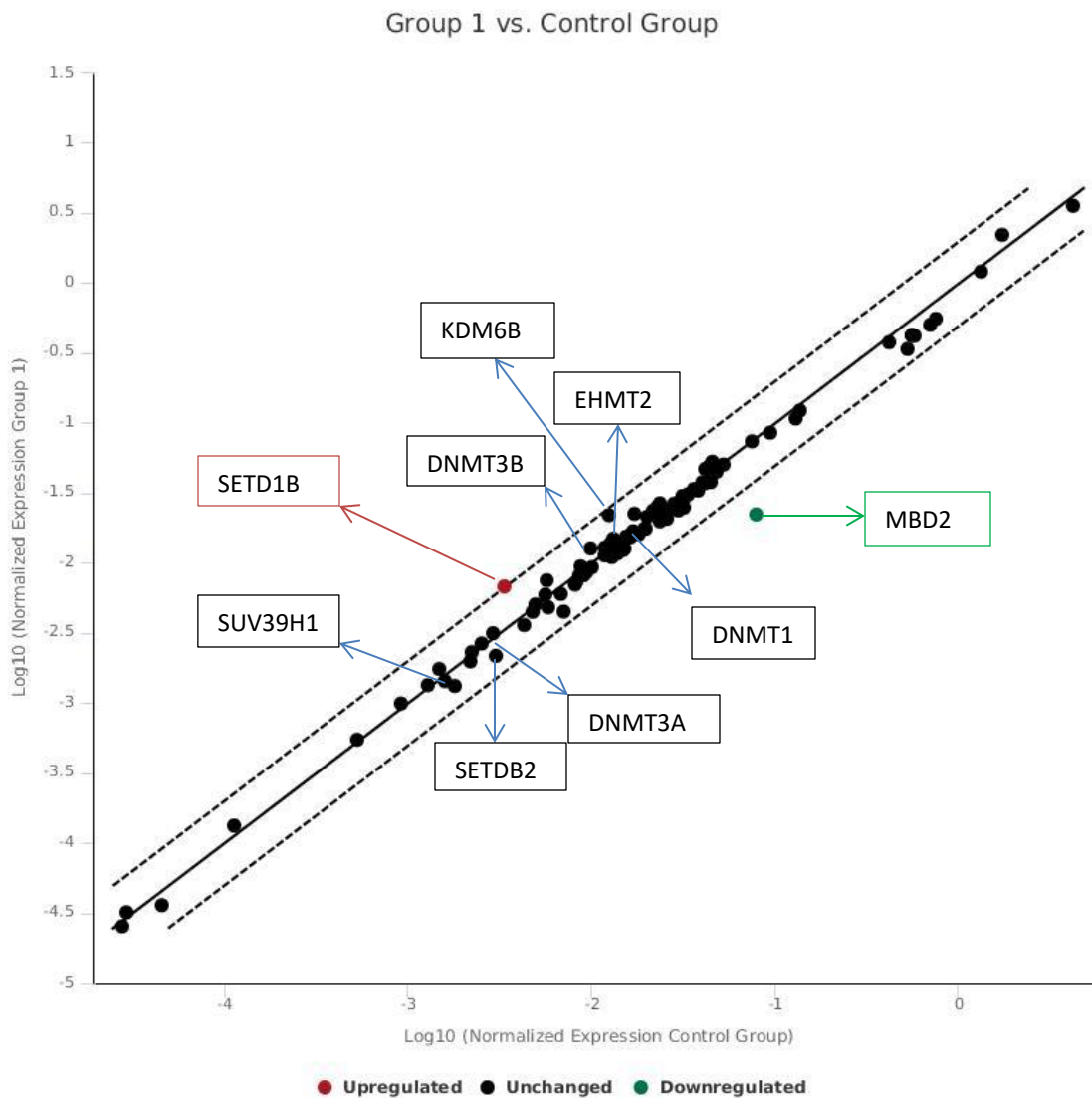
Figura 12. La disminución de DAXX afecta de manera diferencial la metilación de la heterocromatina constitutiva. a Controles positivos y negativos de metilación para el

MeDIP. Niveles de metilación en el repetido LINE 1 (**b**), en el telómero del brazo corto del cromosoma X(**c**), en el satélite alfa (**d**) y satélite 2 (**e**). Se normalizó el valor del IP con el anticuerpo específico IgG. *= $p \leq 0.05$, **= $p \leq 0.01$ y ***= $p \leq 0.001$. Las barras muestran la desviación estándar del triplicado técnico.

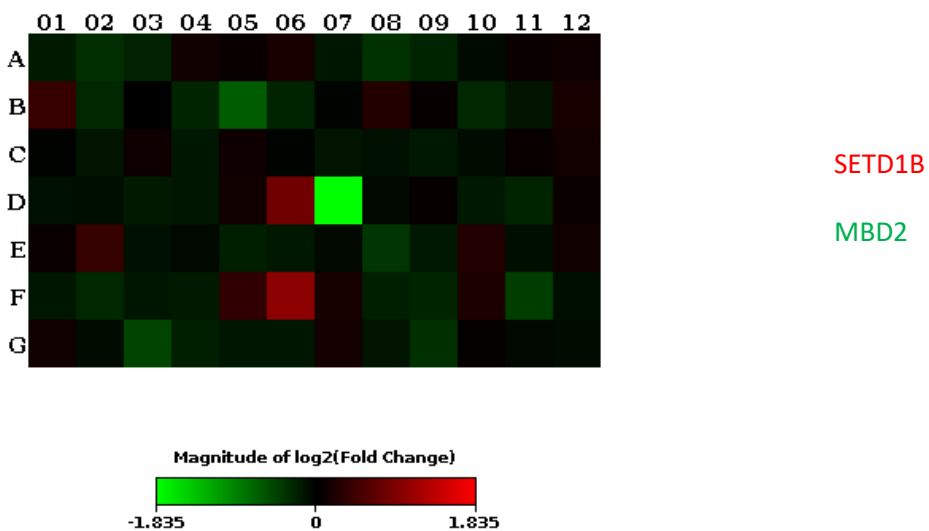
A continuación, determinamos si los cambios de metilación e inducción de CIN observados en las células DAXX-KD eran debidos a cambios en la expresión de las enzimas encargadas de la generación de heterocromatina. Realizamos por lo tanto un ensayo de expresión en un panel RT2 que contenía 84 enzimas clave en la remodelación de la cromatina. Dentro de lo que encontramos, las enzimas encargadas de la metilación del DNA (DNMTs) y del posicionamiento y lectura de H3K9me3 (EHMT2 y SUV39H1) no se ven afectadas al disminuir los niveles de DAXX (Figura 13). Por el contrario, la placa nos indicó que el gen SETD1B se encuentra sobreexpresado. Esta es una metiltransferasa de histonas que deposita la trimetilación de la lisina 4 (H3K4me3), característica de genes activos o eucromatina. En el sentido inverso, observamos la subexpresión del gen MBD2, el cual codifica para una enzima de unión a DNA metilado. Estos resultados nos sugirieron que el efecto observado en la pérdida de metilación del DNA por KD-DAXX, no tiene que ver con la alteración de expresión génica de las enzimas epigenéticas encargadas del mantenimiento de la heterocromatina. Por lo tanto tiene más que ver con alteraciones en el posicionamiento de la DNMTs a las regiones blanco de DAXX.

Finalmente decidimos evaluar si la expresión de genes relacionados con la generación de CIN se veía afectada al disminuir los niveles de DAXX. Con la ayuda de nuevas placas de RT2 que contaban con genes relacionados con el mantenimiento de la estabilidad cromosómica (Figura 14), pudimos observar que ninguno de éstos se veía afectado. En cambio, genes que no imaginábamos como EPO, un gen de hipoxia que se sobreexpresa al tener a DAXX-KD y otro como KDR, un receptor de VEGF se encuentra subexpresado.

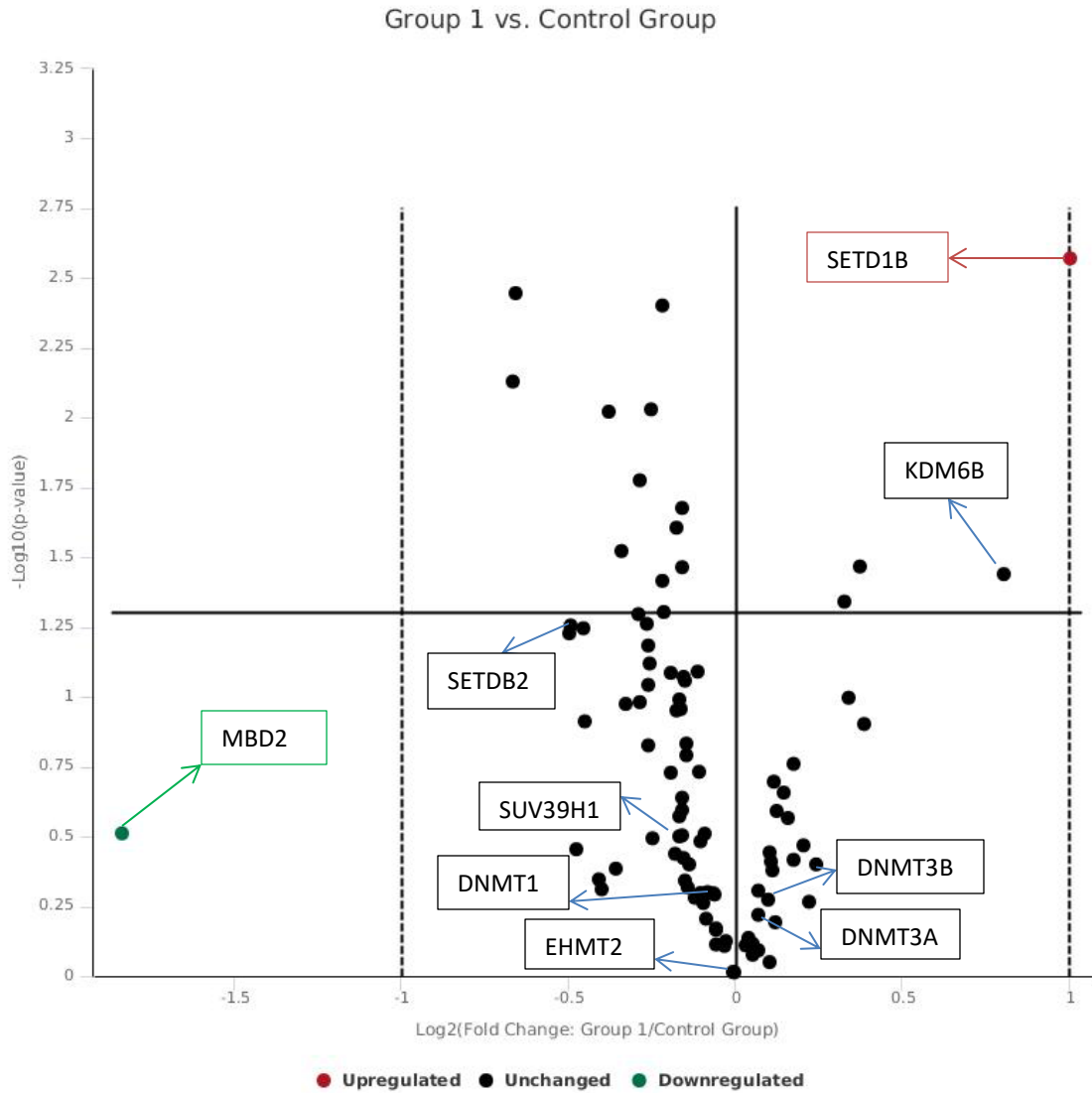
a



b



c



d

Enzimas necesarias para el mantenimiento de heterocromatina en la placa de RT2.

Categoría	Enzimas
Metiltransferasas del DNA	DNMT1, DNMT3A, DNMT3B.
Metiltransferasas de histonas	EHMT2, SETDB2, SUV39H1
Proteínas con el dominio SET (con actividad de metiltransferasa de histonas)	SETD1B , SETD8, SETDB1, SUV39H1.
Desmetilasas del DNA e histonas	KDM1A (KDM1), KDM5B, KDM5C, KDM4A, KDM4C, KDM6B, MBD2 .
Desacetilasas de histonas	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11.

e

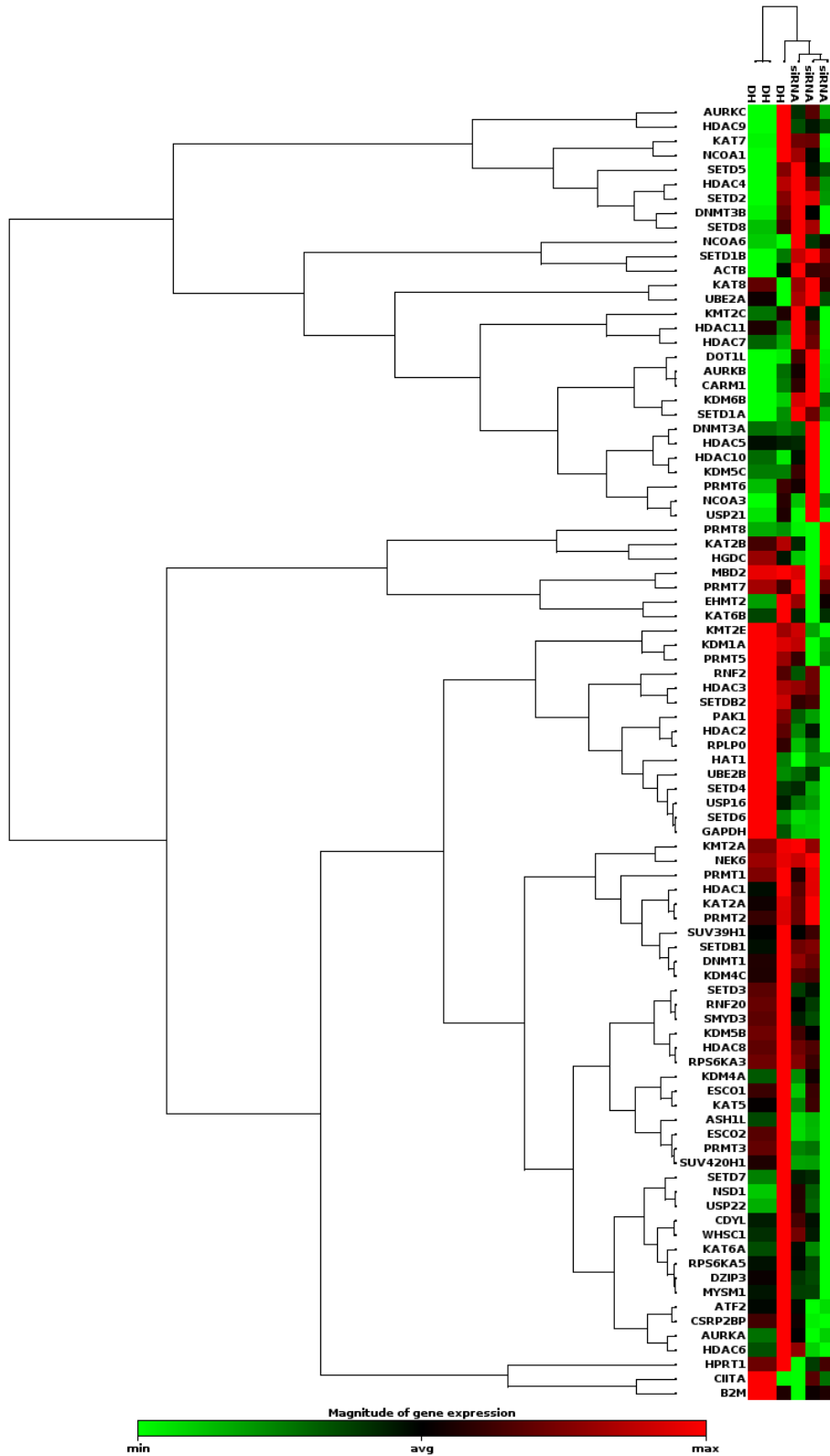
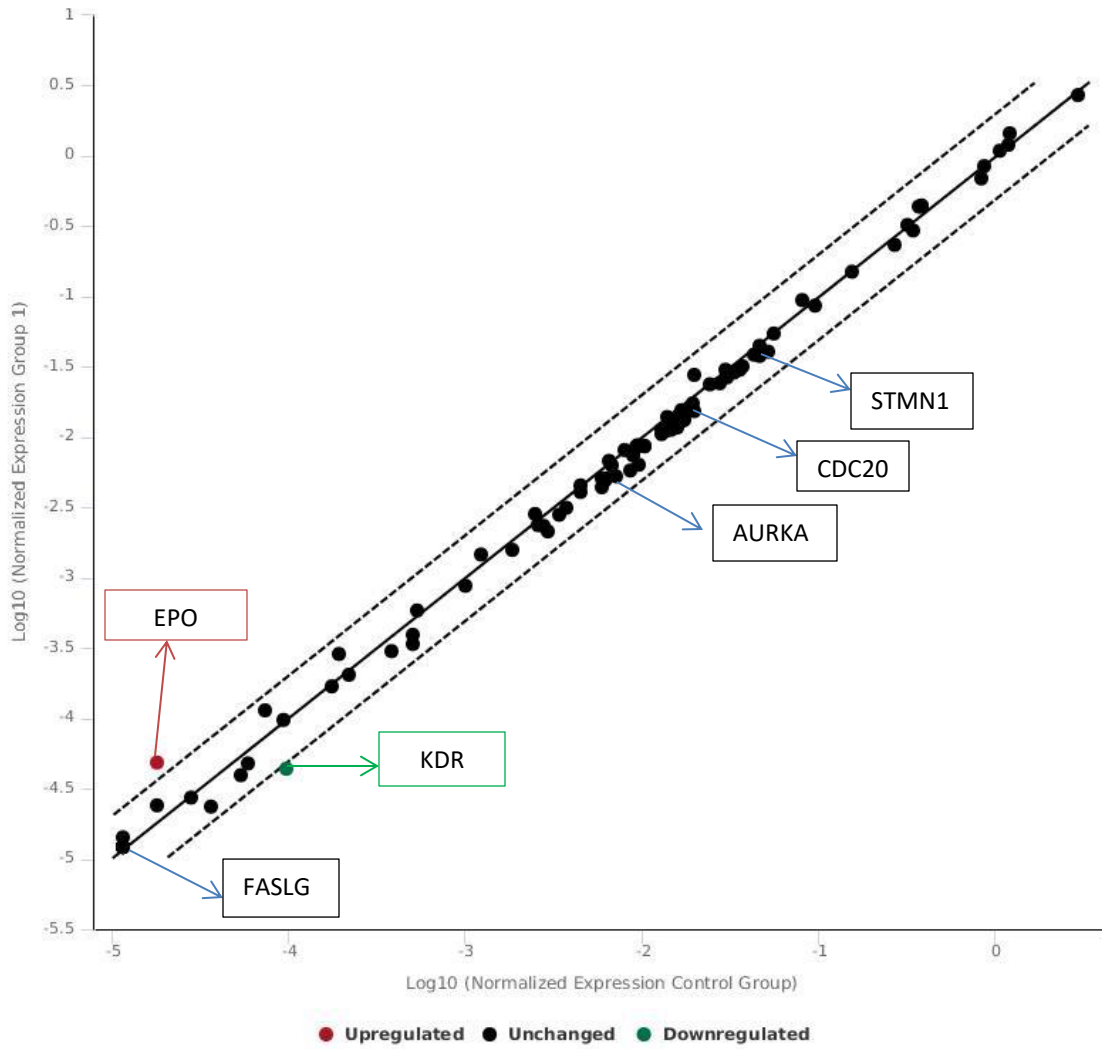


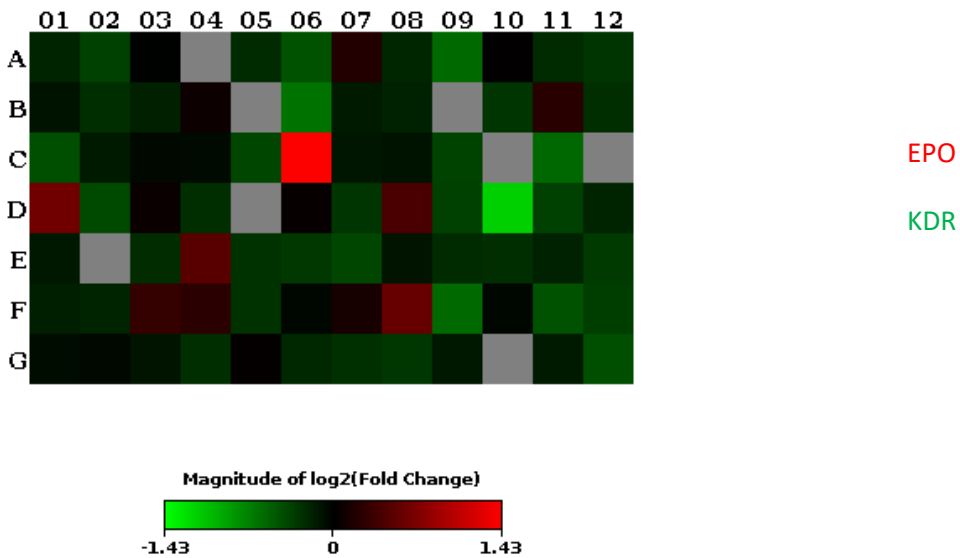
Figura 13. La disminución de DAXX no afecta a las principales enzimas de mantenimiento de la heterocromatina constitutiva. Diferentes representaciones en Scatter plot (a), heat map (b), Volcano plot (c) y cladograma (e). $p \leq 0.05$. El color rojo indica genes sobreexpresados (SETD1B) mientras que el verde señala los subexpresados (MBD2). La tabla e señala a los genes de las enzimas involucradas en el mantenimiento de la heterocromatina constitutiva que contenía la placa.

a

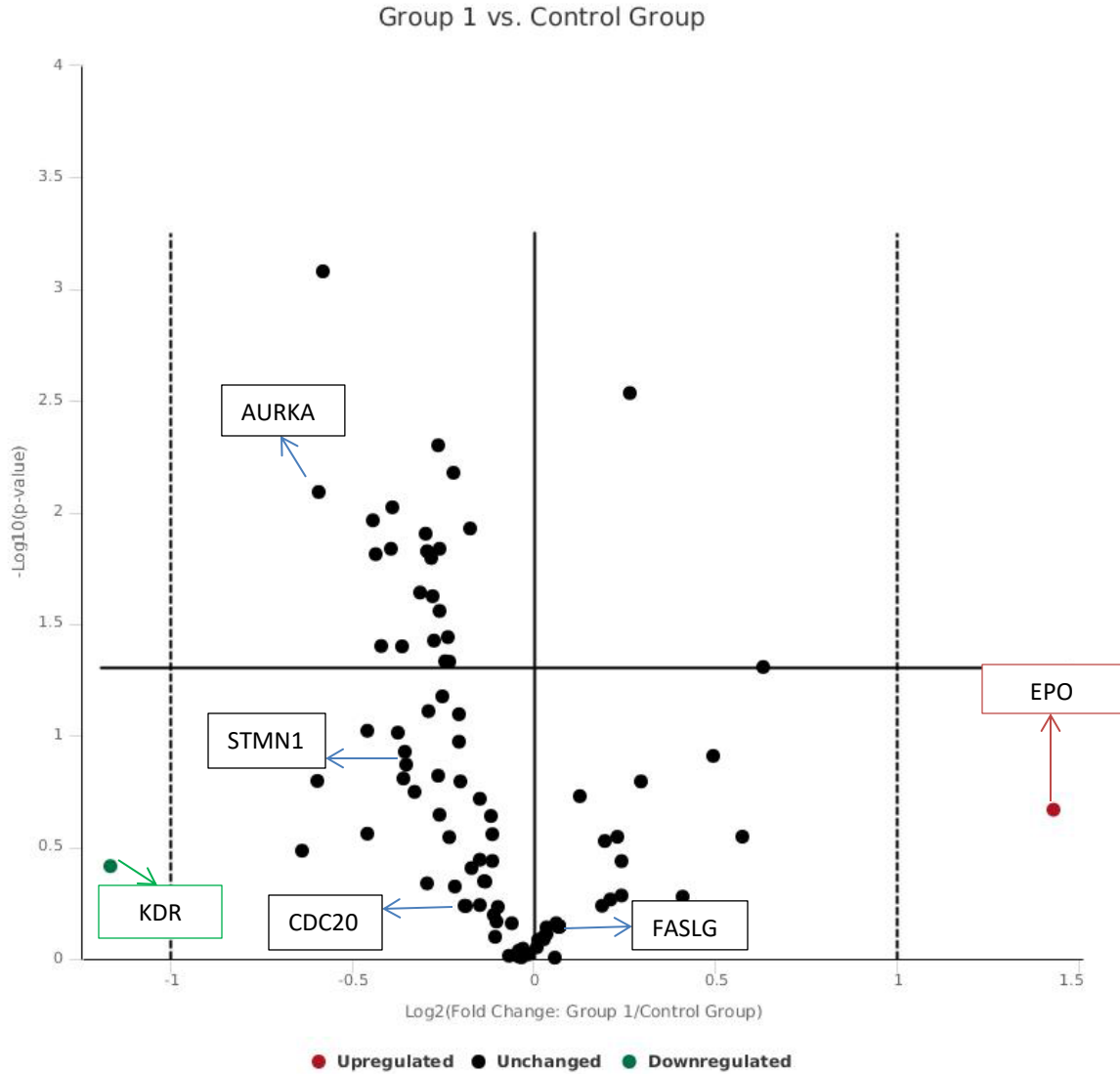
Group 1 vs. Control Group



b



c



d

Proteínas de interés involucradas en diferentes vías de cáncer

Vía de cáncer	Proteínas
Ciclo celular	AURKA, CCND2, CCND3, CDC20, E2F4, MCM2, MKI67, SKP2, STMN1, WEE1
Reparación y daño al DNA	DDB2, DDIT3 (GADD153, CHOP), ERCC3 (XPB), ERCC5, GADD45G, LIG4, POLB, PPP1R15A (GADD34)
Apoptosis	FASLG
Angiogénesis	EPO
Hipoxia	KDR

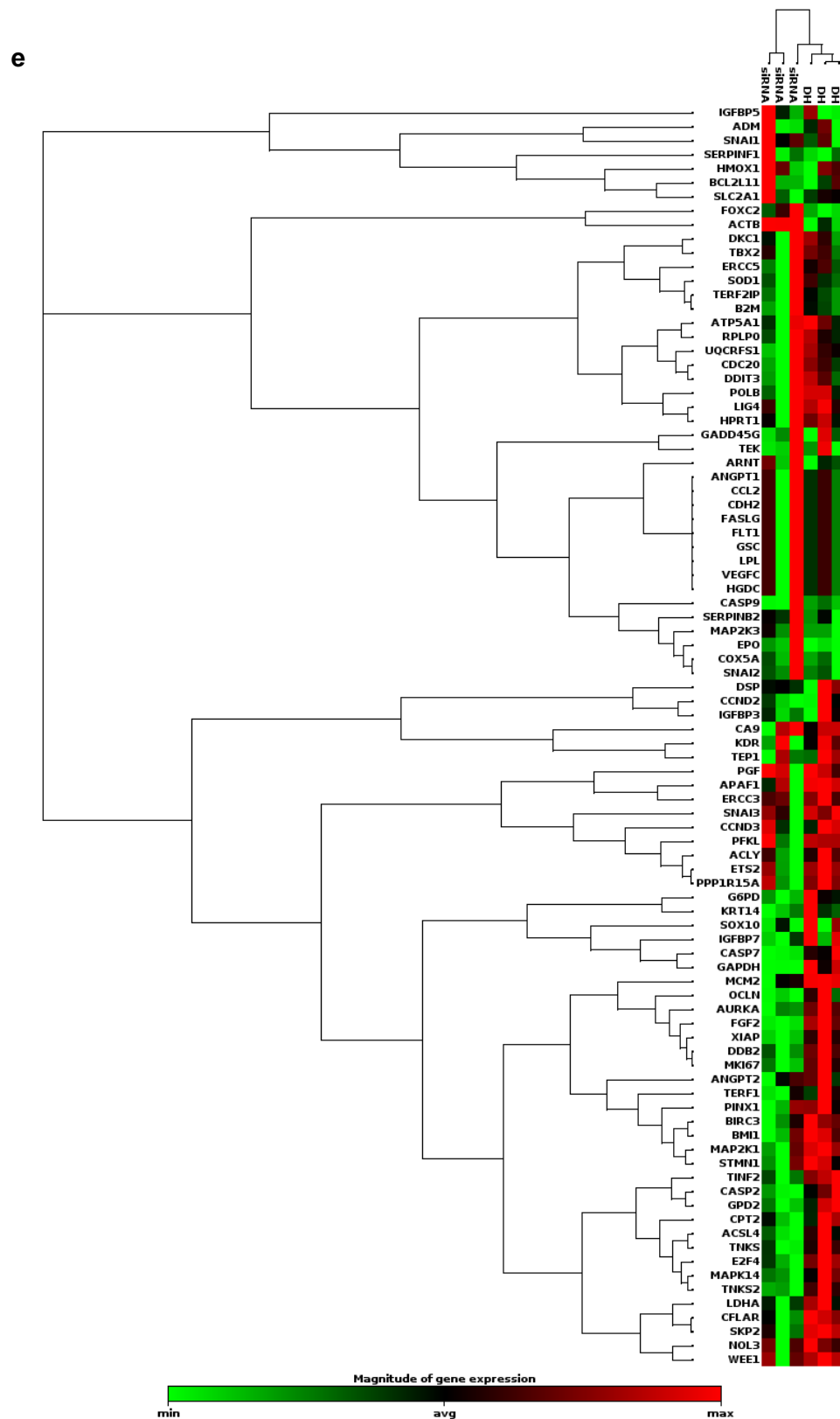


Figura 14. La subexpresión de DAXX afecta genes involucrados en angiogénesis, migración e hipoxia. Diferentes representaciones en Scatter plot (a), heat map (b), Volcano plot (c) y cladograma (e). $p \leq 0.05$. El color rojo indica genes sobreexpresados (EPO) mientras que el verde señala los subexpresados (KDR). La tabla e señala a los genes de las proteínas relacionadas con inestabilidad cromosómica que contenía la placa.

Discusión

Aunque la mayoría de los estudios sobre DAXX se han enfocado a su función en apoptosis, existe un creciente interés por estudiar a esta proteína en su papel como chaperona de histonas. Independientemente de su función, existen pocos reportes en los que se hayan medido los niveles de DAXX en diferentes tejidos y líneas celulares^{34,48}. Nuestros resultados sugieren que, contrario a lo reportado por Pan et al. (2013), las líneas celulares de ovario no tienen una mayor abundancia de DAXX en comparación a nuestros controles, sin embargo ellos utilizaron un control la línea celular HeLa, mientras que nosotros empleamos una línea epitelial primaria como control. Generamos un modelo KD-DAXX en HCT116 empleando el siRNA 3 y el siRNA 4, los cuales lograron inhibir alrededor del 80-60% de la proteína respectivamente. Seleccionamos esta línea celular ya que, no sólo validamos la abundancia de DAXX en ella, sino que a diferencia de las otras líneas celulares que observamos, ésta tiene un crecimiento rápido y no cuenta con inestabilidad cromosómica. Lo que nos permitió observar el efecto de la disminución de DAXX en la inducción de CIN.

Existen varios reportes en donde se ha visto que la alteración en la maquinaria de represión conlleva a la generación de CIN^{41,46,47,54}, por lo cual la generación de micronúcleos al emplear a DAC como un inhibidor de DNMTs era de esperarse. El KD de DAXX por su parte, indujo CIN, aunque en menor medida que DAC. En tumores neuroendócrinos pancreáticos (PanNETs) donde el 43% tiene una mutación con pérdida de función ya sea en ATRX o DAXX, se ha visto que la pérdida de DAXX se relaciona con CIN y un peor pronóstico para los pacientes⁵⁷. A pesar de que el número de micronúcleos es menor en las DAXX-KD, en comparación con las tratadas con DAC, podemos ver que a las 72h sí se indujo CIN, donde observamos que las células KD-DAXX presentaban un incremento en la formación de micronúcleos a la 72h (alrededor del 60%). De acuerdo a las especificaciones del proveedor del siRNA (Dharmacon), se tiene de 48 a 96 horas para ver el efecto de inhibición a nivel proteína, por lo que probablemente a las 48h la inhibición apenas comenzaba y por lo mismo no se observó el efecto tan

marcado como a las 72h. Para futuros experimentos podría intentarse evaluar un punto intermedio de tiempo para ver lo ocurre, y comprobar si 48h es suficiente tiempo.

De manera general, nosotros observamos que el número de micronúcleos es menor a 48h que a 72h, lo que indica que conforme transcurre el tiempo aumenta la inestabilidad cromosómica. Sin embargo, nosotros esperábamos ver un efecto sinérgico en las células DAXX-KD junto con DAC, siendo esta combinación la que causaría la mayor cantidad de micronúcleos. Esto no fue así, puesto que en comparación con las células tratadas con DAC, la combinación presenta menor número de micronúcleos. Esto se pudo deber a que no todas las células contadas en ese tratamiento tuvieron a DAXX disminuido. Se ha visto que el KD de DAXX disminuye la viabilidad celular ⁵⁸, y quizá al juntar el KD con DAC sólo las células que no lograron transfectarse hayan podido dividirse, o también es posible que las células hayan activado algún mecanismo que les haya permitido contra restar la inducción de CIN. Sin embargo no existe reporte alguno que apoye esta idea, por lo que sería interesante abordarlo de manera futura.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la subexpresión de DAXX es suficiente para generar CIN, y que la combinación de las células KD-DAXX y DAC a 72h genera menor cantidad de micronúcleos en comparación con el KD-DAXX solo.

Una vez comprobado que el KD-DAXX generaba CIN, decidimos evaluar si la inducción de CIN observada a 72h era causada por la desmetilación de las regiones de heterocromatina constitutiva. Para lograrlo, empleamos el ensayo MeDIP, con el que encontramos que el KD-DAXX causa la desmetilación de las regiones teloméricas, pericentroméricas (satélite 2) y centroméricas (satélite alfa). Por el contrario, la metilación de los repetidos LINE1 no se vio afectada significativamente. Los LINES son secuencias repetidas dispersas a lo largo del genoma denominadas en inglés: long interspersed nucleotide elements ⁵⁹. La familia de LINE1 se encuentra dispersa a lo largo del genoma, pero es más abundante en regiones ricas en A-T, con escasez de genes y con bajas tasas de

recombinación ⁶⁰. Existen diferentes familias de LINES, pero es la L1 la de mayor importancia cuantitativa, al constituir el 17% del genoma humano ⁵⁹. La mayoría de las 500,000 copias existentes (alrededor del 99.8%) se encuentran inactivas mediante metilación del DNA, y sólo 90 L1 se consideran activos ⁵⁹. Junto con las secuencias Alu, representan el 50% de la metilación global del genoma y la hipometilación de estos elementos se ha asociado con inestabilidad cromosómica ⁶¹. La exposición a factores ambientales afecta diferencialmente el estado de metilación de estos dos elementos, lo que sugiere que la metilación de L1 y Alu representan diferentes medidas de metilación en diferentes partes del metiloma ⁶¹. Similar a nuestros resultados, Marinoni et al. (2017) observaron que la disminución de DAXX no afecta significativamente los niveles de metilación de estas secuencias. Esto puede ser atribuido a su distribución a lo largo del genoma: es posible que gran cantidad de estas secuencias se encuentren en regiones donde no es DAXX la proteína encargada del recambio de histonas, sin embargo no existen artículos que lo demuestren.

Esta ampliamente reportado que DAXX ejerce su papel de chaperona de histonas en las regiones de heterocromatina constitutiva de los telómeros y la región pericentromérica. Nosotros observamos que las células KD-DAXX cuentan con una desmetilación en dichos bloques de heterocromatina, lo cual vimos al analizar las secuencias repetidas que en parte constituyen dichas regiones génicas. Los telómeros de los mamíferos consisten en secuencias repetidas ricas en guanina, que se unen a complejos de proteínas que protegen y cubren los extremos de los cromosomas para conservar la estabilidad genómica ⁶². Por su parte se encuentran los satélites, también secuencias repetidas entre las que destaca el satélite 2. Éste se encuentra conformado por su unidad básica de 23-26pb rico en las secuencias GGAAT y ATC, seguido en menor medida de CGAAT ⁴⁷. A pesar de que su tamaño puede variar entre los individuos, abarca megabases, y es debido a la complejidad de su estructura que es difícil de estudiar ⁶³. Dichos repetidos son heterocromatinizados no sólo por razones de represión, si no con fines estructurales de la cromatina. Esto sucede mediante metilación del DNA y modificaciones postraduccionales como H3K9me3, H4K20me3, que en conjunto

funcionan como un código que recluta proteínas que establecen y mantienen el estado de heterocromatina constitutiva ⁶⁴. Nuestros resultados sugieren que DAXX participa en la generación y mantenimiento de la metilación de DNA a estas regiones. En el caso del telómero, la disminución de la metilación fue de alrededor del 40% mientras que en el satélite 2 fue del 10%. Se ha visto que la alteración en la metilación de los telómeros ⁶⁵ así como la región pericentromérica ocasiona la acumulación de alteraciones cromosómicas ^{47,66}. Incluso se ha asociado la hipometilación de la región pericentromérica con fenotipos más agresivos de cáncer de mama ⁶⁶.

La razón por la que estas regiones se desmetilan podría ser causada por la interacción de DAXX con la DNMT1 ⁶⁷. DAXX y la DNMT1 comparten 1174 sitios, de los cuales al subexpresar a DAXX sólo 192 se mantienen ³⁸. Los resultados del ensayo de meDIP podrían sugerir que la DNMT1 deja de metilar estas regiones, siendo entonces DAXX otro mecanismo por el cual se puede dirigir de manera específica a DNMT1 a estas regiones críticas para la estabilidad genómica. Sin embargo a la fecha no existen reportes que lo demuestren y se requiere por lo tanto de más estudios para entender la importancia de este mecanismo.

Un hallazgo novedoso de nuestro estudio es, que a diferencia de lo que observamos en el repetido pericentromérico (satélite 2), en el repetido satélite alfa, observamos que la disminución de DAXX promueve una pérdida de alrededor del 50% de la metilación del DNA. Esto es importante ya que este es un repetido en tándem de 171 pb que conforma el 5% del genoma y es característico de las regiones centroméricas del genoma ⁶⁸. A su vez a diferencia del satélite 2 y el telómero, ésta no incrementa con la combinación con el tratamiento con DAC. Esto sugiere que DAXX es una proteína importante y podría ser muy específica en el mantenimiento y generación de la metilación de DNA en las secuencias centroméricas. La pérdida de metilación en esta región es crítica para el mantenimiento y el control de la estabilidad cromosómica, en especial durante la división celular ^{69,70}. Hasta la fecha no se le había atribuido la pérdida de metilación del centrómero a la disminución de una chaperona de histonas diferente

a la que deposita CENP-A, la variante de histonas característica de centrómero ⁷¹. En un principio se pensaba que DAXX sólo era capaz de interactuar con la variante de histonas H3.3, sin embargo al haber una sobreexpresión de CENP-A, también es capaz de interactuar con ella y despositarla en otras regiones como brazos del cromosoma, ocasionando entonces inestabilidad cromosómica ^{72,73}. Contrario a lo reportado anteriormente ⁷², nuestros resultados sugieren que la disminución de DAXX sí parece afectar la zona del centrómero, de manera más específica la metilación de esta región.

La generación de inestabilidad cromosómica a través de la desmetilación de estas regiones no es un tema del todo nuevo. El que la subexpresión de una chaperona de histonas como lo es DAXX pueda ocasionarlo, lo es. Cada chaperona de histonas interactúa con distintas proteínas y complejos ³³, por lo que al afectar los niveles de éstas se alteran de manera diferencial los factores de remodelación. Como se pudo observar, la función de la DNMT1 parecía verse afectada con la disminución de DAXX, sin embargo era necesario corroborarlo.

Para determinar no sólo si las DNMTs se encontraban alteradas al subexpresar a DAXX, sino también la maquinaria de heterocromatina, utilizamos un panel de expresión (RT2) que nos permitía observar cambios en las enzimas de modificación de la cromatina. Nosotros observamos que ninguna de las enzimas de la maquinaria de heterocromatina se vio afectada al disminuir a DAXX, ni siquiera las DNMTs o SUV39H1/2. Esto podría indicarnos que el KD-DAXX no altera la expresión de las enzimas encargadas de poner las marcas represivas, pero podría causar una deslocalización de estas proteínas ²³. De cualquier modo, se necesitan más experimentos para corroborarlo.

Sin embargo, el panel arrojó que el KD-DAXX provoca la sobreexpresión de SETD1B y subexpresión de MBD2. El primero es una de las seis metiltransferasas de histonas del complejo Tritorax que deposita la modificación de trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3) ^{74,75}. Esta modificación postraducciona es abundante en regiones activas de la cromatina. La sobreexpresión de esta enzima sugiere que esta marca de eucromatina podría ser aumentada a lo largo del

genoma, perdiéndose entonces la heterocromatina y posiblemente afectado la regulación de algunos genes. Sin embargo, se necesitan más experimentos para afirmarlo, puesto que sólo se observó la sobreexpresión del gen SETB1B y no que efectivamente la enzima lleve a cabo una función descontrolada.

Por su parte, el gen MBD2 codifica para la proteína con dominio de unión a citosinas metiladas. Esta proteína es capaz de unirse a sitios CpG metilados, especialmente en promotores de genes con islas CpG y de esta forma regular la estructura de la cromatina y la represión transcripcional ⁷⁶. A diferencia de las demás MBDs, ésta se une con mayor afinidad al DNA altamente metilado y ayuda a regular genes de supresores de tumores ⁷⁷. El haberlo encontrado subexpresado al disminuir los niveles de DAXX, indica que la metilación del DNA se ha visto afectada en estos genes que son relevantes en enfermedades como el cáncer. Nuestros resultados dan pie a estudiar este posible mecanismo, además de ser de los pocos estudios que sugieren la capacidad de DAXX no sólo de regular regiones de heterocromatina constitutiva, si no también participar en la regulación génica.

Finalmente, una vez comprobado que la maquinaria de heterocromatina no se ve afectada al subexpresar a DAXX, tratamos de elucidar si la expresión de genes relacionados con la inestabilidad cromosómica se alteraba. Utilizamos entonces la placa RT2 de vías de cáncer para analizarlo. De manera general se sabe que alteraciones en los niveles de expresión de DAXX resultan en un peor pronóstico para pacientes con distintos tipos de cáncer (C.W. Lin et al., 2016; Pan et al., 2013; Shing Kwan et al., 2013). Al respecto, se encontró que dos genes en vías relacionadas con cáncer se desregulan al subexpresar a DAXX, sin embargo ninguno de ellos relacionado con inducción de inestabilidad cromosómica. El primero de ellos es el gen EPO, el cual codifica para la eritropoyetina y se encuentra altamente sobreexpresado. Hasta 1990 se pensaba que la única función de esta proteína era la estimulación del crecimiento y diferenciación de las células rojas sanguíneas, sin embargo se observó que EPO también participa en la proliferación celular y angiogénesis de células tumorales de endoteliales ⁷⁹.

Otros estudios sugieren que también está involucrado en una mayor migración, lo que promueve la metástasis y una menor supervivencia ⁷⁹. La expresión de este gen se encuentra regulado por los niveles de oxígeno a través de la hipoxia ⁷⁹. Por su parte la transcripción de DAXX es negativamente regulada por la hipoxia, y su subexpresión se relación con una mayor invasión en cáncer de pulmón ⁵³. Lo que se puede observar es que al disminuir a DAXX el gen de eritropoietina se sobreexpresa, y esto podría activar las vías de angiogénesis, proliferación y migración, que podrían desencadenar en un tumor más agresivo. A pesar que en el experimento no se trabajaron con condiciones de hipoxia, el efecto al subexpresar a DAXX es el mismo en cuanto a la sobreexpresión de EPO, lo que podría indicarnos que DAXX regula de manera negativa a dicho gen.

En el sentido opuesto, la subexpresión de DAXX también causa la subexpresión del gen KDR (kinase insert domain receptor), el cual codifica para uno de los receptores de VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), por lo que se encuentra altamente relacionado con la angiogénesis ⁸⁰. La disminución de KDR a su vez, ha sido asociada a la inducción de apoptosis en cáncer de mama ⁸¹. Al igual que en el caso anterior, la hipoxia también subexpresa a KDR, alterando la vía de VEGF y por lo tanto atenuando la angiogénesis ⁸². Es posible pensar que la disminución de DAXX tenga un efecto similar en la regulación de genes que se alteran por hipoxia, ocasionando la alteración de su expresión, sin embargo ese no fue el objeto de estudio del presente trabajo, por lo que no se ahondó al respecto.

Al igual que con los genes anteriores habría que validar los resultados obtenidos del panel RT2. Este primer abordaje nos indicó que el KD de DAXX no afecta a las enzimas clave de formación y mantenimiento de heterocromatina, ni a los genes relacionados con inestabilidad cromosómica, pero si tiene la capacidad de afectar genes involucrados en la remodelación de cromatina y otras función celulares. Esto apoya la importancia de seguir estudiando a la chaperonas de histonas para comprender la implicación de estas en la regulación génica y la estabilidad genómica.

Conclusión

La disminución de los niveles de DAXX genera inestabilidad cromosómica, la cual podría asociarse a la desmetilación de los telómeros, la región pericentromérica y centromérica. La disminución de DAXX no afecta la expresión de enzimas de la maquinaria epigenética de posicionamiento y mantenimiento de la heterocromatina constitutiva, ni de genes relacionados con inestabilidad cromosómica.

Perspectivas

- Generar un modelo con mayor inhibición de DAXX mediante el empleo de CRISPR-cas9.
- Medir los niveles de las enzimas DNMTs y SUV39H1/2 al realizar el KD de DAXX a través de un western blot, así como observar su localización mediante inmunofluorescencia.
- Realizar un CHIP de las DNMTs y SUV39H1/2 con las células KD de DAXX en las regiones de LINE1, Telómero, región pericentromérica y centrómero.

Lista de Abreviaturas

ADD: ATRX-DNMT1-DNMT3L Domain

ATRX: alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

CAF1: Chromatin assembly factor 1

CENP-A: Centromere protein A

ChIP-seq: Secuenciación de la inmunoprecipitación de la cromatina

CIN: Chromosome instability (inestabilidad cromosómica)

DAXX: Death Domain Associated Protein

DBM: DAXX binding motif

Dh: Medio de transfección del siRNA, control negativo

DHB: DAXX helical bundle

E.C.: Estabilidad cromosómica

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

H4K20me3: Trimetilación de la lisina 20 en la histona 4

HBD: Histone binding domain

HCT116: Línea celular de carcinoma de colon

HDACs: Desacetilasas de histonas

HIRA: Histone Cell Cycle Regulator

HP1: Heterochromatin Protein 1

KD: Knock down (subexpresión)

MIN: Inestabilidad microsatélital, por sus siglas en inglés

MeDIP: Inmunoprecipitación del DNA metilado, por sus siglas en inglés

NIN: Inestabilidad de Nucleótidos, por sus siglas en inglés

OVCAR3: Línea celular de adenocarcinoma de ovario

PC3: Línea celular de cáncer de próstata

PCS-200: Cultivo celular de queratinocitos neonatales

PTM: Modificaciones postraduccionales, por sus siglas en inglés

SIM: SUMO interacting motifs

SKOV3: Línea celular de adenocarcinoma de ovario

SPE: Segmento rico en Ser/Pro/Glu

SPT: Región rica en Ser/Pro/Thr

SUV39h1/2: Suppressor of variegation 3-9 homolog 1/2

SW626: Línea celular de adenocarcinoma de ovario, derivado de tumor de colón

Bibliografía

1. Talbert, P. B. & Henikoff, S. Histone variants on the move: Substrates for chromatin dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2017). doi:10.1038/nrm.2016.148
2. Annunziato, A. DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin | Learn Science at Scitable. *Nature Education* 26 (2008). Available at: <https://www.nature.com/scitable/nated/article?action=showContentInPopup&contentPK=310>. (Accessed: 23rd July 2018)
3. Filipescu, D., Uller, S. & Almouzni, E. Histone H3 Variants and Their Chaperones During Development and Disease: Contributing to Epigenetic Control. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **30**, 615–46 (2014).
4. Felsenfeld, G. & Groudine, M. Controlling the double helix. *Nature* **421**, 448–453 (2003).
5. Gurard-Levin, Z. A., Quivy, J.-P. & Almouzni, E. Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics. *Annu. Rev. Biochem* **83**, 487–517 (2014).
6. Cutter, A. R. & Hayes, J. J. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters* (2015). doi:10.1016/j.febslet.2015.05.016
7. Talbert, P. B. & Henikoff, S. Histone variants — ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 264–275 (2010).
8. Thesis, A. Anti-silencing at Telomeres Anti-silencing at Telomeres. (2012).
9. Homepage – Richmond Group | ETH Zurich. Available at: <http://www.richmondgroup.ethz.ch/>. (Accessed: 12th October 2018)
10. Prabakaran, S., Lippens, G., Steen, H. & Gunawardena, J. Post-translational modification: Nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **4**, 565–583 (2012).
11. Knorre, D. G., Kudryashova, N. V & Godovikova, T. S. Chemical and functional aspects of posttranslational modification of proteins. *Acta Naturae* **1**, 29–51 (2009).
12. Melters, D. P., Nye, J., Zhao, H. & Dalal, Y. Chromatin Dynamics in Vivo: A Game of Musical Chairs. *Genes (Basel)*. **6**, 751–776 (2015).
13. Allis, C. D. & Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* (2016). doi:10.1038/nrg.2016.59
14. Venkatesh, S. & Workman, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 178–189 (2015).

15. Marzluff, W. F., Gongidi, P., Woods, K. R., Jin, J. & Maltais, L. J. The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes. *Genomics* **80**, 487–498 (2002).
16. Buschbeck, M. & Hake, S. B. Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**, 299–314 (2017).
17. Marzluff, W. F., Gongidi, P., Woods, K. R., Jin, J. & Maltais, L. J. The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes. *Genomics* **80**, 487–498 (2002).
18. Skene, P. J. & Henikoff, S. Histone variants in pluripotency and disease. *Development* (2013). doi:10.1242/dev.091439
19. Elsaesser, S. J. & Allis, C. D. HIRA and Daxx constitute two independent histone H3.3-containing predeposition complexes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (2010). doi:10.1101/sqb.2010.75.008
20. Filipescu, D., Szenker, E. & Almouzni, G. Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones. *Trends Genet.* **29**, 630–40 (2013).
21. Elsässer, S. J. & D’Arcy, S. Towards a mechanism for histone chaperones. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* (2012). doi:10.1016/j.bbagr.2011.07.007
22. Jin, C. *et al.* H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark ‘nucleosome-free regions’ of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* **41**, 941–945 (2009).
23. Rapkin, L. M. *et al.* The histone chaperone DAXX maintains the structural organization of heterochromatin domains. *Epigenetics Chromatin* **8**, 44 (2015).
24. Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K.-M., Stadler, S. C. & Allis, C. D. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2010). doi:10.1073/pnas.1008850107
25. Ricketts, M. D. & Marmorstein, R. A Molecular Perspective for HIRA Complex Assembly and H3.3-Specific Histone Chaperone Function. *J. Mol. Biol.* **429**, 1924–1933 (2017).
26. Zhang, H. *et al.* RPA Interacts with HIRA and Regulates H3.3 Deposition at Gene Regulatory Elements in Mammalian Cells HHS Public Access. *Mol Cell* **65**, 272–284 (2017).
27. Voon, H. P. J. & Wong, L. H. New players in heterochromatin silencing: Histone variant H3.3 and the ATRX/DAXX chaperone. *Nucleic Acids Research* (2015). doi:10.1093/nar/gkw012

28. Voon, H. P. J. & Wong, L. H. New players in heterochromatin silencing: Histone variant H3.3 and the ATRX/DAXX chaperone. *Nucleic Acids Research* (2015). doi:10.1093/nar/gkw012
29. Saksouk, N., Simboeck, E. & Déjardin, J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics and Chromatin* **8**, (2015).
30. Agrawal, T. The Multifunctional Protein Daxx: Studies of its Biology and Regulation, and Discovery of a Novel Function. **828**, (2013).
31. Wang, X., Zhao, Y., Zhang, J. & Chen, Y. Structural basis for DAXX interaction with ATRX. *Protein and Cell* (2017). doi:10.1007/s13238-017-0462-y
32. Escobar-Cabrera, E., Lau, D. K. W., Giovinazzi, S., Ishov, A. M. & McIntosh, L. P. Article Structural Characterization of the DAXX N-Terminal Helical Bundle Domain and Its Complex with Rassf1C. *Struct. Des.* **18**, 1642–1653 (2010).
33. Santiago, A., Godsey, A. C., Hossain, J., Zhao, L. Y. & Liao, D. Identification of two independent SUMO-interacting motifs in Daxx: Evolutionary conservation from *Drosophila* to humans and their biochemical functions. *Cell Cycle* (2009). doi:10.4161/cc.8.1.7493
34. Pan, W.-W. *et al.* Death Domain-associated Protein DAXX Promotes Ovarian Cancer Development and Chemoresistance * □ S. (2013). doi:10.1074/jbc.M112.446369
35. Salomoni, P. The PML-Interacting Protein DAXX: Histone Loading Gets into the Picture. *Front. Oncol.* **3**, (2013).
36. Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M. & Hamiche, A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* (2010). doi:10.1101/gad.566910
37. Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K.-M., Stadler, S. C. & Allis, D. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres.
38. Puto, L. A., Benner, C. & Hunter, T. 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**, (2015).
39. Lee, G. E., Kim, J. H., Taylor, M. & Muller, M. T. DNA Methyltransferase 1-associated Protein (DMP1) Is a Co-repressor That Stimulates DNA Methylation Globally and Locally at Sites of Double Strand Break Repair. *J. Biol. Chem.* **285**, 37630–37640 (2010).

40. Raha, D., Hong, M. & Snyder, M. ChIP-Seq: A Method for Global Identification of Regulatory Elements in the Genome. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **91**, 21.19.1-21.19.14 (2010).
41. González-Barrios, R. *et al.* Differential distribution of HP1 proteins after trichostatin a treatment influences chromosomal stability in HCT116 and WI-38 cells. *Cell Div.* (2014). doi:10.1186/s13008-014-0006-2
42. Pikor, L., Thu, K., Vucic, E. & Lam, W. The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **32**, 341–52 (2013).
43. Thompson, S. L., Bakhoun, S. F. & Compton, D. A. Mechanisms of Chromosomal Instability. *Current Biology* (2010). doi:10.1016/j.cub.2010.01.034
44. van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. J. & Kanaar, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 196–206 (2001).
45. Giam, M. & Rancati, G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Div.* **10**, 3 (2015).
46. Mcmanus, K. J., Biron, V. L., Heit, R., Underhill, D. A. & Hendzel, M. J. Dynamic Changes in Histone H3 Lysine 9 Methylations IDENTIFICATION OF A MITOSIS-SPECIFIC FUNCTION FOR DYNAMIC METHYLATION IN CHROMOSOME CONGRESSION AND SEGREGATION * □ S Downloaded from. *J. Biol. Chem.* **281**, 8888–8897 (2006).
47. Prada, D. *et al.* Satellite 2 demethylation induced by 5-azacytidine is associated with missegregation of chromosomes 1 and 16 in human somatic cells. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* (2012). doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.10.007
48. Nye, J., Melters, D. P. & Dalal, Y. The Art of War: harnessing the epigenome against cancer. *F1000Research* **7**, 141 (2018).
49. Review: What Is Cancer? | SEER Training. Available at: <https://training.seer.cancer.gov/disease/cancer/review.html>. (Accessed: 15th October 2018)
50. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
51. Muntean, A. G. & Hess, J. L. Epigenetic dysregulation in cancer. *Am. J. Pathol.* **175**, 1353–61 (2009).
52. Shing Kwan, P. *et al.* Daxx regulates mitotic progression and prostate cancer predisposition. *Carcinogenesis* **34**, 750–759 (2013).
53. Lin, C. W. *et al.* Daxx inhibits hypoxia-induced lung cancer cell metastasis by

suppressing the HIF-1 α /HDAC1/Slug axis. *Nat. Commun.* (2016).
doi:10.1038/ncomms13867

54. Costa, G., Barra, V., Lentini, L., Cilluffo, D. & Di Leonardo, A. DNA demethylation caused by 5-Aza-2'-deoxycytidine induces mitotic alterations and aneuploidy. *Oncotarget* **7**, 3726–39 (2016).
55. Christman, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483–5495 (2002).
56. Karahoca, M. & Momparler, R. L. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clin. Epigenetics* **5**, 3 (2013).
57. Marinoni, I. *et al.* Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology* **146**, 453–60.e5 (2014).
58. Marinoni, I. *et al.* Title: "Hypo-methylation mediates Chromosomal Instability in pancreatic NET"; (2017).
59. Brouha, B. *et al.* Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5280–5 (2003).
60. Graham, T. & Boissinot, S. The genomic distribution of L1 elements: the role of insertion bias and natural selection. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 75327 (2006).
61. Huen, K. *et al.* DNA methylation of LINE-1 and Alu repetitive elements in relation to sex hormones and pubertal timing in Mexican-American children. *Pediatr. Res.* **79**, 855–862 (2016).
62. Huang, J. *et al.* Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells. *Cell Res.* **21**, 779–792 (2011).
63. Altemose, N., Miga, K. H., Maggioni, M. & Willard, H. F. Genomic Characterization of Large Heterochromatic Gaps in the Human Genome Assembly. *PLoS Comput Biol* **10**, 1003628 (2014).
64. Allshire, R. C. & Madhani, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 229–244 (2018).
65. Vajen, B., Thomay, K. & Schlegelberger, B. Induction of Chromosomal Instability via Telomere Dysfunction and Epigenetic Alterations in Myeloid Neoplasia. *Cancers (Basel)*. **5**, 857–74 (2013).
66. Tsuda, H., Takarabe, T., Kanai, Y., Fukutomi, T. & Hirohashi, S. *Correlation of DNA Hypomethylation at Pericentromeric Heterochromatin Regions of Chromosomes 16 and 1 with Histological Features and Chromosomal*

Abnormalities of Human Breast Carcinomas. The American Journal of Pathology **161**, (2002).

67. Puto, L. A. & Reed, J. C. Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation. *Genes Dev.* **22**, 998–1010 (2008).
68. Aldrup-MacDonald, M. E., Kuo, M. E., Sullivan, L. L., Chew, K. & Sullivan, B. A. Genomic variation within alpha satellite DNA influences centromere location on human chromosomes with metastable epialleles. *Genome Res.* **26**, 1301–1311 (2016).
69. Forsburg, S. L. The CINs of the centromere. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1706–11 (2013).
70. Zhang, W. *et al.* Centromere and kinetochore gene misexpression predicts cancer patient survival and response to radiotherapy and chemotherapy. *Nat. Commun.* **7**, 12619 (2016).
71. Giunta, S. & Funabiki, H. Integrity of the human centromere DNA repeats is protected by CENP-A, CENP-C, and CENP-T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 1928–1933 (2017).
72. Lacoste, N. *et al.* Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX. *Mol. Cell* **53**, 631–44 (2014).
73. Shrestha, R. L. *et al.* Mislocalization of centromeric histone H3 variant CENP-A contributes to chromosomal instability (CIN) in human cells. *Oncotarget* **8**, 46781–46800 (2017).
74. Brici, D. *et al.* Setd1b, encoding a histone 3 lysine 4 methyltransferase, is a maternal effect gene required for the oogenic gene expression program. *Development* **144**, 2606–2617 (2017).
75. Schmidt, K. *et al.* The H3K4 methyltransferase Setd1b is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis in mice. *Elife* **7**, (2018).
76. Le Guezennec, X. *et al.* MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol. Cell Biol.* **26**, 843–51 (2006).
77. Mian, O. Y. *et al.* Methyl-binding domain protein 2-dependent proliferation and survival of breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **9**, 1152–62 (2011).
78. Lin, C.-W. *et al.* ARTICLE Daxx inhibits hypoxia-induced lung cancer cell metastasis by suppressing the HIF-1a/HDAC1/Slug axis. (2016). doi:10.1038/ncomms13867
79. Debeljak, N., Solár, P. & Sytkowski, A. J. Erythropoietin and cancer: the

unintended consequences of anemia correction. *Front. Immunol.* **5**, 563 (2014).

80. Antonescu, C. R. *et al.* KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors. *Cancer Res.* **69**, 7175–9 (2009).
81. Zhang, X., Ge, Y.-L., Zhang, S.-P., Yan, P. & Tian, R.-H. Downregulation of KDR expression induces apoptosis in breast cancer cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **19**, 527–41 (2014).
82. Olszewska-Pazdrak, B., Hein, T. W., Olszewska, P. & Carney, D. H. Chronic hypoxia attenuates VEGF signaling and angiogenic responses by downregulation of KDR in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, 1162–1170 (2009).