

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***PARTICIPACIÓN DEL CO-REPRESOR SKI EN EL MANTENIMIENTO  
DE LA HETEROCROMATINA PERICENTROMÉRICA EN MODELO  
DE EPITELIO MAMARIO HUMANO***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica  
Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

***VÍCTOR GIOVANNI ANTONIO POLA VÉLIZ***

**Directores de Tesis: Dra. Katherine Marcelain Cubillos  
Dra. Carmen Romero Osses**

**Santiago-CHILE**

**Abril 2017**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

## VÍCTOR GIOVANNI ANTONIO POLA VÉLIZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

Director de Tesis:

Dra. Katherine Marcelain Cubillos

---

Co-director de Tesis:

Carmen Romero Osses

---

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Daniela Seelenfreund

---

Dra. Alejandra Loyola

---

Dr. Mario Chiong

---

# Índice

Abreviaturas .....	i
Resumen .....	ii
Abstract .....	iii
1. Introducción .....	1
1.1 Epidemiología e hitos del cáncer.....	1
1.2 El co-represor Ski.....	1
1.3 Ski en regiones pericentroméricas y su rol en la inestabilidad cromosómica. ....	4
1.4 Importancia de la H3K9me3 en el establecimiento de la heterocromatina pericentromérica.....	7
2. Hipótesis.....	13
2.1 Objetivo General .....	13
2.2 Objetivos Específicos .....	13
3. Materiales y Métodos .....	14
3.1 Materiales.....	14
3.2 Cultivo Celular. ....	16
3.3 Transducción retroviral y lentiviral.....	16
3.4 Extracción de RNA, transcripción inversa y PCR cuantitativo (qPCR).....	17
3.5 Ensayo de Western Blot. ....	18
3.6 Sincronización celular y citometría de flujo.....	18
3.7 Obtención de coordenadas genómicas para el diseño de partidores específicos. ....	19
3.8 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). ....	19
4. Resultados .....	21
4.1 Generación de los modelos celulares de estudio. ....	21
4.2 Sincronización mitótica de células MCF7 y MCF10A. ....	27
4.3 Identificación específica de secuencias satelitales II y $\beta$ en cromosomas mitóticos de células de epitelio mamario humano. ....	29
4.4 Determinación de la presencia de Ski en secuencias satelitales II y $\beta$ en cromosomas mitóticos de células MCF7 y MCF10A. ....	32
4.5 Evaluación del efecto de Ski sobre la tri-metilación y acetilación de la H3K9 en secuencias satelitales II y $\beta$ en células mitóticas MCF7 y MCF10A. ....	46
5. Discusión.....	70
5.1 Expresión de Ski en células MCF7 y MCF10A .....	70
5.2 Ski está localizado en BSR y HSatII en cromosomas mitóticos .....	71

5.3	Ski regula el enriquecimiento de H3K9me3/ac en secuencias satelitales y promotores en cromosomas mitóticos humanos.....	76
5.4	Mantenimiento de las marcas de heterocromatina pericentromérica a través del ciclo celular .....	85
6.	Conclusiones .....	87
7.	Referencias .....	88

## Abreviaturas

AURKA:	Aurora quinasa A
AURKB:	Aurora quinasa B.
BSR:	Repetición satelital Beta
CENP-A:	Proteína Centromérica A.
CDC2:	Proteína quinasa cdc2.
CIN:	Inestabilidad cromosómica
DNA:	Ácido desoxirribonucleico.
Fig.:	Figura.
HAT:	Acetil transferasa de histonas.
HDAC:	Desacetilasa de histonas.
HMT:	Metil transferasa de histonas.
HSatII:	Satélite humano II.
HP-1:	Proteína de heterocromatina 1.
JMJD1:	Proteína dominio Jumonji 2.
MaSat:	Satélite mayor de ratón.
MeCP2:	Proteína metil-citosina 2.
MEF:	Fibroblasto embrionario de ratón.
MiSat:	Satélite menor de ratón.
Mmp:	Metaloproteinasa de matriz
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero.
NCoR:	Co-represor del receptor Nuclear.
SAC:	Punto de control de la unión del huso mitótico
Ski:	Proteína Sloan Kettering Institute.
SMAD:	Homólogo mamífero de Smad y Mad.
Suv39h:	Supresor homólogo 1 de la variegación 3-9.
UBF:	Factor de unión río arriba.

## Resumen

Ski es un co-represor transcripcional de la vía de señalización TGF $\beta$ , entre otras. En fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), la ausencia de Ski induce a defectos en la segregación cromosómica, alteraciones de SAC y aneuploidía. Recientemente, encontramos que en MEFs, Ski se localiza en la región pericentromérica de un número limitado de cromosomas mitóticos y esta localización está relacionada con cambios epigenéticos en la cromatina local. Para evidenciar la localización y potencial función de Ski sobre la estructura de los cromosomas en células humanas, evaluamos la presencia de esta proteína en cromosomas mitóticos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-qPCR) en las líneas celulares epiteliales MCF7 y MCF10A. Encontramos que en células MCF10A no-transformadas, Ski se localiza en la región pericentromérica de cromosomas acrocéntricos. En cambio, en células MCF7, la localización de esta proteína no es restrictiva a estos cromosomas. Para identificar el DNA satelital ocupado por Ski, diseñamos partidores cromosoma-específicos para el satélite beta (BSR) y el satélite humano II (HSatII) usando la herramienta RepeatMasker (UCSC). Los ensayos de ChIP-qPCR mostraron un enriquecimiento de la ocupancia de Ski en BSR en el cromosoma 15, y en HSatII en el cromosoma 22. Una disminución de los niveles de Ski a través de un shRNA en células MCF10A provocaron una reducción de la tri-metilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3), mientras que la sobre-expresión de esta proteína en células MCF7 llevó a un incremento de los niveles de H3K9me3 en estas regiones. La marca de H3K9me3 es una característica de heterocromatina pericentromérica y es crítica para la formación apropiada del centrómero. En conjunto, estos resultados sugieren una función potencial de Ski sobre el mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica en cromosomas humanos, lo cual podría tener un impacto importante sobre la segregación cromosómica y la estabilidad del genoma.

## Abstract

Ski is a transcriptional co-repressor of TGF $\beta$  and other signaling pathways. In mouse embryonic fibroblasts (MEFs), absence of Ski leads to chromosome segregation defects and aneuploidy. Recently we found that in MEFs, Ski is located at the pericentromeric region of a limited number of mitotic chromosomes and that localization is related to epigenetic changes in the local chromatin. To assess the localization and potential function of Ski on chromosomal structure in human cells, we evaluated the presence of this protein on mitotic chromosomes by indirect immunofluorescence (IFI) and chromatin immunoprecipitation assays (ChIP-qPCR) in MCF7 and MCF10A breast epithelial cell lines. We found that in non-transformed MCF10A cells, Ski localizes at the pericentromeric region of acrocentric chromosomes, while in MCF7 cells Ski was not restricted to these chromosomes. To identify satellite DNA occupied by Ski, we designed chromosome-specific primers for Beta Satellite (BSR) and Human Satellite II (HSatII) sequences, using the RepeatMasker tool (UCSC). The ChIP-qPCR assays showed an enrichment of Ski occupancy in BSR at chr 15, and HSatII at chr 22. Decreasing Ski levels by shRNAs in MCF10A cells resulted in reduced trimethylation of Lys9 in Histone 3 (H3K9me3), while overexpression of Ski in MCF7 cells led to increased H3K9me3 levels in these satellite regions. H3K9me3 is a feature of pericentromeric heterochromatin and is critical for proper centromere formation. Altogether, this data suggests a potential function of Ski on pericentromeric heterochromatin maintenance in human chromosomes, which could have a significant impact on chromosome segregation and genome stability.

## **1. Introducción**

### **1.1 Epidemiología e hitos del cáncer.**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En el 2012, se estimaron 14,1 millones de nuevos casos de cáncer, de los cuales 7,4 millones (53%) afectaban a mujeres y 6,7 millones (47%) a hombres<sup>1</sup>. Dentro de estas cifras, encontramos que los tipos de cáncer que originan una mayor mortalidad en la población son el cáncer de pulmón (hombres) y el cáncer de mama (mujeres)<sup>1,2</sup>. En Chile, la incidencia supera los 175,7 casos por cada 100.000 habitantes, con una mortalidad de 103 fallecidos por cada 100.000 personas, posicionándose esta enfermedad como un importante problema de salud pública<sup>3</sup>.

Las células cancerígenas poseen diversos genotipos, los cuales son una manifestación de los diferentes tipos de alteraciones en vías de señalización que repercuten en la fisiología celular, las cuales en su conjunto determinan el crecimiento de las células malignas. Entre estas alteraciones, Hanahan y Weinberg describieron la autosuficiencia a las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de anti-crecimiento, evasión de la muerte programada (Apoptosis), ilimitado potencial replicativo, angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis<sup>4</sup>. La evidencia actual sugiere la adquisición directa o indirecta de nuevas características, a través de cambios en el genoma de las células cancerígenas. Estos cambios se ven reflejados en la pérdida de la expresión de supresores tumorales (ej. p53, PTEN, BRCA1) y aumento en la expresión de oncogenes, lo que repercute en una evasión de los puntos de control del ciclo celular y desregulación de la respuesta al daño del DNA<sup>5-8</sup>. Este desbalance induce una presión constante de entrada al ciclo celular, promoviendo un estado de estrés replicativo, lo cual aumenta la tasa de mutación y consecuente inestabilidad genómica<sup>5,9</sup>.

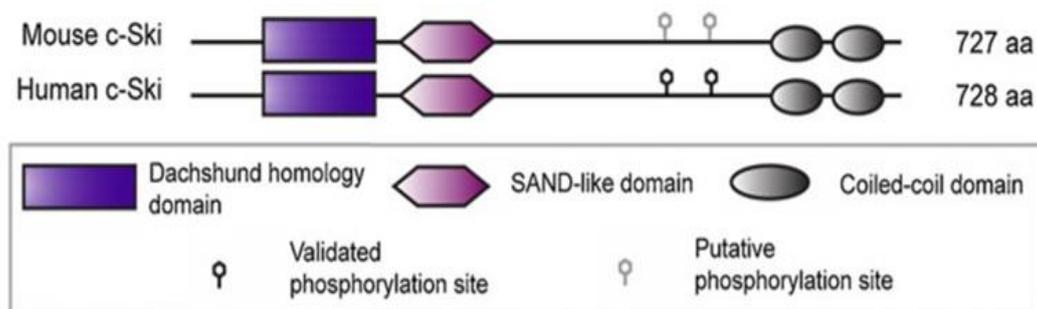
### **1.2 El co-represor Ski**

Una proteína que se ha relacionado con la mantención de la estabilidad genómica es la proteína Ski. En cáncer, Ski se describe como una oncoproteína, pero también se le ha descrito como supresor tumoral. Así, se ha reportado un aumento en la expresión de Ski en diversos tejidos transformados como melanoma<sup>10,11</sup>, leucemia<sup>12</sup>, colorrectal<sup>13</sup>,

gástrico<sup>14,15</sup>, pancreático<sup>16</sup>, esofágico<sup>17</sup> y glioblastoma<sup>18</sup>. Sin embargo, también se encontró una disminución en la expresión de Ski de casi un 50% en células de cáncer colorrectal<sup>13</sup> y un efecto supresor tumoral en cáncer pancreático<sup>19,20</sup>, melanoma<sup>21</sup> y mama<sup>22-24</sup>. Más aun, resultados de nuestro laboratorio demostraron que la sobreexpresión de Ski inhibe la transformación celular producida por el oncogen Aurora quinasa A (AURKA)<sup>25</sup>.

Ski fue descrita inicialmente como una proteína viral (v-Ski) en el Sloan Kettering Institute, la cual es codificada en el genoma del Virus aviario SKV y que presenta características oncogénicas en el hospedero<sup>26</sup>. Estudios posteriores lograron identificar ortólogos que corresponden a proteínas de mayor tamaño (Ski/c-Ski) en diversas especies, incluido humanos<sup>27</sup>.

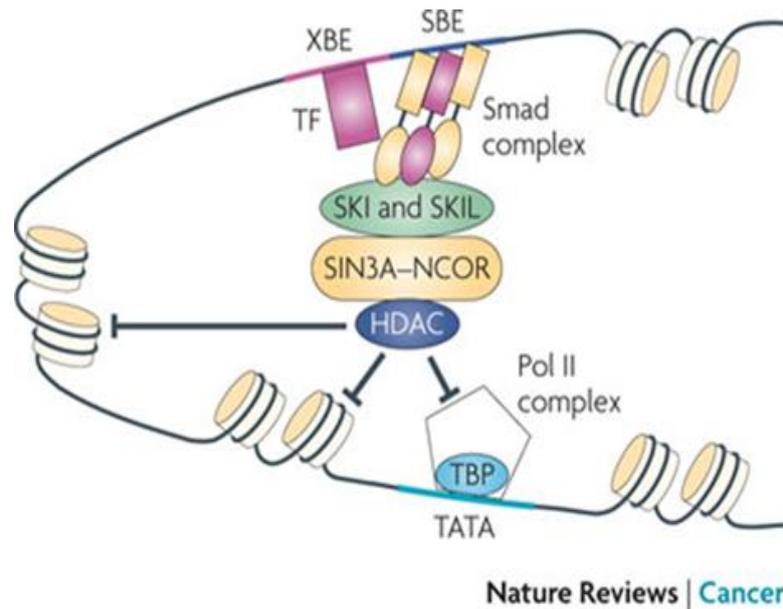
El gen humano de Ski codifica para una proteína de 728 aminoácidos, la cual posee dominios conservados entre especies: en el extremo N-terminal se encuentra el dominio SAND (sp100, AIRE1, NucP41/75 y DEAF1) que interacciona con Smad2-3 y Smad4. En el extremo N-terminal también presenta un “Dachshund Homology Domain” (DHD), el cual participa de manera directa en la interacción con diversos represores y co-represores transcripcionales<sup>28</sup>. Por otra parte, en el extremo C-terminal, se encuentra la señal de localización nuclear (NLS) que posiciona a esta proteína principalmente en el núcleo. Finalmente, posee un “Coiled-coil Domain” que le permite formar homodímeros y heterodímeros con diversos factores de transcripción (Fig. 1)<sup>29,30</sup>.



**Figura 1: Representación de la estructura proteica de Ski.** Esquema de los dominios de la proteína Ski de ratón (727 aa) y humana (728 aa). La proteína Ski posee 3 sitios conservados, llamados Dachshund homology domain, SAND-like domain y Coiled-coil domain. Los sitios de fosforilación de la proteína Ski sólo se encuentran validados en humanos (Modificado de Bonnon, *et al.* 2012)<sup>31</sup>.

Ski se ha descrito, principalmente, como un potente regulador negativo de la expresión génica en respuesta al factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ )<sup>31,32</sup>. En esta vía de señalización, TGF- $\beta$  se une a su receptor (R-TGF- $\beta$ ), éste dimeriza y activa su dominio serina/treonina quinasa, el cual es capaz de fosforilar a las proteínas Smad2 y Smad3 (R-Smad). Las R-Smads fosforiladas pueden unirse al mediador común Smad4 (Co-Smad) y formar complejos heteroméricos que pueden translocar al núcleo, donde son capaces de unirse al DNA y activar la transcripción de genes blanco que posean en sus promotores la secuencia “Smad-binding element” (SBE)<sup>33</sup>. Dentro de esta señalización, Ski es capaz de unirse a Smad4 en el citoplasma, inactivando el complejo Smad 2/3/4, el cual ingresa al núcleo para unirse a la secuencia SBE, inhibiendo la unión de nuevos complejos activos<sup>34,35</sup>. Además, la presencia de Ski previene la unión de acetilasas de Histonas (HATs) como p300/CBP, y permite el reclutamiento de represores, como N-CoR, favoreciendo el silenciamiento de genes blanco (**Fig. 2**)<sup>36,37</sup>.

Ski no posee dominios que presenten actividad enzimática ni unión al DNA. Sin embargo, sus dominios de interacción le confieren la función de ser proteína de andamiaje para diversos factores de transcripción asociados a maquinarias co-represoras<sup>29,31</sup>. Dentro de estos complejos co-represores se encuentran MeCP2, HIPK2, N-CoR/SMRT y mSin3A, que a su vez reclutan a desacetilasas de histonas (HDAC) y metiltransferasas de histonas (HMT), silenciando genes blancos no sólo de la vía del TGF $\beta$ <sup>28,31,38-41</sup>.



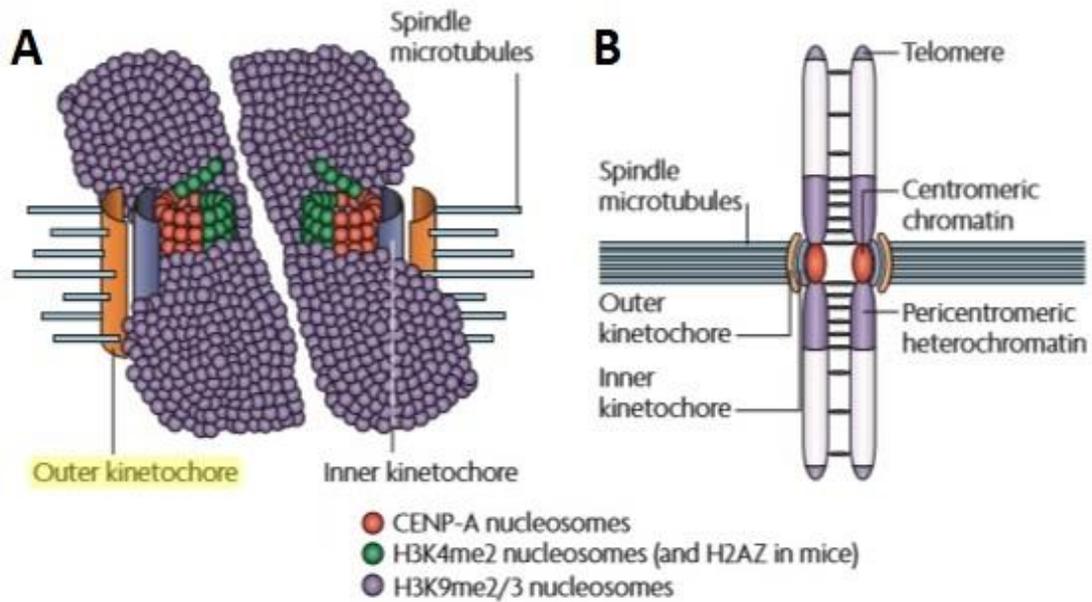
**Figura 2: Función de Ski en la vía de señalización de TGF-β.** La proteína Ski cumple la función de proteína andamio entre la maquinaria represora (N-CoR/SIN3A, HDAC) y los factores de transcripción (TF y Complejo Smad) depositados en los elementos SBE y XBE, ubicados en los promotores de genes de respuesta a TGFβ. HDAC: Desacetilasa de histona; NCOR: Co-represor del receptor nuclear; SIN3A: Proteína Sin3a; Ski: Sloan Kettering Institute; SKIL: Proteína tipo Ski; TBP: Proteína de unión a TATA; SBE: Elemento de unión de Smad; XBE: Elemento de unión de Rex (Ikushima, *et al.* 2010)<sup>32</sup>.

### 1.3 Ski en regiones pericentroméricas y su rol en la inestabilidad cromosómica.

El centrómero es un gran complejo de proteína y cromatina que sitúa el ensamblaje del cinetocoro mitótico: un complejo proteico que une los microtúbulos del huso mitótico para segregar las cromátidas durante anafase<sup>42</sup>. Además de la unión del huso, los cinetocoros determinan puntos de control (*checkpoint* mitóticos) y la generación de fuerzas que segregan los cromosomas durante la división celular<sup>43</sup>. Los cinetocoros se subdividen en una región interna (unida a DNA satélite) y una externa que es ensamblada sólo durante la división celular<sup>44</sup>. En ratón, las regiones centroméricas y pericentroméricas (rodeando el centrómero) están compuestas por dos familias de secuencias altamente conservadas conocidas como repeticiones en tándem: DNA satélite Menor y Mayor (MiSat y MaSat, respectivamente). El MiSat consiste en monómeros de 120 pares de bases que ocupan 300-600 kilobases, sitio donde el cinetocoro es formado. El MaSat es más abundante y consiste de monómeros de 234 pares de bases que se sitúan adyacentes al MiSat, los cuales están implicados en la formación de heterocromatina pericentromérica y en la cohesión de las cromátidas hermanas<sup>45</sup>. En humanos, el

centrómero está constituido por un grupo de DNA satélite llamado Satélite Alpha, el cual está caracterizado por poseer repeticiones multi-monoméricas, organizadas en tándem casi idénticos, conocidas como “repeticiones de orden superior” (HOR)<sup>46,47</sup>. Los HORs interactúan directamente con las proteínas implicadas en el montaje del cinetocoro y son competentes para establecer el centrómero *de novo*<sup>48</sup>.

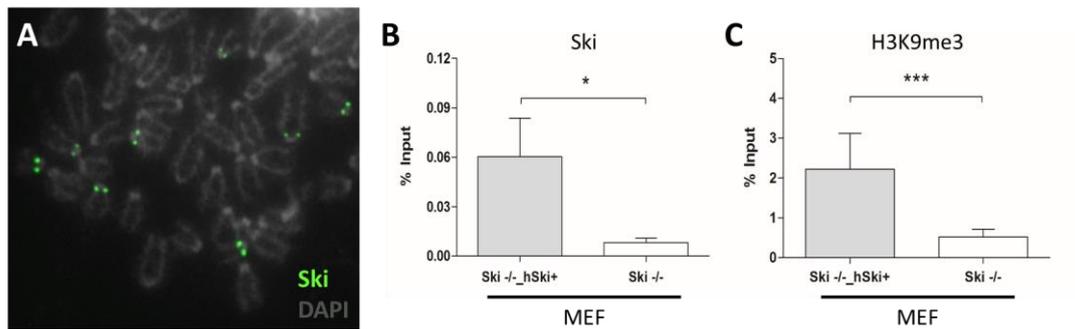
En centrómeros de ratón y humano, los nucleosomas presentan la sustitución de la histona H3 por una variante que es específica y conservada en el centrómero: la proteína centromérica A (CENP-A), la cual se encuentra intercalada y bloquea los nucleosomas que contienen histona H3<sup>49,50</sup>. El tamaño del DNA encapsulado en esta estructura es de aproximadamente 500-1500 kb en humanos, el cual se encuentra plegado en este tipo de nucleosomas, posicionando a CENP-A en la superficie, con H3 por debajo, lo que permite montar el cinetocoro y asociar los microtúbulos del huso mitótico (**Fig. 3A**)<sup>51</sup>. Al igual que en ratón, rodeando la densidad centromérica se encuentra la heterocromatina pericentromérica, la cual provee una plataforma estructural para la formación del centrómero, y es esencial para el mantenimiento de la integridad del genoma, ya que posee una alta densidad de cohesinas que permiten la cohesión de las cromátidas hermanas (**Fig. 3B**)<sup>44</sup>. Existen diversas marcas epigenéticas que son exclusivas de la región pericentromérica, región en donde encontramos la metilación del DNA satélite, la presencia de la di-metilación de la Lisina 20 de la Histona H4 (H4K20me2) y la ausencia de la acetilación de la Lisina 9 de la Histona H3 (H3K9ac) y la presencia de la trimetilación de la Lisina 9 de la Histona H3 (H3K9me3), siendo ésta última reconocida como *hallmark* de heterocromatina<sup>44,49,52-54</sup>.



**Figura 3: Estructura y organización del centrómero.** En **A**) se muestra un modelo en 3D de la estructura del centrómero mitótico, en el cual los nucleosomas son plegados por la modificación H3K4me2, permitiendo a los nucleosomas con CENP-A ser presentados en la superficie, permitiendo el ensamblaje del cinetocoro y la asociación con el huso mitótico. En **B**) se muestra la cromatina centromérica, la cual sustenta el cinetocoro, que contiene una región interna y una externa con sitios de unión a microtúbulos. La heterocromatina pericentromérica flanquea la cromatina centromérica, la cual posee una gran cantidad de cohesinas que permiten la cohesión de las cromátidas hermanas (Modificado de Allshire y Karpen, 2008)<sup>44</sup>.

Las funciones co-represoras de Ski han sido descritas para genes codificantes de proteínas, en núcleos interfásicos. Sin embargo, diversos antecedentes sugieren que esta proteína además tendría un papel importante durante la mitosis. Ski alcanza sus mayores niveles proteicos en la fase M del ciclo celular, los cuales aumentan gradualmente desde G2, y disminuyen en las etapas G1/S<sup>55,56</sup>. Esto se debe a que los niveles de Ski son controlados post-traduccionalmente por un mecanismo de proteólisis dependiente del ciclo celular<sup>55</sup>. En líneas celulares humanas tumorales, U2OS y HeLa, Ski es blanco de diversas quinasas que controlan la progresión de la mitosis, como el complejo cdk1(p34cdc2)/CyclinB y AURKA, quinasa que fosforila a Ski en los centrosomas<sup>56,57</sup>.

Estudios recientes de nuestro laboratorio han mostrado que en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) mitóticos, Ski se localiza en forma de puntos definidos sobre las cromátidas hermanas, en algunos cromosomas mitóticos, y que su acumulación se establece en regiones cercanas al centrómero (**Fig. 4A**. Datos no publicados).



**Figura 4: Ski se localiza en el satélite mayor (región pericentromérica) de ratón y favorece la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3).** **A)** Inmunofluorescencia sobre placas metafásicas de MEFs <sup>-/-</sup>\_hSki<sup>+</sup> sincronizadas en fase M. La marca de Ski se visualiza en verde y el DNA en gris (DAPI). La marca de Ski se observa como 2 puntos simétricos cercanos al centrómero (región pericentromérica). **B)** La presencia de Ski sobre el satélite mayor (MaSat), detectada mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) sobre MEF <sup>-/-</sup>\_hSki<sup>+</sup> y MEF Ski <sup>-/-</sup> sincronizadas en fase M. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\* p≤ 0,05). **C)** La presencia de Ski sobre los niveles de H3K9me3 en regiones satelitales MaSat (Datos no publicados). Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*\*) p≤ 0,001).

Posteriormente, ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en MEFs mitóticos de ratón, demostraron que Ski se localiza sobre el Satélite Mayor (MaSat) y que su sobre-expresión, en las células MEF Ski <sup>-/-</sup>\_hSki<sup>+</sup>, aumenta la marca de la H3K9me3 en dicha región, respecto a las MEFs que no expresan Ski, MEF Ski<sup>-/-</sup>-(**Fig. 4B y 4C**. Datos no publicados).

#### 1.4 Importancia de la H3K9me3 en el establecimiento de la heterocromatina pericentromérica.

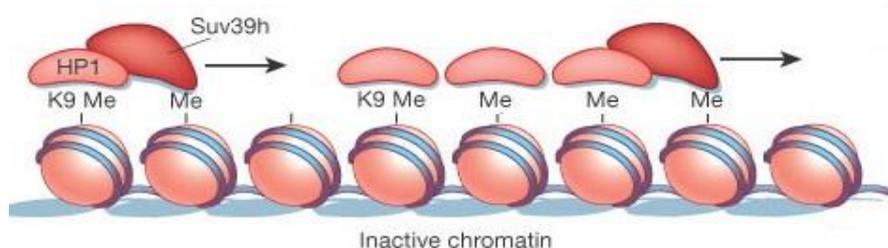
Como se mencionó anteriormente, la cromatina pericentromérica es fundamental para una correcta formación del centrómero y la unión de éste a los microtúbulos. En ratón, esta heterocromatina es fácilmente visible en distintas etapas del ciclo celular. En núcleos interfásicos constituye regiones altamente compactadas distinguibles bajo la tinción con DAPI, las cuales son denominadas cromocentros, y en mitosis esta marca se encuentra alojada en regiones cercanas al centrómero en cromosomas metafásicos<sup>58,59</sup>.

Las secuencias de DNA en heterocromatina pericentromérica difieren sustancialmente entre especies<sup>60</sup>. En modelo murino, el DNA está formado por el satélite

mayor y en humanos se constituye por los satélites  $\beta$ ,  $\gamma$ , I, II y III<sup>61</sup>. Mediante FISH se ha podido determinar la localización cromosómica de estos satélites. Así, el satélite  $\beta$  (también conocido como “repeticiones satelitales beta”, BSR) se localiza en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 (cromosomas acrocéntricos) y el satélite II (conocido como HSatII) en los cromosomas 1, 2, 10, 16 y 22<sup>62-64</sup>. Por otra parte, como se mencionó previamente, la heterocromatina pericentromérica se caracteriza por poseer DNA altamente metilado, abundante H4K20me2 y H3K9me3, y unido a esta última marca, se encuentra la Proteína de Heterocromatina 1 (HP-1)<sup>65</sup>.

La H3K9 es sustrato específico de diversas metiltransferasas de histona, como Suv39h, G9a y ESET<sup>66,67</sup>. Se ha descrito que la pérdida en la expresión de estas metiltransferasas impide el mantenimiento de la heterocromatina e induce inestabilidad cromosómica en células tumorales, poniendo en evidencia la importancia de la metilación de la H3K9 en la mantención de la integridad cromosómica<sup>68,69</sup>. En regiones pericentroméricas, la HMT responsable de la acumulación de la H3K9me3 es Suv39h (Supresor of variegation 3-9 homolog 1), y su ausencia causa defectos en el crecimiento y desarrollo, inestabilidad genómica y susceptibilidad al desarrollo de tumores<sup>70,71</sup>.

La tri-metilación de H3K9, catalizada por Suv39h, es reconocida por el motivo *chromodomain* (CD) de HP-1, creando una estabilización de este complejo y propagándose al nucleosoma vecino, reclutando nuevos complejos Suv39h/HP-1 que inducirán la formación de heterocromatina y silenciarán genes albergados en esas regiones (**Figura 5**)<sup>72,73</sup>. Además, estudios realizados en levaduras de fisión, encontraron

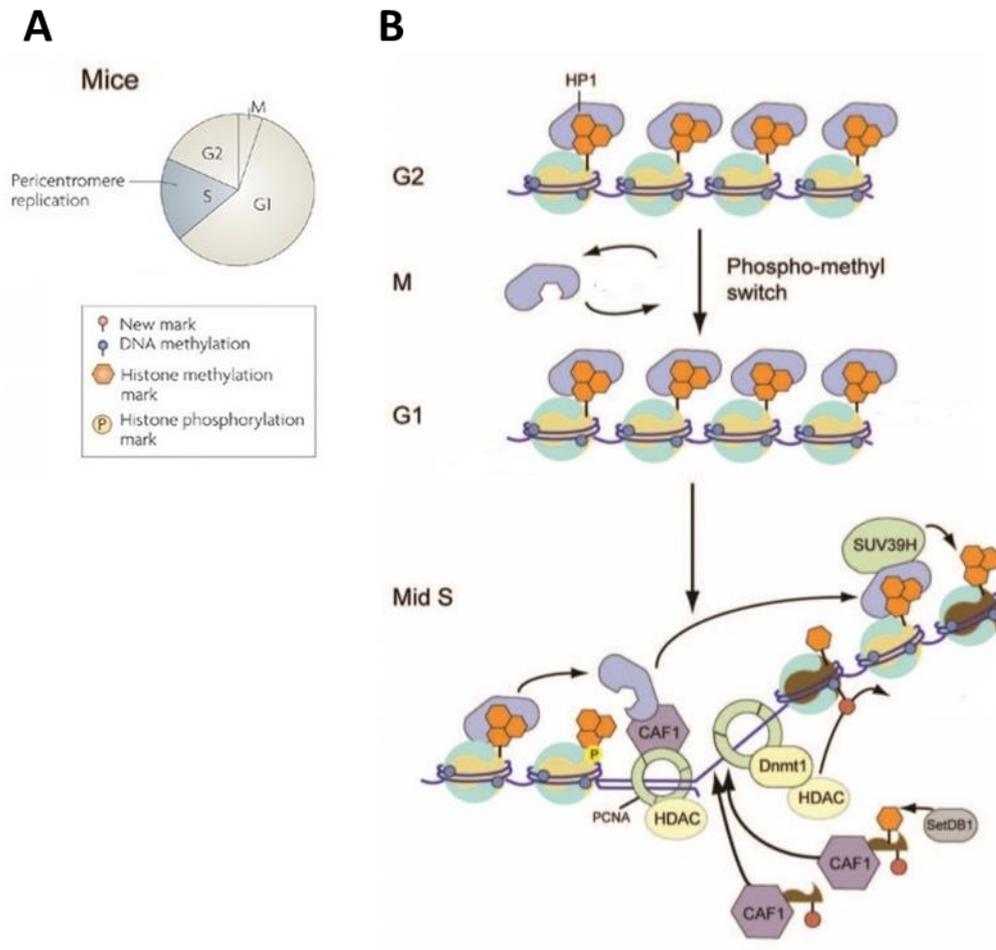


**Figura 5: Formación de la heterocromatina pericentromérica.** A) Se muestra un esquema en modelo de ratón, Suv39h se localiza en regiones pericentroméricas y es responsable de la tri-metilación de la H3K9. HP-1 se acumula en dichas regiones y su reclutamiento es dependiente de Suv39h y H3K9me3. El complejo HP-1/Suv39h se propaga a lo largo de las regiones satélites, silenciando genes albergados en dichas regiones (cromatina inactiva) (Modificado de Bulut-karslioglu, *et al.* 2009)<sup>87</sup>.

que H3K9me3, catalizada por Clr4 (análogo a Suv39h), es esencial para el reclutamiento de Swi6 (análogo a HP-1), y de esta forma favorecería la cohesión de las cromátidas hermanas y el centrómero, lo cual es un requisito clave para la correcta segregación cromosómica en mitosis<sup>59,68,74</sup>.

En ratón, las regiones pericentroméricas se replican en la fase S del ciclo celular y en G2 se encuentran enriquecidas en H3K9me3 unida por HP-1 y poseen altos niveles de metilación del DNA<sup>58</sup>. De esta manera, al iniciar la mitosis, la cromatina es condensada apropiadamente dentro de los cromosomas a través de una acumulación de la H3K9me3<sup>75,76</sup>. Además, HP-1 es desplazado de dichas regiones por un mecanismo denominado “*phospho-methyl switch*”, el cual comprende la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10ph) por la quinasa Aurora B, desestabilizando la unión de HP-1 a la H3K9me3, que se encuentra en el residuo adyacente. Se desconoce el mecanismo por el cual al inicio de la fase G1 el “*phospho-methyl switch*” se interrumpe o por qué HP-1 se vuelve a re-localizar en dichas regiones<sup>77,78</sup>. Una vez en la fase S, la maquinaria de ensamble de cromatina juega un rol central en el establecimiento de la heterocromatina pericentromérica en la nueva hebra de DNA sintetizada. El factor de ensamble de cromatina 1 (CAF-1) deposita nuevas histonas H3 y H4 en una forma acoplada a la síntesis de DNA<sup>79</sup>. Las nuevas histonas H3 unidas a CAF-1, son desacetiladas por HDACs para luego ser mono-metiladas por la HMT SetDB1, originando el sustrato para que Suv39h establezca la H3K9me3 reconocida por HP-1<sup>80,81</sup>. La conexión de CAF-1, HP-1 y SetDB1 con la replicación del DNA sugiere un proceso secuencial y altamente coordinado para asegurar la propagación de la H3K9me3 sobre heterocromatina pericentromérica en la nueva hebra de DNA sintetizada (**Fig. 6**).

Una vez que HP-1 es reclutado a la nueva hebra sintetizada en la fase S, interactúa con una variedad de proteínas esenciales en el mantenimiento de la heterocromatina hasta mitosis (histonas metiltransferasas, DNA metiltransferasas, proteínas de unión a metil-CpG (MeCP2), etc), por lo que HP-1 se convierte en una plataforma estructural para el reclutamiento de más mediadores que ayudarán a constituir la heterocromatina<sup>82</sup>. Más aún, se ha reportado que en ratón, MeCP2 se localiza principalmente sobre el MaSat tanto en cromosomas como en núcleos interfásicos, y que recluta complejos con actividad histona desacetilasa para actuar de manera sinérgica en dichas regiones<sup>49,83</sup>. Como se

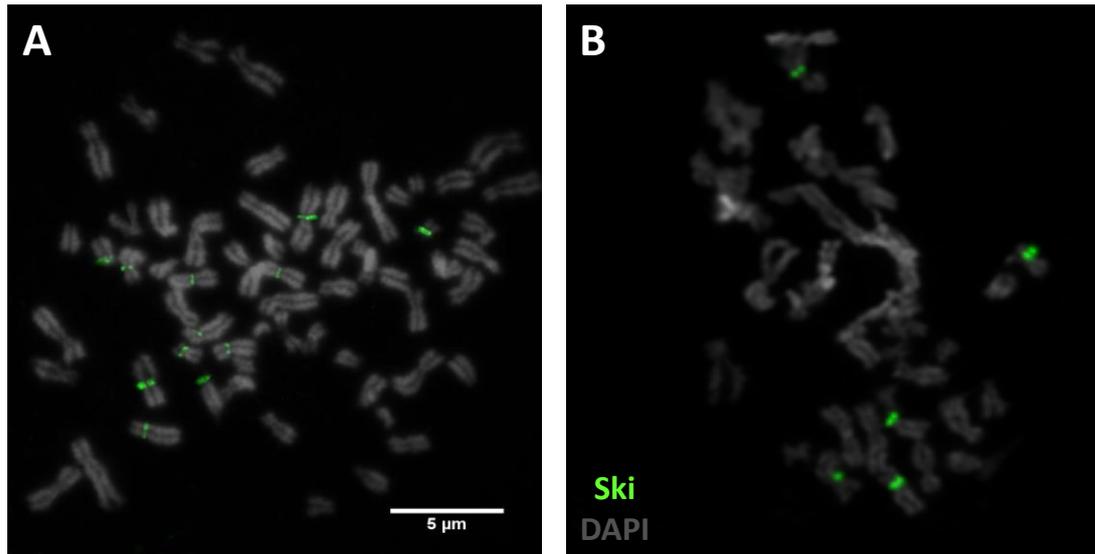


**Figura 6: Mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica en ratón.** **A)** La heterocromatina pericentromérica es replicada en la fase S del ciclo celular. **B)** En G2 existe un enriquecimiento de H3K9me3 y HP-1 alojado en heterocromatina pericentromérica. Al entrar a mitosis, se produce la salida de HP-1 de dichas regiones, la cual se vuelve a depositar en la fase G1. En fase S, iniciada la replicación del DNA, el factor CAF-1 recluta nuevas histonas no-nucleosomales a la hebra de DNA sintetizada. Estas histonas son previamente desacetiladas por HDACs y el DNA es metilado por DNA metiltransferasas (Dnmt1). La HMT SetDB1 monometila las nuevas histonas H3, lo cual provoca la tri-metilación de dicho residuo por Suv39h y posterior unión de HP-1 a dichos nucleosomas (Modificado de Almouzni G, *et al.* 2011)<sup>58</sup>.

mencionó, Ski presenta dominios de interacción con MeCP2 y se ha descrito que forma complejos proteicos con actividad desacetilasa de histonas.

Recientemente, se ha encontrado que la sobre-expresión de la desmetilasa de histona JMJD2B, antagoniza la formación de heterocromatina a través de la reducción de la H3K9me3 en regiones pericentroméricas, induciendo tumorigénesis en células mamarias<sup>84</sup>. Más aún, se encontró que dicha desmetilasa está presente en tumores mamarios y que provoca una reducción considerable de CENP-A alojado en los centrómeros, lo cual induce un incremento de la inestabilidad cromosómica en dichas células<sup>85</sup>. Por otra parte, se ha visto la participación de algunas maquinarias co-represoras y factores de transcripción alojados en dichas regiones, las cuales poseen actividad modificadora de histonas y modulan el mantenimiento de la heterocromatina a través de la H3K9me3<sup>80,86,87</sup>. De esta manera, alteraciones en los niveles de la H3K9me3 afectarán la mantención de la heterocromatina pericentromérica, provocando la pérdida del ambiente represivo y altamente compactado de dichas regiones. Todo esto repercutirá en procesos mitóticos como el acoplamiento de microtúbulos al cinetocoro, generando aberraciones en la segregación cromosómica<sup>88</sup>.

En resumen, los antecedentes muestran que la H3K9me3 es una marca esencial para el establecimiento de la heterocromatina pericentromérica, cuyos niveles disminuidos generan una serie de aberraciones en el curso mitótico que repercuten en la estabilidad genómica. El co-represor Ski, por su parte, ha sido asociado a diversos sucesos en mitosis. En modelo murino, Ski se localiza en regiones pericentroméricas, específicamente en el MaSat, y su marca va acompañada de un aumento de H3K9me3 en dichas regiones. En células humanas, se ha observado la localización de Ski en regiones pericentroméricas de cromosomas acrocéntricos (**Fig. 7**). Los cromosomas acrocéntricos están compuestos por DNA satelital BSR y HSatII. Sin embargo, la unión de esta proteína al DNA satélite y el efecto de esta localización sobre las modificaciones post-traduccionales de la H3K9, aún no han sido descritos en células humanas. Por lo tanto, considerando los antecedentes en modelo murino, fue posible plantear que Ski ocupa las secuencias satelitales de regiones pericentroméricas de cromosomas acrocéntricos y que participa en el enriquecimiento de la tri-metilación de la H3K9 sobre dichas regiones.



**Figura 7: Ski se localiza en las regiones pericentroméricas de algunos cromosomas acrocéntricos de células epitelio mamario humano.** Las células humanas de adenocarcinoma mamario MCF7 y epitelio mamario MCF10A fueron sincronizadas en fase M y se realizó IFI sobre placas metafásicas. La marca de Ski se visualiza en verde y el DNA en gris (DAPI). En MCF7 (A) y en MCF10A (B), la marca de Ski se observa como 2 puntos simétricos cercanos al centrómero (región pericentromérica) en algunos cromosomas, incluyendo aquellos con morfología acrocéntrica (Datos no publicados).

## **2. Hipótesis**

“Ski se localiza sobre DNA satélite II y  $\beta$ , y su presencia es necesaria para que exista un enriquecimiento de la tri-metilación y pérdida de la acetilación de la H3K9 en dichas regiones en células MCF10A y MCF7”.

### **2.1 Objetivo General**

Evaluar la participación de Ski en el enriquecimiento de las modificaciones post-traduccionales de H3K9 presentes en heterocromatina de regiones pericentroméricas en las líneas celulares MCF10A y MCF7.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Identificar, de manera específica, secuencias satelitales II y  $\beta$  en cromosomas mitóticos de células MCF10A y MCF7.
2. Determinar la presencia de Ski en secuencias satelitales II y  $\beta$  de cromosomas mitóticos de células MCF10A y MCF7.
3. Evaluar el efecto de Ski sobre la tri-metilación y acetilación de la H3K9 en secuencias satelitales II y  $\beta$  en células mitóticas MCF10A y MCF7.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 cultivo celular:

Reactivo	Marca comercial
DMEM	GIBCO, EEUU
DMEM/F12	CORNING, EEUU
Suero fetal bovino	GIBCO, EEUU
Suero fetal de caballo	GIBCO, EEUU
Penicilina/Estreptomicina	GIBCO, EEUU
Factor de crecimiento endotelial (EGF)	R&D Systems
Insulina	Sigma Aldrich, Alemania
Hidrocortisona	Sigma Aldrich, Alemania
Blasticidina	GIBCO, EEUU
Puromicina	Sigma Aldrich, Alemania

##### 3.1.2 Extracción de RNA, transcripción inversa y PCR cuantitativo (qPCR):

Reactivo	Marca comercial
Rneasy Plus Mini Kit	QIAGEN, Alemania
DNasa I	AMBION, EEUU
Affinity Script qRT-PCR	Stratagene, EEUU
Brilliant II SYBR Green	Stratagene, EEUU
Equipo	Marca comercial
Termociclador Eco Realtime	Illumina, EEUU

##### 3.1.3 Western Blot:

Reactivo	Marca comercial
Cocktail de inhibidores de proteasas	Thermo Fisher Scientific, EEUU
Cocktail de inhibidores de fosfatasas	Thermo Fisher Scientific, EEUU
Kit de cuantificación BCA	Thermo Fisher Scientific, EEUU
SuperSignal™ West Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, EEUU
Equipo	Marca comercial
Fotodocumentador ChemiScope3600	Clinx Science Instruments, China

### 3.1.4 Inmunoprecipitación de cromatina:

Reactivo	Marca comercial
Formaldehído 37% (Metanol 10%)	Sigma Aldrich, Alemania
RNasa A	Sigma Aldrich, Alemania
Proteinasa K	Sigma Aldrich, Alemania
Agua libre de nucleasas	Winkler, EEUU
Etanol absoluto	Merck, Alemania
Buffer TE pH 8,0	Winkler, EEUU
Beads de agarosa conjugado a Proteína A	Santa Cruz, EEUU
Beads de agarosa conjugado a Proteína G	Santa Cruz, EEUU
Glicógeno	Roche, Suiza
Equipo	Marca comercial
EpiShear™ Probe Sonicator	Active Motif, EEUU

### 3.1.5 Anticuerpos:

Anticuerpo	Isotipo	# catálogo	Marca comercial
Anti-Ski (H-329)	Conejo	sc-9140	Santa Cruz, EEUU
Anti-H3K9me3	Conejo	ab8898	Abcam, Inglaterra
Anti-H3K9ac	Ratón	ab12179	Abcam, Inglaterra
IgG	Conejo	12-370	Millipore, Alemania
IgG	Ratón	12-371	Millipore, Alemania
Anti-Actina	Ratón	MA1-744	Thermo Fisher Scientific, EEUU
Anti- $\alpha$ -Tubulina	Ratón	A11126	Thermo Fisher Scientific, EEUU
Anti-Conejo (Conjugado a HRP)	Cabra	31460	Thermo Fisher Scientific, EEUU
Anti-Ratón (Conjugado a HRP)	Cabra	31430	Thermo Fisher Scientific, EEUU

### 3.2 Cultivo Celular.

Las células MCF7 *wild-type* que se utilizaron en este estudio corresponden a una línea humana epitelial de adenocarcinoma mamario, subtipo luminal, las cuales poseen un cariotipo de 82 cromosomas (rango: 66 a 87 cromosomas) y expresan el receptor de estrógeno.

Las células MCF10A *wild-type* corresponden a una línea humana epitelial de mama, poseen un cariotipo de 47 cromosomas y responden a insulina, glucocorticoides, y el factor de crecimiento epidermal (EGF).

Las líneas celulares MCF7 *wild-type*, MCF7-Mock y MCF7-T7hSki+, se cultivaron en “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) suplementado con suero fetal de bovino 10%, penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml). Los cultivos se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta un 70-80% de confluencia. Las células MCF10A *wild-type*, MCF10A shc, MCF10A shSki39 y MCF10A shSki48 se cultivaron en DMEM/F12 (1:1) suplementado con 5% suero fetal de caballo, EGF 10 ng/ml, insulina 10 ng/ml e hidrocortisona 0.5 µg/ml. Fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta un 70-80% de confluencia.

### 3.3 Transducción retroviral y lentiviral.

Para sobre-expresar la proteína Ski en células MCF7 *wild-type*, se utilizó el vector retroviral RIGB, el cual fue creado por la inserción del cDNA de la proteína fluorescente verde (GFP) fusionado al gen de la resistencia a blasticidina, el cual se encuentra río debajo del sitio de clonamiento múltiple (*polylinker site*) donde está incorporado el cDNA de Ski humano fusionado a un epítotope *tag* (MASMTGGQMG) llamado T7 (T7hSki) en el vector REBNA. Además, para aumentar la eficiencia del procedimiento, previamente se transfectaron las células empaquetadoras Phoenix A (Células HEK 293 modificadas codificantes para proteínas de la cápside viral). La transfección se realizó con Lipofectamine® 3000, incubando las células durante 48 h a 37°C. Luego, fueron seleccionadas con blasticidina (10 µg/ml) y monitoreadas por fluorescencia. Post-transfección, se colectaron los medios de cultivos enriquecidos en partículas virales (medio condicionado), los cuales se filtraron a través de un filtro, con un tamaño de poro de 0,22 µm. Para transducir las células MCF7 *wild-type*, se cultivaron las células hasta un 30-40% de confluencia y se incubaron con los medios condicionados durante 12 h. Este proceso fue repetido 3 veces, y luego se inició la selección con blasticidina (10 µg/ml) y

monitoreo por fluorescencia. Seguido de esto, las células se separaron mediante *cell-sorter* (FACS) de GFP.

Las células MCF10A *wild-type* fueron transducidas con un vector lentiviral comercial pre-empaquetado, que contiene la secuencia codificante para un *short hairpin* RNA (shRNA) específico para hSki. El vector está clonado dentro del plásmido de expresión pRedPuro, el cual fue creado por la inserción del cDNA de la proteína fluorescente roja (RFP) fusionado al gen de la resistencia a Puromicina. La transducción se llevó a cabo cultivando  $5 \times 10^4$  células en DMEM/F12 con Polybrene (5 µg/mL), utilizando una multiplicidad de infección (MOI) igual a 5, acorde a la concentración de unidades infecciosas (IFU) otorgadas por el fabricante. A las 48 h post-transducción, las células fueron seleccionadas con Puromicina 5 µg/ml, fueron monitoreadas por fluorescencia y posterior a esto, fueron separadas por medio de un *cell-sorter* para RFP (FACS).

### **3.4 Extracción de RNA, transcripción inversa y PCR cuantitativo (qPCR).**

El RNA total de las células MCF7 y MCF10A se extrajo mediante el sistema comercial RNeasy Plus Mini Kit, posteriormente se incubó con DNasa I. Para la síntesis de cDNA se utilizó el sistema comercial AffinityScript qRT-PCR, siguiendo las especificaciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó a partir de 1 µg de RNA y como partidores se usó una mezcla de oligo dT (170 ng) y *random primers* (30 ng) en un volumen total de 20 µl. La mezcla fue incubada durante 5 min a 25°C, 45 min a 42 °C y 5 min a 95°C. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 10 µl, utilizando como templado 1 µl de cDNA previamente diluido 1/5 veces y una mezcla de 0,1 µM de cada partidor, 5 µl Brilliant II SYBR Green y 7,5 µL de agua desionizada. Se utilizaron partidores específicos para el mRNA de hSki (Fw: 5' TGG TGC TTG GTT GAA CAA GGG A 3'; Rv: 5' GTA CAA GAT GCT GGA AGG CAC AGA 3'; Tamaño de amplicón: 90 pares de bases) y HPRT (Fw: 5' CAA GCT TGC TGG TGA AAA GGA C 3'; Rv: 5' GTC AAG GGC ATA TCC TAC AAC AAA 3'; Tamaño de amplicón: 101 pares de bases). La cuantificación de la PCR se llevó a cabo en un termociclador Eco Realtime, utilizando el siguiente ciclo termal: 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 15 seg a 60°C y 15 seg a 72°C. Se utilizó el gen *HPRT* fue utilizado como normalizador de la reacción.

### 3.5 Ensayo de Western Blot.

Las células MCF7 y MCF10A fueron homogeneizadas manualmente en solución RIPA (Tris-Cl 10 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NP-40 1%, Deoxicolato de Sodio 1% y Dodecilsulfato de Sodio (SDS) 1% suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas y tres inhibidores de fosfatasa (NaF 25 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM y Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 30 μM). Las muestras proteicas se centrifugaron a 16000xg a 4°C durante 20 min. La concentración de proteínas totales de las muestras se cuantificó utilizando el sistema comercial BCA. Luego, se separaron 30-40 μg de proteínas de cada muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF la cual se bloqueó con albumina de suero bovino (BSA) 5% en solución salina de fosfato (PBS) 1X. Finalmente, la membrana se incubó durante 16 h a 4°C con el anticuerpo primario disuelto en solución de bloqueo. Luego de tres lavados con PBS-Tween 0,05%, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente. El revelado se realizó con el reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Chemiluminescent Substrate en el equipo para luego lavar nuevamente e incubar con la solución de revelado. Los anticuerpos primarios utilizados fueron Anti-Ski (Dilución 1:1.000), Anti-β-actina (Dilución 1:30.000) y Anti-tubulina (Dilución 1:4.000) como control de carga. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Anti-conejo (Dilución 1:5.000) y Anti-ratón (Dilución 1:3.000). Las imágenes se registraron con el fotodocumentador ChemiScope3600 posteriormente fueron analizadas con el *software* ImageJ (NIH), donde la señal de cada anticuerpo fue normalizada contra la señal del anticuerpo control de carga.

### 3.6 Sincronización celular y citometría de flujo.

Las líneas celulares MCF7 *wild-type*, MCF7-Mock, MCF7-T7hSki+, MCF10A *wild-type*, MCF10A shc y MCF10A shSki fueron sincronizadas en fase M usando colcemid (50 ng/ml por 16 h). Las células que están en fase M son menos adherentes que las células no sincronizadas y se desprenden con facilidad al inducir un estrés mecánico (*shake-off*). Las células enriquecidas en el sobrenadante fueron colectadas y centrifugadas a 450 xg durante 5 min. El pellet fue lavado con PBS 1X para eliminar el colcemid y centrifugado nuevamente a 450 xg durante 5 min.

La eficiencia de sincronización fue monitoreada mediante citometría de flujo. Para ello, el sedimento celular fue fijado con etanol absoluto frío durante 1 h. Luego de la fijación, las células se centrifugaron a 1.400 xg durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS 1X frío, para luego centrifugar a 1.400 xg durante 10 min a 4°C. Descartado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 500 µl de solución de tinción (yoduro de propidio 50 µg/mL, RNasa A 10 µg/mL, citrato de sodio 1% y NP-40 1% en PBS 1X). Las células control fueron resuspendidas en una solución similar que no contiene yoduro de propidio. Las células fueron incubadas protegidas de la luz a 37°C durante 1 h, para luego traspasarlas a tubos de citometría para su análisis.

### **3.7 Obtención de coordenadas genómicas para el diseño de partidores específicos.**

Para el diseño de partidores específicos, que permitieran la amplificación de las regiones pericentroméricas del genoma humano, se descargaron los archivos de coordenadas del genoma humano (versión hg19) desde la base de datos The Genome Browser database (University of California Santa Cruz, UCSC) con la finalidad de obtener la secuencia nucleotídica de estas regiones. Brevemente, se utilizaron los archivos de coordenadas de secuencias repetitivas del genoma humano RepeatMasker (versión hg19), filtrando y seleccionando aquellas regiones que estuvieran caracterizadas por este archivo como regiones “BSR” o “HSatII” los cuales corresponden a regiones *beta satellite región* y *Human Satellite II*, respectivamente. Posteriormente, se descargaron las secuencias nucleotídicas consolidadas desde la aplicación Table Browser (Custom Track, utilizando las regiones de interés) desde la base de datos The Genome Browser (UCSC). Finalmente, se diseñaron partidores específicos para dichas regiones, utilizando el programa Amplifx (versión 1.5.4), los cuales fueron analizados utilizando la aplicación Primer-BLAST para verificar su especificidad.

### **3.8 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).**

Las líneas celulares MCF7 *wild-type*, MCF7-Mock, MCF7-T7hSki+, MCF10A *wild-type*, MCF10A *shc* y MCF10A *shSki39* fueron sincronizadas en mitosis, posteriormente las células se lavaron y fijaron (*crosslinking*) en formaldehído 1% en PBS

1X 10 minutos a temperatura ambiente. La fijación se detuvo con una solución de glicina 0,125 M en PBS 1X. Las células fijadas se centrifugaron durante 10 min a 1.400 xg y se lavaron en PBS 1X, para posteriormente lisarlas en solución de lisis 1X (Hepes 25 mM pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 10 mM, Nonidet P-40 0,1% y un cocktail de inhibidores de proteasas según instrucciones del fabricante). La muestra enriquecida en cromosomas mitóticos fue resuspendida en solución de sonicación 1X (Hepes 50 mM pH 7,9, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, desoxicolato de sodio 0,1%, SDS 0,1% y un cocktail inhibidores de proteasas según instrucciones del fabricante), la cual se sometió a 30 pulsos de sonicación (5 seg On – 5 seg Off, Amplitud 20%). La muestra se sonicó en el equipo EpiShear™ Probe Sonicator. Para comprobar la efectividad de la sonicación, se sometió una alícuota de la cromatina a un *reverse crosslinking* para separar el DNA de las proteínas fijadas, y el resto se congeló a -80°C. La alícuota se incubó con 2 µg de RNasa A a 65°C *overnight* y 2,5 µg de Proteinasa K durante 2 h a 50 °C en un volumen final de 100 µl en solución de Sonicación 1X. El DNA se purificó por extracción fenólica, se precipitó con etanol absoluto y se eluyó en agua libre de nucleasas. Finalmente, la muestra se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en TBE 1X para comprobar la presencia de fragmentos de DNA enriquecidos entre 200-400 pares de bases. Para la inmunoprecipitación se utilizaron 25 µg de cromatina sonicada y se llevaron a un volumen final de 450 µl de solución de sonicación 1X junto a 4 µg de los siguientes anticuerpos primarios utilizados: Anti-Ski, Anti-H3K9me3 y Anti-H3K9ac. Como control negativo se inmunoprecipitó un anticuerpo del mismo isotipo que el experimental pero inespecífico (IgG ratón e IgG conejo). Los complejos inmunes asociados a la cromatina se precipitaron utilizando *beads* de agarosa conjugadas a proteínas A o G. La cromatina precipitada se sometió a *reverse crosslinking*, con el mismo procedimiento detallado antes. El DNA se purificó por extracción fenólica, se precipitó con etanol absoluto. Finalmente, se eluyó en solución TE pH 8,0 y se utilizó para la reacción de qPCR usando partidores específicos para secuencias satelitales (Mostrados en Resultados, **Tabla I**) y el motivo SBE del promotor de *SMAD7* (Fw: 5' CGA AAC ACA ATC GCT TTT TTT TT 3'; Rv: 5' CCC TCT GCT CGG CTG GTT 3' tamaño del amplicón 112 pares de bases).

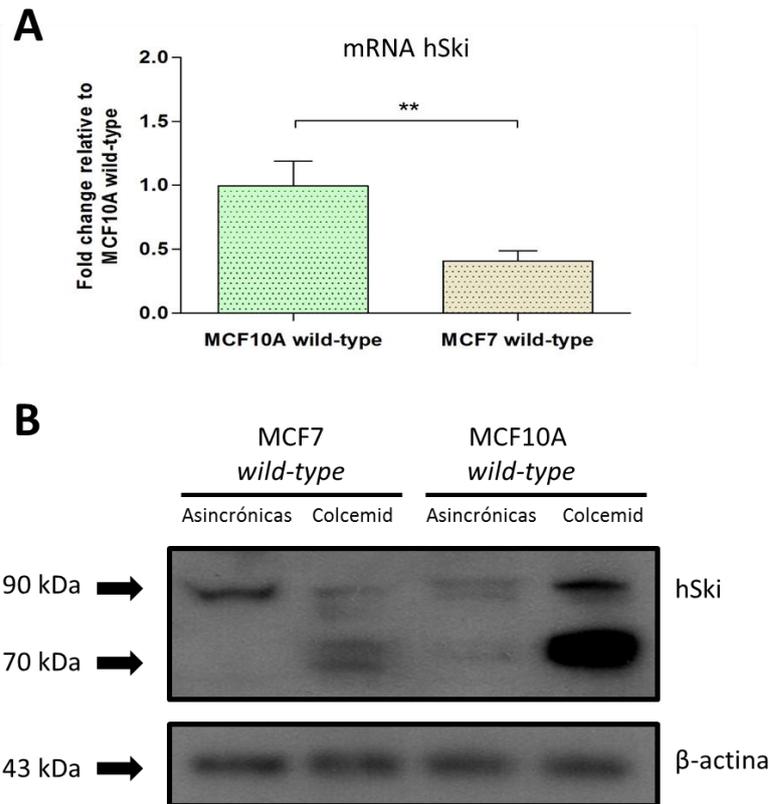
## 4. Resultados

### 4.1 Generación de los modelos celulares de estudio.

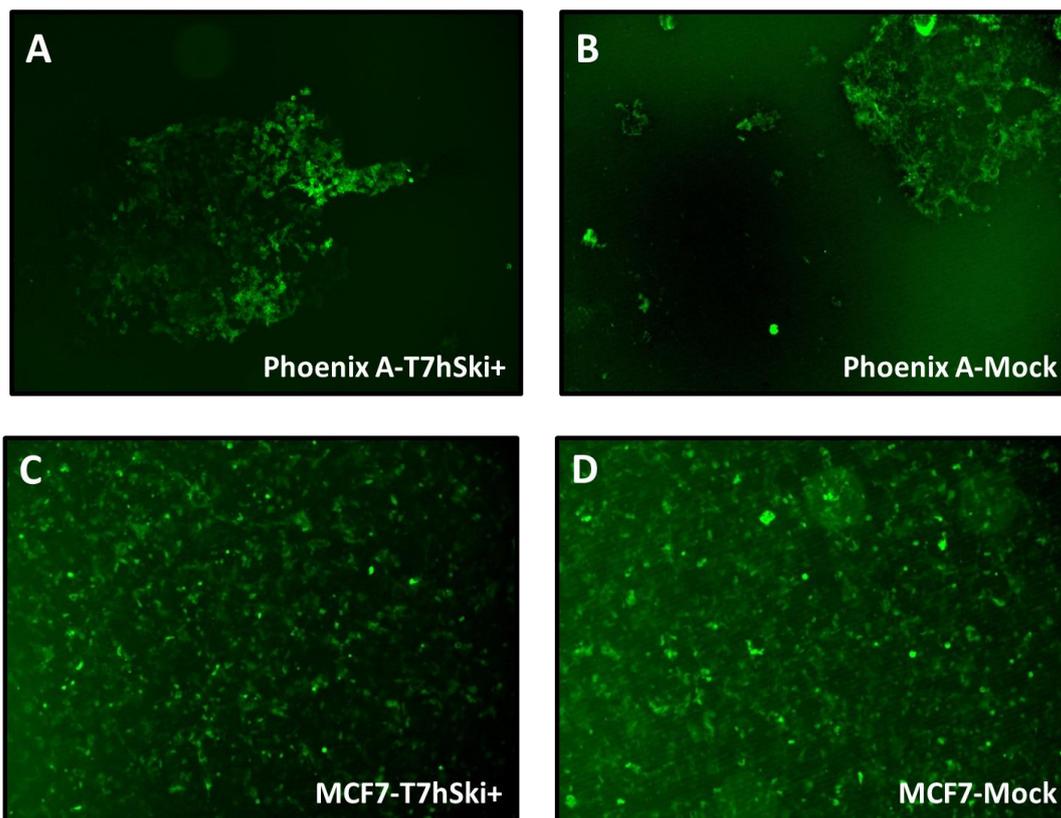
En este trabajo se utilizaron las células epiteliales mamarias MCF7 y MCF10A. Primeramente, las células wild-type fueron caracterizadas respecto a los niveles endógenos de Ski que éstas poseen. Mediante RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR), se determinó que las células MCF7 presentan aproximadamente un 50% menos de mRNA hSki respecto a las células MCF10A (**Fig. 8A**). Los mismos tipos celulares fueron sincronizados en mitosis, mediante la incubación durante 16 h con colcemid y se evaluaron los niveles proteicos de hSki a través de un ensayo de Western Blot. Con este ensayo se evidencia la presencia de múltiples bandas reconocidas por el anticuerpo anti-Ski, destacando la banda de 90 kDa que, según la literatura y tamaño esperado, correspondería a Ski. Al comparar la expresión de Ski en células sincronizadas con células sin sincronizar, se encontró que en células MCF10A la banda de 90 kDa aumenta en mitosis, sin embargo este aumento no es evidenciado en células MCF7 (**Fig. 8B**). Por lo tanto, dado que las células MCF10A presentan mayor expresión de hSki que las células MCF7, y que en éstas últimas no se evidencia un aumento de la proteína en mitosis, la estrategia que se abordó en este trabajo para investigar la función de Ski en mitosis fue sobre-expresar esta proteína en células MCF7 y silenciar la expresión de la misma en células MCF10A.

La sobreexpresión de Ski en las células MCF7 wild-type se indujo mediante transducción retroviral. Para ello, previamente utilizamos las células Phoenix A, las cuales fueron transfectadas con el vector retroviral RIGB que posee el cDNA de hSki (RIGB-T7hSki) y el vector vacío (RIGB-Mock). Se generaron las líneas celulares Phoenix A-T7hSki y Phoenix A-Mock (**Fig. 9A y B**).

Luego de la transfección, se colectaron los medios de cultivos enriquecidos en partículas virales que contienen ambos vectores retrovirales (medio condicionado), los cuales fueron utilizados para transducir las células MCF7 wild-type. Así, se generaron las líneas estables MCF7-T7hSki+ y MCF7-Mock (**Fig. 9C y D**).

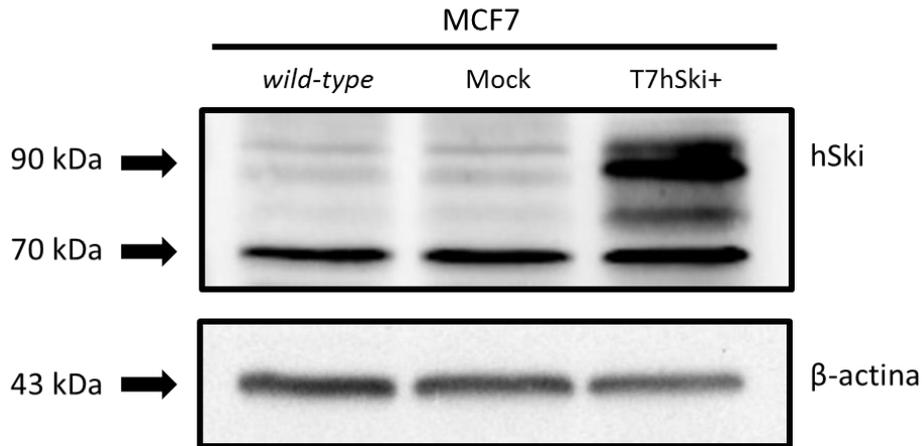


**Figura 8: Niveles de expresión de Ski en células MCF10A y en MCF7.** En **A**) se muestra un RT-qPCR. En células MCF7, los niveles de mRNA hSki corresponden a un 50% menos respecto a MCF10A. Los valores son expresados como veces de cambio respecto al promedio de los Cq de MCF10A. El mRNA del gen *HPRT* fue usado como referencia. Se muestran graficados 3 experimentos independientes. Se aplicó t-test con un  $p < 0,01$  (\*\*). En **B**) se muestra un Western Blot de células MCF10A y MCF7, las cuales fueron sincronizadas (colcemid) para ser comparadas con células sin sincronizar (Asincrónicas). La banda de hSki corresponde a 90 kDa y la de  $\beta$ -actina a 43 kDa. Al comparar células asincrónicas con células tratadas con colcemid, el aumento proteico de Ski descrito en bibliografía sólo se encontró en células MCF10A.  $\beta$ -actina fue usado como control de carga.



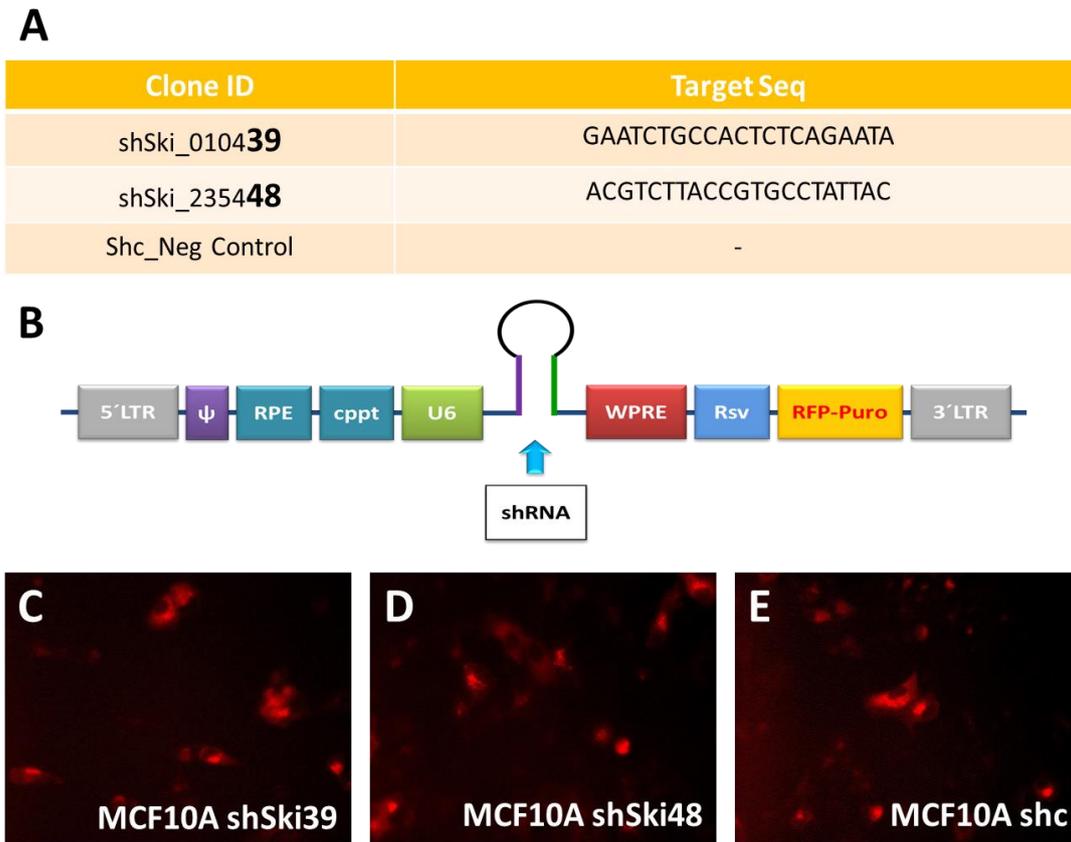
**Figura 9: Transducción retroviral de células MCF7 con el vector RIGB.** Las células Phoenix A fueron transfectadas con el vector retroviral RIGB que posee el cDNA de Ski unido a un tag T7 (T7hSki+) y el vector vacío (Mock) como control. La transfección fue realizada durante 48 h y posterior a eso, la selección se realizó con blasticidina 10 mg/mL. El vector RIGB expresa la proteína GFP, la cual fue visualizada por fluorescencia como control de transfección. Así, se generaron las líneas estables Phoenix A-T7hSki+ (A) y Phoenix-Mock (B). De éstas últimas se colectaron los medios de cultivo, los cuales se usaron para transducir las células MCF7 *wild-type*. Las células transducidas fueron seleccionadas con blasticidina 10 mg/mL y por *cell-sorter* a través de GFP. Así se obtuvieron las células MCF7-T7-Ski (C) y MCF7-Mock (D).

La eficiencia de la sobreexpresión de Ski se evaluó a través de Western Blot. Concordante con lo esperado, las células MCF7-T7hSki+ presentaron mayores niveles proteicos de Ski (banda de 90 kDa) que las células MCF7-Mock y que las células MCF7 *wild-type*. Más aún, no se encontró diferencias entre estas últimas, validando la efectividad de las células MCF7-Mock como control de transducción (Fig. 10).



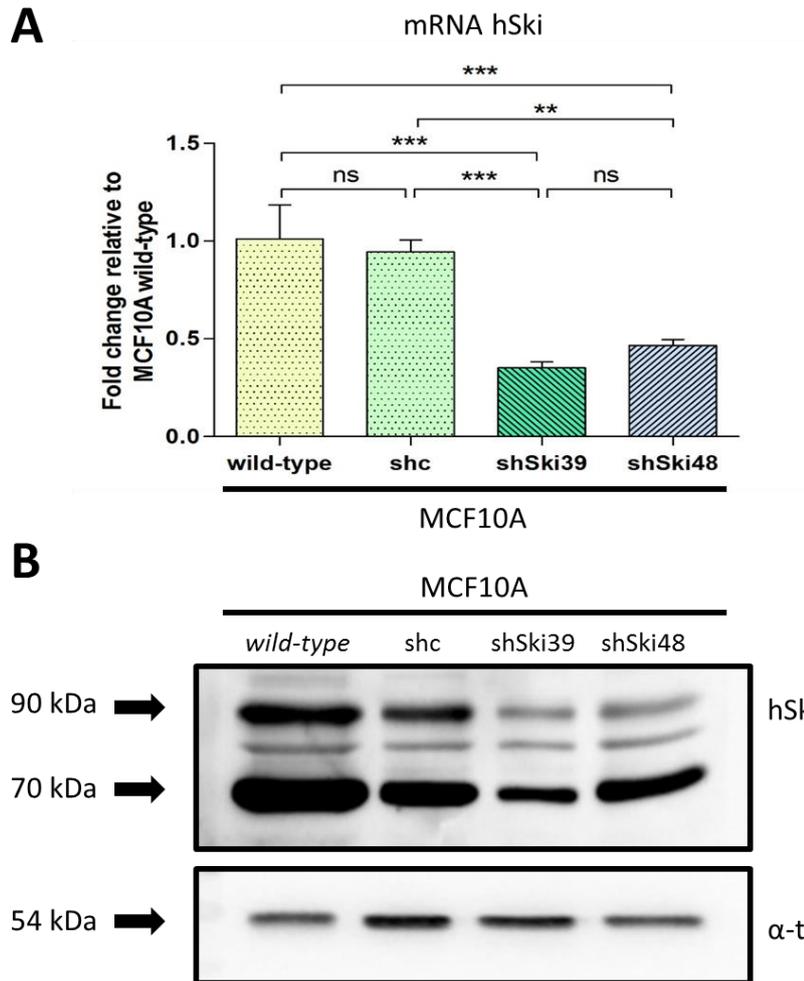
**Figura 10: Sobre-expresión de hSki en células MCF7.** Las células MCF7 fueron transducidas con partículas virales provenientes de células Phoenix A-Mock y Phoenix A-T7hSki+. Los lisados proteicos obtenidos de las células MCF7-Mock y MCF7-T7hSki+ fueron evaluados por Western Blot, utilizando como control células MCF7 *wild-type*. La figura muestra un considerable aumento de la banda que corresponde a hSki (90 kDa) en células MCF7-T7hSki+, no así en las otras líneas evaluadas. β-actina se utilizó como control de carga.

Para evaluar el efecto de la disminución de Ski en células MCF10A, se utilizaron dos vectores lentivirales que poseen diferentes *short hairpin* RNA (shRNA) específicos para hSki, los cuales se denominaron shSki39 y shSki48. Además se utilizó un tercer vector denominado shRNA *scrambled* (shc) como control de transducción (**Fig. 11A**). Cada vector está clonado dentro de un plásmido de expresión pRedPuro, el cual expresa la proteína fluorescente roja RFP fusionado al gen de la resistencia a Puromicina (**Fig. 11B**). Se generaron las líneas MCF10A shSki39, MCF10A shSki48 y MCF10A shc (**Fig. 11C-E**). A partir de estas células se sintetizó el cDNA a partir del RNA total y se obtuvieron sus lisados proteicos para evaluar la eficiencia del silenciamiento de los dos shRNA a través de RT-qPCR y Western Blot, respectivamente, utilizando como control las células MCF10A *wild-type* y shc.



**Figura 11: Transducción lentiviral de células MCF10A.** **A)** Secuencias blanco de dos shRNAs específicos para hSki, llamados shSki39 y shSki48, y el control de transducción (shc: scrambled). **B)** Esquema de la construcción del lentivirus, el cual se clonó dentro de un plásmido de expresión. Se destaca la presencia de los extremos LTR, el promotor U6 río arriba de la secuencia blanco (shRNA) y las secuencias de la proteína fluorescente roja (RFP) y la resistencia a Puomicina (Puro). Además se muestran células MCF10A transducidas y seleccionadas. En **C)** células MCF10A shSki39; **D)** células MCF10A shSki48 y **E)** células MCF10A shc.

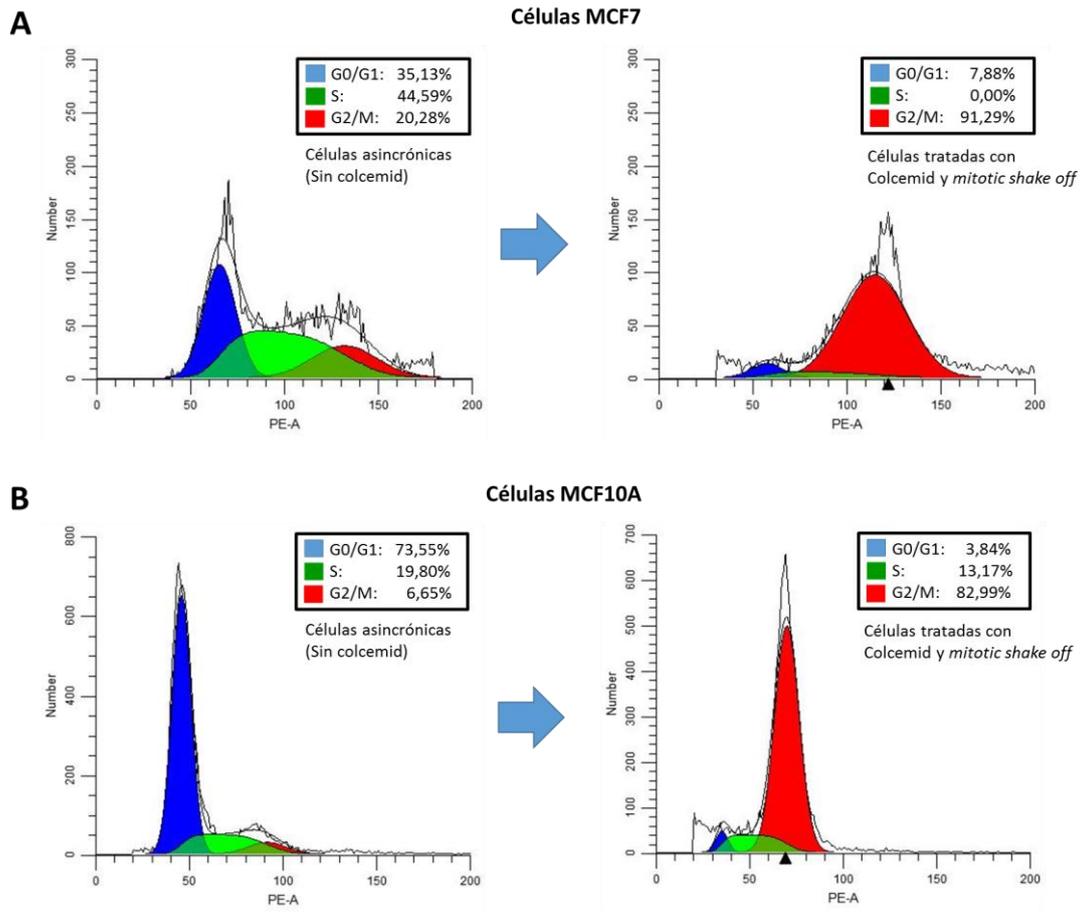
Mediante RT-qPCR, se determinó que en las células MCF10A shSki39 y el shSki48 se logró aproximadamente un 65,23% y 53,78% de silenciamiento (*knockdown*), respectivamente, en comparación con MCF10A *wild-type*. Por su parte, la línea MCF10A shc no presentó variaciones en la expresión de Ski respecto al *wild-type* (**Fig. 12A**). Más aún, mediante Western Blot, se encontró que la línea MCF10A shSki39 presenta menores niveles proteicos de la banda de 90 kDa que las líneas MCF10A *wild-type*, shc y shSki48 (**Fig. 12B**). Dados estos resultados, los experimentos realizados a continuación, en los que se evalúa el efecto del silenciamiento de Ski, fueron realizados en la línea MCF10A shSki39.



**Figura 12: Evaluación de la eficiencia de los shRNAs sobre el silenciamiento de Ski en células MCF10A.** Se evaluó la eficiencia de silenciamiento de hSki en las líneas MCF10A shSki39 y MCF10A shSki48, utilizando como control las células MCF10A *wild-type* y shc (*scrambled*). **A)** RT-qPCR de los RNAs extraídos de dichas células. La línea MCF10A shSki39 presentó un 65,23% de *knockdown* versus un 53,78% de la línea MCF10A shSki48, respecto a las células MCF10A *wild-type*. No se encontraron diferencias significativas entre las líneas MCF10A *wild-type* y MCF10A shc. El mRNA del gen *HPRT* se utilizó como referencia. Se usó *one-way* ANOVA, con post hoc Bonferroni  $p < 0,05$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) y ns (no significativo). **B)** Western Blot de los lisados proteicos extraídos de dichas células. La línea MCF10A shSki39 posee menores niveles de la banda correspondiente a hSki (90 kDa) respecto a la línea MCF10A shSki48. Se encontraron pequeñas diferencias entre la línea MCF10A shc y la línea MCF10A *wild-type*.  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga.

## 4.2 Sincronización mitótica de células MCF7 y MCF10A.

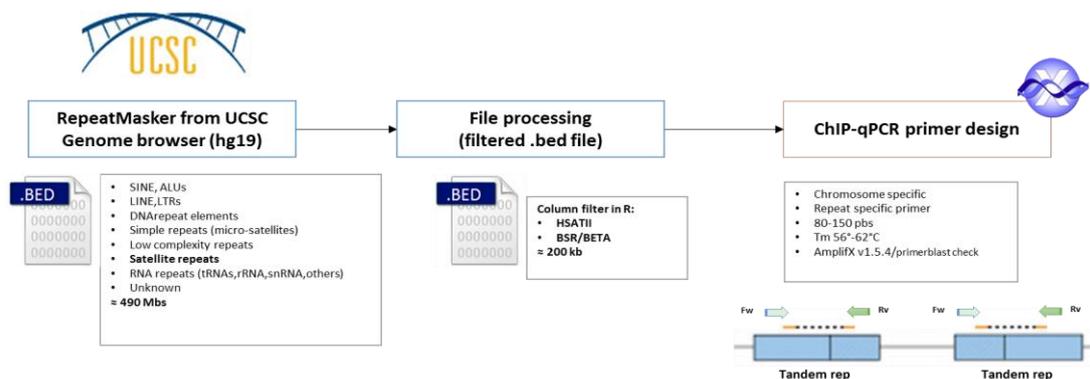
Las líneas celulares MCF7 y MCF10A *wild-type* fueron sincronizadas en fase M usando colcemid (50 ng/ml durante 16 h). Las células en fase M son menos adherentes que las células no sincronizadas y se desprenden con facilidad al inducir un estrés mecánico (*shake-off*). Las células desprendidas se enriquecen en el sobrenadante, el cual fue colectado y centrifugado. La eficiencia de sincronización fue monitoreada mediante citometría de flujo usando yoduro de propidio (PI) como marcador de DNA. Este método permite separar las células en base a su contenido de DNA, pudiendo distinguir las poblaciones celulares que se encuentran en las diferentes etapas del ciclo celular. En células MCF7 se encontró que luego de la sincronización con colcemid, la población celular G1/G0 disminuye de 35,1% a 7,9%. La población S disminuye de 44,6% a 0,0%. Finalmente, la población G2/M, aumenta de 20,3% a 91,3% (**Fig. 13A**). Por su parte, en las células MCF10A sincronizadas con colcemid, la población G1/G0 disminuyó de 75,6% a 3,8%. La población S, de 19,8% a 13,2%; y finalmente, la población G2/M aumentó de 6,7% a 83,0% (**Fig. 13B**). Dado estos valores, este protocolo de sincronización (50 ng/mL de colcemid durante 16 h + *shake off*) se utilizó en los experimentos siguientes.



**Figura 13: Sincronización celular de células MCF7 y MCF10A.** Las células MCF7 y MCF10A fueron tratadas con colcemid a 50 ng/mL durante 16 h, luego fueron sometidas a *mitotic shake-off* para enriquecer el medio de cultivo en células mitóticas. Las células fueron fijadas y teñidas con yoduro de propidio para su monitoreo por citometría de flujo. Luego de la sincronización un 91,3% de las células MCF7 (**A**) y un 83,0% de las células MCF10A (**B**) se encuentran en G2/M (color rojo).

### 4.3 Identificación específica de secuencias satelitales II y $\beta$ en cromosomas mitóticos de células de epitelio mamario humano.

Utilizando la base de datos Genome Browser de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC) y RepeatMasker, se generó un nuevo archivo .BED el cual sólo contiene repeticiones satelitales, específicamente las repeticiones BSR y HSatII, ubicadas en regiones pericentroméricas de todos los cromosomas. Teniendo las secuencias, se diseñaron partidores específicos para dichas regiones utilizando el programa Amplifx v1.5.4, siguiendo los parámetros de un diseño estándar de partididor para qPCR ( $T_m > 58^\circ\text{C}$ , amplicón máximo 200 pbs, etc) (Fig. 14). Se obtuvieron 2 parejas de partidores para BSR ubicado en el cromosoma 15, y 7 parejas de partidores para HSatII en el cromosoma 22 (Tabla I). Se utilizaron las 9 parejas de partidores para amplificar DNAs provenientes de cromatina sonicada de células MCF10A *wild-type* sincronizadas en mitosis. Finalmente, se eligieron aquellos partidores que presentaron productos únicos de qPCR y eficiencias de amplificación entre 80 y 120%. Para BSR, se escogió el partididor “Chr15\_BSR/731”, el cual genera un amplicón de un tamaño de 88 pares de bases y una eficiencia de 98,4% (Fig. 15A). Para HSatII, se escogió el partididor “Chr22\_146/HSatII” el cual genera un amplicón de 107 pares de base y posee una eficiencia de 117,6% (Fig. 15B).

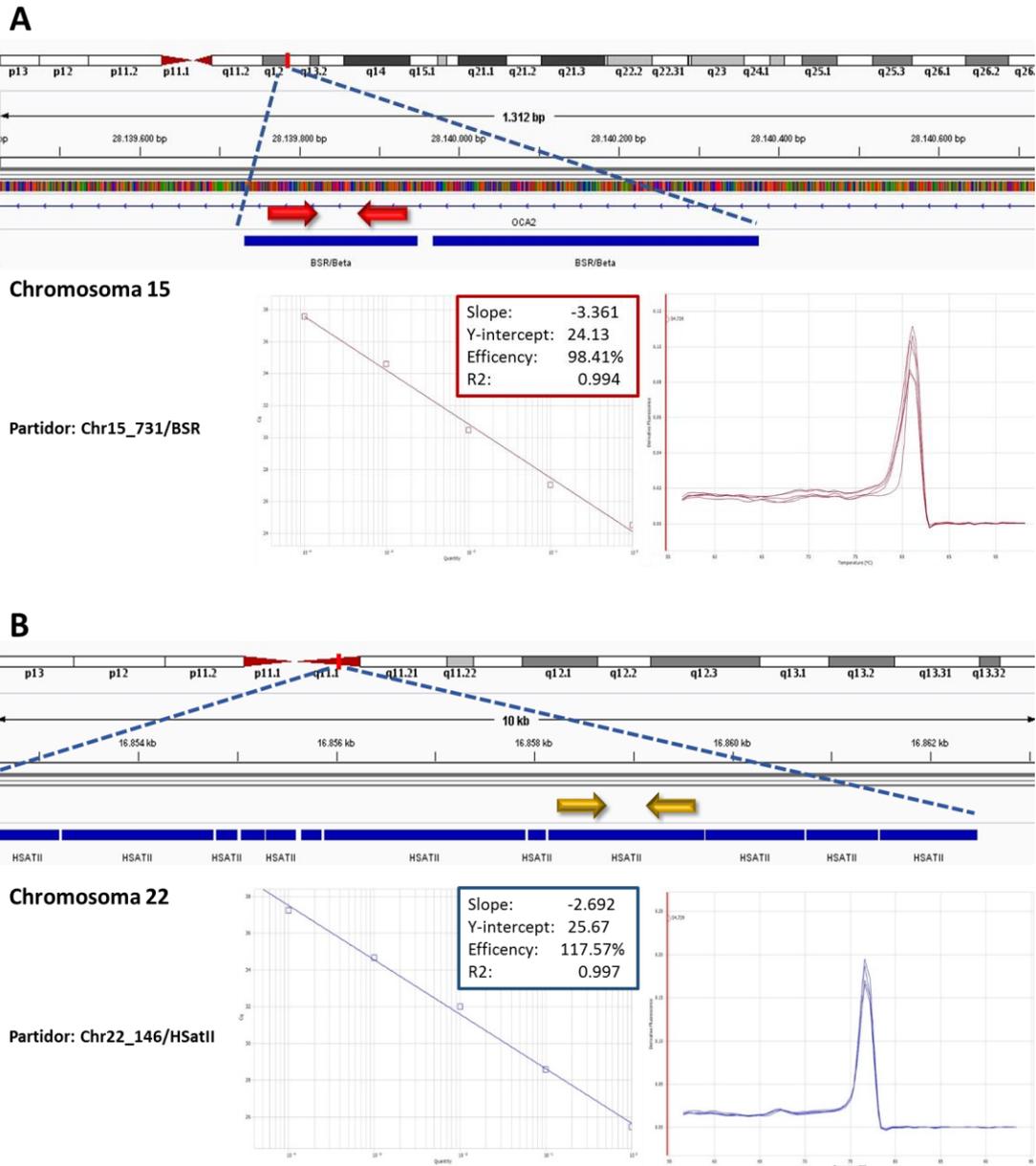


**Figura 14: Diagrama de flujo para el diseño de partidores usando RepeatMasker.** La plataforma Genome browser (hg19) de UCSC que posee diversos tipos de máscaras bioinformáticas. Una de estas máscaras corresponde a RepeatMasker, la cual alberga diversos grupos de DNA repetitivo, incluidas las repeticiones satelitales. Esta máscara fue filtrada y se escogieron específicamente los DNA satélite BSR y HSatII contenidos en regiones pericentroméricas de cromosomas humanos. Luego, utilizando el software Amplifx se diseñaron partidores con los parámetros estándar para qPCR.

**Tabla I**

**Partidores diseñados para regiones satelitales específicas para los cromosomas 15 y 22.** Partidores usados para amplificar las secuencias satelitales BSR y HSatII de los cromosomas 15 y 22, respectivamente.

Nombre	Satélite	Cromosoma	Partidor	Secuencia (5' -> 3')	Amplicón (pb)
Chr15_731/BSR	BSR	15	Fw	CTC TGC ACC TTG AAG ATG TGA CTC	88
			Rv	TTG GAT GAA AGG CCC AGC CAT A	
Chr15_967/BSR	BSR	15	Fw	AGG AAG CAT AAG GAC CTG TCT GTG	82
			Rv	ACC CTT TGT GGC AGG TTT CAG T	
Chr22_854/HSatII	HSatII	22	Fw	ATG GAC TCG AAT GGA ACC ATC	125
			Rv	TTC CGT CGA TTC TTT TCG ATG	
Chr22_170/HSatII	HSatII	22	Fw	CAT CGA ATG GAC TCG AAT GGA AAC	146
			Rv	GGA TTC CAA TCG AGC CCA TTC A	
Chr22_233/HSatII	HSatII	22	Fw	GAA ACC GAA TGG AAT CAT CGA G	177
			Rv	TTC CAT TCG CTG ATG TTT CC	
Chr22_650/HSatII	HSatII	22	Fw	ATC GTT GAA TGG GCT CGA ATG G	111
			Rv	TTC CGT TCG ATG CTG ATT CCG T	
Chr22_944/HSatII	HSatII	22	Fw	TCG GAT GGA ATC ATT GAA TGG ACT	84
			Rv	TCC ATT CGA TTC CAT TCG ATG ACG	
Chr22_146/HSatII	HSatII	22	Fw	TGG AGT CAC CAA ATG GAA CCG A	107
			Rv	ATG ATT CCA TTG GAT TCC ATG CGA	
Chr22_752/HSatII	HSatII	22	Fw	CGA ATG GAA TCA TGG ATC GGA GTT	90
			Rv	CGA TGT TGA TTC CAT TCG AGT CCA	



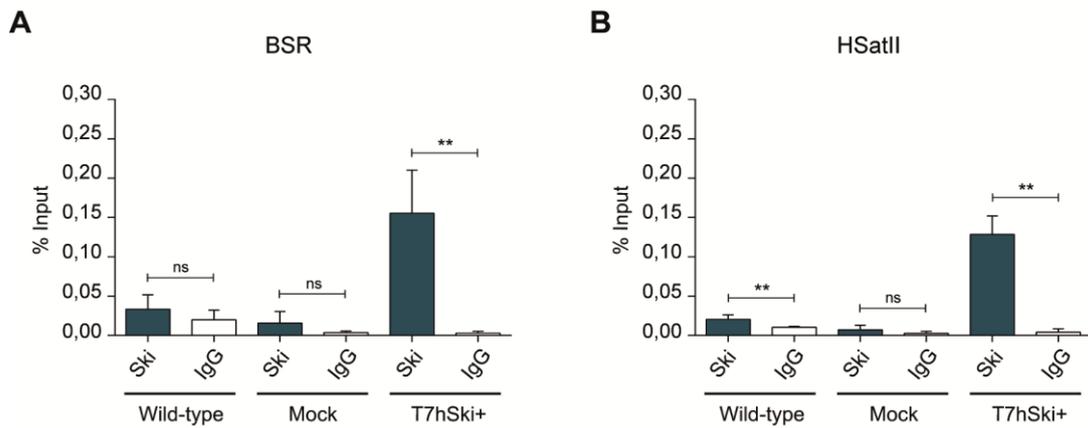
**Figura 15: Localización y eficiencia de partidores para amplificar secuencias satelitales.** Se diseñaron 9 parejas de partidores para amplificar las secuencias satelitales ubicadas en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 15 y 22. **A)** Para el cromosoma 15, se escogió el partidor “Chr15\_731/BSR”, el cual amplifica un producto único (flechas rojas) sobre la secuencia BSR a todas las diluciones probadas en la PCR. Posee una eficiencia de 98,4% y la curva de diluciones presentó una linealidad de  $R^2=0,994$ . **B)** Para el cromosoma 22, se escogió el partidor “Chr22\_146/HSatII”, el cual amplifica un producto único (flechas amarillas) sobre la secuencia HSatII a todas las diluciones probadas en la PCR. Posee una eficiencia de 117,6% y la curva de diluciones presentó una linealidad de  $R^2=0,997$ .

#### 4.4 Determinación de la presencia de Ski en secuencias satelitales II y $\beta$ en cromosomas mitóticos de células MCF7 y MCF10A.

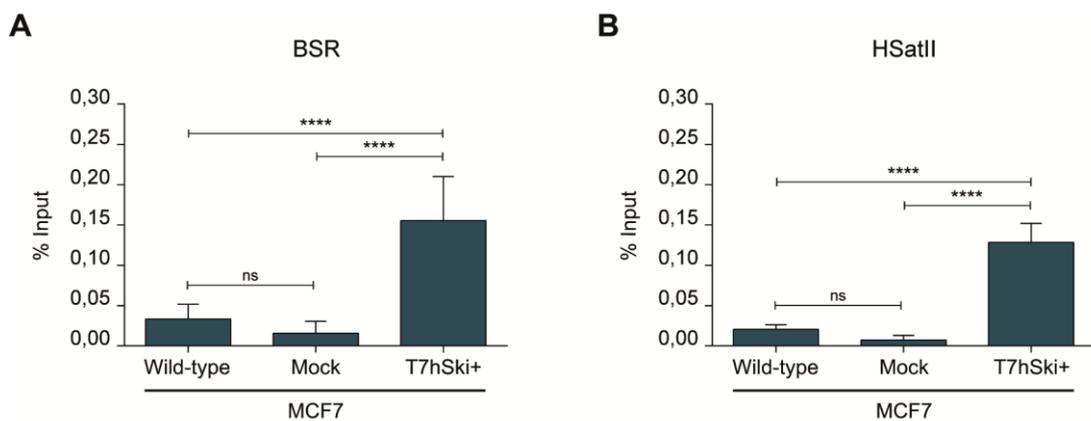
Resultados previos de nuestro laboratorio (no publicados), mostraron que Ski se localiza en regiones pericentroméricas de algunos cromosomas mitóticos en MEFs. Por su parte, en células humanas, los estudios de inmunofluorescencia sugieren que Ski también se localiza en las regiones pericentroméricas de algunos cromosomas acrocéntricos. Para confirmar esta localización de Ski en cromosomas humanos, evaluamos la presencia de esta proteína asociada a secuencias satélites de cromosomas mitóticos.

Para demostrar si Ski se une a los satélites  $\beta$  y II de cromosomas mitóticos de células MCF7 y MCF10A, se utilizaron células MCF7 *wild-type*, MCF7-Mock, MCF7-T7hSki+; y células MCF10A *wild-type*, MCF10A shc y MCF10A shSki. Estos cultivos fueron sincronizados en fase M del ciclo celular y se realizó una ChIP-qPCR sobre ellas, utilizando anticuerpos para inmunoprecipitar Ski (isotipo conejo) e IgG (isotipo conejo) como control de IP. Finalmente, los DNAs eluidos se amplificaron por qPCR, utilizando los partidores “Chr15\_731/BSR” y “Chr22\_146/HSatII” para DNA satélite  $\beta$  y II, distribuidos en regiones pericentroméricas del cromosoma 15 y 22, respectivamente. Los resultados se expresaron en relación al “*Input*” de cada experimento (cromatina total sin inmunoprecipitar).

En células mitóticas MCF7 se realizaron tres experimentos independientes para las líneas *wild-type*, Mock y T7hSki+, en las cuales se comparó el porcentaje de Input (% Input) obtenido para Ski e IgG asociado a las secuencias BSR y HSatII. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que en la secuencia BSR, sólo se detectó la presencia de Ski por IP en las células MCF7-T7hSki+ (**Fig. 16A**). Por otra parte, sobre HSatII, en las células MCF7 *wild-type* y T7hSki+ encontramos diferencias significativas respecto a IgG (**Fig. 16B**). Cuando las tres líneas celulares se compararon entre sí, la sobre-expresión de Ski mostró un enriquecimiento de la ocupancia de esta proteína sobre las secuencias BSR y HSatII en las células MCF7-T7hSki+. Más aún, no se encontraron diferencias entre las líneas *wild-type* y Mock (**Fig. 17A y B**).



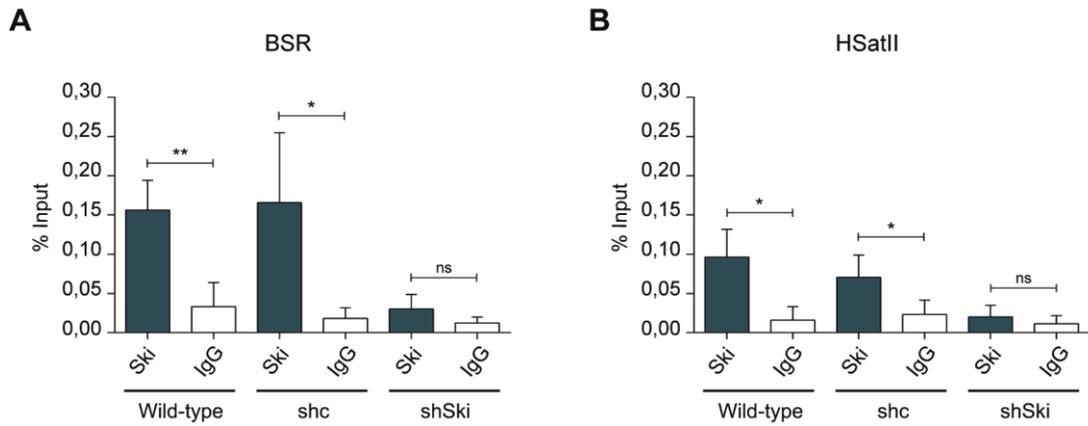
**Figura 16: Presencia de Ski en secuencias satelitales de células mitóticas MCF7.** Las células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ se sincronizaron en mitosis y la presencia de Ski en las regiones BSR y HSatII se evaluó mediante CHIP-qPCR, usando un anticuerpo contra Ski. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*  $p < 0,01$ ; ns: no significativo).



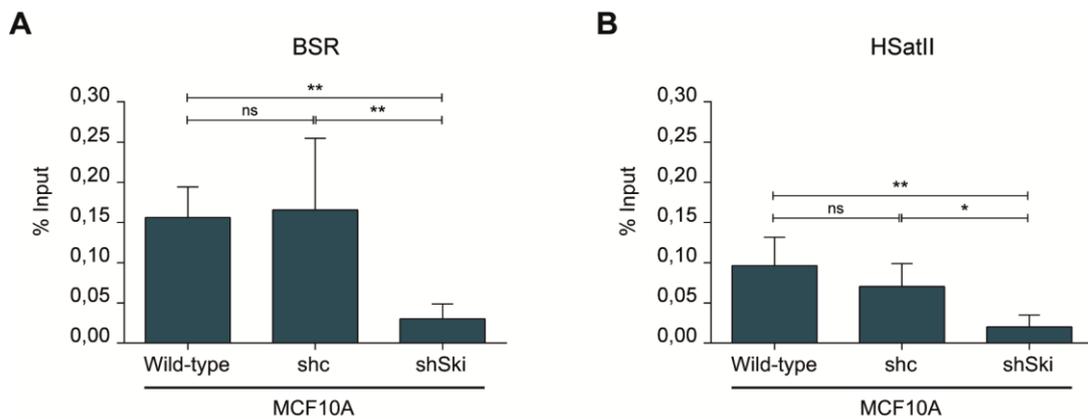
**Figura 17: Enriquecimiento de la ocupancia de Ski en secuencias satelitales de células mitóticas MCF7.** Los resultados de CHIP en células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ sincronizadas en mitosis se compararon entre sí para establecer la ocupancia de Ski sobre regiones satelitales humanas. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*\*\*  $p < 0,001$ ; ns: no significativo).

En células mitóticas MCF10A, se realizaron tres experimentos independientes para las líneas *wild-type*, *shc* y *shSki*, en las cuales se comparó el % de Input obtenido para Ski e IgG sobre las secuencias BSR y HSatII. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que la inmunoprecipitación de Ski tanto en el BSR como en HSatII, fue posible sólo en las células MCF10A *wild-type* y *shc* (**Fig. 18A y B**). Cuando las tres líneas celulares se compararon entre sí, el silenciamiento de Ski en las células MCF10A *shSki* mostró una disminución en la ocupancia de esta proteína sobre las secuencias BSR y HSatII. Más aún, no se encontraron diferencias entre las líneas *wild-type* y *shc* (**Fig 19A y B**).

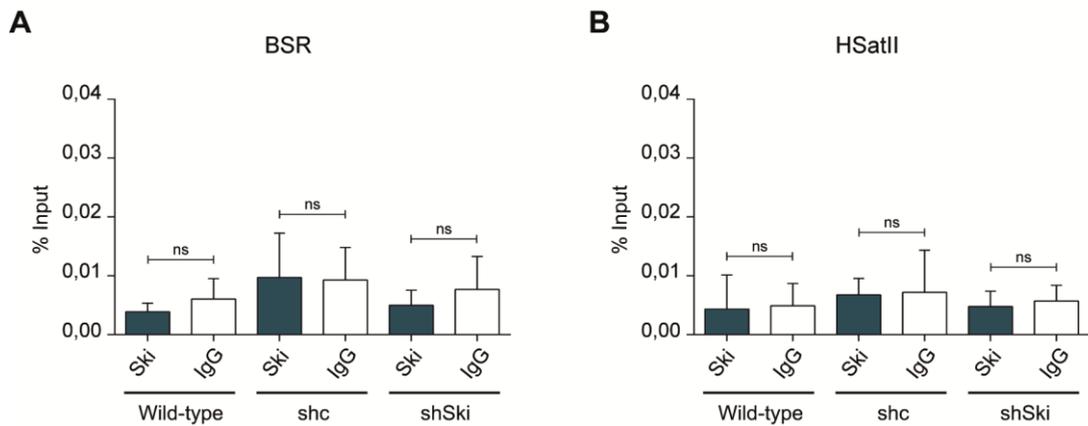
Debido a que Ski mostró una ocupancia de los satélites BSR y HSatII en células mitóticas, evaluamos si su presencia en estas regiones es restrictiva en la fase M o si esta localización se mantiene en otras fases del ciclo celular. Para ello, utilizamos células MCF10A asincrónicas, las cuales se encuentran mayoritariamente en interfase (**Fig. 13B**) y realizamos ChIP-qPCR sobre ellas, con la misma metodología antes evaluada. En las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki*, encontramos que la inmunoprecipitación de Ski en la región satelital BSR no mostró diferencias significativas respecto a IgG (**Fig. 20A**), y este fenómeno también se apreció sobre el HSatII (**Fig. 20B**). Más aún, cuando se compararon las tres líneas, no se evidenció diferencia entre ellas, en ambas secuencias satelitales (**Fig. 21A y B**).



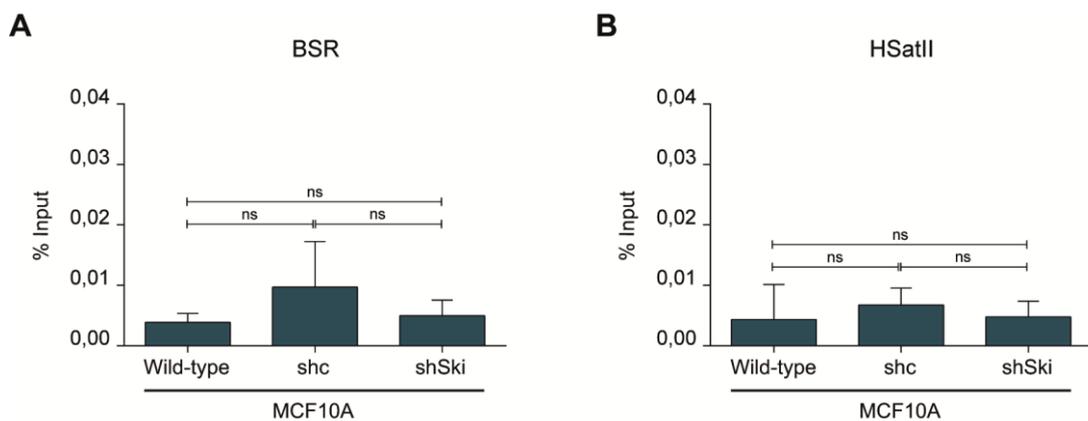
**Figura 18: Presencia de Ski en secuencias satelitales de células mitóticas MCF10A.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se sincronizaron en mitosis y la presencia de Ski en las regiones BSR y HSatII se evaluó mediante CHIP-qPCR, usando un anticuerpo contra Ski. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; ns: no significativo).



**Figura 19: Enriquecimiento de la ocupancia de Ski en secuencias satelitales de células mitóticas MCF10A.** Los resultados de CHIP en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* sincronizadas con colcemid se compararon entre sí para establecer la ocupancia de Ski sobre regiones satelitales humanas. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; ns: no significativo).



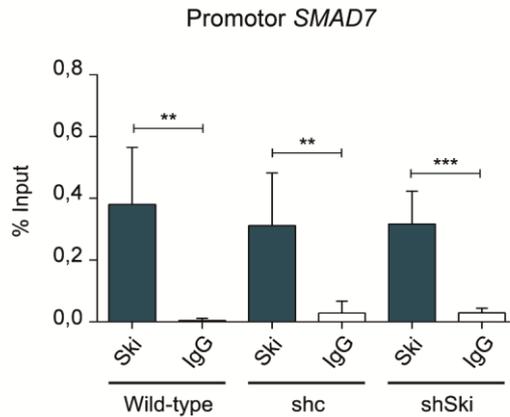
**Figura 20: Ausencia de Ski en secuencias satelitales de células asincrónicas MCF10A.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se cultivaron hasta un 80% de confluencia y la presencia de Ski en las regiones BSR y HSatII se evaluó mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra Ski. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (ns: no significativo).



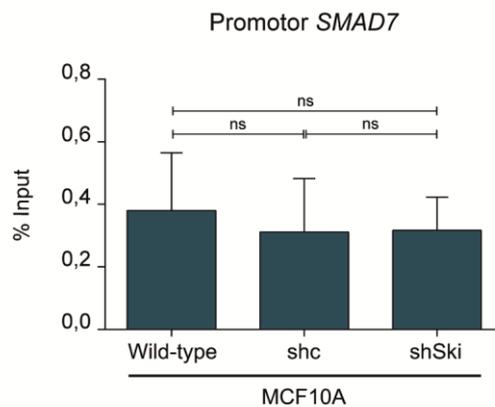
**Figura 21: Enriquecimiento de la ocupancia de Ski en secuencias satelitales de células asincrónicas MCF10A.** Los resultados de ChIP en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* no sincronizadas se compararon entre sí para establecer la ocupancia de Ski sobre regiones satelitales humanas. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (ns: no significativo).

En células humanas asincrónicas, se ha documentado que la proteína Ski se encuentra localizada sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*. En dicha secuencia, Ski forma complejos proteicos con actividad desacetilasa y metiltransferasa de histonas para mantener el estado represivo en ese promotor<sup>41</sup>. Por este motivo, se evaluó la presencia de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*, como control positivo.

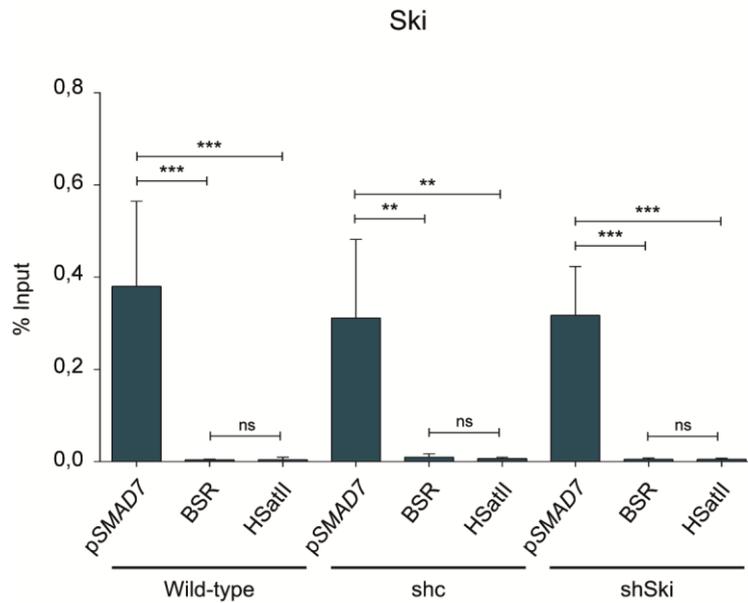
Utilizando la misma metodología de ChIP-qPCR sobre las células MCF10A *wild-type*, shc y shSki, encontramos que en el motivo SBE del promotor de *SMAD7*, la inmunoprecipitación de Ski mostró diferencias significativas respecto a IgG en las tres líneas celulares (**Fig. 22**). Más aún, cuando las células fueron comparadas entre sí, no se detectaron diferencias entre ellas (**Fig. 23**). Finalmente, comparamos la ocupancia de Ski en el promotor de *SMAD7* con la encontrada sobre los satélites BSR y HSatII, demostrando que la presencia de Ski sobre estas secuencias satelitales en las tres líneas estudiadas es significativamente menor respecto al promotor de *SMAD7* (**Fig. 24**).



**Figura 22: Presencia de Ski en el promotor de *SMAD7* en células asincrónicas MCF10A.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se cultivaron hasta un 80% de confluencia y la presencia de Ski en el promotor de *SMAD7* se evaluó mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra Ski. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentaje de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



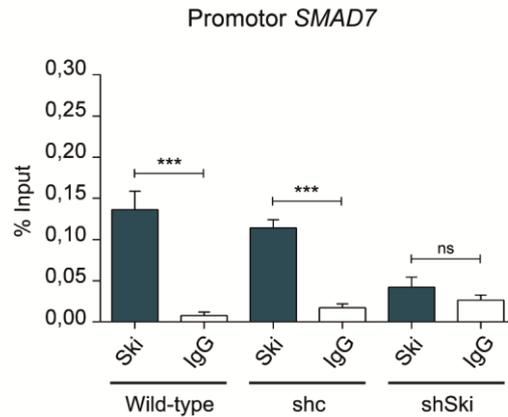
**Figura 23: Enriquecimiento de la ocupancia de Ski en el promotor de *SMAD7* en células asincrónicas MCF10A.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7* en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* no sincronizadas se compararon entre sí para establecer la ocupancia de Ski sobre el motivo SBE de células MCF10A. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* obtenido en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (ns: no significativo).



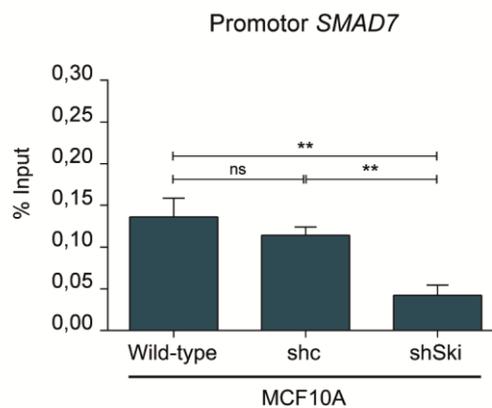
**Figura 24: Ocupancia de Ski en el promotor de *SMAD7* y en secuencias satelitales de células asincrónicas MCF10A.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7*, secuencias BSR y HSatII en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* no sincronizadas se compararon entre sí para evaluar los niveles de ocupancia de Ski en dichas regiones. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* y las secuencias satelitales BSR y HSatII en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que, en ausencia de TGF $\beta$ , la proteína Ski se mantiene ocupando, durante la mitosis, los promotores de un clúster de genes *mmp*, específicamente en el motivo SBE. Además, su presencia estaba asociada a un enriquecimiento de H3K9me3 en esas secuencias (resultados no publicados). Por esta razón, evaluamos si la proteína Ski mantiene su ocupancia sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* en mitosis, iniciando nuestro estudio con las células MCF10A, dado que mostraron ocupancia de la proteína Ski sobre dicho promotor en estado asincrónico.

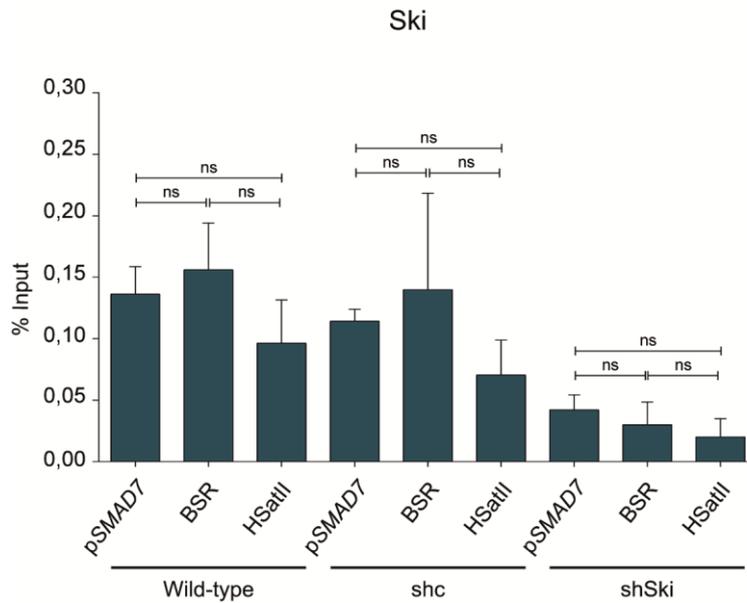
En células MCF10A mitóticas, se realizaron tres experimentos independientes para las líneas *wild-type*, *shc* y *shSki*, en las cuales se comparó el % de Input obtenido para Ski e IgG sobre el promotor de *SMAD7*. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que la inmunoprecipitación de Ski fue significativa en las células MCF10A *wild-type* y *shc*, pero no en MCF10A *shSki* (**Fig. 25**). Más aún, cuando las células fueron comparadas entre sí, el silenciamiento de Ski generó diferencias significativas respecto a las líneas *wild-type* y *shc* (**Fig. 26**). Finalmente, la ocupancia de Ski en el promotor de *SMAD7* respecto a la encontrada sobre los satélites BSR y HSatII, no mostró diferencias significativas cuando se compararon entre sí en las tres líneas celulares estudiadas (**Fig. 27**).



**Figura 25: Presencia de Ski en el promotor de *SMAD7* en células mitóticas MCF10A.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se sincronizaron en mitosis y la presencia de Ski en el promotor de *SMAD7* se evaluó mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra Ski. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).

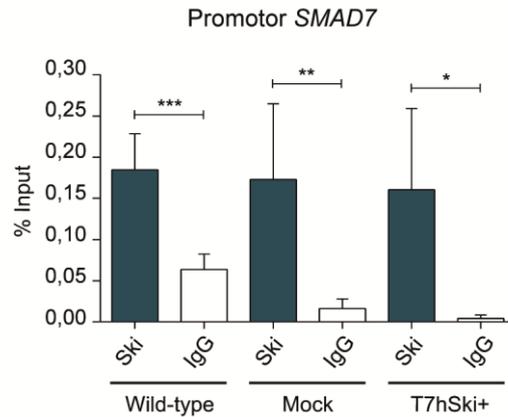


**Figura 26: Enriquecimiento de la ocupancia de Ski en el promotor de *SMAD7* de células mitóticas MCF10A.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7* en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* sincronizadas con colcemid se compararon entre sí para establecer la ocupancia de Ski sobre el motivo SBE. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* obtenido en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; ns: no significativo).

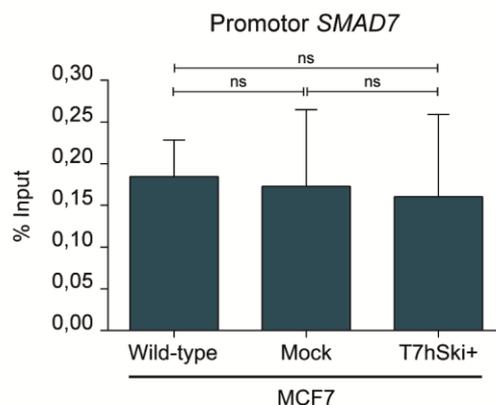


**Figura 27: Ocupancia de Ski en el promotor de *SMAD7* y en secuencias satelitales de células mitóticas MCF10A.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7*, secuencias BSR y HSatII en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* sincronizadas con colcemid se compararon entre sí para evaluar los niveles de ocupancia de Ski en dichas regiones. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* y las secuencias satelitales BSR y HSatII en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (ns: no significativo).

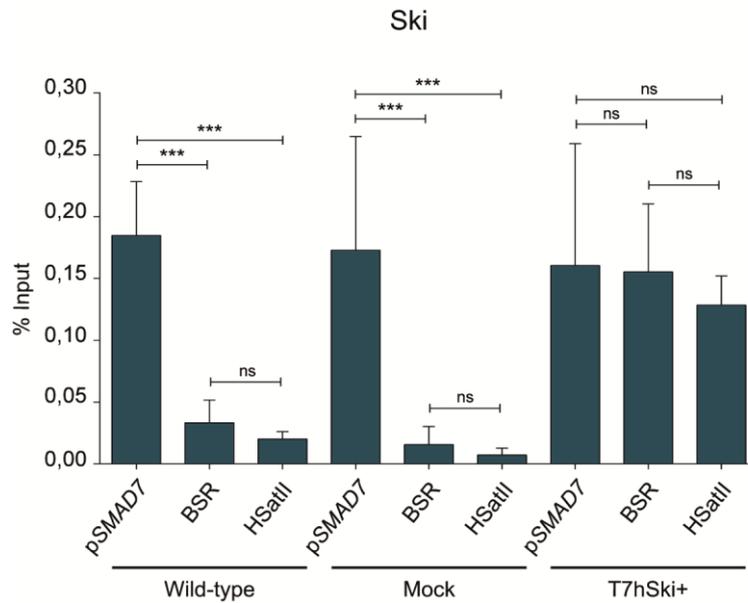
En células mitóticas MCF7, se realizaron tres experimentos independientes para las líneas *wild-type*, Mock y T7hSki+, en las cuales se comparó el porcentaje de Input (% Input) obtenido para Ski e IgG sobre el promotor de *SMAD7*. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que la inmunoprecipitación de Ski fue significativa en las tres líneas celulares (**Fig. 28**). Por otra parte, cuando las células se compararon entre sí, no se evidenciaron diferencias entre ellas (**Fig. 29**). Finalmente, la ocupancia de Ski en el promotor de *SMAD7* respecto a la encontrada sobre los satélites BSR y HSatII mostró diferencias significativas sólo en las células *wild-type* y Mock, no así en las MCF7-T7hSki+ (**Fig. 30**).



**Figura 28: Presencia de Ski en el promotor de *SMAD7* en células mitóticas MCF7.** Las células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ se sincronizaron en mitosis y la presencia de Ski en el promotor de *SMAD7* se evaluó mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra Ski. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



**Figura 29: Enriquecimiento de la ocupancia de Ski en el promotor de *SMAD7* de células mitóticas MCF7.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7* en células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ sincronizadas con colcemid se compararon entre sí para establecer la ocupancia de Ski sobre el motivo SBE. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* obtenido en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (ns: no significativo).



**Figura 30: Ocupancia de Ski en el promotor de *SMAD7* y en secuencias satelitales de células mitóticas MCF7.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7*, secuencias BSR y HSatII en células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki sincronizadas con colcemid se compararon entre sí para evaluar los niveles de ocupancia de Ski en dichas regiones. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de Ski sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* y las secuencias satelitales BSR y HSatII en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).

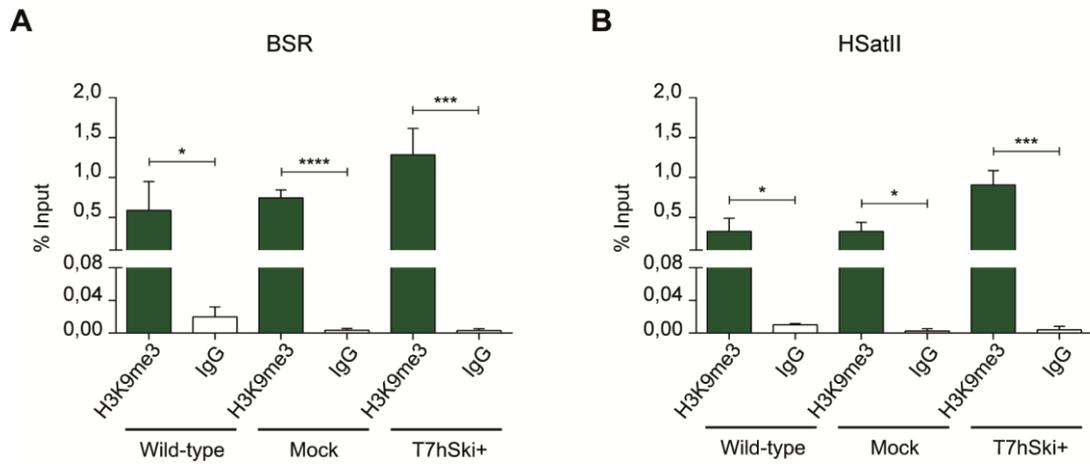
#### 4.5 Evaluación del efecto de Ski sobre la tri-metilación y acetilación de la H3K9 en secuencias satelitales II y $\beta$ en células mitóticas MCF7 y MCF10A.

La heterocromatina pericentromérica se caracteriza por poseer DNA altamente metilado, histonas hipoacetiladas y metiladas. Entre estas modificaciones, la marca de la H3K9me3 es esencial para el reclutamiento de HP-1 y el establecimiento de estas regiones. Resultados no publicados de nuestro laboratorio muestran que en MEFs sincronizados en mitosis, Ski se localiza en regiones pericentroméricas, específicamente sobre el satélite mayor (MaSat), y la presencia de la proteína se asocia con mayores niveles de la marca H3K9me3 en estas regiones.

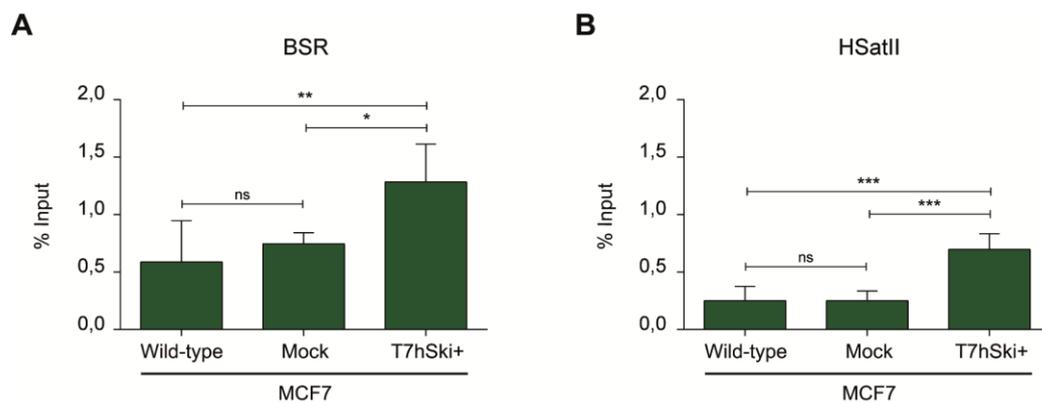
Para evaluar el efecto de Ski sobre el estado de trimetilación y acetilación de la H3K9 sobre las secuencias BSR y HSatII durante la mitosis, utilizamos ChIP-qPCR en células MCF7 *wild-type*, MCF7-Mock, MCF7-T7hSki+, y células MCF10A *wild-type*, MCF10A shc y MCF10A shSki. Estos cultivos fueron sincronizados en fase M del ciclo celular y se inmunoprecipitó con anticuerpos contra H3K9me3 (isotipo conejo), IgG (isotipo conejo), H3K9ac (isotipo ratón) e IgG (isotipo ratón). Finalmente, los DNAs eluidos se amplificaron por qPCR, utilizando los partidores “Chr15\_731/BSR” y “Chr22\_146/HSatII” contra DNA satélite  $\beta$  y II. Los resultados fueron expresados en relación al Input de cada experimento (cromatina total sin inmunoprecipitar).

Se realizaron tres experimentos independientes en las líneas celulares MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ mitóticas. En estos se comparó el % de Input obtenido para H3K9me3 e IgG sobre las secuencias BSR y HSatII. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que, en BSR y en HSatII, la inmunoprecipitación de H3K9me3 fue positiva en las 3 líneas celulares (**Fig. 31A y B**). Cuando estas células fueron comparadas entre sí, encontramos que en las células MCF7-T7hSki+ que sobre-expresan Ski, el enriquecimiento de la marca H3K9me3 fue significativamente mayor respecto a las líneas *wild-type* y Mock, tanto en las secuencias BSR como en HSatII. Más aún, no se detectaron diferencias entre las líneas *wild-type* y Mock (**Fig. 32A y B**). Por otra parte, se realizó el mismo procedimiento para la marca H3K9ac, la cual mostró una inmunoprecipitación positiva en las 3 líneas celulares sobre el BSR y HSatII (**Fig. 33A y B**). Sin embargo, la

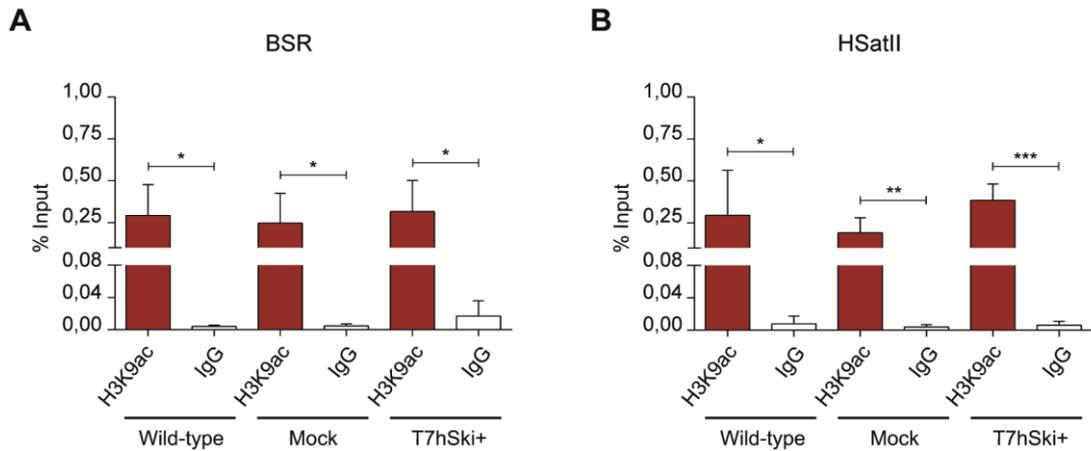
sobreexpresión de Ski no tuvo efecto sobre los niveles de H3K9ac en las secuencias BSR ni en HSatII (Fig. 34A y B).



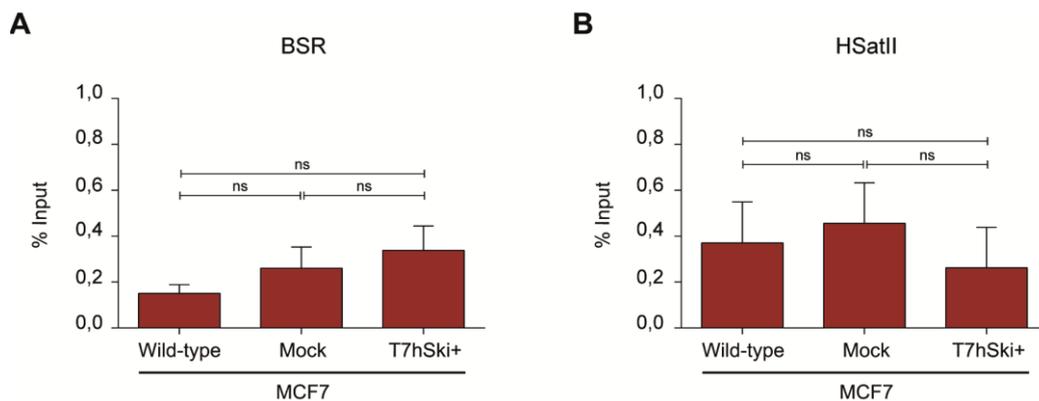
**Figura 31: Niveles de H3K9me3 en secuencias satelitales de células mitóticas MCF7.** Las células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ se sincronizaron en mitosis y los niveles de H3K9me3 en las regiones BSR y HSatII se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9me3. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Figura 32: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9me3 en secuencias satelitales de células mitóticas MCF7.** Los resultados de ChIP en células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ sincronizadas en mitosis se compararon entre sí para determinar el efecto de la sobre-expresión de Ski sobre los niveles de la H3K9me3 en regiones satelitales humanas. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).



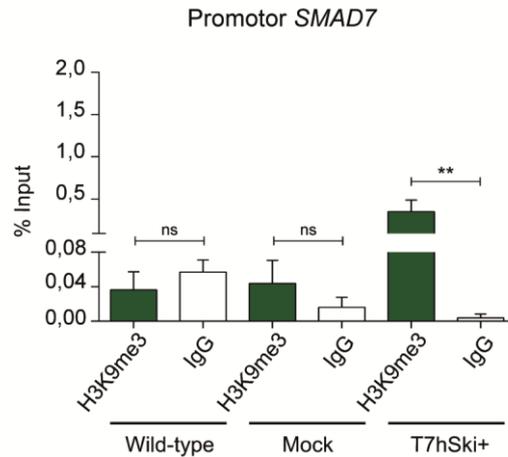
**Figura 33: Niveles de H3K9ac en secuencias satelitales de células mitóticas MCF7.** Las células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ se sincronizaron en mitosis y los niveles de H3K9ac en las regiones BSR y HSatII se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9ac. Como control negativo, se utilizó IgG normal de ratón. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



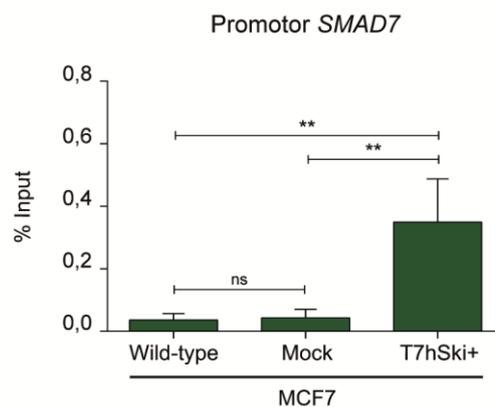
**Figura 34: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9ac en secuencias satelitales de células mitóticas MCF7.** Los resultados de ChIP en células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ sincronizadas en mitosis se compararon entre sí para determinar el efecto de la sobre-expresión de Ski sobre los niveles de la H3K9ac en regiones satelitales humanas. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (ns: no significativo).

Dado que en células MCF7 mitóticas evidenciamos que Ski ocupa el motivo SBE del promotor de *SMAD7*, evaluamos los niveles de H3K9me3 y H3K9ac de dicho promotor para establecer una relación del efecto de la sobre-expresión de Ski sobre regiones satelitales BSR y HSatII respecto a un gen blanco de Ski. Para ello, se realizaron tres experimentos independientes para las líneas *wild-type*, Mock y T7hSki+, en las cuales se comparó el % de Input obtenido para H3K9me3 e IgG (isotipo conejo), H3K9ac e IgG (isotipo ratón) sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que la inmunoprecipitación de H3K9me3 fue positiva sólo en MCF7-T7hSki+ (**Fig. 35**), siendo el enriquecimiento de la marca H3K9me3 significativamente mayor en las células que sobre-expresan Ski respecto a las líneas *wild-type* y Mock (**Fig. 36**). Finalmente, los niveles de H3K9me3 en el promotor de *SMAD7* fueron comparados con los niveles encontrados en las secuencias satelitales BSR y HSatII. En los tres tipos celulares, los niveles de H3K9me3 del promotor de *SMAD7* fueron significativamente menores respecto al BSR y HSatII (**Fig. 37**).

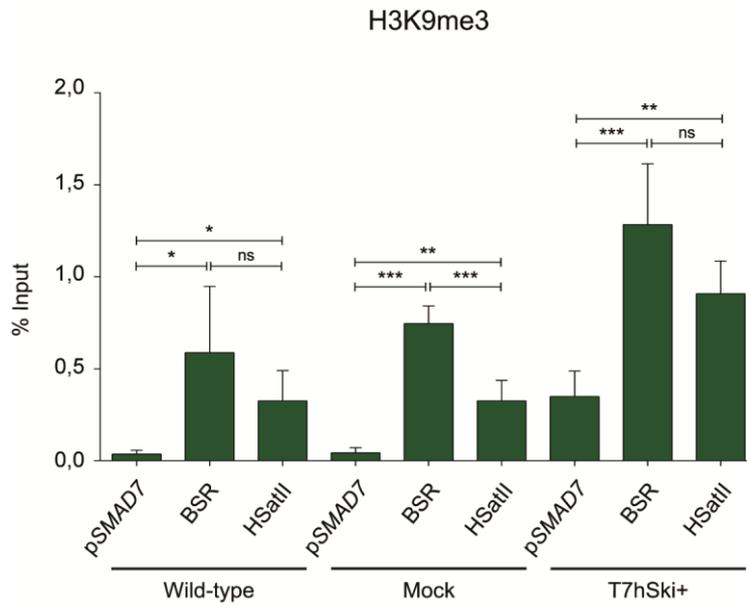
Por otra parte, se realizó el mismo procedimiento para la marca H3K9ac, la cual mostró una inmunoprecipitación positiva en las tres líneas celulares sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* (**Fig. 38**). Los niveles encontrados en la línea T7hSki+ fueron significativamente menores respecto a las líneas *wild-type* y Mock (**Fig. 39**). Finalmente, los niveles de H3K9ac en el promotor de *SMAD7* se compararon con los niveles encontrados en las secuencias satelitales BSR y HSatII. En las líneas *wild-type* y Mock, la marca de H3K9ac fue significativamente superior a las secuencias satelitales, sin embargo, la sobre-expresión de Ski, en las células MCF7-T7hSki+, disminuyó los niveles de acetilación hasta no presentar diferencias significativas respecto a las secuencias satelitales estudiadas (**Fig. 40**).



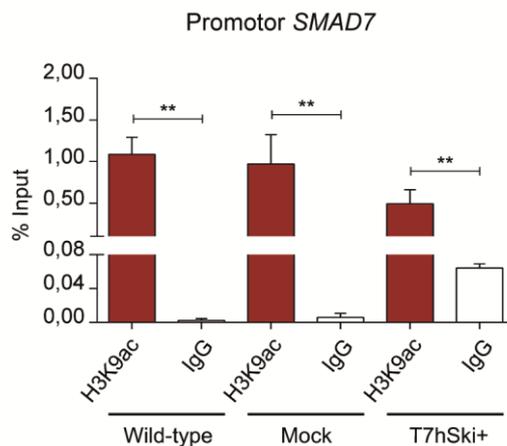
**Figura 35: Niveles de H3K9me3 en el promotor de SMAD7 de células mitóticas MCF7.** Las células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ se sincronizaron en mitosis y los niveles de H3K9me3 en el promotor de SMAD7 se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9me3. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre el motivo SBE del promotor de SMAD7. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; ns: no significativo).



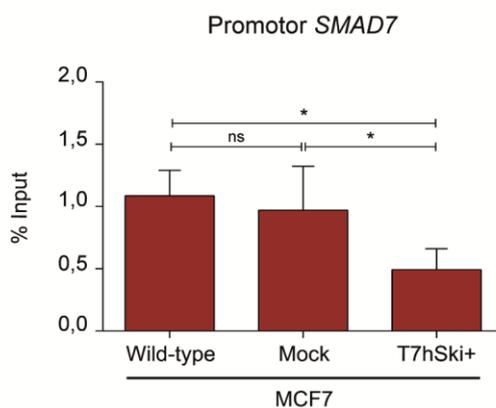
**Figura 36: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9me3 en el promotor de SMAD7 de células mitóticas MCF7.** Los resultados de ChIP en el promotor de SMAD7 en células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ sincronizadas con colcemid se compararon entre sí para determinar el efecto de la sobre-expresión de Ski sobre los niveles de la H3K9me3 sobre el motivo SBE. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre el motivo SBE del promotor de SMAD7 obtenido en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; ns: no significativo).



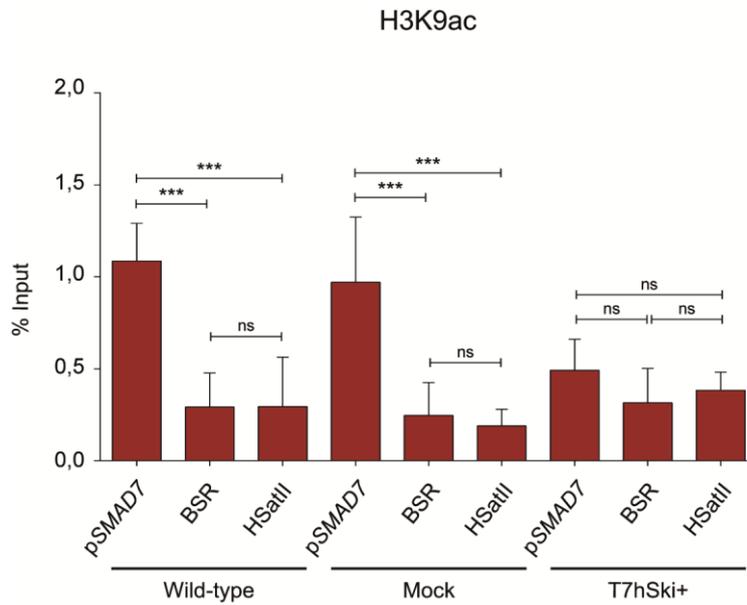
**Figura 37: Niveles de H3K9me3 en el promotor de *SMAD7* y en secuencias satelitales de células mitóticas MCF7.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7*, secuencias BSR y HSatII en células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki sincronizadas en mitosis se compararon entre sí para relacionar la sobre-expresión de Ski con los niveles de H3K9me3 en dichas regiones. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* y las secuencias satelitales BSR y HSatII en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).



**Figura 38: Niveles de H3K9ac en el promotor de *SMAD7* de células mitóticas MCF7.** Las células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ se sincronizaron en mitosis y los niveles de H3K9ac en el promotor de *SMAD7* se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9ac. Como control negativo, se utilizó IgG normal de ratón. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ).

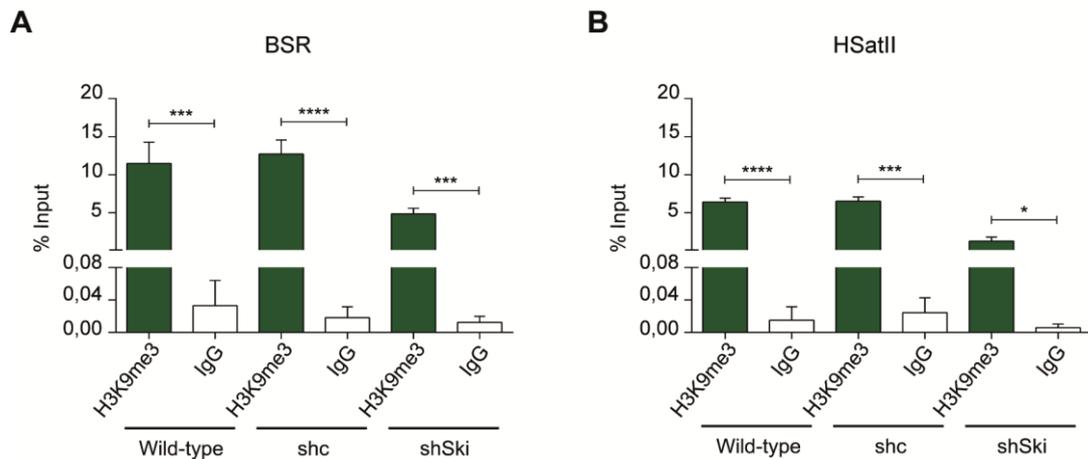


**Figura 39: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9ac en el promotor de *SMAD7* de células mitóticas MCF7.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7* en células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+ sincronizadas con colcemid se compararon entre sí para determinar el efecto de la sobre-expresión de Ski sobre los niveles de la H3K9ac sobre el motivo SBE. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* obtenido en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; ns: no significativo).

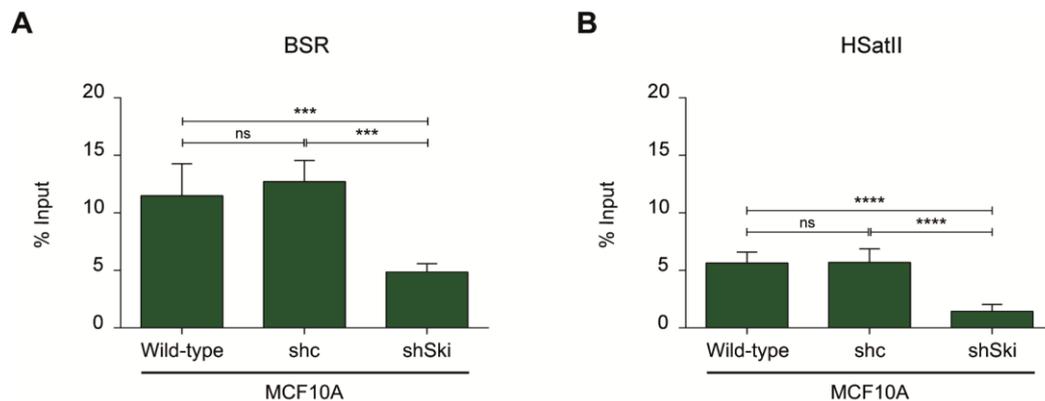


**Figura 40: Niveles de H3K9ac en el promotor de *SMAD7* y en secuencias satelitales de células mitóticas MCF7.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7*, secuencias BSR y HSatII en células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki sincronizadas en mitosis se compararon entre sí para relacionar la sobre-expresión de Ski con los niveles de H3K9ac en dichas regiones. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* y las secuencias satelitales BSR y HSatII en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).

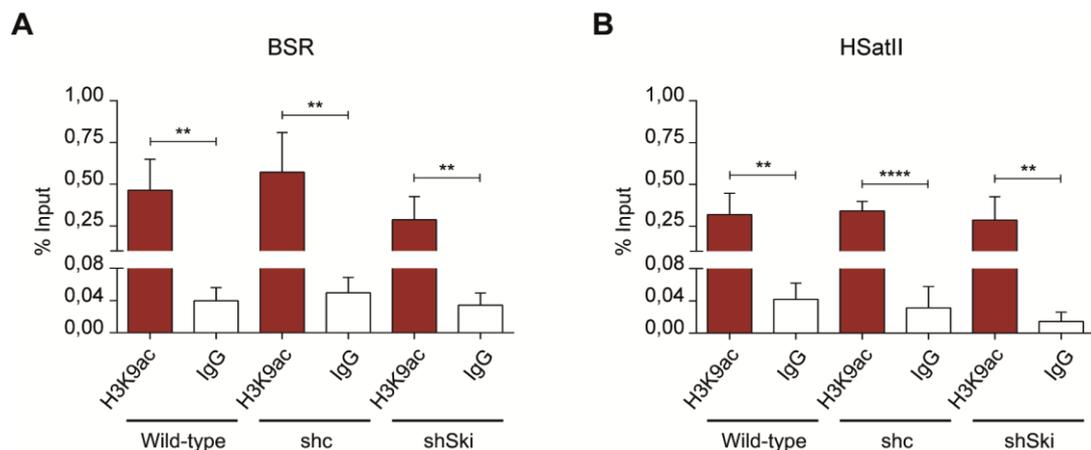
En células mitóticas MCF10A, se realizaron tres experimentos independientes para las líneas *wild-type*, Mock y T7hSki+, en las cuales se comparó el % de Input obtenido para H3K9me3 e IgG sobre las secuencias BSR y HSatII. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que sobre las secuencias BSR y HSatII, la inmunoprecipitación de H3K9me3 fue significativamente positiva en las 3 líneas celulares (**Fig. 41A y B**). Cuando estas células se compararon entre sí, encontramos que las células con niveles disminuidos de Ski (MCF10A shSki) muestran una disminución significativa de la marca H3K9me3 sobre las secuencias BSR y HSatII. No se encontraron diferencias entre las líneas *wild-type* y shc (**Fig. 42A y B**). Por otra parte, el mismo procedimiento realizado para la marca H3K9ac, mostró una inmunoprecipitación positiva en las tres líneas celulares sobre el BSR y HSatII (**Fig. 43A y B**). Al comparar estas células entre sí, no se encontraron diferencias en los niveles de H3K9ac en las secuencias BSR y HSatII (**Fig. 44A y B**).



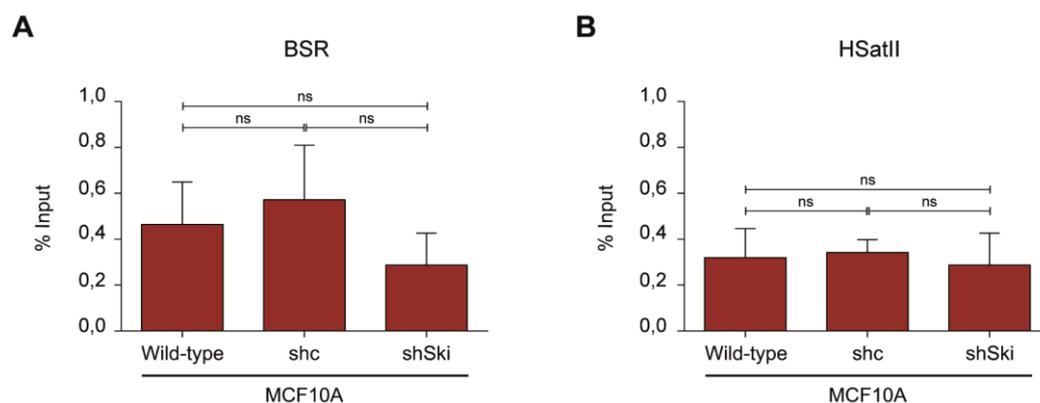
**Figura 41: Niveles de H3K9me3 en secuencias satelitales de células mitóticas MCF10A.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se sincronizaron en mitosis y los niveles de H3K9me3 en las regiones BSR y HSatII se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9me3. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Figura 42: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9me3 en secuencias satelitales de células mitóticas MCF10A.** Los resultados de ChIP en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* sincronizadas en mitosis se compararon entre sí para determinar el efecto de la disminución de Ski sobre los niveles de la H3K9me3 en regiones satelitales humanas. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ ; ns: no significativo).



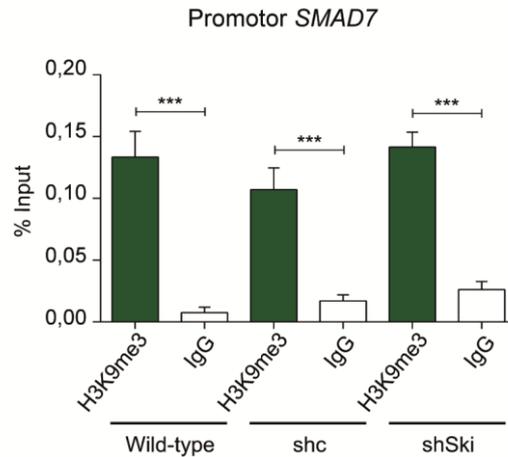
**Figura 43: Niveles de H3K9ac en secuencias satelitales de células mitóticas MCF10A.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se sincronizaron en mitosis y los niveles de H3K9ac en las regiones BSR y HSatII se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9ac. Como control negativo, se utilizó IgG normal de ratón. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ ).



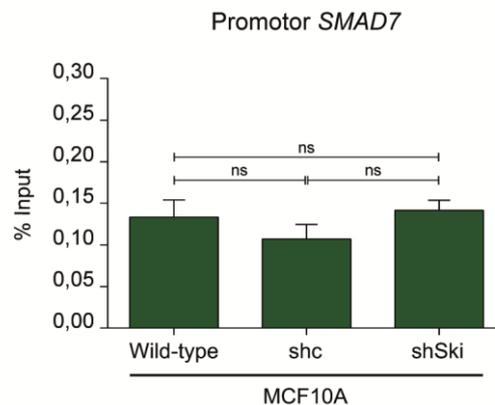
**Figura 44: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9ac en secuencias satelitales de células mitóticas MCF10A.** Los resultados de ChIP en células MCF7 *wild-type*, *shc* y *shSki* sincronizadas en mitosis se compararon entre sí para determinar el efecto de la disminución de Ski sobre los niveles de la H3K9ac en regiones satelitales humanas. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (ns: no significativo).

Dado que en células mitóticas MCF10A, Ski también ocupa el motivo SBE del promotor de *SMAD7*, evaluamos los niveles de H3K9me3 y H3K9ac de dicho promotor para establecer una relación del efecto del silenciamiento de Ski sobre regiones satelitales BSR y HSatII respecto a un gen blanco de Ski. Para ello, se realizaron tres experimentos independientes para las líneas *wild-type*, *shc* y *shSki*, en las cuales se comparó el % de Input obtenido para H3K9me3 e IgG (isotipo conejo), H3K9ac e IgG (isotipo ratón) sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que la inmunoprecipitación de H3K9me3 fue significativamente positiva en las tres líneas (**Fig. 45**). Cuando estas células se compararon entre sí, encontramos que el silenciamiento de Ski, en las células MCF10A *shSki* no mostraron diferencias significativas respecto a las líneas *wild-type* y *shc* (**Fig. 46**). Finalmente, los niveles de H3K9me3 en el promotor de *SMAD7* se compararon con los niveles encontrados en las secuencias satelitales BSR y HSatII. Los niveles de H3K9me3 del promotor de *SMAD7* respecto al BSR y HSatII fueron significativamente menores en las líneas *wild-type*, *shc* y *shSki* (**Fig. 47**).

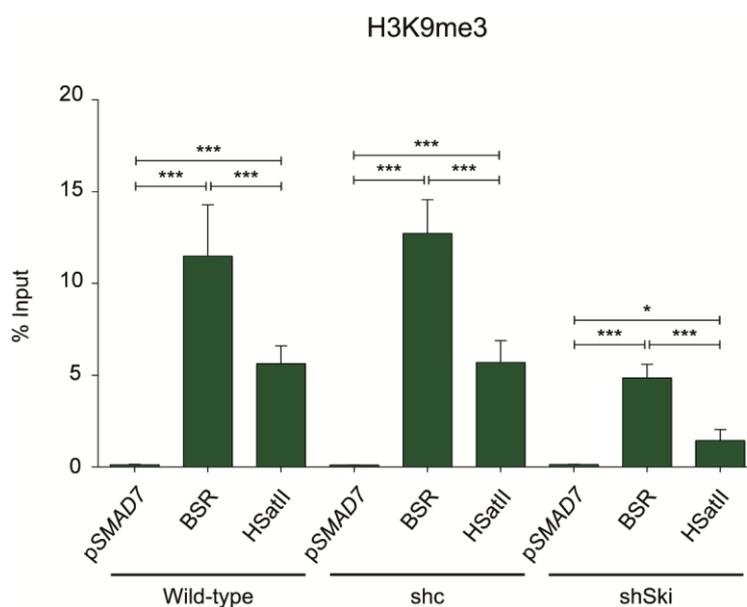
Por otra parte, se realizó un análisis similar para la marca H3K9ac, la cual mostró una inmunoprecipitación positiva en las tres líneas celulares sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* (**Fig. 48**). Al comparar estas células entre sí, se evidencia en las células con niveles reducidos de Ski (MCF10A *shSki*) un aumento significativo de la H3K9ac respecto a las líneas *wild-type* y *shc* (**Fig. 49**). Finalmente, los niveles de H3K9ac en el promotor de *SMAD7* se compararon con los niveles encontrados en las secuencias satelitales BSR y HSatII, no mostrando diferencias significativas en las células *wild-type* y *shc*. Sin embargo, en las células MCF10A *shSki*, la marca de la H3K9ac es significativamente superior en el promotor de *SMAD7* respecto a las secuencias satelitales estudiadas (**Fig. 50**).



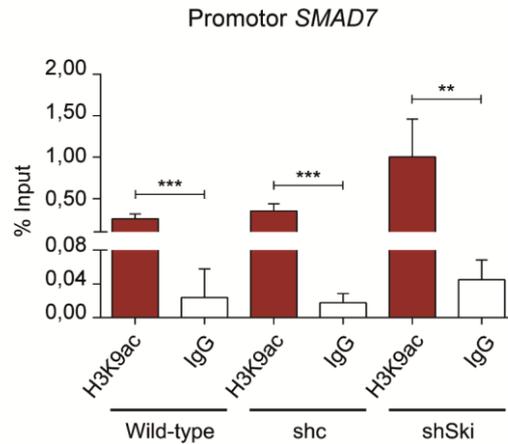
**Figura 45: Niveles de H3K9me3 en el promotor de *SMAD7* de células mitóticas MCF10A.** Las células MCF10A *wild-type*, shc y shSki se sincronizaron en mitosis y los niveles de H3K9me3 en el promotor de *SMAD7* se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9me3. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*. *Wild-type*: Ski endógeno; shc: control de transducción; shSki: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).



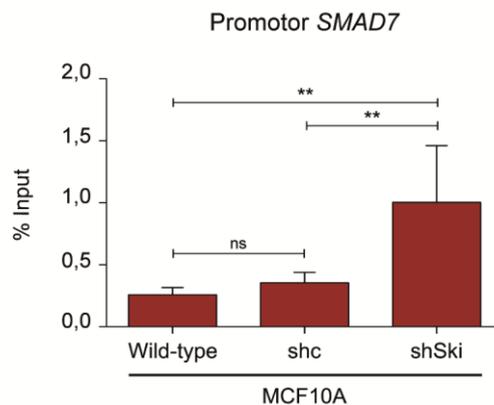
**Figura 46: Efecto de la ausencia de Ski sobre los niveles de H3K9me3 en el promotor de *SMAD7* de células mitóticas MCF10A.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7* en células MCF10A *wild-type*, shc y shSki sincronizadas con colcemid se compararon entre sí para determinar el efecto de la disminución de Ski sobre los niveles de la H3K9me3 sobre el motivo SBE. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* obtenido en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; shc: control de transducción; shSki: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni



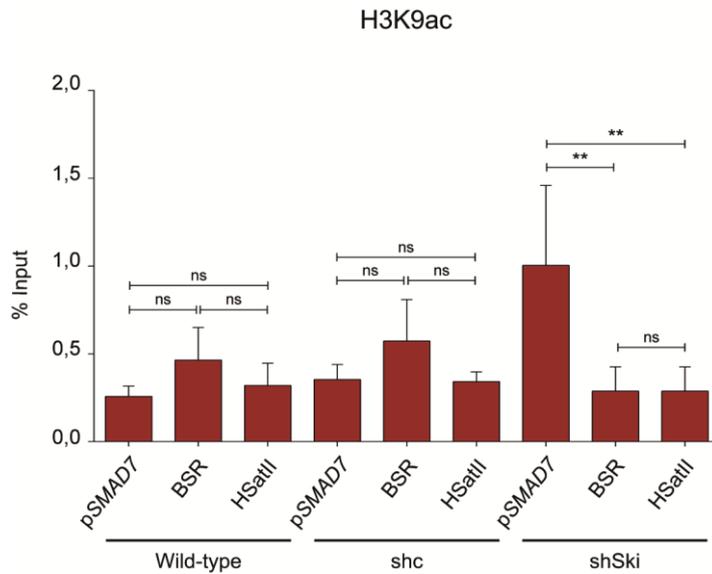
**Figura 47: Niveles de H3K9me3 en el promotor de *SMAD7* y en secuencias satelitales de células mitóticas MCF10A.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7*, secuencias BSR y HSatII en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* sincronizadas en mitosis se compararon entre sí para relacionar la disminución de Ski con los niveles de H3K9me3 en dichas regiones. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* y las secuencias satelitales BSR y HSatII en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).



**Figura 48: Niveles de H3K9ac en el promotor de SMAD7 de células mitóticas MCF10A.** Las células MCF7 *wild-type*, *shc* y *shSki* se sincronizaron en mitosis y los niveles de H3K9ac en el promotor de SMAD7 se evaluaron mediante CHIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9ac. Como control negativo, se utilizó IgG normal de ratón. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre el motivo SBE del promotor de SMAD7. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

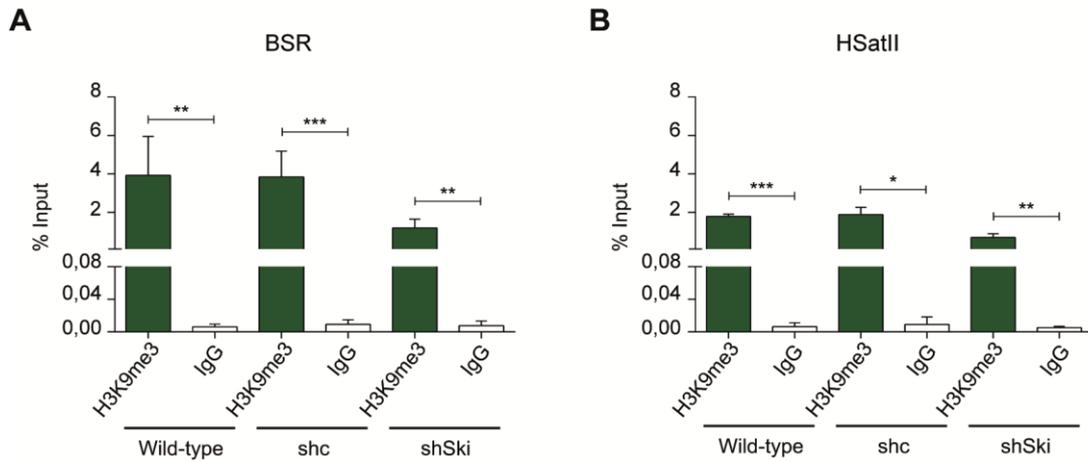


**Figura 49: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9ac en el promotor de SMAD7 de células mitóticas MCF10A.** Los resultados de CHIP en el promotor de SMAD7 en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* sincronizadas con colcemid se compararon entre sí para determinar el efecto de la disminución de Ski sobre los niveles de la H3K9ac sobre el motivo SBE. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre el motivo SBE del promotor de SMAD7 obtenido en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; ns: no significativo).

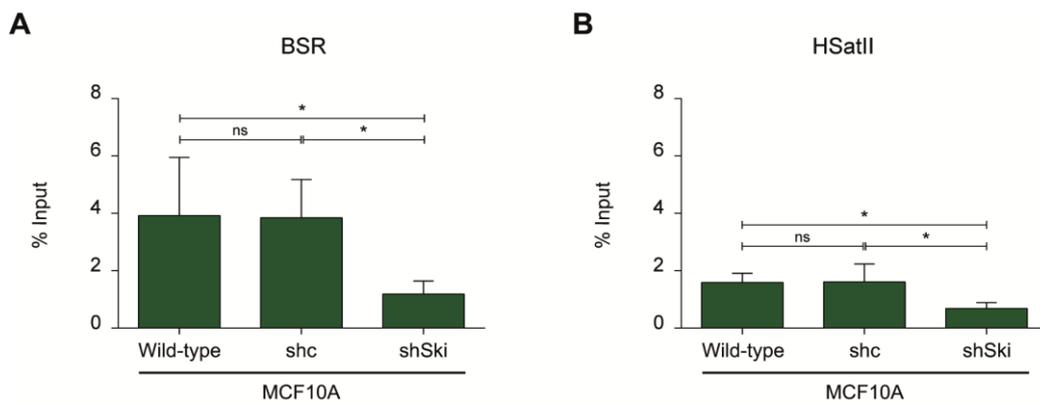


**Figura 50: Niveles de H3K9ac en el promotor de *SMAD7* y en secuencias satelitales de células mitóticas MCF10A.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7*, secuencias BSR y HSatII en células MCF10A *wild-type*, shc y shSki sincronizadas en mitosis se compararon entre sí para relacionar la disminución de Ski con los niveles de H3K9ac en dichas regiones. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* y las secuencias satelitales BSR y HSatII en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; shc: control de transducción; shSki: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; ns: no significativo).

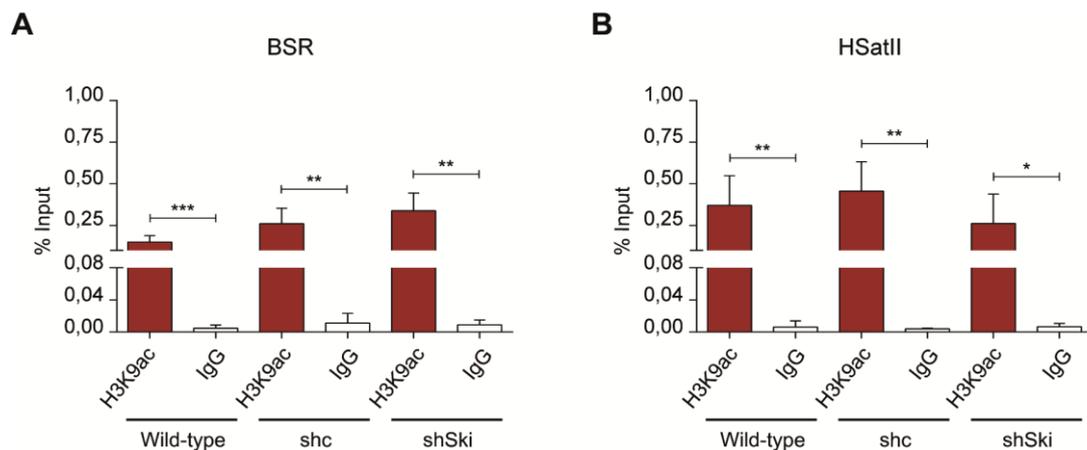
Para evaluar el efecto de la disminución de Ski sobre las modificaciones de H3K9 en células MCF10A no sincronizadas, se realizaron tres experimentos independientes para las líneas *wild-type*, *shc* y *shSki*, en las cuales se comparó el % de Input obtenido para H3K9me3 e IgG sobre las secuencias BSR y HSatII. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que sobre las secuencias BSR y HSatII, la inmunoprecipitación de H3K9me3 fue positiva en las tres líneas celulares (**Fig. 51A y B**). Cuando estas células se compararon entre sí, encontramos que el silenciamiento de Ski, en las células MCF10A *shSki* genera una disminución de la marca H3K9me3 sobre las secuencias BSR y HSatII. No hubo diferencias entre las líneas *wild-type* y *shc* (**Fig. 52A y B**). Por otra parte, el mismo procedimiento fue realizado para la marca H3K9ac, la cual mostró una inmunoprecipitación positiva en las tres líneas celulares sobre el BSR y HSatII (**Fig. 53A y B**). Al comparar estas células entre sí, no se detectaron diferencias en los niveles de H3K9ac en las secuencias BSR y HSatII (**Fig. 54A y B**).



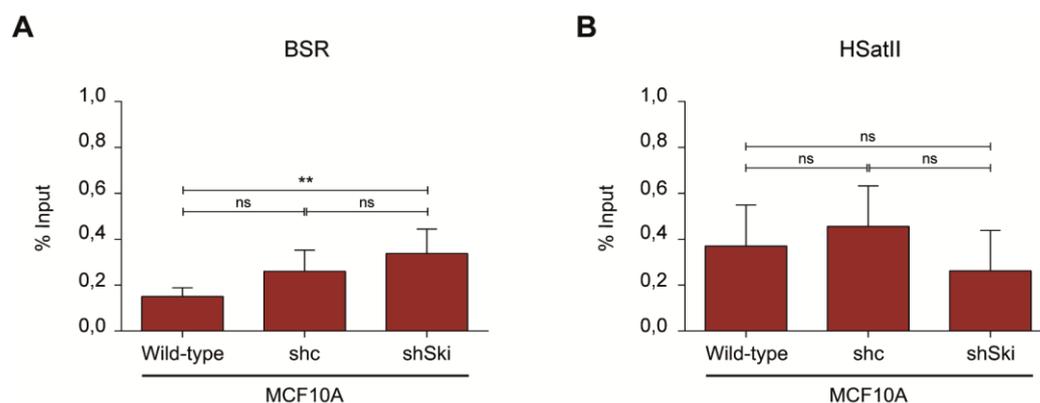
**Figura 51: Niveles de H3K9me3 en secuencias satelitales de células asincrónicas MCF10A.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se cultivaron hasta un 80% de confluencia y los niveles de H3K9me3 en las regiones BSR y HSatII se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9me3. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



**Figura 52: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9me3 en secuencias satelitales de células asincrónicas MCF10A.** Los resultados de ChIP en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* no sincronizadas se compararon entre sí para determinar el efecto de la disminución de Ski sobre los niveles de la H3K9me3 en regiones satelitales humanas. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; ns: no significativo).



**Figura 53: Niveles de H3K9ac en secuencias satelitales de células asincrónicas MCF10A.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se cultivaron hasta un 80% de confluencia y los niveles de H3K9ac en las regiones BSR y HSatII se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9ac. Como control negativo, se utilizó IgG normal de ratón. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

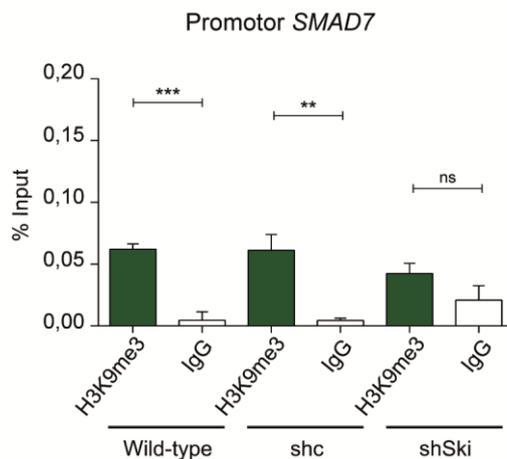


**Figura 54: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9ac en secuencias satelitales de células asincrónicas MCF10A.** Los resultados de ChIP en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* no sincronizadas se compararon entre sí para determinar el efecto de la disminución de Ski sobre los niveles de la H3K9ac en regiones satelitales humanas. **A)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre la secuencia BSR en el cromosoma 15. **B)** Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre la secuencia HSatII en el cromosoma 22. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; ns: no significativo).

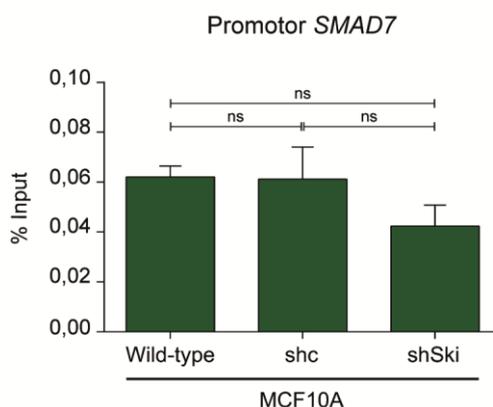
Luego, se evaluaron los niveles de H3K9me3 y H3K9ac del promotor de *SMAD7* para comparar el efecto del silenciamiento de Ski sobre regiones satelitales BSR y HSatII respecto a un gen blanco de Ski. Para ello, se realizaron 3 experimentos independientes para las líneas *wild-type*, *shc* y *shSki*, en las cuales se comparó el % de Input obtenido para H3K9me3 e IgG (isotipo conejo), y H3K9ac e IgG (isotipo ratón) sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7*. Los resultados de las ChIP-qPCR mostraron que la inmunoprecipitación de H3K9me3 fue positiva en las células MCF10A *wild-type* y *shc*, no así en la línea *shSki* (**Fig. 55**). Cuando estas células fueron comparadas entre sí, encontramos que el silenciamiento de Ski, en las células MCF10A *shSki* no mostró diferencias significativas respecto a las líneas *wild-type* y *shc* (**Fig. 56**). Finalmente, los niveles de H3K9me3 en el promotor de *SMAD7* se compararon con los niveles encontrados en las secuencias satelitales BSR y HSatII. Los niveles de H3K9me3 del promotor de *SMAD7* respecto al BSR presentaron diferencias en las líneas *wild-type*, *shc* y *shSki*; y respecto a HSatII en las líneas *shc* y *shSki* (**Fig. 57**).

Por otra parte, al realizar un análisis similar para la marca H3K9ac, se encontró una inmunoprecipitación positiva en las tres líneas celulares sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* (**Fig. 58**). Al comparar estas células entre sí, el silenciamiento de Ski en las células MCF10A *shSki* no generó diferencias significativas de la H3K9ac entre las tres líneas (**Fig. 59**). Finalmente, los niveles de H3K9ac en el promotor de *SMAD7* fueron superiores cuando se compararon con los niveles encontrados en las secuencias satelitales BSR y HSatII, en las tres líneas estudiadas (**Fig. 60**).

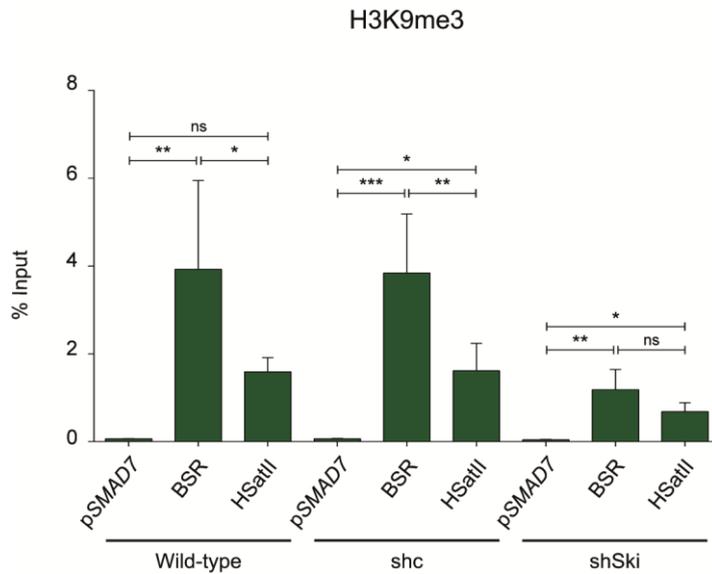
Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la presencia de Ski en regiones satelitales contribuye significativamente al enriquecimiento de la marca H3K9me3, y no H3K9ac, lo cual es necesario para la mantención de la heterocromatina pericentromérica en células humanas.



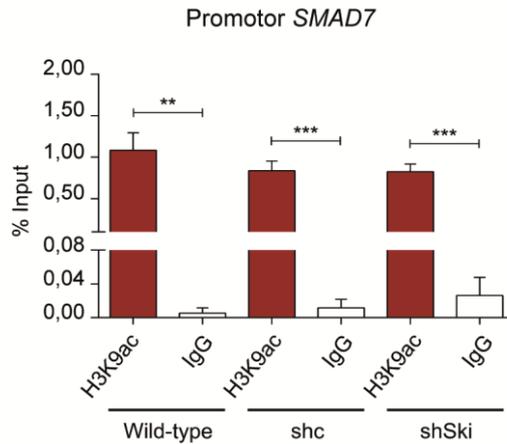
**Figura 55: Niveles de H3K9me3 en el promotor de SMAD7 de células MCF10A no asincronizadas.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se cultivaron hasta un 80% de confluencia y los niveles de H3K9me3 en el promotor de SMAD7 se evaluaron mediante ChIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9me3. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre el motivo SBE del promotor de SMAD7. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).



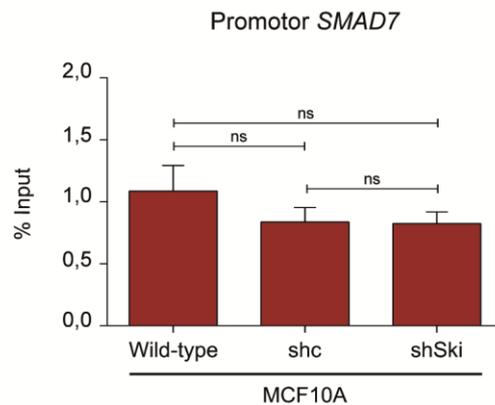
**Figura 56: Efecto de la ausencia de Ski sobre los niveles de H3K9me3 en el promotor de SMAD7 de células MCF10A no sincronizadas.** Los resultados de ChIP en el promotor de SMAD7 en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* no sincronizadas se compararon entre sí para determinar el efecto de la disminución de Ski sobre los niveles de la H3K9me3 sobre el motivo SBE. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre el motivo SBE del promotor de SMAD7 obtenido en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (ns: no significativo).



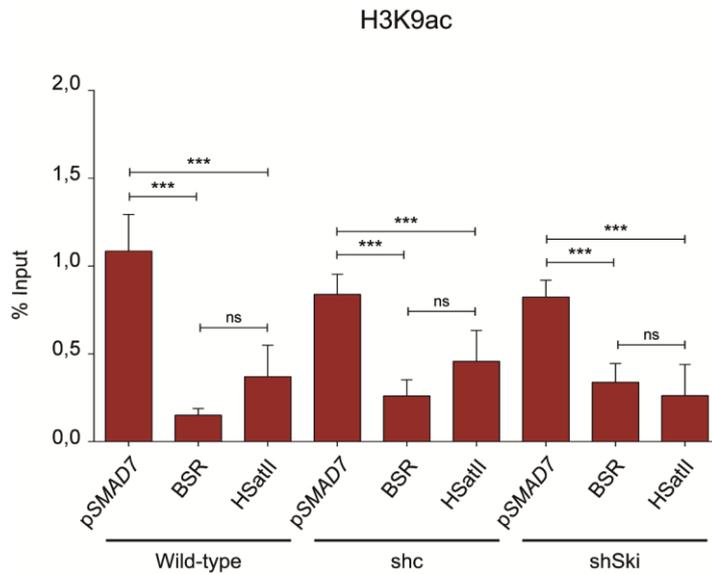
**Figura 57: Niveles de H3K9me3 en el promotor de *SMAD7* y en secuencias satelitales de células MCF10A no sincronizadas.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7*, secuencias BSR y HSatII en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* no sincronizadas se compararon entre sí para relacionar la disminución de Ski con los niveles de H3K9me3 en dichas regiones. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9me3 sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* y las secuencias satelitales BSR y HSatII en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).



**Figura 58: Niveles de H3K9ac en el promotor de SMAD7 de células MCF10A no sincronizadas.** Las células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* se cultivaron hasta un 80% de confluencia y los niveles de H3K9ac en el promotor de SMAD7 se evaluaron mediante CHIP-qPCR, usando un anticuerpo contra H3K9ac. Como control negativo, se utilizó IgG normal de conejo. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre el motivo SBE del promotor de SMAD7. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de T de Student, con un 95% de confianza (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



**Figura 59: Efecto de Ski sobre los niveles de H3K9ac en el promotor de SMAD7 de células MCF10A no sincronizadas.** Los resultados de CHIP en el promotor de SMAD7 en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* no sincronizadas se compararon entre sí para determinar el efecto de la disminución de Ski sobre los niveles de la H3K9ac sobre el motivo SBE. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre el motivo SBE del promotor de SMAD7 obtenido en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (ns: no significativo).



**Figura 60: Niveles de H3K9ac en el promotor de *SMAD7* y en secuencias satelitales de células asincrónicas MCF10A.** Los resultados de ChIP en el promotor de *SMAD7*, secuencias BSR y HSatII en células MCF10A *wild-type*, *shc* y *shSki* no sincronizadas se compararon entre sí para relacionar la disminución de Ski con los niveles de H3K9ac en dichas regiones. Enriquecimiento (% Input) obtenido en la inmunoprecipitación de H3K9ac sobre el motivo SBE del promotor de *SMAD7* y las secuencias satelitales BSR y HSatII en las tres líneas celulares. *Wild-type*: Ski endógeno; *shc*: control de transducción; *shSki*: *knockdown* de Ski. Se muestra el promedio de los porcentajes de Input (% Input)  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Se aplicó el test de One-way ANOVA post test Bonferroni con un 95% de confianza (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; ns: no significativo).

## 5. Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo y estudios previos de nuestro laboratorio indican que la proteína Ski participa en la regulación epigenética de la heterocromatina pericentromérica. Los niveles proteicos de Ski son regulados de una manera dependiente del ciclo celular, alcanzando los más altos niveles en mitosis, localizándose en el huso mitótico<sup>56</sup>, y sobre regiones satelitales de cromosomas humanos y de ratón (Tesis Magister David Carrero y Tesis Doctoral Claudio Cappelli). Más aún, la ausencia de Ski en MEFs se asocia con una disminución de la marca de la H3K9me3 sobre secuencias satelitales ubicadas en regiones pericentroméricas de ratón (Tesis doctoral Claudio Cappelli). Todo lo anterior nos lleva a proponer que Ski ejerce un importante rol en diversos mecanismos mitóticos, entre los cuales en este trabajo nos enfocamos en su relación con el enriquecimiento de la marca de la H3K9me3 sobre regiones pericentroméricas en cromosomas humanos, las cuales son esenciales para la mantención de la integridad cromosómica.

### 5.1 Expresión de Ski en células MCF7 y MCF10A

Ski participa de manera activa en la regulación de la expresión génica de la vía de señalización de TGF- $\beta$  y otras vías que regulan procesos celulares como proliferación, diferenciación y transformación tumoral<sup>32,55,56,89</sup>. Más aún, se ha descrito que Ski actúa como una oncoproteína en varios tipos de cáncer<sup>10-12,14,15,17,18</sup>. Por el contrario en cáncer de mama se ha demostrado su efecto como supresor tumoral<sup>22-24</sup>. Diversos autores proponen que los niveles fisiológicos de Ski parecen proteger a las células de la transformación, y cuando éstos aumentan, disminuyen o existe una localización aberrante de esta proteína, se promueven las funciones pro-oncogénicas de Ski<sup>10,31</sup>. En este trabajo comparamos la expresión de la línea celular MCF10A que corresponde a células inmortalizadas no transformadas de epitelio mamario y las células MCF7 que provienen de un adenocarcinoma mamario. Concordante con lo anterior, encontramos que existen diferencias en la expresión de Ski entre ambos tipos celulares, donde las células MCF7 poseen menores niveles respecto a MCF10A (**Fig. 8A**). Más aún, cuando sincronizamos estas células en mitosis encontramos que sólo en MCF10A existe un aumento de los niveles proteicos de Ski comparado a células asincrónicas (**Fig. 8B**), como ha sido documentado en trabajos anteriores de nuestro laboratorio<sup>56</sup>. Dado que la desregulación

de Ski es partícipe de variados mecanismos asociados a progresión tumoral, los niveles significativamente menores en la expresión de Ski que evidenciamos en un modelo de adenocarcinoma mamario respecto a células inmortalizadas del mismo tejido, podrían ser causales, al menos parcialmente, del fenotipo tumoral de las células MCF7.

## **5.2 Ski está localizado en BSR y HSatII en cromosomas mitóticos**

La heterocromatina pericentromérica está compuesta principalmente por largos tramos de secuencias de DNA repetitivo rico en A+T, e incluyen elementos de DNA transposables y repeticiones satelitales. En ratón, estas regiones son conocidas como repeticiones de satélite mayor y se encuentran localizadas en todos los cromosomas, a diferencia de células humanas, en las cuales la composición satelital es más compleja y cromosoma dependiente.

Resultados previos de nuestro laboratorio realizados en células humanas evidenciaron que la proteína Ski se localiza sobre la región pericentromérica de cromosomas mitóticos con morfología acrocéntrica, que corresponden a los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. En dichas regiones, estos cromosomas albergan secuencias codificantes para el DNA ribosomal (rDNA) y las secuencias satelitales BSR y HSatII. A través de IFI sobre placas metafásicas en células MCF7 sincronizadas en mitosis, se evidenció que Ski se localiza sobre cromosomas acrocéntricos y co-localiza con la proteína UBF, factor transcripcional canónico de rDNA, en un 35,4% del total de placas metafásicas estudiadas (Datos no publicados - Tesis Magister David Carrero). A la fecha, ya demostramos la co-localización de Ski y UBF en células MCF10A mitóticas, y dado que estas células poseen un número cromosómico relativamente normal (a diferencia de la poliploidía presentada en células MCF7), fue posible construir un cariotipo humano que evidencia la ocupancia de esta proteína tanto en regiones pericentroméricas de cromosomas acrocéntricos y de otros con una morfología diferente (Datos no publicados). Esto podría dar cuenta de una función aún más relevante a la abordada en este trabajo que se restringe a la función mitótica de esta proteína sobre los satélites localizados en los cromosomas 15 y 22.

En este trabajo describimos por primera vez la ocupancia de Ski en secuencias satelitales localizadas en regiones pericentroméricas de cromosomas mitóticos en células

MCF7 y MCF10A. Dada la complejidad de localizar y amplificar por PCR cuantitativo secuencias satelitales localizadas en regiones de heterocromatina pericentromérica, fue necesario utilizar la herramienta bioinformática proporcionada por la Universidad de California Santa Cruz (UCSC) llamada RepeatMasker. Esta herramienta genera un mapeo completo del genoma humano actualizado (hg19), pudiendo obtener secuencias satelitales localizadas en regiones pericentroméricas y que son específicas para cada cromosoma. El diseño de partidores se realizó con el programa Amplifx siguiendo parámetros estándar de un partidador para PCR cuantitativo. De esta forma, encontramos que BSR y HSatII son las secuencias satélites más abundantes en regiones pericentroméricas de los cromosomas 15 y 22, respectivamente. Se escogieron dos parejas de partidores que mostraron los mejores rendimientos, una específica para la región pericentromérica del cromosoma 15 en la secuencia satelital BSR, y la segunda que es específica para la región pericentromérica del cromosoma 22 en la secuencia satelital HSatII (**Fig. 15**).

La hipótesis que Ski podría estar localizado específicamente en secuencias satelitales de células epiteliales de mama fue abordada mediante ensayos de ChIP en células sincronizadas en mitosis. Ensayos de ChIP en células MCF7 en mitosis evidencian que los niveles endógenos de Ski (*wild-type* y Mock) son lo suficientemente bajos para no alcanzar valores significativos respecto al control de inmunoprecipitación (IgG) en las secuencias BSR y HSatII. Sin embargo, cuando esta proteína es sobre-expresada, en las células MCF7-T7hSki+, la unión de Ski en dichas regiones aumenta significativamente respecto al control de IgG (**Fig. 16A y B**). De forma más clara, cuando los valores de las 3 líneas celulares se compararon entre sí, el enriquecimiento obtenido sobre las secuencias BSR y HSatII en células MCF7-T7hSki+ es significativamente superior a las células *wild-type* y Mock, en cambio no hay diferencias entre éstas últimas (**Fig. 17A-B**). Se realizó el mismo tipo de ensayo en MCF10A, y encontramos que los niveles endógenos de Ski, en células MCF10A *wild-type* y shc, sí generan un enriquecimiento significativo sobre los valores experimentales del control IgG en las secuencias BSR y HSatII. En MCF10A shSki, estos valores disminuyen en el BSR y HSatII, lo cual es concordante con la menor expresión de Ski en estas células (**Fig. 18A y B**). Al comparar los 3 tipos celulares, encontramos que existe un aumento significativo de la ocupancia de Ski sobre las secuencias BSR y HSatII en las células *wild-type* y shc en relación a las células MCF10A shSki (**Fig. 19A y B**). Estos resultados en su conjunto muestran que Ski está enriquecido

sobre las regiones satelitales BSR y HSatII del cromosoma 15 y 22, respectivamente, en células MCF7 y MCF10A durante la mitosis.

Los resultados de ChIP en células MCF10A no sincronizadas mostraron que Ski no ocupa los satélites BSR y HSatII durante interfase en los tres modelos estudiados (**Fig. 20 y 21**). El monitoreo de las poblaciones celulares por citometría de flujo arrojó que aproximadamente el 75% de las células MCF10A asincrónicas se encuentran en la fase G1/G0 (**Fig. 13B**). Por lo tanto, los resultados de ChIP obtenidos en células no sincronizadas podrían ser atribuidos en gran medida a células que están cursando la fase G1. Todo esto podría indicar que en células humanas, una vez finalizada la mitosis, Ski deja de ocupar las regiones satelitales estudiadas.

Para fortalecer nuestros resultados, analizamos un promotor de un gen que se ha descrito en la literatura como blanco de Ski, de manera tal de establecer una comparación con los niveles de enriquecimiento obtenidos en los satélites BSR y HSatII. En células HeLa y HepG2 no sincronizadas, se ha descrito la presencia de complejos represores que contienen a Ski, ocupando el promotor de *SMAD7* para mantener el estado represivo de este gen en ausencia del estímulo de TGF $\beta$ <sup>41</sup>.

A través de ChIP-qPCR encontramos que Ski también ocupa dicho promotor en células MCF10A asincrónicas, sin embargo la disminución de Ski mediante shRNAs no afectó la ocupación de este promotor, a diferencia de lo observado en las secuencias satelitales (**Fig. 22-23**). Una explicación para este fenómeno podría ser la eficiencia de *knockdown* lograda a través de la transducción lentiviral. Como se mostró anteriormente, existe una reducción aproximada de un 65% en la expresión de Ski respecto a células *wild-type*; sin embargo, el 35% restante podría ser suficiente para ocupar el motivo SBE y generar un efecto epigenético. Además, el promotor de la proteína *SMAD7* corresponde a un blanco canónico de unión de otras proteínas SMAD para iniciar la transcripción, señalización de la cual los complejos proteicos que contienen a Ski son co-represores directos. Por lo tanto, la ocupancia de Ski sobre el motivo SBE podría estar más favorecida que su ocupancia en secuencias satelitales. Una alternativa para evaluar el efecto del silenciamiento de Ski sobre dicho promotor es suprimir en un 100% la expresión de Ski a través de la generación de una línea *knockout* para esta proteína y evaluar el mismo procedimiento realizado en este estudio. Finalmente, cuando

comparamos el enriquecimiento obtenido en el promotor de *SMAD7* respecto a las secuencias satelitales estudiadas, encontramos que sobre el motivo SBE, Ski presenta una ocupancia significativamente superior (**Fig. 24**).

Cuando se inicia el proceso mitótico, muchos factores de transcripción y reguladores transcripcionales son excluidos del núcleo para favorecer la compactación de los cromosomas, sin embargo, nuestro laboratorio ha evidenciado que la proteína Ski mantiene su ocupancia en regiones satelitales y ciertos genes codificantes (Datos no publicados - Tesis Doctoral Claudio Cappelli). Es por esto, que inicialmente, evaluamos si en células MCF10A sincronizadas en mitosis, Ski mantiene su ocupancia sobre el promotor de *SMAD7*. Como se mostró antes, Ski mostró un enriquecimiento en las líneas con expresión endógena (*wild-type* y *shc*), y se observó una disminución de su ocupancia cuando Ski es silenciado en las células MCF10A *shSki* (**Fig. 25 y 26**). La comparación de todas las secuencias estudiadas arrojó que los niveles encontrados en secuencias satelitales respecto el promotor de *SMAD7* son similares en los tres modelos de MCF10A (**Fig. 27**). Debido a que Ski ocupa el motivo SBE en células mitóticas MCF10A, evaluamos si este fenómeno se presenta en células mitóticas MCF7. De forma interesante, evidenciamos la misma ocupancia de esta proteína y además no encontramos diferencias cuando Ski fue sobre-expresado en MCF7-T7hSki+ (**Fig. 28 y 29**). Una explicación de este fenómeno podría ser la restricción espacial producto de la compactación de la cromatina en cromosomas mitóticos en los motivos de unión de factores de transcripción o complejos reguladores de la transcripción. Este fenómeno ya había sido visto con anterioridad en nuestro laboratorio, debido a que Ski posee una gran ocupancia de forma endógena en el promotor de *SMAD7* en células MCF7, por lo que la sobre-expresión de esta proteína en células MCF7-T7hSki+ difícilmente generará mayor ocupancia sobre dichas secuencias. La comparación de todas las secuencias estudiadas evidenció que los niveles encontrados en secuencias satelitales respecto el promotor de *SMAD7* son significativamente inferiores en células MCF7 *wild-type* y Mock. Sin embargo, la sobre-expresión de Ski en las células MCF7-T7hSki+, aumentó la ocupancia de esta proteína en secuencias satélites hasta valores similares a los encontrados sobre el promotor de *SMAD7* (**Fig. 30**).

En conclusión, los niveles endógenos de Ski encontrados en células MCF10A son lo suficientemente elevados para ocupar el promotor de *SMAD7* y secuencias satelitales

en cromosomas mitóticos. Por otra parte, la baja expresión de Ski evidenciada en células MCF7 sólo permitió su inmunoprecipitación sobre el promotor de *SMAD7*, siendo necesario sobre-expresar esta proteína para evidenciar su ocupancia sobre regiones satelitales. Estos resultados concuerdan con lo observado en células MCF10A shSki, las cuales presentan niveles de Ski comparables a los niveles endógenos de la proteína en MCF7.

**Tabla II**

**Resumen de la ocupancia de la proteína Ski sobre regiones satelitales y el promotor de *SMAD7*.** Resultados obtenidos de ensayos de ChIP en células mitóticas y no sincronizadas utilizando un anticuerpo contra Ski. (✓: ocupa; x: no ocupa).

	Ski			
	BSR	HSatII	Promotor <i>SMAD7</i>	
MCF7 wt	x	x	✓	Mitosis
MCF7 Mock	x	x	✓	
MCF7 T7hSki+	✓	✓	✓	
	BSR	HSatII	Promotor <i>SMAD7</i>	Mitosis
MCF10A wt	✓	✓	✓	
MCF10A shc	✓	✓	✓	
MCF10A shSki	x	x	x	
	BSR	HSatII	Promotor <i>SMAD7</i>	Interfase
MCF10A wt	x	x	✓	
MCF10A shc	x	x	✓	
MCF10A shSki	x	x	✓	

### 5.3 Ski regula el enriquecimiento de H3K9me3/ac en secuencias satelitales y promotores en cromosomas mitóticos humanos

Además del contenido de DNA satelital, la heterocromatina pericentromérica presenta diversas marcas que son transmitidas de forma estable de generación en generación, y por definición, son de naturaleza epigenética. En células de ratón, el DNA es metilado en dinucleótidos CpG<sup>90</sup>. A nivel nucleosomal, las histonas generalmente son hipoacetiladas y metiladas de forma específica en la lisina 9 de la histona H3<sup>68</sup>, lo cual permite el reclutamiento de HP-1 a estas regiones<sup>73</sup>.

En este trabajo demostramos que la presencia de Ski sobre secuencias BSR y HSatII se correlaciona con un aumento en la marca de la H3K9me3. En MCF7, al comparar los tres modelos celulares entre sí, encontramos que la sobre-expresión de Ski, en las células MCF7-T7hSki+, presentó un enriquecimiento sobre las secuencias BSR y HSatII de la H3K9me3 respecto a las células *wild-type* y Mock (**Fig. 32A-B**). Sin embargo, la evaluación de la H3K9ac no mostró diferencias en ambos satélites (**Fig. 34A-B**). Debido a que en estas células Ski está ocupando el promotor de *SMAD7*, evaluamos los niveles de H3K9me3 y H3K9ac para relacionarlos con los enriquecimientos obtenidos en secuencias satélites. Encontramos que la sobre-expresión de Ski, en las células MCF7-T7hSki+, presentó un enriquecimiento significativo de la H3K9me3 en células *wild-type* y Mock sobre el motivo SBE (**Fig. 36**). Finalmente, cuando los niveles de H3K9me3 evaluados en el promotor de *SMAD7* se compararon con las secuencias satelitales, encontramos que en los tres modelos estudiados de MCF7, los satélites BSR y HSatII poseen niveles significativamente superiores que el promotor de *SMAD7*, lo cual es concordante con las características propias de la heterocromatina pericentromérica en la cual están albergadas las secuencias satelitales estudiadas. Más aún, la sobre-expresión de Ski en las células MCF7-T7hSki+ generó un aumento de la H3K9me3 en las tres secuencias estudiadas (**Fig. 37**). Por otra parte, cuando el mismo procedimiento fue realizado para la H3K9ac, encontramos que las células MCF7-T7hSki+ presentaron una disminución de los niveles de esta marca respecto a las células *wild-type* y Mock sobre el motivo SBE (**Fig. 39**). Finalmente, cuando los niveles de H3K9ac evaluados en el promotor de *SMAD7* se compararon con las secuencias satelitales, encontramos que en células MCF7 *wild-type* y Mock, el promotor de *SMAD7* posee niveles significativamente superiores que los satélites BSR y HSatII. Sin embargo, la sobre-expresión de Ski en las células MCF7-T7hSki+ disminuyó la marca H3K9ac en el promotor de *SMAD7* hasta no

observar diferencias con los niveles encontrados en las secuencias BSR y HSatII (**Fig. 40**). Todo lo anterior podría dar cuenta de una regulación epigenética diferente en secuencias satelitales respecto a genes codificantes en células MCF7, donde el enriquecimiento de H3K9me3 es dependiente de Ski, pero no la modificación H3K9ac sobre los satélites BSR y HSatII. En cambio el enriquecimiento de ambas marcas sobre el promotor de *SMAD7* depende de Ski.

Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de Ski sobre secuencias BSR y HSatII se correlaciona con una disminución de los niveles de H3K9me3. En MCF10A, encontramos que el silenciamiento de Ski, en las células MCF10A shSki, presentó una disminución significativa de la H3K9me3 respecto a las células *wild-type* y shc sobre las secuencias BSR y HSatII (**Fig. 42A y B**). Sin embargo, la evaluación de la H3K9ac no mostró diferencias en ambos satélites (**Fig. 44A y B**). Al igual que en células MCF7, Ski ocupa el promotor de *SMAD7* en células MCF10A. Por lo tanto, evaluamos los niveles de H3K9me3 y H3K9ac para analizar su enriquecimiento en secuencias satélites. El silenciamiento de Ski en las células MCF10A shSki, no presentó diferencias en los niveles de la H3K9me3 respecto a células *wild-type* y shc sobre el motivo SBE (**Fig. 46**). Finalmente, los niveles de H3K9me3 evaluados en los satélites BSR y HSatII poseen niveles significativamente superiores que el promotor de *SMAD7*. Al igual que lo evidenciado en células MCF7, los resultados son concordantes con las características propias de la heterocromatina pericentromérica (**Fig. 47**). Por otra parte, un análisis de H3K9ac, detectó que las células MCF10A shSki presentaron un aumento en el enriquecimiento de esta marca respecto a las células *wild-type* y shc sobre el motivo SBE (**Fig. 49**). Finalmente, los niveles de H3K9ac evaluados en el promotor de *SMAD7* son similares a los encontrados en las secuencias satelitales en células MCF7 *wild-type* y Mock. Sin embargo, el silenciamiento de Ski en las células MCF10A shSki aumentó la H3K9ac en el promotor de *SMAD7* por sobre la acetilación encontrada en las secuencias BSR y HSatII (**Fig. 50**). La acetilación de la H3K9 en heterocromatina pericentromérica es un evento anterior a la metilación del mismo residuo, por lo tanto, nuestros resultados se ajustan a la hipótesis que Ski regula la H3K9me3 en dichas regiones, no ejerciendo un efecto sobre la H3K9ac. Respecto a la regulación epigenética del promotor de *SMAD7* en mitosis, no existen evidencias publicadas hasta la fecha, lo cual le otorga novedad a este trabajo que vincula la localización de Ski sobre el motivo SBE con la regulación de la H3K9ac en la misma región.

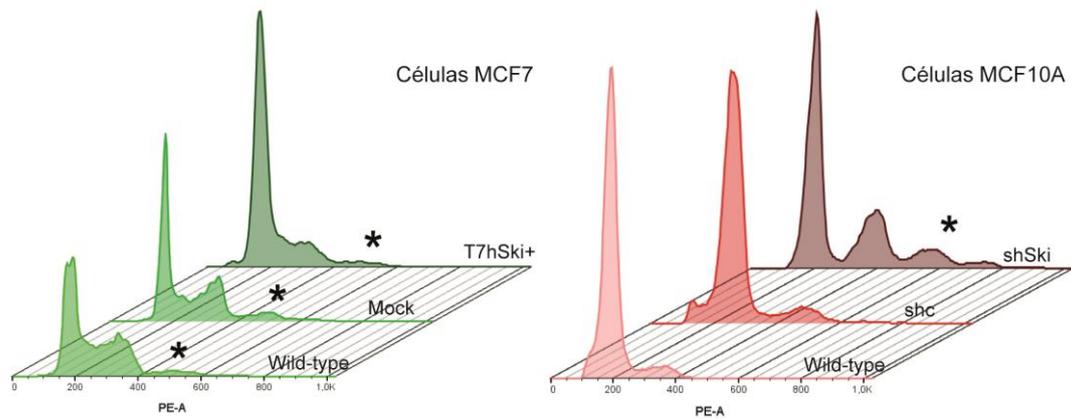
**Tabla III**

**Resumen de los niveles de H3K9me3 y H3K9ac evaluados sobre regiones satelitales y el promotor de *SMAD7*.** Resultados obtenidos de ensayos de ChIP en células mitóticas y no sincronizadas utilizando un anticuerpo contra H3K9me3 y H3K9ac. (↑: aumenta; ↓: disminuye; ns: no hay diferencias significativas).

	H3K9me3			H3K9ac			
	BSR	HSatII	Promotor SMAD7	BSR	HSatII	Promotor SMAD7	
MCF7 wt vs Mock	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Mitosis
MCF7 wt vs T7hSki+	↑	↑	↑	ns	ns	↓	
	BSR	HSatII	Promotor SMAD7	BSR	HSatII	Promotor SMAD7	
MCF10A wt vs shc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
MCF10A wt vs shSki	↓	↓	ns	ns	ns	↑	Interfase
	BSR	HSatII	Promotor SMAD7	BSR	HSatII	Promotor SMAD7	
MCF10A wt vs shc	ns	ns	ns	↑	ns	ns	
MCF10A wt vs shSki	↓	↓	↓	ns	ns	ns	

Las anomalías cromosómicas estructurales y numéricas son las características más evidentes y distintivas de los genomas cancerígenos. Los reordenamientos estructurales tienen un impacto en el desarrollo del tumor a través de la activación de oncogenes y la inactivación de los supresores de tumores<sup>91</sup>. En modelos animales, la variación en el número de cromosomas (aneuploidía) es considerada como una característica o *hallmark* del cáncer, pudiendo predisponer el desarrollo de tumores sólidos a través de un fenómeno denominado inestabilidad cromosómica (CIN)<sup>5,92</sup>. Diversos mecanismos pueden generar CIN, por ejemplo: defectos en la dinámica del acoplamiento microtúbulo-cinetocoro, el número de centrosomas, el control de ensamblaje del huso mitótico y la cohesión cromosómica<sup>8,93</sup>. En este contexto, nuestro laboratorio comprobó que la ausencia de la proteína Ski, en MEF *knockout* para el gen *ski* (*ski*<sup>-/-</sup>) provoca CIN manifestado por la presencia de puentes intercromosómicos, micronúcleos y aneuploidía.

La evaluación citogenética del fenotipo inducido por el silenciamiento de Ski, en MCF10A shSki, evidenció que estas células exhiben las mismas alteraciones mitóticas mostradas en MEFs *knockout* para Ski, caracterizadas por la formación de micronúcleos, presencia de cromosomas retrasados, anafases multipolares y aneuploidía (Datos no publicados – Tesis Víctor Inostroza). Más aún, evaluamos el contenido de DNA de las células MCF10A shSki, y encontramos que estas células presentan *peaks* que difieren de las células MCF10A *wild-type* y shc, y que dan cuenta de poblaciones celulares aneuploides. El efecto de la sobre-expresión de Ski en las células MCF7-T7hSki+ sobre el curso mitótico y estabilidad del genoma no ha sido estudiado hasta la fecha. El monitoreo mediante citometría de flujo mostró que estas células no presentan *peaks* diferentes a las células MCF7 *wild-type* y Mock, por lo tanto, resulta difícil proponer la hipótesis que Ski pudiese revertir el alto nivel de aberraciones mitóticas que presentan estas células tumorales (**Fig. 61**).



**Figura 61: Monitoreo de la cantidad de DNA en células MCF7 y MCF10A.** Las células MCF7 *wild-type*, Mock y T7hSki+; y las células MCF10A *wild-type*, shc y shSki fueron fijadas y teñidas con yoduro de propidio para ser monitoreadas por citometría de flujo. El gráfico muestra 15.000 eventos que fueron seleccionados en base a su contenido de DNA (PE-A). *Wild-type*: Ski endógeno; shc y Mock: control de transducción; T7hSki+: Sobre-expresión de Ski; shSki: *knockdown* de Ski. En asterisco (\*) se denotan las poblaciones celulares que presentaron *peaks* con señales de PE-A por sobre la densidad característica de la fase G2/M.

Los resultados de ChIP en células MCF10A no sincronizadas mostraron que Ski no ocupa los satélites BSR y HSatII, sin embargo, encontramos que en células MCF10A shSki existe una disminución significativa de la H3K9me3 en ambas secuencias satelitales con las líneas *wild-type* y *shc* (**Fig. 52A y B**). Más aún, la acetilación de la H3K9 evidenció algunas diferencias en la secuencia BSR, que podrían dar cuenta de una tendencia del efecto de Ski en dicho satélite (**Fig. 54A y B**). Como se describió, Ski ocupa el promotor de *SMAD7* en células MCF10A asincrónicas, por lo que evaluamos los niveles de H3K9me3 y H3K9ac en secuencias satélites. El silenciamiento de Ski en las células MCF10A shSki, no presentó diferencias en los niveles de la H3K9me3 respecto a células *wild-type* y *shc* sobre el motivo SBE (**Fig. 56**). Finalmente, los niveles de H3K9me3 evaluados en los tres modelos estudiados de MCF10A, encontramos que los satélites BSR y HSatII poseen niveles significativamente superiores de esta marca epigenética que el promotor de *SMAD7* (**Fig. 57**). Al analizar los % de Input de H3K9me3 encontrados en células MCF10A asincrónicas respecto a MCF10A mitóticas, vemos que en éstas últimas aumentan considerablemente, lo cual concuerda con los mecanismos descritos sobre la regulación de la H3K9me3. Una vez terminado el proceso mitótico, la cromatina disminuye su estado de compactación, a través de una disminución de los niveles de metilación de la H3K9, entre otras marcas epigenéticas. Esto permite el acceso de los factores de transcripción y reguladores transcripcionales a sus secuencias blanco<sup>94</sup>. Por otra parte, un análisis de la marca H3K9ac, en las células MCF10A shSki no mostró diferencias en la acetilación de H3K9 respecto a las células *wild-type* y *shc* sobre el motivo SBE (**Fig. 59**). Finalmente, los niveles de H3K9ac evaluados en los satélites BSR y HSatII resultaron significativamente menores respecto al promotor de *SMAD7* (**Fig. 60**). A la fecha, no ha sido descrito la expresión de transcritos no codificantes albergados en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 15 y 22, por lo tanto, los bajos niveles de H3K9ac encontrados en regiones satelitales son concordantes con un estado transcripcional represivo respecto al promotor de un gen como *SMAD7*.

En este trabajo demostramos que en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 15 y 22, Ski ocupa los satélites BSR y HSatII durante la mitosis, y modula los niveles de la H3K9me3 en dichas secuencias. Sin embargo, en células asincrónicas, pese a que Ski abandona los satélites BSR y HSatII, el efecto asociado a la H3K9me3 se mantiene. Este novedoso fenómeno ha sido foco de estudio en nuestro laboratorio, pero orientado a la regulación génica. El “*Mitotic Bookmarking*” es un proceso por el cual los

promotores de genes específicos son ocupados por reguladores transcripcionales durante mitosis para modular su expresión génica en la fase G1 temprana. Sin embargo, estos “genes marcados” han sido asociados a factores de transcripción y reguladores que activan la transcripción<sup>95,96</sup>. A la fecha, se ha demostrado que algunos genes pueden ser regulados negativamente por factores de transcripción, provocando una represión de la transcripción<sup>97</sup>. La hipótesis que Ski podría ser una proteína candidata para dichos procesos fue abordada en estudios anteriores realizados en MEFs. En estas células, Ski se encuentra asociado a un clúster de genes de metaloproteinasas de matriz (*mmp*), constituido por el gen *mmp3*, *mmp10* y *mmp13*, el cual está localizado en la región pericentromérica del cromosoma 9. En estos promotores, la ausencia de Ski en las células MEF Ski -/- se asocia con una disminución de la H3K9me3 y un aumento con la expresión de estas proteínas, generando un cambio en el comportamiento de estas células, caracterizado por una mayor motilidad, capacidad invasiva y aumento en la actividad caseolítica respecto a los MEFs que poseen reconstituida la expresión de Ski (MEF Ski-/-\_Ski+). Sin embargo, las mismas células asincrónicas no poseen Ski unido a estas regiones, aunque el efecto asociado a los niveles de H3K9me3 en sus promotores se mantiene (Datos no publicados – Tesis doctoral Claudio Cappelli).

Recientemente, hemos descrito que en células MCF7 y MCF10A, Ski se encuentra localizado sobre el promotor genes ribosomales. En humanos, los genes ribosomales se encuentran organizados en diversos clúster distribuidos en cromosomas acrocéntricos, los cuales codifican para el transcrito 47S, el que luego es procesado y da lugar a los transcritos de ARN ribosomal 18S, 5.8S y 28S<sup>98</sup>. En dichos cromosomas, éstos clúster ribosomales se encuentran proximales a secuencias satelitales, específicamente BSR<sup>62</sup>. La distancia entre los genes ribosomales y HSatII no ha sido estudiada a la fecha. Nuestro laboratorio propone la hipótesis que de forma análoga a los promotores de *mmp* en ratón, el efecto en la marca de la H3K9me3 asociada a Ski se extiende hasta abarcar el promotor ribosomal. Como consecuencia de lo anterior, las células MCF10A shSki presentan menores niveles de H3K9me3 en la región promotora y un aumento en la expresión de los transcritos de ARN ribosomal respecto a células MCF10A *wild-type* y shc (Datos no publicados). Diversos trabajos plantean mecanismos de propagación de las marcas de heterocromatina en regiones pericentroméricas cuando estas localidades son establecidas *de novo*, generando un silenciamiento general de los genes contenidos en dichas regiones y elementos de transposición, resguardando la estabilidad del genoma<sup>86,87</sup>. Por lo tanto,

es posible plantear la hipótesis que las enzimas remodeladoras de cromatina que son reclutadas a regiones pericentroméricas y generan marcas represivas, inducen un entorno heterocromatínico que se propaga hacia los alrededores, promoviendo el silenciamiento de los genes contenidos en regiones proximales a dichas secuencias satélites.

Ski actúa en combinación con un gran número de proteínas formando complejos co-represores con actividad desacetilasa de histonas que están involucrados en las vías de señalización antes descritas (TGF- $\beta$ , receptores nucleares de hormonas, etc). Dentro de estos complejos con actividad remodeladora de cromatina, Ski ha sido asociado a HDAC 1 y 3<sup>99</sup> y a la proteína arginina metiltransferasa 5 (PRMT5)<sup>41</sup>. Sin embargo, dado que esta proteína carece de dominios proteicos de unión a DNA, se hace difícil la tarea de encontrar regiones en las cuales esta proteína podría estar participando. En ratón y humanos, los complejos represores que contienen a Ski se unen al factor transcripcional Smad4 a través de éste y son reclutados a los promotores de los genes blanco en respuesta a TGF- $\beta$ , específicamente al motivo SBE que es reconocido por Smad4. Cuando las células no presentan un estímulo con la citoquina TGF- $\beta$ , la unión de los complejos que contienen a Ski sirve para mantener un estado basal represivo en dichos promotores, a través de las actividades desacetilasas de histona y arginina metiltransferasa de histona. Resultados de nuestro laboratorio realizados en MEFs Ski -/- y MEF Ski -/-\_hSki+ sostienen que las diferencias encontradas en los niveles de H3K9ac sólo están presentes sobre los promotores de los genes *mmp*, y que ésta no sufre ningún cambio significativo en el MaSat (Datos no publicados – Tesis doctoral Claudio Cappelli).

La trimetilación de la H3K9 por metiltransferasas que se depositan específicamente en regiones pericentroméricas necesita que dicho residuo se encuentre previamente hipoacetilado. Nuestra hipótesis de que los complejos que contienen a Ski con actividad desacetilasa de histonas puedan ser reclutados a dichas regiones y desacetilen la H3K9 para su subsiguiente metilación fue abordada evaluando los niveles de H3K9ac. Curiosamente, nuestros resultados indican que en mitosis la sobre-expresión de Ski en MCF7-T7hSki+ no genera ninguna diferencia significativa en los niveles de la H3K9ac cuando se compara con las células *wild-type* y Mock en secuencias satelitales, pero sí se relaciona con una disminución en el promotor de *SMAD7*. Más aún, cuando evaluamos la misma marca epigenética en células mitóticas MCF10A shSki, no fue posible encontrar cambios respecto a las células *wild-type* y shc en secuencias satelitales,

pero sí un aumento significativo en el promotor de *SMAD7*. Cuando analizamos los niveles de H3K9ac en células MCF10A asincrónicas, encontramos que los niveles de acetilación encontrados no muestran diferencias significativas sobre secuencias satelitales, aunque se detecta una tendencia que se podría confirmar aumentando el número de ensayos.

En conclusión, nuestros resultados en células humanas, en conjunto con los hallazgos en MEFs, permiten de proponer a Ski como una proteína candidata que modula la H3K9me3 en regiones satelitales en mitosis y G1. Sin embargo, aún desconocemos la composición de los complejos que contienen a Ski y de los factores que reclutan a Ski a secuencias satelitales en ratón y en humano. Además, nuestros resultados sostienen que en secuencias satelitales la principal marca asociada a Ski corresponde a la H3K9me3 en mitosis y G1. Se requieren nuevas estrategias para evaluar otras modificaciones de histonas relacionadas a represión, como H3K27me3, y a activación como H3K4me3 y H3K27ac durante mitosis y G1. Más aún, la estrategia de Re-ChIP entre Ski y la H3K9me3 podría establecer una relación más directa entre la proteína Ski y esta marca epigenética en su interacción con BSR y HSatII. Finalmente, la purificación de los complejos mitóticos asociados a Ski y su posterior análisis mediante espectrometría de masas ayudaría a conocer (la totalidad) las interacciones proteicas de Ski en mitosis. Todo lo anterior nos permitiría proponer nuevos mecanismos por los cuales Ski podría participar en la mantención de la heterocromatina pericentromérica de los cromosomas 15 y 22.

#### **5.4 Mantenimiento de las marcas de heterocromatina pericentromérica a través del ciclo celular**

La heterocromatina pericentromérica se encuentra yuxtapuesta al centrómero, y es una región de cromatina que se mantiene condensada a través del ciclo celular. Su apropiada organización es esencial para asegurar la correcta segregación de los cromosomas, y de esta forma, tiene un importante rol en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

La principal marca de heterocromatina pericentromérica es su enriquecimiento en HP-1, la cual es reclutada por la marca de H3K9me3 en regiones de DNA altamente repetitivo y secuencias transposables<sup>59</sup>. En mamíferos se ha descrito que el establecimiento de la heterocromatina pericentromérica comienza durante la fase mid-S, cuando estas secuencias satelitales se replican. Asociadas a la horquilla replicativa, las proteínas HDACs y Dnmts son reclutadas por PCNA para desacetilar las nuevas histonas incorporadas en la formación de los nucleosomas y restaurar la metilación del DNA. Además, PCNA recluta al factor de ensamble de cromatina 1 (CAF-1), el que deposita nuevas histonas H3-H4 acoplado a la síntesis de DNA. Las nuevas histonas H3 unidas a CAF-1 son mono-metiladas por SetDB1, lo cual es reconocido por Suv39h, para establecer la H3K9me3 y posterior unión de HP-1<sup>58,75,100</sup>. Nuestros resultados plantean que los niveles mitóticos de H3K9me3 asociados al BSR y HSatII disminuyen en células MCF10A shSki, y por otra parte aumentan cuando Ski es sobre-expresado en MCF7. Estos datos sugieren que Ski es fundamental para mantener los dominios heterocromatínicos en dichas regiones. Sin embargo, no existe claridad si estos sucesos mitóticos son particulares de ésta fase o provienen de etapas anteriores del ciclo celular. Ski aumenta sus niveles progresivamente desde G2, hasta alcanzar un máximo en mitosis<sup>56</sup>, al igual que los niveles de metilación inducidos por la enzima Suv39h sobre regiones pericentroméricas los cuales son necesarios para una correcta segregación cromosómica en mitosis<sup>88</sup>.

A través de la estrategia de sincronización celular y posteriores experimentos de ChIP-qPCR, sería posible revelar en cual fase del ciclo celular Ski se deposita en estas regiones satelitales y modula los niveles de la H3K9me3. Para ello es necesario obtener poblaciones celulares enriquecidas en las fases G1/S, S tardío y G2, para evaluar temporalmente el establecimiento, propagación y mantención de las marcas de

heterocromatina pericentromérica sobre las secuencias satelitales. Además, sobre las mismas células sincronizadas, experimentos de co-inmunoprecipitación entre Ski y diversas proteínas podrían dar cuenta si Ski es necesario para el mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica, formando complejos con la metiltransferasa de la H3K9 Suv39h y metiltransferasa de DNA Dnmt1; y si es necesario para el establecimiento de dichas regiones, Ski podría formar complejos con HDAC, Dnmts y PCNA. Estos experimentos ayudarán a caracterizar mejor los complejos proteicos en los cuales Ski es partícipe, y así, comprender de una forma más global los eventos que se desarrollan en torno a la formación y mantención de la heterocromatina pericentromérica.

## 6. Conclusiones

En este trabajo utilizamos la herramienta bioinformática RepeatMasker para localizar secuencias satelitales humanas cromosoma-específicas, y logramos amplificar y cuantificar de forma específica las secuencias BSR y HSatII de los cromosomas 15 y 22, respectivamente.

En células MCF7 y MCF10A, utilizando la técnica ChIP-qPCR comprobamos que la proteína Ski ocupa los satélites BSR y HSatII en mitosis. Más aún, evidenciamos que la presencia y ausencia de Ski modulan los niveles de la marca de la H3K9me3, y no la H3K9ac de dichas regiones.

Interesantemente, en este estudio comprobamos que Ski ocupa el promotor de *SMAD7*, un gen blanco de la vía de señalización de TGF $\beta$ , en mitosis. Evidenciamos que la presencia y ausencia de Ski contribuye a los niveles de H3K9me3 y H3K9ac en este promotor.

Finalmente, analizamos las células MCF10A shSki y demostramos la presencia de poblaciones celulares aneuploides inducidas por el silenciamiento de Ski, confirmando la importancia de esta proteína para la mantención de la integridad del genoma.

## 7. Referencias

- 1 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. *GLOBOCAN* 2012; **11**.
- 2 Torre L a, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. 2015; **00**: 1–22.
- 3 Itriago L, Cortes G, Programas S, CI C, Condes L, Coordinadora E *et al*. Cáncer en Chile y el mundo : una mirada epidemiológica , presente y futuro. *Rev Médica Clin las Condes* 2013; **24**: 531–552.
- 4 Hanahan D, Weinberg R a. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57–70.
- 5 Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 220–228.
- 6 Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**: 57–60.
- 7 Kops GJPL, Weaver B a a, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 773–785.
- 8 Thompson SL, Bakhoun SF, Compton D a. Mechanisms of Chromosomal Instability. *Curr Biol* 2010; **20**: R285–R295.
- 9 Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–674.
- 10 Reed J a, Bales E, Xu W. Cytoplasmic Localization of the Oncogenic Protein Ski in Human Cutaneous Melanomas in Vivo : Functional Implications for Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling Advances in Brief Cytoplasmic Localization of the Oncogenic Protein Ski in Human Cutaneous Mela. 2001; **250**: 8074–8078.
- 11 Reed J a., Chen D, Lin Q, Medrano EE. SKI is critical for repressing the growth inhibitory function of TGF- $\beta$  in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; **21**: 494–495.
- 12 Ritter M, Kattmann D, Teichler S, Hartmann O, Samuelsson MKR, Burchert a *et al*. Inhibition of retinoic acid receptor signaling by Ski in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; **20**: 437–443.
- 13 Buess M, Terracciano L, Reuter J, Ballabeni P, Boulay J-L, Laffer U *et al*. Amplification of SKI Is a Prognostic Marker in Early Colorectal Cancer. *Neoplasia* 2004; **6**: 207–212.

- 14 Kiyono K, Suzuki HI, Morishita Y, Komuro A, Iwata C, Yashiro M *et al.* C-Ski overexpression promotes tumor growth and angiogenesis through inhibition of transforming growth factor- $\beta$  signaling in diffuse-type gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2009; **100**: 1809–1816.
- 15 Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M *et al.* SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor- $\beta$  signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem* 2009; **284**: 3334–3344.
- 16 Heider TR, Lyman S, Schoonhoven R, Behrns KE. Ski promotes tumor growth through abrogation of transforming growth factor-beta signaling in pancreatic cancer. *Ann Surg* 2007; **246**: 61–68.
- 17 Fukuchi M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Sohda M *et al.* Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor- $\beta$  signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004; **108**: 818–824.
- 18 Jiang H, Jin C, Liu J, Hua D, Zhou F, Lou X *et al.* Next generation sequencing analysis of miRNAs: MiR-127-3p inhibits glioblastoma proliferation and activates TGF- $\beta$  signaling by targeting SKI. *OMICS* 2014; **18**: 196–206.
- 19 Wang P, Chen Z, Meng ZQ, Fan J, Luo JM, Liang W *et al.* Dual role of Ski in pancreatic cancer cells: Tumor-promoting versus metastasis-suppressive function. *Carcinogenesis* 2009; **30**: 1497–1506.
- 20 Wang P, Chen Z, Meng Z-Q, Luo J-M, Lin J-H, Zhou Z-H *et al.* Ski acts as therapeutic target of qingyihuaqi formula in the treatment of SW1990 pancreatic cancer. *Integr Cancer Ther* 2010; **9**: 50–58.
- 21 Tulley S, Chen W-T. Transcriptional Regulation of Seprase in Invasive Melanoma Cells by Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling. *J Biol Chem* 2014; **289**: 15280–96.
- 22 Azuma H, Ehata S, Miyazaki H, Watabe T, Maruyama O, Imamura T *et al.* Effect of Smad7 expression on metastasis of mouse mammary carcinoma JygMC(A) cells. *J Natl Cancer Inst* 2005; **97**: 1734–1746.
- 23 Le Scolan E, Zhu Q, Wang L, Bandyopadhyay A, Javelaud D, Mauviel A *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  suppresses the ability of ski to inhibit tumor metastasis by inducing its degradation. *Cancer Res* 2008; **68**: 3277–3285.
- 24 Theohari I, Giannopoulou I, Magkou C, Nomikos A, Melissaris S, Nakopoulou L. Differential effect of the expression of TGF- $\beta$  pathway inhibitors, Smad-7 and Ski, on invasive breast carcinomas: Relation to biologic behavior. *Apmis* 2012; **120**: 92–100.
- 25 Rivas S, Armisen R, Rojas D, Maldonado E, Huerta H, Tapia J *et al.* The Ski protein is involved in the transformation pathway of Aurora kinase A. *J Cell Biochem* 2015. doi:10.1093/biostatistics/manuscript-acf-v5.

- 26 Stavnezer E, Barkas AE, Brennan LA, Brodeur D. Transforming Sloan-Kettering Viruses Generated from the Cloned v-ski Oncogene by In Vitro and In Vivo Recombinations. 1986; **57**.
- 27 Nagase T, Mizuguchi G, Nomura N, Ishizaki R, Ueno Y, Ishii S. Requirement of protein co-factor for the DNA-binding function of the human ski proto-oncogene product. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 337–343.
- 28 Nomura T, Khan MM, Kaul SC, Dong H-D, Wadhwa R, Colmenares C *et al*. Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev* 1999; **13**: 412–423.
- 29 Nagata M, Goto K, Ehata S, Kobayashi N, Saitoh M, Miyoshi H *et al*. Nuclear and cytoplasmic c-Ski differently modulate cellular functions. *Genes to Cells* 2006; **11**: 1267–1280.
- 30 Heyman HC, Stavnezer E. A carboxyl-terminal region of the Ski oncoprotein mediates homodimerization as well as heterodimerization with the related protein SnoN. *J Biol Chem* 1994; **269**: 26996–27003.
- 31 Bonnon C, Atanasoski S. c-Ski in health and disease. *Cell Tissue Res* 2012; **347**: 51–64.
- 32 Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 415–424.
- 33 Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B *et al*. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1998; **1**: 611–617.
- 34 Wu JW, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K *et al*. Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: Insights on Ski-mediated repression of TGF-?? signaling. *Cell* 2002; **111**: 357–367.
- 35 Suzuki H, Yagi K, Kondo M, Kato M, Miyazono K, Miyazawa K. c-Ski inhibits the TGF-beta signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene* 2004; **23**: 5068–5076.
- 36 Ueki N, Hayman MJ. Signal-dependent N-CoR Requirement for Repression by the Ski Oncoprotein. *J Biol Chem* 2003; **278**: 24858–24864.
- 37 Stroschein S, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. Negative Feedback Regulation of TGF-β Signaling by the SnoN Oncoprotein. *Science* (80- ) 1999; **286**: 771–774.
- 38 Harada J, Kokura K, Kanei-Ishii C, Nomura T, Khan MM, Kim Y *et al*. Requirement of the co-repressor homeodomain-interacting protein kinase 2 for Ski-mediated inhibition of bone morphogenetic protein-induced transcriptional activation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 38998–39005.

- 39 Kokura K, Kaul SC, Wadhwa R, Nomura T, Khan MM, Shinagawa T *et al.* The Ski Protein Family Is Required for MeCP2-mediated Transcriptional Repression. *J Biol Chem* 2001; **276**: 34115–34121.
- 40 Karagianni P, Wong J. HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression. *Oncogene* 2007; **26**: 5439–5449.
- 41 Tabata T, Kokura K, ren Dijke P, Ishii S. Ski co-repressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF- $\beta$  target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5. *Genes to Cells* 2009; **14**: 17–28.
- 42 Westhorpe FG, Straight AF, Varetto G, Pellman D, David J, Cheeseman IM. The Centromere : Epigenetic Control of Chromosome Segregation during Mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014.
- 43 Bloom KS. Centromeric Heterochromatin: The Primordial Segregation Machine. *Annu Rev Genet* 2014; **48**: 457–484.
- 44 Allshire RC, Karpen GH. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* 2008; **9**: 923–937.
- 45 Schueler MG, Higgins a W, Rudd MK, Gustashaw K, Willard HF. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 2001; **294**: 109–115.
- 46 Alexandrov I a, Medvedev LI, Mashkova TD, Kisselev LL, Romanova LY, Yurov YB. Definition of a new alpha satellite suprachromosomal family characterized by monomeric organization. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 2209–2215.
- 47 Willard HF, Waye JS. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet* 1987; **3**: 192–198.
- 48 Harrington J, Van Bokkelen G, Mays R, Gustashaw K, Willard H. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet* 1997; **15**: 57–61.
- 49 Kuznetsova I, Podgornaya O, Ferguson-Smith M a. High-resolution organization of mouse centromeric and pericentromeric DNA. *Cytogenet Genome Res* 2006; **112**: 248–255.
- 50 Palmer DK, O’Day K, Wener MH, Andrews BS, Margolis RL. A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol* 1987; **104**: 805–815.
- 51 Blower MD, Sullivan B a., Karpen GH. Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* 2002; **2**: 319–330.

- 52 Sullivan B a, Karpen GH. Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* 2004; **11**: 1076–1083.
- 53 Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 2003; **112**: 407–421.
- 54 Mitchell a R, Jeppesen P, Nicol L, Morrison H, Kipling D. Epigenetic control of mammalian centromere protein binding: does DNA methylation have a role? *J Cell Sci* 1996; **109** ( Pt 9): 2199–2206.
- 55 Macdonald M, Wan Y, Wang W, Roberts E, Cheung TH, Knuesel MT *et al.* Control of cell cycle-dependent degradation of c-Ski proto-oncoprotein by Cdc34. *Oncogene* 2004; **23**: 5643–5653.
- 56 Marcelain K, Hayman MJ. The Ski oncoprotein is upregulated and localized at the centrosomes and mitotic spindle during mitosis. *Oncogene* 2005; **24**: 4321–4329.
- 57 Mosquera J, Armisen R, Zhao H, Rojas D a., Maldonado E, Tapia JC *et al.* Identification of Ski as a target for Aurora A kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **409**: 539–543.
- 58 Almouzni G, Probst A V. Heterochromatin maintenance and establishment Lessons from the mouse pericentromere. *Nucleus* 2011; **2**: 332–338.
- 59 Guenatri M, Bailly D, Maison C, Almouzni G. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol* 2004; **166**: 493–505.
- 60 Henikoff S, Ahmad K, Malik HS. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 2001; **293**: 1098–1102.
- 61 Nehmé S, Simboeck E, Article I, Url A, Central P, Central B *et al.* Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. 2015. doi:10.1186/1756-8935-8-3.
- 62 Greig GM, Willard HF. Beta satellite DNA: characterization and localization of two subfamilies from the distal and proximal short arms of the human acrocentric chromosomes. *Genomics* 1992; **12**: 573–580.
- 63 Tagarro I, Fernández-Peralta a M, González-Aguilera JJ. Chromosomal localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes. *Hum Genet* 1994; **93**: 383–388.
- 64 Altemose N, Miga KH, Maggioni M, Willard HF. Genomic Characterization of Large Heterochromatic Gaps in the Human Genome Assembly. *PLoS Comput Biol* 2014; **10**. doi:10.1371/journal.pcbi.1003628.

- 65 Blasco M a. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet* 2007; **8**: 299–309.
- 66 Pandey M, Sahay S, Tiwari P, Upadhyay DS, Sultana S, Gupta KP. Involvement of EZH2, SUV39H1, G9a and associated molecules in pathogenesis of urethane induced mouse lung tumors: Potential targets for cancer control. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; **280**: 296–304.
- 67 Chiba T, Saito T, Yuki K, Zen Y, Koide S, Kanogawa N *et al*. Histone lysine methyltransferase SUV39H1 is a potent target for epigenetic therapy of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2014; **23**. doi:10.1002/ijc.28985.
- 68 Peters AHFM, O’Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C *et al*. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 2001; **107**: 323–337.
- 69 Kondo Y, Shen L, Ahmed S, Bumber Y, Sekido Y, Haddad BR *et al*. Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. *PLoS One* 2008; **3**. doi:10.1371/journal.pone.0002037.
- 70 Melcher M, Schmid M, Aagaard L, Selenko P, Laible G, Jenuwein T. Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 3728–3741.
- 71 Czvitkovich S, Sauer S, Peters a H, Deiner E, Wolf a, Laible G *et al*. Over-expression of the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice. *Mech Dev* 2001; **107**: 141–153.
- 72 Smallwood A, Estève PO, Pradhan S, Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev* 2007; **21**: 1169–1178.
- 73 Bannister a J, Zegerman P, Partridge JF, Miska E a, Thomas JO, Allshire RC *et al*. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 2001; **410**: 120–124.
- 74 Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K-I, Ayoub N, Cohen A, Grewal SIS. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* 2002; **297**: 2232–2237.
- 75 Park J-A, Kim A-J, Kang Y, Jung Y-J, Kim HK, Kim K-C. Deacetylation and methylation at histone H3 lysine 9 (H3K9) coordinate chromosome condensation during cell cycle progression. *Mol Cells* 2011; **31**: 343–349.
- 76 McManus KJ, Biron VL, Heit R, Underhill DA, Hendzel MJ. Dynamic changes in histone H3 lysine 9 methylations: Identification of a mitosis-specific function for dynamic methylation in chromosome congression and segregation. *J Biol Chem* 2006; **281**: 8888–8897.

- 77 Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia B a, Shabanowitz J *et al.* Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 2005; **438**: 1116–1122.
- 78 Hirota T, Lipp JJ, Toh B-H, Peters J-M. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 2005; **438**: 1176–1180.
- 79 Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B. Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 1996; **87**: 95–104.
- 80 Loyola A, Tagami H, Bonaldi T, Roche D, Quivy JP, Imhof A *et al.* The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep* 2009; **10**: 769–775.
- 81 Loyola A, Bonaldi T, Roche D, Imhof A, Almouzni G. PTMs on H3 Variants before Chromatin Assembly Potentiate Their Final Epigenetic State. *Mol Cell* 2006; **24**: 309–316.
- 82 Mosch K, Franz H, Soeroes S, Singh PB, Fischle W. HP1 Recruits activity-dependent neuroprotective protein to H3K9me3 marked pericentromeric heterochromatin for silencing of major satellite repeats. *PLoS One* 2011; **6**. doi:10.1371/journal.pone.0015894.
- 83 Ghoshal K, Ghoshal K, Datta J, Datta J, Majumder S, Majumder S *et al.* and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 8302–8319.
- 84 Pedersen MT, Helin K. Histone demethylases in development and disease. *Trends Cell Biol* 2010; **20**: 662–671.
- 85 Slee RB, Steiner CM, Herbert B-S, Vance GH, Hickey RJ, Schwarz T *et al.* Cancer-associated alteration of pericentromeric heterochromatin may contribute to chromosome instability. *Oncogene* 2012; **31**: 3244–3253.
- 86 Festenstein R, Chan JPK. Context is everything: activators can also repress. *Nat Struct Mol Biol* 2012; **19**: 973–975.
- 87 Bulut-karslioglu A, Perrera V, Scaranaro M, Rosa-velazquez IA De, Nobelen S Van De, Shukeir N *et al.* A transcription factor – based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nat Struct Mol Biol* 2012; **19**: 1023–1030.
- 88 Heit R, Rattner JB, Chan GKT, Hendzel MJ. G2 histone methylation is required for the proper segregation of chromosomes. *J Cell Sci* 2009; **122**: 2957–2968.
- 89 Deheuninck J, Luo K. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009; **19**: 47–57.
- 90 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; : 6–21.

- 91 Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 233–245.
- 92 Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees C a *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; **406**: 747–752.
- 93 Compton D a. Mechanisms of aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol* 2011; **23**: 109–113.
- 94 Festenstein R, Chan JPK. Context is everything: activators can also repress. *Nat Struct Mol Biol* 2012; **19**: 973–5.
- 95 Michelotti GA, Michelotti EF, Pullner A, Duncan RC, Eick D, Levens D. Multiple Single-Stranded cis Element Are Associated with Activated Chromatin of the Human c-myc Gene In Vivo. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 2656–2669.
- 96 Kadauke S, Udugama MI, Pawlicki JM, Achtman JC, Jain DP, Cheng Y *et al.* Tissue-specific mitotic bookmarking by hematopoietic transcription factor GATA1. *Cell* 2012; **150**: 725–737.
- 97 Young DW, Hassan MQ, Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Lee S *et al.* Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. *Nature* 2007; **445**: 442–446.
- 98 Venema J, Tollervey D. Ribosome Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 1999; **33**: 261–311.
- 99 Nomura T, Khan MM, Kaul SC, Dong H-D, Wadhwa R, Colmenares C *et al.* Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev* 1999; **13**: 412–423.
- 100 Alvarez F, Muñoz F, Schilcher P, Imhof A, Almouzni G, Loyola A. Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *J Biol Chem* 2011; **286**: 17714–17721.