



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Efectos de la depleción de la histona H1 en células de cáncer de mama: proliferación y respuesta a interferón

Alcides Alberto Bustillos Ortiz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB) - CSIC

TESIS DOCTORAL

“Efectos de la depleción de la histona H1 en células de cáncer de mama: proliferación y respuesta a interferón”

ALCIDES ALBERTO BUSTILLOS ORTIZ

Barcelona, 2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

“Efectos de la depleción de la histona H1 en células de cáncer de mama: proliferación y respuesta a interferón”

Memoria presentada por Alcides Alberto Bustillos Ortiz para optar por el grado de Doctor en Biotecnología de la Universidad de Barcelona.

DIRECTOR

TUTOR

Dr. Albert Jordan Vallès

Dr. Carlos Ciudad Gómez

Barcelona 2017

“He sospechado alguna vez que la única cosa sin misterio es la felicidad, porque se justifica por sí sola”

Jorge Luis Borges

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que conocí y momentos que viví al escribir este trabajo, ahora representan parte de mi formación académica, sentimental y cultural.

Estoy infinitamente agradecido con Albert, por su valiosa guía y dirección.

A mis colegas de laboratorio Andrea, Erik, Alicia, Judit, Dani, Patri y Carles que siempre hicieron de mi lugar de trabajo también un lugar afable y divertido en el cuál trabajar.

A mis amigos David, Juan Carlos, Liliana, Jorge, Jose, Majo, María, Vero, Marce, Naty, Kary, Raque, Alejo, Carla, Heri y demás amigos que supieron llenar de alegría Barcelona/Ecuador y darme una mano en momentos complicados.

A mi suegrita Yolanda por su apoyo en los días finales de este doctorado y mis gracias eternas a mi hermana Diana, mi madre Nely Ortiz y mi padre Alcides Bustillos que a la distancia siempre supieron elevarme el ánimo.

Gracias mi amada esposa Cristina Arteaga, esto ha sido posible gracias a tu apoyo y mil gracias a la vida por mi hijo Fabio Alejandro Bustillos, por ser mi motivación, mis miedos y mis esperanzas.

Agradezco al pueblo ecuatoriano que a través de la decisión política del presidente Rafael Correa, me ha financiado a través de una beca doctoral, gracias totales Mashí.

A pesar de mi ceguera científica, aprendí de mis errores y ahora estoy más seguro de las palabras de Eduardo Galeano:

“Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos”.

Eduardo Galeano

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	3
1. ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE LA CROMATINA	5
1.1 ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	5
1.2 NUCLEOSOMA.....	5
1.3 LA FIBRA DE 30NM DE CROMATINA.....	7
1.4 HISTONAS NUCLEARES	9
2. HISTONA H1	12
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	12
2.2 HISTONA H1 Y SUS VARIANTES	15
2.3 DISTRIBUCIÓN DE LA HISTONA H1 EN EL GENOMA	16
2.4 H1 Y SU ROL EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL	18
3. INTERFERONES	19
3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS INTERFERONES	20
3.1.1. <i>Interferón tipo I</i>	20
3.1.2 <i>Interferón tipo II</i>	22
3.1.3 <i>Interferón tipo III</i>	22
3.2 FACTORES DE REGULACIÓN DE IFN (IRFs).....	22
4. GENES INDUCIDOS POR INTERFERÓN (ISGS).....	23
4.1 REGULACIÓN DE ISGS DEPENDIENTE DE LA RUTA DEL JAK-STAT	24
4.2 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS ISGS	25
4.3 ISGS CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL.....	27
4.3.1 <i>Familia de las MX</i>	28
4.3.2 <i>ISG15</i>	29
4.3.3 <i>IFITM</i>	29
4.4 SENSORES DE RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS	30
4.4.1 <i>Sensores de RNA</i>	30
4.4.2 <i>Receptores de DNA</i>	32
4.4.3 <i>Otros receptores de DNA</i>	33
4.4.4 <i>Otros sensores de RNA y DNA</i>	33

OBJETIVOS.....	35
1. OBJETIVO GENERAL	37
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	41
2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	41
2.1 PLÁSMIDOS	41
2.2 TRANSFORMACIÓN DE DNA PLASMÍDICO.....	42
2.3 OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS A PEQUEÑA, MEDIANA Y GRAN ESCALA.....	42
2.4 SISTEMA FÁRMACO-INDUCIBLE Y CONSTITUTIVO DE RNA DE INTERFERENCIA.....	42
2.5 GELES DE AGAROSA PARA EL ANÁLISIS DE DNA.....	44
2.6 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	44
2.7 SÍNTESIS DE CDNA.....	44
2.8 QPCR.....	44
3. EXTRACTOS PROTEICOS Y ANÁLISIS POR INMUNODETECCIÓN.....	46
3.1 EXTRACCIÓN ÁCIDA DE HISTONA H1	46
3.2 EXTRACCIÓN ÁCIDA TOTAL DE HISTONAS.....	46
3.3 EXTRACTO TOTAL DE PROTEÍNAS POR LISIS CELULAR (RIPA)	47
3.4 FRACCIONAMIENTO CELULAR	47
3.5 SDS-PAGE WESTERN BLOT	48
3.6 ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS	49
4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR, FLUORESCENCIA Y CICLO CELULAR.....	49
4.1 ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	49
4.2 ANÁLISIS CLONOGÉNICO DEPENDIENTE DE LA ADHERENCIA A LA SUPERFICIE	49
4.3 ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE COLONIAS, INDEPENDIENTE DE LA ADHERENCIA A LA SUPERFICIE (AGAR BLANDO)	50
4.4 CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS ACTIVADAS POR FLUORESCENCIA (FACS)	51
4.5 CICLO CELULAR.....	51
5. PRODUCCIÓN DE VIRUS E INFECCIÓN.....	51
6. TRATAMIENTOS.....	52

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN SIMULTANEA DE DISTINTAS VARIANTES DE LA HISTONA H1 SOBRE LA RESPUESTA A INTERFERÓN.....	57
1.1 DISEÑO DE RNA INTERFERENTES (SHRNA) ESTABLES INDUCIBLES PARA INHIBIR DISTINTAS VARIANTES H1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.....	57
1.1.1 <i>Inhibición de múltiples variantes en células T47D con el shRNA multi H1 inducible.....</i>	58
1.1.2 <i>Inhibición de H1.4 y H1.2 en células T47D con el shRNA H1.4/H1.2 inducible..</i>	60
1.1.3 <i>Inhibición de H1.2 y H1.5 en células T47D con el shRNA H1.2/H1.5 inducible..</i>	62
1.1.4 <i>Inhibición de H1.4 y H1.5 en células T47D con el shRNA H1.4/H1.5 inducible..</i>	64
1.1.5 <i>Inhibición de múltiples variantes en células MCF7 con el shRNA multi H1 inducible.....</i>	65
1.2 LA INHIBICIÓN DE MÚLTIPLES VARIANTES DE H1 CON EL MH1 SHRNA INDUCE LA EXPRESIÓN DE GENES ESTIMULADOS POR IFN(ISGs)	66
1.3 LA DEPLECIÓN COMBINADA DE H1.2 Y H1.4 EN CÉLULAS T47D CON SHRNAS ESPECÍFICOS ES SUFICIENTE PARA PROMOVER LA INDUCCIÓN DE LOS GENES ESTIMULADOS POR IFN(ISGs)	69
1.4 LA DEPLECIÓN SIMULTÁNEA DE H1.2 Y H1.5 CAUSA LA SOBREGULACION DE LOS ISGs, PERO A NIVELES INFERIORES DE LOS OBTENIDOS EN LAS CÉLULAS H1.4/H1.2 SHRNA.....	70
1.5 MCF7 MH1 SHRNA INDUCE LA RESPUESTA A IFN.....	72
1.6 ENSAYO DE RECUPERACIÓN POR SOBREENPRESIÓN DE DISTINTAS VARIANTES DE H1 REESTABLECEN PARCIALMENTE LOS NIVELES BASALES DE LOS ISGs.....	72
1.7 LOS NIVELES BASALES DE LOS ISGs SE REESTABLECEN DESPUÉS DE LA INACTIVACIÓN DEL SISTEMA INDUCIBLE MH1 SHRNA A TRAVÉS DEL LAVADO Y REMOCIÓN DE DOXICICLINA.	74
1.8 SÍNTESIS DE INTERFERÓN DESPUÉS DE LA DEPLECIÓN DE MÚLTIPLES VARIANTES (MH1 SHRNA).....	75
1.9 LA COMBINACIÓN DE IFN-β COMERCIAL Y LA DEPLECIÓN SIMULTÁNEA DE LAS VARIANTES H1.2 Y H1.4 MUESTRAN UN EFECTO SINÉRGICO EN LA SOBREENPRESIÓN DE LOS ISGs.	77
1.10 LOS INHIBIDORES 2-AMINOPURINE, BX795 Y RUXOLITINIB DISMINUYEN LA RESPUESTA INTERFERÓN INDUCIDA POR LA INHIBICIÓN MÚLTIPLE DE VARIANTES DE H1.	78

1.11 KNOCK DOWNS CONSTITUTIVOS DE SENSORES DE DNA Y RNA CITOSÓLICOS AFECTAN EN DIFERENTE MEDIDA LA RESPUESTA A INTERFERÓN INDUCIDA POR LA DEPLECIÓN DE MÚLTIPLES VARIANTES DE H1	80
2. EFECTOS DE LA DEPLECIÓN DE LA HISTONA H1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA: PROLIFERACIÓN.....	83
2.1 LA DEPLECIÓN SIMULTÁNEA DE MÚLTIPLES VARIANTES DE H1 (MH1SH) AFECTA DRÁSTICAMENTE EL CRECIMIENTO CELULAR.	83
2.2 LA DEPLECIÓN DE MÚLTIPLES VARIANTES DE H1 (MH1 SHRNA) ASÍ COMO LA DEPLECIÓN DE H1.2 DE FORMA INDIVIDUAL AFECTAN DRÁSTICAMENTE EL CRECIMIENTO INDEPENDIENTE DE ANCLAJE.	84
2.3 LA DEPLECIÓN INDIVIDUAL DE H1.2 Y H1.3, ASÍ COMO LA INHIBICIÓN COMBINADA MH1SH, AFECTARON INTENSAMENTE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE COLONIAS DEPENDIENTES DE ANCLAJE EN CÉLULAS T47D.	86
CONCLUSIONES.....	89
1. CONCLUSIONES.....	91
BIBLIOGRAFÍA.....	93

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- CROMATINA Y SUS DIFERENTES ESTRUCTURAS DE ACUERDO A SU NIVEL DE CONDENSAMIENTO A) NUCLEOSOMA. B) CROMATOSOMA. C) ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA CROMATINA 10NM. D) ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA CROMATINA 30NM. E) ESTRUCTURAS DE ORDEN SUPERIOR DE LA CROMATINA. FIGURA MODIFICADA DE BIO-SOCIAL METHODS COLLABORATIVE, 2013.....	6
FIGURA 2.- LÍNEA DE TIEMPO CON ALGUNOS DE LOS PRINCIPALES DESCUBRIMIENTOS SOBRE LA CROMATINA (IMAGEN MODIFICADA TZELEPIS ET AL. 2017).....	8
FIGURA 3.- MODELOS DE ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA: A) FIBRA DE 10NM. B) VISTA LATERAL DE LA FIBRA DE 30NM. C)VISTA POSTERIOR DE LA FIBRA DE 30NM. FIGURA MODIFICADA (QUÉNET ET AL., 2012)	9
FIGURA 4.- CROMATOSOMA CON LAS PRINCIPALES MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS (COTA, SHAFI, & RANCOURT, 2013).....	9
FIGURA 5.- TRANSCRIPCIÓN DEL GENE DE IFNB DESPUÉS DE LA INFECCIÓN VIRAL. A) DOMINIOS REGULADORES (PRD) I, II, III Y IV. B) ACETILACIÓN DE LOS RESIDUOS DE LISINA DE LAS HISTONAS H3 Y H4 EN EL NUCLEOSOMA. C) COMPLEJOS DE REMODELACIÓN DE LA CROMATINA, SE PONEN EN CONTACTO CON LA HISTONA ACETILADA. D) FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TFIID INDUCE LA EXPRESIÓN DE IFNB.....	21
FIGURA 6.- CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE INTERFERON (IFN). LAS TRES CLASES DE IFNs PRESENTAN DISTINTOS COMPLEJOS RECEPTORES EN LA SUPERFICIE CELULAR A) IFN TIPO I. B) IFN TIPO III. C) IFN TIPO II. IMAGEN (SCHNEIDER ET AL., 2014).....	25
FIGURA 7.- REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS ISGs (GENES ESTIMULADOS POR IFN). SE DESCRIBEN VARIOS COACTIVADORES Y COREPRESORES. DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN CON IFN, ISGF3 o STAT1 SE UNE A LA REGIÓN PROMOTORA DE ISG, RECLUTANDO VARIOS REMODELADORES DE CROMATINA BAF, PBAF, p300/CBO, GCN5, HAT, HDAC, MCM3, MCM5, NMI Y DRIP15. POR EL CONTRARIO, ENTRE LOS COREPRESORES TENEMOS FOXO3, TAF-I, HDAC3, ENTRE OTROS. IMAGEN (WANG, XU, SU, PEPPLENBOSCH, & PAN, 2017).....	26
FIGURA 8.- VARIOS ISGs (ESTRELLAS) QUE INTERFIEREN EN DISTINTAS ETAPAS DEL CICLO VIRAL. IMAGEN (SCHNEIDER ET AL., 2014).....	28
FIGURA 9.- CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS SEGÚN (BALTIMORE, 1971)GRUPOS DEL I-VI. LOS GRUPOS DE VIRUS SON CLASIFICADOS DEPENDIENDO DE LA COMBINACIÓN O CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA(DNA, RNA) VIRAL, CADENA (SENCILLA, DOBLE), SENTIDO(+ SENTIDO, - ANTISENTIDO), Y MODO DE REPLICACIÓN (RETRO VIRUS RT). LOS SENSORES QUE RECONOCEN LOS RESPECTIVOS GRUPOS DE VIRUS ESTÁN INDICADOS. IMAGEN (IWASAKI, 2012)	34
FIGURA 10.- ANÁLISIS POR WESTERN BLOT Y RT-qPCR DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS Y RNA A) LAS CÉLULAS MHI SHRNA FUERON TRATADAS CON DOX POR 12 DÍAS, LOS ANÁLISIS DE INMUNODETECCIÓN SE REALIZARON CON LOS ANTICUERPOS INDICADOS. B) ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA CIERTAS VARIANTES DE H1	59
FIGURA 11.- TINCIÓN COOMASSIE DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS DE CÉLULAS T47D MHI SHRNA SEPARADAS EN UN GEL SDS-PAGE. A) PERFILES DE LAS BANDAS CORRESPONDIENTES A H1, OBTENIDAS CON IMAGEJ. B) CUANTIFICACIÓN PORCENTUAL DE CONTENIDO TOTAL DE H1	60
FIGURA 12.- ANÁLISIS POR WESTERN BLOT Y RT-qPCR DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS Y RNA A) LAS CÉLULAS T47D H1.4/H1.2 SHRNA FUERON TRATADAS CON DOX POR 6 DÍAS, LOS ANÁLISIS DE INMUNODETECCIÓN SE REALIZARON CON LOS ANTICUERPOS INDICADOS(IZQUIERDO ET AL, EN REVISIÓN). B) ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA CIERTAS VARIANTES DE H1.....	61
FIGURA 13.- TINCIÓN COOMASSIE DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS DE CÉLULAS T47D H1.4/H1.2 SHRNA SEPARADAS EN UN GEL SDS-PAGE. A) PERFILES DE LAS BANDAS CORRESPONDIENTES A H1, OBTENIDAS CON IMAGEJ B) CUANTIFICACIÓN PORCENTUAL DE CONTENIDO TOTAL DE H1	62
FIGURA 14.- ANÁLISIS POR WESTERN BLOT Y RT-qPCR DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS Y RNA A) LAS CÉLULAS T47D H1.2/H1.5 SHR-NA FUERON TRATADAS CON DOX POR 6 DÍAS, LOS ANÁLISIS	

DE INMUNODETECCIÓN SE REALIZARON CON LOS ANTICUERPOS INDICADOS. B) ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA H1.2 Y H1.5.	63
FIGURA 15.-TINCIÓN COOMASSIE DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS DE CÉLULAS T47D H1.2/H1.5 SHRNA SEPARADAS EN UN GEL SDS-PAGE. A) PERFILES DE LAS BANDAS CORRESPONDIENTES A H1, OBTENIDAS CON IMAGEJ B) CUANTIFICACIÓN PORCENTUAL DE CONTENIDO TOTAL DE H1	63
FIGURA 16.- ANÁLISIS POR WESTERN BLOT Y RT-QPCR DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS Y RNA A) LAS CÉLULAS T47D H1.2/H1.5 SHR-NA FUERON TRATADAS CON DOX POR 6 DÍAS, LOS ANÁLISIS DE INMUNODETECCIÓN SE REALIZARON CON LOS ANTICUERPOS INDICADOS. B) ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA H1.4 Y H1.5.	64
FIGURA 17.- TINCIÓN COOMASSIE DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS DE CÉLULAS T47D H1.4/H1.5 SHRNA SEPARADAS EN UN GEL SDS-PAGE. A) PERFILES DE LAS BANDAS CORRESPONDIENTES A H1, OBTENIDAS CON IMAGEJ B) CUANTIFICACIÓN PORCENTUAL DE CONTENIDO TOTAL DE H1	65
FIGURA 18.- ANÁLISIS POR WESTERN BLOT Y RT-QPCR DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS Y RNA A) LAS CÉLULAS MCF7 MH1 SHRNA FUERON TRATADAS CON DOX POR 6 DÍAS, LOS ANÁLISIS DE INMUNODETECCIÓN SE REALIZARON CON LOS ANTICUERPOS INDICADOS. B) ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA CIERTAS VARIANTES DE H1.	66
FIGURA 19.- INDUCCIÓN DE LOS ISGs EN CÉLULAS T47D MH1 SHRNA A) EXPRESIÓN DE ISGs CUANTIFICADO POR RT-QPCR, EN CÉLULAS MH1 SHRNA, ASÍ COMO EN EL CONTROL RD SHRNA, TRA-TADAS CON DOX POR 6 DÍAS. LOS VALORES REPORTADOS CORRESPONDEN A LA EXPRESIÓN DEL GEN CORREGIDO POR GAPDH Y RELACIONADOS A LAS CÉLULAS NO TRATADAS. B) EXPRESIÓN DE VARIANTES DE H1 E ISGs A LO LARGO DE DISTINTOS TIEMPOS DE TRATAMIENTO DE DOXICICLINA. LOS VALORES INDICADOS SE ENCUENTRAN CORREGIDOS POR GAPDH Y RELACIONADOS AL PUNTO MÁS ALTO DE EXPRESIÓN.	67
FIGURA 20.- EXPRESIÓN DEL GEN H1.2 Y DE LOS ISGs EN LAS LÍNEAS T47D, HeLa Y MCF7 SEÑALADAS A) NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE H1.2 CORREGIDO POR GAPDH. B) NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE ISGs CORREGIDO POR GAPDH	68
FIGURA 21.- INDUCCIÓN DE LOS ISGs EN CÉLULAS T47D H1.4/H1.2 SHRNA, H1.2 SHRNA Y H1.4 SHRNA A) EXPRESIÓN DE ISGs CUANTIFICADO POR RT-QPCR, EN LAS CÉLULAS INDICADAS, TRATADAS CON DOX POR 6 DÍAS. LOS VALORES REPORTADOS CORRESPONDEN A LA EXPRESIÓN DEL GEN CORREGIDO POR GAPDH Y RELACIONADOS A LAS CÉLULAS NO TRATADAS CORRESPONDIENTES. B) EXPRESIÓN DE VARIANTES DE H1 E ISGs A LO LARGO DE DISTINTOS TIEMPOS DE TRATAMIENTO DE DOXICICLINA EN CÉLULAS T47D H1.4/H1.2 SHRNA. LOS VALORES INDICADOS SE ENCUENTRAN CORREGIDOS POR GAPDH Y RELACIONADOS AL PUNTO MÁS ALTO DE EXPRESIÓN.	69
FIGURA 22.- NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS ISGs DESPUÉS DE 6 DÍAS DE TRATAMIENTO CON DOX EN CÉLULAS A) T47D H1.4 SHRNA, H1.4/H1.2 SHRNA, B) H1.2/H1.5 SHRNA Y H1.4/H1.5 SHRNA. VALORES DE A) Y B) CORREGIDOS POR GAPDH Y RELACIONADOS A SUS CORRESPONDIENTES CÉLULAS NO TRATADAS.	71
FIGURA 23.- EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA H1.3 Y DE VARIOS ISGs CUANTIFICADO POR RT-QPCR, EN LAS CÉLULAS INDICADAS, TRATADAS CON DOX POR 6 DÍAS. A) EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE H1.3. B) NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS ISGs INDICADOS. LOS VALORES REPORTADOS EN A) Y B) CORRESPONDEN A LA EXPRESIÓN DEL GEN CORREGIDO POR GAPDH Y RELACIONADOS A LAS CÉLULAS NO TRATADAS CORRESPONDIENTES.	71
FIGURA 24.- NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS ISGs INDICADOS EN CÉLULAS MCF7 MH1 SHRNA. LOS VALORES REPORTADOS CO-RRESPONDEN A LA EXPRESIÓN DEL GEN DESPUÉS DE 6 DÍAS DE TRATAMIENTO CON DOX CORREGIDO POR GAPDH Y EN RELACIÓN A LAS CÉLULAS NO TRATADAS(-DOX).	72
FIGURA 25.- ANÁLISIS DE FACs, RT-QPCR Y WESTERN BLOT EN CÉLULAS QUE EXPRESAN LAS VARIANTES DE H1 ETIQUETADAS HA Y CON EL GEN MARCADOR GFP-FLUORESCENTE A)EL EJEMPLO MUESTRA LA DOBLE FLUORESCENCIA DE LAS CÉLULAS MH1 SHRNA/H1.3HA. RFP-POSITIVAS POR EL SISTEMA INDUCIBLE REPRIMIDO(SIN DOX) MH1 SHRNA Y GFP-POSITIVAS POR EL MARCADOR DE FLUORESCENCIA ACOPLADO A LA VARIANTE ETIQUETADA DE H1.3HA. B) EXPRESIÓN GÉNICA CORREGIDA POR GAPDH DE LAS VARIANTES DE H1 Y DE IFI27. C)	

INMUNODETECCIÓN DE HA, DE EXTRACTOS TOTALES DE HISTONAS DE LAS MUESTRAS INDICADAS.	73
FIGURA 26.- EXPRESIÓN DE VARIANTES DE H1 E ISGs A LO LARGO DE DISTINTOS TIEMPOS DE TRATAMIENTO DE DOXICICLINA (LÍNEA NEGRA) Y DESPUÉS DEL LAVADO Y REMOCIÓN DE LA DOXICICLINA (LÍNEA GRIS) EN CÉLULAS T47D mH1 shRNA. A) EXPRESIÓN DE LAS VARIANTES DE H1 Y B) EXPRESIÓN DE LOS ISGs. EN A) Y B) LOS VALORES INDICADOS SE ENCUENTRAN CORREGIDOS POR GAPDH Y RELACIONADOS CON EL VALOR REPORTADO AL TIEMPO 0.	75
FIGURA 27.- NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVOS DEL GEN QUE CODIFICA PARA INTERFERÓN ALFA A DISTINTOS TIEMPOS DE TRATAMIENTO CON DOXICICLINA, CORREGIDO POR GAPDH EN RELACIÓN A LAS CÉLULAS NO TRATADAS (-).	76
FIGURA 28.- NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVOS DE VARIOS ISGs EN LAS CÉLULAS INDICADAS. T47D CÉLULA WILD-TYPE, T47D+MEDIA (CO-RRESPONDE A LAS CÉLULAS WILD-TYPE A LAS QUE SE LES TRANSFIRIÓ EL MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS T47D mH1 shRNA TRATADAS POR 3 DÍAS CON DOX).....	76
FIGURA 29.- NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVOS DE IFI27 E IFI6 EN LAS CÉLULAS INDICADAS. T47D (H1.2 shRNA, H1.4 shRNA Y H1.4/H1.2 shRNA). LAS CÉLULAS INDICADAS HAN SIDO TRATADAS CON IFN-B(+)(0.15UG/ML) O (++) (1.2UG/ML) POR 8 HORAS. EL TRATAMIENTO DE DOXICICLINA EN LAS CÉLULAS SEÑALADAS TUVO UNA DURACIÓN DE 6 DÍAS.	78
FIGURA 30.- A) DIANAS DE LOS INHIBIDORES (EN ROJO) 2-AMINOPURINE, BX795 Y RUXOLITINIB REPRESENTADOS EN UN MODELO SIMPLIFICADO DE LA RESPUESTA A INTERFERÓN INDUCIDO POR ssRNA, dsRNA, RNA:DNA, dsDNA. B) CÉLULAS T47D mH1 shRNAtiH1sh FUERON TRATADAS O NO CON DOX, 0.5mM BX795, 1mM RUXOLITINIB O 10mM 2-AMINOPURINE. LA EXPRESIÓN GÉNICA ESTÁ CORREGIDA POR GAPDH Y EN RELACIÓN A SU RESPECTIVA MUESTRA NO TRATADA.	80
FIGURA 31.- NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE ISGs EN CÉLULAS T47D mH1 shRNA SIN Y CON DEPLECIÓN A) STING, MAVS, MDA5. B) T47D mH1 shRNA CON DEPLECIÓN DE TLR3. EN A) Y EN B) LAS CÉLULAS FUERON TRATADAS CON DOX POR 6 DÍAS. LA EXPRESIÓN GÉNICA ESTÁ CORREGIDA POR GAPDH Y EN RELACIÓN A SU RESPECTIVA MUESTRA NO TRATADA.	81
FIGURA 32.- RIG-I/MDA5 INDUCE LA EXPRESION DE INTERFERON DEL TIPO I Y ACTIVA LA RESPUESTA IN-MUNE INNATA, LOS GENES EXPRESADOS EN FORMA DIFERENCIAL SE ENCUENTRAN EN PÚRPURA.	82
FIGURA 33.- REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE VARIACIÓN DE LAS PROPORCIONES RFP/GFP-POSITIVOS FRENTE A RFP/GFP NEGATIVOS (RADIO KD/WT) DE LAS DISTINTAS VARIANTES INDICADAS. LOS DATOS HAN SIDO OBTENIDOS A DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO CON DOX.....	83
FIGURA 34.- FORMACIÓN DE COLONIAS INDEPENDIENTES DE ANCLAJE EN CÉLULAS T47D. LAS LÍNEAS CELULARES INDICADAS FUERON SEMBRADAS EN SOFT-AGAR, TRATADAS O NO CON DOXICICLINA. LAS CÉLULAS FUERON CONTADAS DESPUÉS DE 21 DÍAS CON IMAGEJ.	84
FIGURA 35.- FORMACIÓN DE COLONIAS INDEPENDIENTES DE ANCLAJE DE CÉLULAS A) MCF7 Y B) HeLa. LAS LÍNEAS CELULARES INDICADAS FUERON SEMBRADAS EN SOFT-AGAR, TRATADAS O NO CON DOXICICLINA. LAS CÉLULAS FUERON CONTADAS DESPUÉS DE 21 DÍAS CON IMAGEJ.....	85
FIGURA 36.- FORMACIÓN DE COLONIAS DEPENDIENTES DE ANCLAJE EN CÉLULAS T47D. LAS LÍNEAS CELULARES INDICADAS FUERON TRATADAS O NO CON DOXICICLINA. LAS CÉLULAS FUERON CONTADAS DESPUÉS DE 21 DÍAS CON IMAGEJ Y LOS VALORES REPRESENTAN EL NÚMERO DE COLONIAS EN RELACIÓN A LAS CÉLULAS NO TRATADAS.	86
FIGURA 37.- FORMACIÓN DE COLONIAS DEPENDIENTES DE ANCLAJE EN CÉLULAS A) MCF7 Y B) HeLa. LAS LÍNEAS CELULARES INDICADAS FUERON TRATADAS O NO CON DOXICICLINA. LAS CÉLULAS FUERON CONTADAS DESPUÉS DE 21 DÍAS CON IMAGEJ Y LOS VALORES REPRESENTAN EL NÚMERO DE COLONIA	87

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.- RESUMEN DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EN LAS VARIANTES MÁS COMUNES DE LA HISTONA HUMANA H1. LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN EN NEGRITA CORRESPONDEN A SITIOS CONSENSUS EN DCT. * INDICA N-A-ACETILACIÓN DEL RESIDUO N-TERMINAL, DESPUÉS DE RETIRAR LA METIONINA. TABLA MODIFICADA (MILLÁN ARIÑO, 2013)	14
TABLA 2.- FAMILIA DE LA HISTONA H1 EN HUMANOS Y RATONES	15
TABLA 3.- LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS, DESCRIPCIÓN DE SUS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS Y EL MEDIO DE CULTIVO	41
TABLA 4.- RNA DE INTERFERENCIA UTILIZADOS CON SU RESPECTIVO VECTOR, DIANA Y SECUENCIA DIANA.	43
TABLA 5.- OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS CON SUS RESPECTIVAS SECUENCIAS.....	46
TABLA 6.- ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN	49
TABLA 7.- MOLÉCULAS UTILIZADAS CON SUS RESPECTIVAS CONCENTRACIONES, TIEMPO DE EXPOSICIÓN AL TRATAMIENTO Y EFECTOS ESPERADOS.	53
TABLA 8.- shRNAs ESTABLECIDOS Y UTILIZADOS PARA INHIBIR LAS DISTINTAS VARIANTES DE H1.....	58

RESUMEN

La histona H1 se une al nucleosoma, situándose en la base, cerca de los sitios de entrada y salida del DNA, siendo una de sus principales funciones descritas, el mantenimiento de una estructura estable y condensada de la cromatina. Los primeros estudios realizados del rol que desempeña H1 en la regulación transcripcional señalaban que H1 era un represor global de la transcripción. Sin embargo, estudios recientes sugieren que H1 desempeña un papel más dinámico y contribuye a una regulación transcripcional específica de genes. Siete variantes de histonas H1 existen en células somáticas humanas (H1.1 a H1.5 que son expresadas de una manera dependiente de la replicación, mientras que H1.0 y H1X son independientes de la replicación). Uno de los principales debates es si dichas variantes de histonas H1 tienen un rol específico o redundante.

En este trabajo investigamos esto a través de RNAs interferentes inducibles para inhibir de manera individual y por primera vez de manera simultánea las variantes de la histona H1 en células de cáncer de mama T47D.

La inhibición individual de las distintas variantes ocasionó una reducción de la velocidad de crecimiento en comparación a células parentales. Al inhibir de manera simultánea las variantes H1.2 y H1.4, se observó que la proliferación se ve afectada en mayor medida que al inhibir las variantes H1.2 y H1.4 de manera individual. Debido a que la proliferación celular y adhesión celular son características relacionadas con la tumorigénesis e invasión metastásica, se investigó además los efectos de la depleción de las distintas variantes en la capacidad de formar colonias independientes del anclaje. Nuestros resultados sugieren que la variante H1.2 es esencial para que las células crezcan tanto de manera independiente como dependiente del anclaje, lo que sugiere que al inhibir dicha variante las células posiblemente pierden su capacidad metastásica. La combinación de la depleción de H1.2 y H1.4 indujo una fuerte respuesta a interferón (IFN), efecto que no se observó en depleciones individuales de variantes de histonas H1. Se verificó que la depleción combinada de H1.2 y H1.4 producía la sobreexpresión y síntesis de interferón. Dicha síntesis de IFN indujo la respuesta a IFN en células T47D y activó la ruta JAK-STAT, principal ruta involucrada en la activación de la transcripción de ISGs. Se verificó mediante la combinación de dos RNA interferentes para las variantes H1.4 y H1.2 en T47D(H1.4/H1.2sh) que la respuesta a interferón ocasionada por el multiH1 shRNA, se reproduce al inhibir tanto a nivel de RNA como

de proteína únicamente las variantes H1.2 y H1.4. La inhibición de otras combinaciones que incluyen H1.2 con H1.5, H1.4 con H1.5 y triples combinaciones H1.2/H1.5/H1.3 y H1.4/H1.5/H1.3 produjeron, sólo cuando la depleción de H1.2 estuvo involucrada, la sobreexpresión de ISGs a niveles inferiores a los observados en la depleción mH1sh o en la combinación H1.4/H1.2. En las células en las que no se deplecionó H1.2 no se observó la respuesta a interferón.

Por otra parte, la combinación de la depleción de H1.2 y H1.4(H1.4/H1.2sh) con el tratamiento con IFN β comercial produjo un efecto sinérgico en la sobreexpresión de ISGs, lo que sugiere que existen otros mecanismos de inducción de los ISGs además de la estimulación por el IFN sintetizado. Análisis con inhibidores y knock downs constitutivos de sensores y adaptadores de la respuesta a IFN nos sugieren que posiblemente al deplecionar H1.2/H1.4 se desencadena la expresión de dsRNA no codificantes posiblemente formados desde retrovirus endógenos o de secuencias repetitivas de heterocromatina, y que dichos ácidos nucleicos son los causantes de la activación de la respuesta inmune antiviral, que ocasiona los efectos observados como son la síntesis de IFN, sobreexpresión de ISGs, defectos en la proliferación.

INTRODUCCIÓN

1. Estructura y dinámica de la cromatina

1.1 Estructura de la cromatina

La cromatina consiste en fibras que contienen proteínas estructurales, DNA, proteínas no estructurales y RNA. El DNA se encuentra compactado en diferentes niveles en el núcleo. El primer nivel de organización consiste en 1.7 vueltas de DNA alrededor de 8 histonas formando una unidad llamada nucleosoma, Esta unidad generalmente se encuentra asociada a otra histona H1 y al DNA conector, completando de esta manera este primer nivel. A continuación, se forma una super hélice denominada fibra de 30nm mediante el empaquetamiento de los nucleosomas, en este proceso la Histona H1 tiene un rol importante. Finalmente la fibra de 30 nm se condensa hasta llegar al nivel máximo de empaquetamiento, el cromosoma, los mecanismos por los cuáles se alcanzan este nivel de condensamiento es aún poco conocido(Widom, 1998; Robert, McGinty y Song, 2014)

El genoma consta de unos miles de millones de pares de bases, cuya longitud se calcula es de aproximadamente 3m si se despliega completamente. Para que esta estructura calce dentro del núcleo tiene que ser altamente compactada como se mencionó anteriormente. Se ha descrito que durante la interfase en las fases G0 y G1, la cromatina se encuentra en dos estados, el primero denominado heterocromatina, en el cual la cromatina está condensada, ubicada principalmente en la periferia nuclear y se asocia este estado principalmente a bajos niveles de expresión génica. El segundo estado, presenta una cromatina ligeramente compactada, se le conoce con el nombre de eucromatina, está ubicada hacia el interior del núcleo y está asociada con una mayor expresión génica(Prakash, 2016).

1.2 Nucleosoma

Los resultados de varios estudios por centrifugación analítica, digestión con nucleasas, cristalografía de rayos x, así como las primeras imágenes de los nucleosomas obtenidas por microscopía electrónica, develaron que el nucleosoma es una estructura de 11 nm de diámetro, constituida por unos 146pb de DNA enrollada en 8 proteínas de histonas. Este octámero está conformado por un tetrámero de histonas H3/H4 flanqueado por

dos dímeros de H2A/H2B , cada octámero tiene aproximadamente 1.7 vueltas de DNA alrededor suyo dando lugar al nucleosoma (Figura 1A) (Kornberg, 1974; Kornberg & Lorch, 2017; Richmond et al., 1984)

Las histonas nucleares son ricas en lisinas y argininas, aminoácidos básicos que le donan una fuerte carga positiva, lo cual favorece para su asociación con el DNA que se encuentra cargado negativamente, además los nucleosomas están unidos por segmentos cortos de DNA, denominados DNA enlazador. Aproximadamente 20 pb de este DNA enlazador se encuentra asociado con la histona H1, en humanos la familia H1 comprende once variantes o subtipos, que se une al nucleosoma, situándose en la base cerca a los sitios de entrada y salida del DNA, a la asociación de la histona H1 más los nucleosomas se le conoce con el nombre de cromatosoma (Figura 1B). Las interacciones entre nucleosomas vecinos dan lugar a la "estructura primaria" de la cromatina que comprende una fibra de cromatina de 10nm (Figura 1C). La histona H1 promueve el mantenimiento y la asociación de los nucleosomas en las estructuras de orden superior como las fibras de cromatina de 30 nm que corresponden a la estructura secundaria(Figura 1D), así como en las estructuras más condensadas que permiten organizar el DNA en el núcleo celular (Figura 1E)(Robert et al., 2014; Widom, 1998)

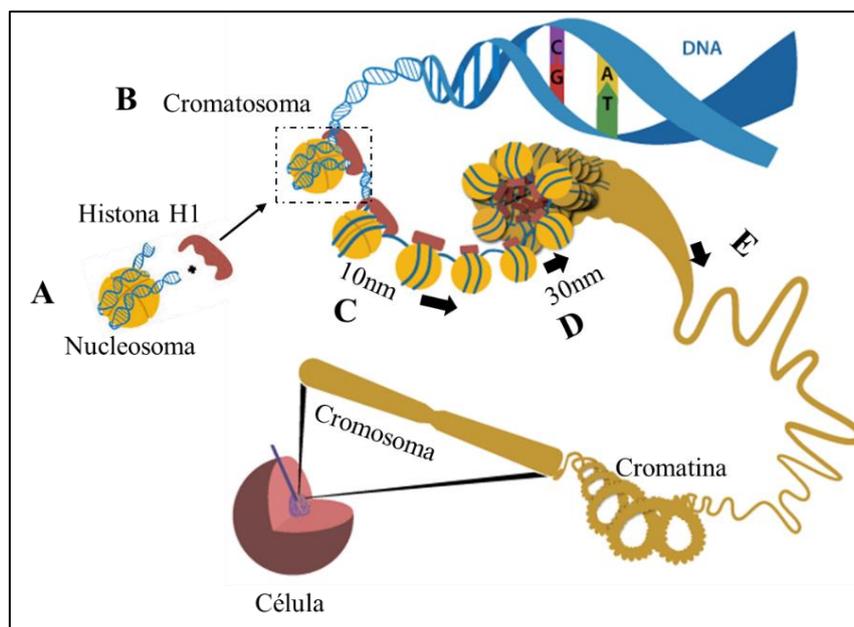


Figura 1.- Cromatina y sus diferentes estructuras de acuerdo a su nivel de condensamiento A) Nucleosoma. B) Cromatosoma. C) Estructura primaria de la cromatina 10nm. D) Estructura secundaria de la cromatina 30nm. E) Estructuras de orden superior de la cromatina. Figura modificada de Bio-Social Methods Collaborative, 2013

1.3 La fibra de 30nm de cromatina

En la Figura 2 se sintetizan los principales hitos en el estudio de la cromatina, los avances en varias técnicas especialmente de microscopía electrónica han permitido observar, describir y diferenciar la eucromatina de la heterocromatina, así como obtener imágenes de fragmentos de cromatina bajo diferentes condiciones. Se ha descrito que la cromatina a niveles fisiológicos de fuerzas iónicas, se establece como una cadena de nucleosomas condensada que forma una estructura regular de 30nm (Finch y Klug, 1976; Thoma, Koller y Klug, 1979) (Fig 3B y C)

Para la formación de esta fibra se ha descrito que la histona H1 desempeña un papel importante, debido a que su unión al nucleosoma permite el empaquetamiento de 20pb adicionales de DNA, dando lugar que el DNA se enrolle dos vueltas completas alrededor del octámero de histonas. La primera descripción de la fibra de 30nm de cromatina fue realizada por microscopía electrónica de transmisión y difracción de rayos X por Finch y Klug. Durante varios años se han validado dichas observaciones mediante ensayos *in vitro*. Actualmente, en estudios realizados *in vivo*, describen un núcleo eucariota constituido única y principalmente por fibras de 10nm de cromatina y proponen que la fibra de 30nm *in vivo*, no existe. De esta manera, el modelo que describe que la estructura de 30nm sostiene un estado quiescente transcripcional del genoma debido a una falta de acceso de las RNA polimerasas o activadores transcripcionales al DNA, cuyos genes se encuentran encubiertos por el octámero de proteínas y sellado con la histona H1, se encuentra en discusión conjuntamente con el modelo de organización de la cromatina(Quénet, McNally, & Dalal, 2012)(Figura 3)

No están totalmente determinados los siguientes niveles de organización, se han propuesto varios modelos que indican, que la fibra de 30nm forma bucles de tamaño variado, conteniendo entre 5000 y 12000 pb según los organismos, estos bucles estarían estabilizados por la histona H1 y proteínas no histonas, incluyendo topoisomerasas tipo II, formando de esta manera un andamio nuclear.

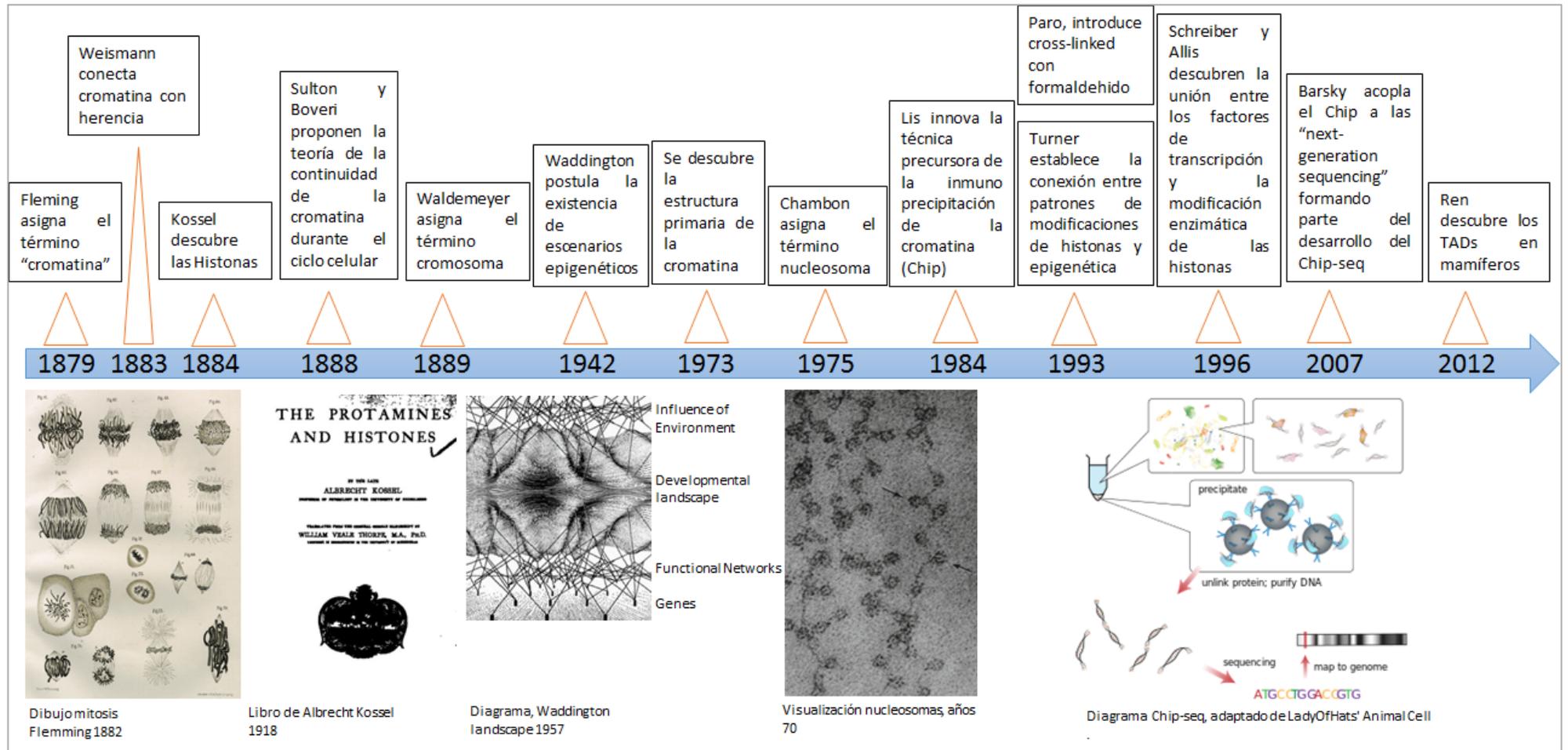


Figura 2.- Línea de tiempo con algunos de los principales descubrimientos sobre la cromatina (Imagen modificada Tzelepis et al. 2017)

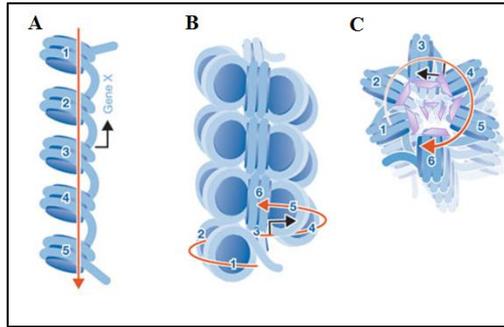


Figura 3.- Modelos de organización de la cromatina: A) fibra de 10nm. B) Vista lateral de la fibra de 30nm. C) Vista posterior de la fibra de 30nm. Figura modificada (Quénet et al., 2012)

1.4 Histonas nucleares

Las histonas son proteínas que unen al DNA y se encuentran en la cromatina de todas las células eucariotas, en general son altamente conservadas, con un alto contenido de arginina/lisina, así como relativamente pequeñas (11-32kDa) y por su composición y secuencia pueden clasificarse en 5 clases principales H1/H5, H2A, H2B, H3 y H4. Cada una de ellas presenta algunas variantes genéticas o subtipos. Las histonas nucleares nucleosomales (H2A/B, H3 y H4) presentan similitudes en su conformación estructural, mientras que H1/H5 son mucho más largas en su conformación. Cada una de las histonas nucleares presentan un dominio globular que media las interacciones histona-histona en el octámero, así como organiza las dos vueltas del DNA en el nucleosoma.

Las histonas son sujetos a varios tipos de modificaciones post-traduccionales que se encuentran sintetizadas en la Figura 4.

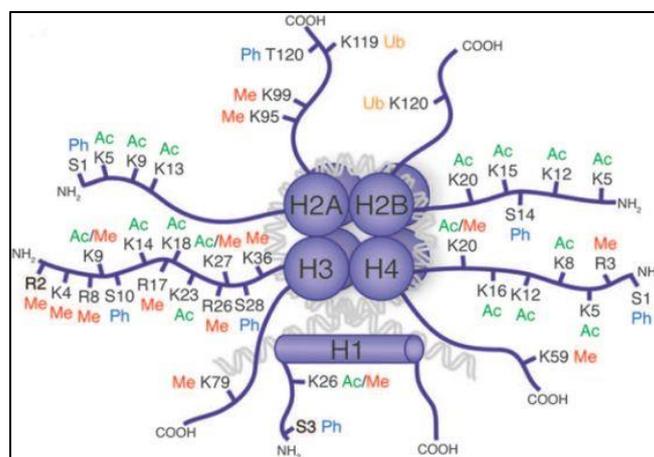


Figura 4.- Cromatosoma con las principales modificaciones post-traduccionales de histonas (Cota, Shafa, & Rancourt, 2013)

Se han descrito principalmente dos mecanismos de funcionamiento de las modificaciones de histonas, en el primero se menciona que dichas modificaciones interfieren en los contactos entre nucleosomas, por ejemplo, abriendo la cromatina en el caso de la acetilación, en el segundo mecanismo se propone que interaccionan con proteínas o complejos proteicos efectores o transductores(Kouzarides, 2007). El accionar combinado de las distintas modificaciones de histonas da lugar al denominado “código de las histonas”(Jenuwein & Allis, 2001; Santos-Rosa & Caldas, 2005; Taverna, Li, Ruthenburg, Allis, & Patel, 2007). Este código es leído por proteínas que contienen dominios específicos de interacción y son los efectores que inician respuestas biológicas como activación o represión de la transcripción, etc. Estudios sobre los mecanismos por los cuáles es ejecutado y heredado el código de histonas, es hasta la actualidad objeto de investigación(Kouzarides, 2007; Ray-Gallet, Gerard, Polo, & Almouzni, 2005; Santos-Rosa & Caldas, 2005)

Varias modificaciones post-traduccionales son de gran importancia en el mantenimiento del estado de heterocromatina silente, la cual por ejemplo, está asociada con niveles bajos de acetilación y niveles elevados de metilación en algunos residuos de las histonas como H3K9, H3K27 y H4K20(Kouzarides, 2007). Se ha descrito que la metilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9) está implicada en el silenciamiento de la heterocromatina(Shilatifard, 2006). Al investigar dicho silenciamiento, se ha observado que la proteína HP1 se une al promotor de los genes reprimidos, esto debido a que la proteína HP1 tiene un cromodominio que reconoce residuos H3K9 metilados. Este mecanismo de silenciamiento de la heterocromatina se propaga por la acción de histona-metil-transferasas que metilan nuevos residuos de H3K9 con la correspondiente unión de más moléculas de HP1(Shilatifard, 2006).

Por el contrario, en las regiones de eucromatina, el DNA presenta mayor flexibilidad, en el caso de eucromatina transcripcionalmente activa, se ha descrito que tiene niveles elevados de acetilación. Entre las principales modificaciones tenemos la acetilación de las histonas H3 y H4 y la di/tri metilación de H3K4(B. Li, Carey, & Workman, 2007). Algunas de estas modificaciones generan pequeños cambios en la estructura de alto orden de la cromatina, este es el caso de la acetilación de H4K16, la cual inhibe la formación de fibras compactas de 30 nm(Shogren-Knaak et al., 2006; Shogren-Knaak

& Peterson, 2006). Varias modificaciones se distribuyen de forma específica en la región reguladora 5' del gen, el promotor proximal, el extremo 5' del ORF (Open Reading Frame) y el extremo 3' del ORF (Rando, 2007). Entre las modificaciones más conocidas tenemos la acetilación y deacetilación de las histonas. La acetilación tiene un efecto activador de la transcripción ya que reduce la afinidad de las histonas por el DNA, al neutralizar la carga positiva de las lisinas. Así, los nucleosomas se empaquetan menos eficientemente, permitiendo que el DNA sea más accesible a proteínas reguladoras. La deacetilación de histonas se correlaciona con compactación de la cromatina y represión transcripcional. Se han estudiado varias familias de histonas deacetilasas HDAC y se ha observado que los niveles relativos de acetilación de histonas estarán determinados por las actividades enzimáticas contrapuestas HAT y HDAC.

Las modificaciones postraduccionales por metilación en las cadenas laterales de lisinas generalmente están catalizadas por enzimas específicas, se han identificado algunas de las enzimas responsables de la metilación de las histonas. Estas se agrupan en varias clases: a) histona metiltransferasas específicas de lisina conteniendo el dominio SET. Son las responsables de las metilaciones en las histonas H3 (residuos K4, K9, K27, K36) y H4 (K20); b) lisina metil-transferasas sin dominio SET, que metilan a H3K79 y c) arginina metiltransferasas que metilan distintos residuos de arginina en las histonas H3 y H4 (Shilatifard, 2006). Las lisinas pueden ser mono/di/tri metiladas y los diferentes grados de metilación darán lugar a respuestas diferentes. Por ejemplo, la metilación de H3K4 crea un sitio de unión de proteínas con cromodominios que, a su vez, atraen a acetil-transferasas para activar la transcripción (Pray-Grant, Daniel, Schieltz, Yates, & Grant, 2005). Además, la H3K4 metilada dirige la asociación de complejos remodeladores de la cromatina que producen cambios en los nucleosomas para la activación de la transcripción (Santos-Rosa et al., 2003). Igualmente, la metilación en H3K36 y H3K79 se correlacionan con activación transcripcional (Santos-Rosa & Caldas, 2005). Por el contrario, la metilación H3K9, H3K27 y H4K20 se ha relacionado con represión transcripcional (Kouzarides, 2007). La metilación en H3K9 (principalmente trimetilación) está implicada en el silenciamiento de la heterocromatina. La metilación en H3K27 se ha encontrado en el silenciamiento de la expresión de genes HOX, en la inactivación del cromosoma X y durante el imprinting genómico.

2. Histona H1

2.1 Características generales

La histona H1 se encuentra asociada al DNA enlazador en la superficie de los nucleosomas, motivo por lo cual se ha señalado que puede desempeñar un papel importante en el modelaje de estructuras de orden superior de la cromatina. Inicialmente, se ha descrito que la histona H1 cumple un rol como represor general de la transcripción, esto debido a que contribuye al condensamiento de la cromatina, ocasionando el impedimento en el acceso de la maquinaria transcripcional al DNA. Sin embargo, en base a estudios recientes, se ha observado que H1, podría participar en la regulación de la expresión de genes, de una manera más específica, por mecanismos que todavía no se encuentran completamente descritos (Harshman, Young, Parthun, & Freitas, 2013; Roque, Ponte, & Suau, 2016; J. Zlatanova, Gaiafa, & van Holde, 2000)

La histona H1 tiene una estructura con tres unidades que incluyen un dominio conservado globular de 75 residuos, una cola N-terminal (DNT) de 20-35 residuos dependiendo del subtipo y un dominio C-terminal (DCT) de 100 residuos (Allan, Hartman, Crane-Robinson, & Aviles, 1980).

El **dominio N-terminal** a través de distintos ensayos ha demostrado no ser esencial para la formación de estructuras de orden superior de la cromatina, a pesar de que su supresión aparentemente reduce la afinidad de H1 a la cromatina (Öberg & Belikov, 2012). El DNT es sujeto de modificaciones post-traduccionales (Tabla 1.) y son de interés principalmente las modificaciones en posiciones conservadas de esta región que en general es la más variable en la histona H1.

El **dominio central globular** es altamente conservado entre especies y se ha reportado que su presencia es suficiente para la unión de la histona con el nucleosoma *in vitro* (Allan et al., 1980). El sitio de unión de este dominio y su ubicación en el nucleosoma ha sido estudiado, varios modelos estructurales y posibles explicaciones de los mecanismos por los que el dominio globular se une al nucleosoma se han propuesto, pero debido a la característica heterogénea de la cromatina ninguno de estos modelos puede satisfacer todas las características de una cromatina nativa, y en su lugar describen escenarios posibles bajo condiciones puntuales (Roque et al., 2016)

El **dominio C-terminal** es altamente variable entre variantes de H1 y entre especies, varios estudios determinaron que el DCT es el dominio principal en el proceso de estabilización de la cromatina (Allan et al., 1980; Allan, Mitchell, Harborne, Bohm, & Crane-Robinson, 1986; Lu & Hansen, 2004). Algunos autores mencionan que las variaciones de DCT en los subtipos de histona H1 provocan que existan diferencias de afinidad con la cromatina entre las variantes (Clausell, Happel, Hale, Doenecke, & Beato, 2009; Orrego et al., 2007). Una de las principales PTMs de H1 ocurre en el DCT (Tabla 1) es la fosforilación por quinasas dependientes de ciclina (CDKs). La histona H1 es fosforilada de manera dependiente del ciclo celular, siendo los niveles de fosforilación bajos en G1 y con un incremento en S y G2. Durante la interfase, la histona H1 presenta un perfil de especies no fosforiladas/débilmente fosforiladas en una proporción del 35%-75% dependiendo de cada variante y el momento del ciclo celular (Sarg, Helliger, Talasz, Forg, & Lindner, 2006).

Varios autores han descrito los sitios y las variantes de histonas que son sujetos de modificaciones post-traduccionales en las histonas H1 (Tabla 1), uno de estos estudios ha sido llevado a cabo por nuestro grupo, mediante el cual se ha observado que T165 en H1.2 se fosforila en fase G2/M, y distintas variantes se acetilan en K17, K34, K46, K85 y K90; además K46 también podría monoubiquitinarse y K90 formilarse, y S36 fosforilarse. Se constató que la fosforilación de H1.2 T165 se inicia en fase S tras liberar las células de un doble bloqueo con timidina. Se observó también que los residuos K26/S27 de H1.4 sufren distintas combinaciones de modificaciones (acetilación o metilación, y fosforilación), dichas modificaciones no alteran que la S27 vecina se fosforile cuando las células llegan a la fase G2/M del ciclo celular. Finalmente, a través de una mutación K26A de H1.4, observamos que las células mutadas proliferaron más lentamente, mostrando una parada de ciclo en G2/M y presentaron un patrón de expresión génica diferencial (J. M. Terme et al., 2014).

H1 Variante	Sitio Fosforilación	Sitio Acetilación	Sitio metilación	Sitio ubiquitinación	Sitio formilación
H1.2	S2, T4, T31 , S36, T146 , T154 , T165 S173	S2*, K17, K34, K46, K52, K63, K64, K85, K90 K97, K169, K192	K34, K52, K64K K97, K106, K119, K168, K187	K46, K64, K75, K85, K90, K97 K106	K17, K34, K46, K63, K64, K75, K85, K90, K97, K160
H1.3	T4, T18 , S37, T147 , T155 , T180 S189	S2*, K17, K34, K46, K52, K63, K64, K85, K90 K97, K169	K52, K64, K97, K106, K169	K47, K65, K76, K86, K91, K98, K107	K34, K46, K63, K64, K75, K85, K90, K97, K141, K160
H1.4	S2, T4, T18 , S27 S36, S41, T142, T146 , T154 , S172 , S187	S2*, K17, K26, K34, k46, k52, k63, k64, K85, K90, K97, K169	K26, K52, K64, K97, K106, K119, K148, K169	K17, K21, K34, K46, K64, K75, K85, K90, K97 K106	K17, K34, K46, K63, K64, K75, K85, K90, K97, K110, K140, K160
H1.5	S2, T4, T11, S18 T39, S44, S107, T138 , T155 , S173 T187 , S189	S2*, K17, K49, K88, K93, K109, K168, K209	K27, K168, K169		K67, K85, K88

Tabla 1.- Resumen de modificaciones post-traduccionales en las variantes más comunes de la histona humana H1. Los sitios de fosforilación en negrita corresponden a sitios concensus en DCT. * indica N- α -acetilación del residuo N-terminal, después de retirar la metionina. Tabla modificada (Millán Ariño, 2013)

Vemos que se han descrito numerosas modificaciones postraduccionales (PTMs) en diferentes isoformas de H1, estas marcas no han sido hasta ahora conectadas en su totalidad directamente al 'código de histonas'. Un estudio ha encontrado evidencia que la histona H1, puede formar parte de un código de histonas dinámico para la reparación del DNA, en el que H1-K63 ubiquitilada, funciona como una plataforma de enlace para RNF8 el cuál promueve el reclutamiento de RNF168, la que posteriormente sea importante para la ubiquitilación de H2A en K13/K15 y de otras proteínas para activar el reclutamiento de los factores de reparación de roturas de doble-cadena de DNA (DSB)(Thorslund et al., 2015)

La multitud de PTM específicas de H1 plantea la posibilidad de que algunas de estas marcas pueden tener un papel integral en el código de histonas, un área de estudio que justifica una investigación más profunda.

2.2 Histona H1 y sus variantes

La familia de histona H1 presenta mayor variabilidad en comparación a las histonas nucleares y en varios organismos se ha descrito que existen muchos subtipos o variantes producto de eventos de duplicación de genes durante la evolución (Kasinsky, Lewis, Dacks, & Ausio, 2001). En humanos, la familia H1 incluye once variantes o subtipos, de las cuales, siete subtipos de H1 humanas son somáticas (H1.1 a H1.5, H1.0 y H1X), tres variantes son específicas del testículo (H1t, H1T2 y HILS1) y una variante específica de ovocitos (H1oo) (Izzo, Kamieniarz, & Schneider, 2008; Parseghian & Hamkalo, 2001)

De las variantes de la histona H1, tenemos que H1.1 a H1.5 se expresan de manera dependiente de la replicación celular, sintetizadas en la fase S, mientras que H1.0 y H1X son independientes de la replicación celular (Tabla 2). H1.2 a H1.5 y H1X se expresan de forma ubicua, la expresión de H1.1 es específica en ciertos tejidos y tipos celulares y H1.0 se acumula en células terminalmente diferenciadas.

Subtipo	Símbolo del gen en humanos	Expresión	Dependencia del ciclo celular
H1.1	HIST1H1A	Somática	Replicación-dependiente
H1.2	HIST1H1C	Somática	
H1.3	HIST1H1D	Somática	
H1.4	HIST1H1E	Somática	
H1.5	HIST1H1B	Somática	
H1.6	HIST1H1T	Testículos	Replicación-independiente
H1.0	H1F0	Somática	
H1.7	H1FNT	Testículos	
H1.8	H1FOO	Ovocito	
H1.9	HILS1	Testículos	
H1.10 (H1X)	H1FX	Somática	

Tabla 2.- Familia de la Histona H1 en humanos y ratones

Mientras que los genes que codifican histonas H1 somáticas humanas suelen agruparse en el brazo corto del cromosoma 6, y sus RNAm no poliadenilados contiene un 3' bucle en horquilla, el gen que codifica la histona H1.0 se encuentra separado, en el

brazo largo del cromosoma 22 y su RNAm se encuentra poliadenilado (Doenecke & Alonso, 1996).

Los motivos de la existencia de las variantes de H1 no son claras, varios estudios se han realizado con el fin de determinar si los subtipos de la histona H1 cumplen un papel específico o tienen funciones redundantes. En un reporte en ratones, al realizarse un simple o incluso un doble *knock-out* de variantes de H1, no se observó ningún fenotipo específico, los ratones parecían desarrollarse normalmente, estos resultados fueron explicados al cuantificar los valores totales de histona H1, los cuales se mantenían inalterados, indicando que además se producía una sobre regulación compensatoria de otros subtipos, favoreciendo el punto de vista en que las variantes de H1 cumplen una función redundante (Y Fan, Sirotkin, Russell, Ayala, & Skoultschi, 2001). Al realizarse el *knock-out* de más de dos variantes, se verificó un descenso en los niveles totales de H1 y se observó retardo en el crecimiento y en ciertos casos letalidad de los embriones, concluyendo que los niveles totales de H1 es un factor crítico para un desarrollo y función normal de los tejidos (Yuhong Fan et al., 2003). Investigaciones recientes, sustentan el punto de vista que las variantes de la histona H1 tienen funciones específicas. Se conoce que las variantes de H1 difieren en sus propiedades bioquímicas, afinidad por la cromatina y la capacidad en la compactación de la cromatina debido a diferencias en la cola C-t y N-t (Yuhong Fan et al., 2003; Luque, Collepardo-Guevara, Grigoryev, & Schlick, 2014). Diferentes subtipos de H1 han sido diferencialmente relacionados con procesos de cáncer, así como, se observa que los subtipos de H1 se modifican post-traduccionalmente de distinta manera y estas modificaciones modulan su interacción con diferentes factores con los cuales se pueden asociar (Daujat, Zeissler, Waldmann, Happel, & Schneider, 2005; Kamieniarz et al., 2012).

2.3 Distribución de la histona H1 en el genoma

Varios grupos han explorado la distribución genómica de H1 *in vivo*. Estudios iniciales basados en ensayos bioquímicos y de microscopía sugirieron una distribución no uniforme de H1 en el núcleo celular y encontraron diferencias entre las variantes. Entre los primeros experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina-microarray (ChIP-chip) en células MCF7 usando un anticuerpo para el contenido total de H1 tenemos el

realizado por (Krishnakumar et al., 2008), mediante el cual observaron que existía una reducción de la histona H1 en las regiones que rodean el TSS, encontrando una correlación negativa entre la abundancia de H1 y la expresión génica. Posteriormente, se utilizó la técnica de *DNA adenine methyltransferase identification* (DamID) para el estudio de la única histona H1 en *Drosophila* (Braunschweig, Hogan, Pagie, & van Steensel, 2009). Estudios recientes han descrito, los primeros mapas del genoma para las variantes de H1. Dos trabajos, usando tecnología DamID y ChIP de variantes H1 etiquetadas, en ESCs de ratón y en células IMR90 humanas, respectivamente, demostraron depleción de H1c y H1d de regiones ricas en GC y genes, así como una sobre-representación en DNA de satélites (Cao et al., 2013), y depleción de H1.2 a H1.5 de regiones reguladoras y CpG-densas, en el caso de H1.1 observaron que mostraba un perfil distinto (Izzo et al., 2013). Además, como se ha mencionado previamente Krishnakumar et al, describió que cuando un gen es transcripcionalmente activo, H1 se ve deplecionada (valle de H1) en el lugar de inicio de transcripción (TSS) de su promotor, esta observación se ve reforzada en un estudio en el que se realizó un mapeo de las distintas variantes de H1 en células somáticas de cáncer de mama (T47D) a través de ensayos (ChIP-chip) y (ChIP-seq), para lo cual se utilizaron anticuerpos específicos para algunos subtipos o el uso de variantes de H1 recombinantes etiquetadas con HA expresadas en líneas celulares, se estudió la distribución de seis variantes de H1 en promotores (ChIP-chip) y cuatro en genoma entero (ChIP-seq), incluyendo H1.0 y H1X por primera vez. En resumen, se describe que la histona H1 no está distribuida uniformemente a lo largo del genoma y existen diferencias entre las variantes, siendo H1.2 la que muestra el patrón más específico y mayor correlación positiva con baja expresión génica. La variante H1.2 se vio enriquecida en los dominios cromosómicos con bajo contenido GC y se asocia con cromosomas pobres en genes, DNA intergénico y dominios asociados a lámina (LADs). Mientras tanto, otras variantes se asocian con mayor contenido de GC, dominios ricos en genes e islas CpG. En general, la distribución de H1.2 a lo largo de los cromosomas se diferencia de la de otras variantes como H1.0 y H1X, las dos variantes estructuralmente más distantes dentro de la familia de H1 somáticas (Millán-Ariño et al., 2014)

2.4 H1 y su rol en la regulación transcripcional

Los primeros estudios realizados del rol que desempeña H1 en la regulación transcripcional apuntaban a que H1 era un represor global de la transcripción. Sin embargo, estudios más recientes que caracterizan los subtipos H1 sugieren que no es un represor global de la transcripción, sino que desempeña un papel más dinámico y contribuye a una regulación transcripcional específica de genes (Yuhong Fan et al., 2005; J.-Y. Li et al., 2012).

Uno de estos estudios, es el realizado anteriormente en nuestro grupo de investigación, en el cual se desarrollaron shRNAs inducibles contra las variantes H1.0-H1.5. Se observó mediante experimentos de microarray que diferentes grupos de genes fueron alterados por el knock-down de las distintas variantes y que la inhibición de H1.2 en células T47D producía parada del ciclo celular en G1 (Sancho, Diani, Beato, & Jordan, 2008)

En un análisis realizado en células pluripotentes (PCs) se observó que tienen niveles relativamente menores de H1.0 y niveles mayores de H1.1, H1.3 y H1.5 comparado con células diferenciadas. De hecho, un knockdown de H1.0 en células madres humanas (ES) no afectan su auto-renovación, pero deterioran su diferenciación, debido a que H1.0 es reclutado hacia las regiones reguladoras de genes de diferenciación y pluripotencia, lo que confirma que esta variante desempeña un papel importante en la regulación de estos genes (J.-M. Terme et al., 2011). Posteriormente, en un estudio realizado en múltiples tejidos de cáncer, encontraron una correlación entre bajos niveles de expresión de H1.0 con prognosis negativas en pacientes, encontraron que en los tejidos tumorales las células que silenciaban la expresión de H1.0, preservaban la capacidad proliferativa indefinida del tumor y que al contrario las células que re-expresaban H1.0 lograban reprimir al grupo de oncogenes y sus rutas, adquiriendo de esta manera un fenotipo caracterizado por un potencial proliferativo bastante limitado (Torres et al., 2016)

Otro de los mecanismos en los cuáles la histona H1 se encuentra involucrado y por el cuál puede mediar procesos como transcripción del DNA o reparamiento es conjuntamente con *chaperones* de histonas. Las *chaperones* son proteínas que se encargan del transporte de las histonas así como su eficiente unión y desplazamiento del nucleosoma. Varios estudios se han realizado, uno de los estudios realizados caracteriza a la

proteína 1 de ensamblaje del nucleosoma(Nap1), describiendo que esta chaperona tiene la capacidad de abrir la cromatina a través del desplazamiento reversible de la histona H1(Jordanka Zlatanova, Seebart, & Tomschik, 2007). Otra chaperona estudiada, es la proteína prothynisin α , para lo cual usaron células permeabilizadas y observaron que esta chaperona puede facilitar el desplazamiento y la deposición de H1(Karetsou et al., 1998). Otro estudio *in vitro* sobre la correlación de la movilidad de H1 con su chaperona es el realizado sobre *Template Activating Factor-I* (TAF-I, también conocido como SET), en este estudio observaron que la sobre expresión de TAF-I potencia la movilidad de la histona H1.1 desplazándola de la cromatina(Kato, Okuwaki, & Nagata, 2011). Continuando con esta observación, Kadota y Nagata en el 2014 establecieron que TAF-I participa en los mecanismos de silenciamiento de los genes estimulados por interferón (ISGs), observaron que un knockdown de TAF-I incrementa la transcripción de los genes estimulados por IFN, así como simultáneamente los niveles de H1 se reducen en los promotores de los ISGs.

Estudios sobre mecanismos por los cuáles las distintas variantes de H1 se encuentran involucradas en la regulación de la expresión de los genes inducidos por interferón ameritan ser realizados debido a que en el estudio mencionado no se establece claramente, si en el mecanismo propuesto de la chaperona TAF-I participa una variante de histona H1 en particular. Sin embargo, este estudio da a conocer un nuevo rol de las histonas H1 de gran importancia ya que participan en la regulación de la respuesta inmune innata a través del silenciamiento de los genes ISGs.

3. Interferones

Interferones son una familia multigénica de citoquinas pequeñas, producidas y secretadas por las células después de la detección celular a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) de moléculas asociadas a patógenos invasores (PAMPs). A continuación, de la detección del patógeno y la subsiguiente producción de IFN, las moléculas de IFN se unen a los receptores de la superficie celular e inician una cascada de señalización a través del transductor de señal de janus quinasa (JAK-STAT), conduciendo a la regulación transcripcional de cientos de genes regulados por IFN (ISGs).

Esto conduce a un estado antiviral, eficaz contra virus y bacterias intracelulares(Schneider, Chevillotte, & Rice, 2014).

3.1 Clasificación de los interferones

3.1.1. Interferón tipo I

Interferón(IFN) del tipo I son citoquinas con la habilidad de bloquear la replicación de los virus, inducir un estado celular intrínseco antimicrobial y modular la respuesta del sistema inmune innato así como la activación del sistema inmune adaptativo(Samuel, 2001). El grupo de los interferones tipo I incluyen al Interferon beta (IFN β) y al interferón alfa (IFN α), que son los tipos más caracterizados. La mayoría de las células produce IFN β mientras que células inmunitarias especializadas, conocidas como células dendríticas plasmocitoides producen la gran mayoría de IFN α .

El IFN β está codificado por un solo gen para IFN β mientras que el IFN α se encuentra codificado por 14 genes distintos que codifican varias isoformas.

Los mecanismos de inducción del gen para IFN β han sido ampliamente estudiados en las últimas décadas. De hecho, como se describe a continuación, la inducción del gen IFN β se produce como un proceso altamente ordenado, y está regulado por múltiples factores de transcripción. La región promotora del gen de IFN β contiene al menos cuatro elementos *cis* reguladores, entre los que tenemos, los dominios reguladores positivos (PRD) I, II, III y IV (Figura 5A). Por el contrario, las regiones promotoras de genes IFN α contienen únicamente los elementos PRD I- y PRD III (Ryals, Dierks, Ragg, & Weissmann, 1985). PRD I y PRD III son los sitios de unión para los miembros de la familia IRF, mientras que los elementos PRD II y PRD IV son los sitios del factor nuclear kB (NF-kB) y AP-1, respectivamente. Después de las infecciones virales, los PRD dirigen el ensamblaje de IRF, NFkB, AP-1 y la proteína de grupo de alta movilidad HMG1 para formar un complejo conocido como enhanceosoma(Kim & Maniatis, 1997). Un estudio, describe que la represión constitutiva del promotor del gen de IFN β puede deberse a la unión de la histona H1 en las zonas ricas en AT, localizadas *upstream* del promotor(Bonnefoy, Bandu, & Doly, 1999). Posteriores estudios indicaron que el promotor de IFN β se activa débilmente por la inducción del factor de necrosis tumoral (TNF-a), que implica la activación de NF-kB y AP-1, pero no de IRF(Reis,

Ho Lee, & Vilcek, 1989). Algo interesante a destacar es que si el nucleosoma en el sitio de inicio de la transcripción es desplazado artificialmente y luego estimulado por TNF- α , el promotor del gen IFN β se activa eficientemente (Lomvardas & Thanos, 2002). Estas observaciones apoyan la idea de que la alteración del nucleosoma es un determinante crítico en el equilibrio de la magnitud de la inducción de IFN β y que una inducción efectiva de IFN β requiere un desplazamiento del nucleosoma o la activación por IRF.

La activación del gen de IFN β se ha descrito que inicia cuando el enhanceosoma recluta las histonas acetil transferasas (HAT) y la proteína de unión CREB, para acetilar los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 en el nucleosoma, que localiza y cubre el sitio de inicio de la transcripción del promotor del gen de IFN β e inhibe la inducción génica en este primer estado estacionario (Figura 5B).

A continuación, la holoenzima de la RNA polimerasa II (carente del factor de transcripción TFIID) se recluta al promotor. A continuación, los complejos de remodelación de la cromatina, tales como los complejos BAF, se reclutan poniéndose en contacto con la histona acetilada (Figura 5C). Finalmente, los complejos BAF inducen el desplazamiento del nucleosoma del sitio de inicio de la transcripción (TSS), haciéndolo accesible para el factor de transcripción TFIID induciendo la expresión de IFN β (Figura 5D) (Agalioti et al., 2000; Honda, Takaoka, & Taniguchi, 2006)

Las moléculas de IFN tipo I, son reconocidas por el heterodimérico receptor compuesto por IFNAR1 y IFNAR2 (Figura 6A).

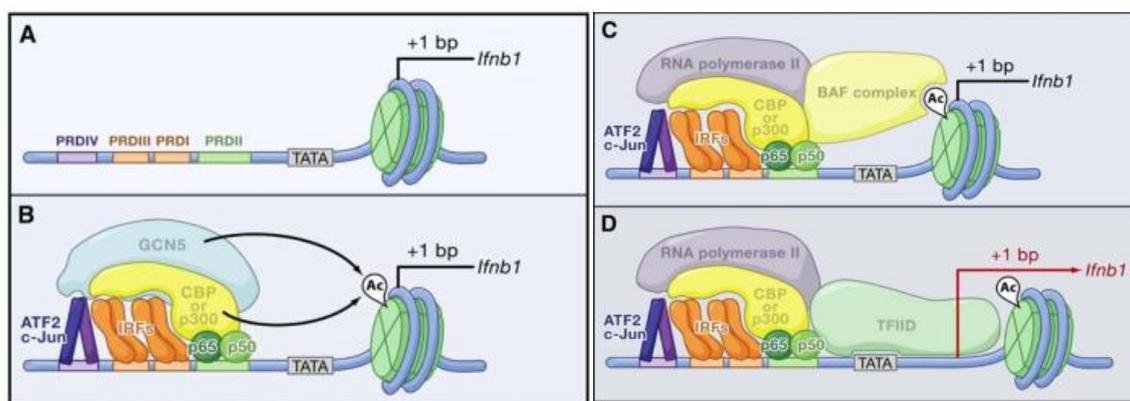


Figura 5.- Transcripción del gene de IFN β después de la infección viral. A) Dominios reguladores (PRD) I, II, III y IV. B) Acetilación de los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 en el nucleosoma. C) Complejos de remodelación de la cromatina, se ponen en contacto con la histona acetilada. D) Factor de transcripción TFIID induce la expresión de IFN β .

3.1.2 Interferón tipo II

IFN- γ es el único interferón tipo II. Se une a su complejo de unión a la superficie celular compuesto por dos subunidades de IFNGR1, a continuación, se une a dos subunidades adicionales denominadas IFNGR2 y provoca la activación del receptor (Figura 6C) (Walter et al., 1995). La producción de IFN- γ , está restringida a las células del sistema inmune (Valente et al., 1992), sin embargo, la mayoría de tipos de células son capaces de responder al IFN- γ debido a que los receptores IFNGR1/2 se encuentran expresados en una gran variedad de células. Los ISGs que son inducidos por el IFN- γ , desempeñan un papel importante en el establecimiento de la inmunidad celular, además algunos de los ISGs producidos desencadenan la respuesta a IFN tipo I.

3.1.3 Interferón tipo III

El tipo III de IFN incluyen IFNL1, IFNL2, IFNL3 y IFNL4 conocidos también como IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3, IFN- λ 4 o interleuquina (IL)-29, IL-28A, y IL-28B respectivamente (Kotenko et al., 2003; Prokunina-Olsson et al., 2013).

Estos IFNs comparten características estructurales con los miembros de la familia de las citoquinas IL-10 y utiliza su mismo receptor de baja afinidad (IL-10R2), este receptor también recibe la señal de las citoquinas IL-22 e IL-26. (Figura 6B) Por otra parte, el receptor de alta afinidad para el interferón de tipo III es la subunidad (IFN- λ receptor 1, IFNLR1), este receptor es exclusivo de IFN tipo III y se expresa únicamente en células epiteliales. Este complejo señala a través de la ruta JAK-STAT como el IFN tipo I e induce muchos de los mismos ISGs (Bolen, Ding, Robek, & Kleinstein, 2014; Sommereyns, Paul, Staeheli, & Michiels, 2008)

3.2 Factores de regulación de IFN (IRFs)

La familia IRF en mamíferos está compuesta por 9 miembros, de IRF1 a IRF9 (5). Cada IRF presenta un dominio de unión a DNA bien conservado de 120 aminoácidos. Esta región reconoce un región con una secuencia consenso de DNA llamada ISRE (Elemento de respuesta estimulada por IFN) (Taniguchi, Ogasawara, Takaoka, & Tanaka, 2001). ISRE fue hallada en el promotor de ISGs, además, se ha encontrado la

región ISRE en el promotor de los mismos genes que codifican para los IFNs de tipo I.

El rol que desempeñan los IRFs depende de la naturaleza del patógeno, el tipo celular, así como de los receptores que han reconocido a dicho patógeno.

Los IRFs, IRF1, IRF3, IRF5 y IRF7 han sido descritos como reguladores positivos de la transcripción de genes de IFN tipo I (Mamane et al., 1999). IRF1 fue el primer miembro que se descubrió que active el promotor en genes de IFN tipo I (Miyamoto et al., 1988). Sin embargo, se ha observado que algunos virus son capaces de inducir la respuesta de IFN en fibroblastos de embriones de ratón, que presentan Knock-out (KO) de IRF1 así como IRF5, lo que indica que IRF1 e IRF5 no son esenciales en la inducción de genes de IFN de tipo I activada por virus por la vía citosólica.

IRF3 e IRF7 también han sido propuestos como reguladores claves en la expresión de IFN tipo I. IRF3 es expresado constitutivamente y reside en forma latente en el citosol, después de la infección viral se transfiere al núcleo, antes de dicha transferencia, se fosforilan serinas específicas de su dominio C-terminal, siendo esto un paso crucial. Las formas de IRF3 fosforiladas forman un dímero o heterodímero con IRF7 el cual puede interactuar con otros coactivadores de los genes de IFN tipo I (Honda & Taniguchi, 2006)

4. Genes inducidos por interferón (ISGs)

Los genes inducidos por IFN son cientos de genes que codifican para una variedad de proteínas que en general tienen como fin ser parte de mecanismos de defensa, induciendo un estado antiviral, contra varios tipos de virus de RNA, virus de DNA, bacterias intracelulares y parásitos (Gonzalez-Navajas, Lee, David, & Raz, 2012)

Los ISG desempeñan varias actividades, entre las proteínas codificadas están los Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), IRF, STAT1, STAT2 e IRF9, las cuales están presentes en la señalización de patógenos, pero también son ISGs, de esta manera refuerzan la respuesta de IFN. Muchos ISGs controlan la infección viral, bacteriana y parasitaria dirigiéndose directamente a las funciones necesarias durante los ciclos de vida de los patógenos. Los reguladores negativos de la señalización ayudan a recuperar el estado silenciado y la homeostasis celular. Otros ISGs codifican para

proteínas proapoptóticas, dando lugar a la muerte celular bajo ciertas condiciones(Schneider et al., 2014).

4.1 Regulación de ISGs dependiente de la ruta del JAK-STAT

Mediante el estudio de los mecanismos de inducción de expresión génica de los genes inducidos por interferón, se definió una vía de señales intracelulares que utiliza como mecanismo de transmisión de señal la fosforilación secuencial en residuos de tirosina de dos grupos de proteínas denominadas JAK y STAT(Wilks, 1989; Wilks et al., 1991).

La secuencia de activación de la vía JAK-STAT se inicia con la interacción de las citoquinas con sus receptores lo que induce la oligomerización de los mismos y aproximación de las JAK asociadas a ellos, que se fosforilan aumentando así su actividad quinasa. A continuación, las JAK fosforilan residuos de tirosina en los dominios intracitoplásmicos de los receptores, creando puntos de anclaje para las STAT, que se unen específicamente a los receptores, y son igualmente fosforiladas por las JAK. Al ser fosforiladas las STAT se activan, dimerizan, se liberan de los receptores y pasan al núcleo, donde se unen en el caso de haber sido inducida la señal por el IFN tipo I y II a un factor regulatorio (IRF9) para formar un complejo de tres moléculas llamado (ISGF3) el cuál se une a la secuencia específica denominada elementos de respuesta estimulados por IFN (ISREs; secuencia consenso TTCNNGAA) de DNA, y activan la transcripción génica de ISGs. Otras citoquinas así como IFN tipo II, activan un homodímero de STAT el cuál se une a una secuencia diferente denominada GAS (secuencia consenso TTCNNGAA) (Duarte & Frank, 2000; Ivashkiv & Donlin, 2014) Una de las características de la vía JAK-STAT es su rapidez. La activación máxima de la expresión génica tras su estimulación con interferón (IFN), se produce en tan sólo 15 a 30 min (Silvennoinen, Ihle, Schlessinger, & Levy, 1993).

Tres de las cuatro JAKs conocidas (JAK1, JAK2 y tirosina quinasa 2 (TYK2)) funcionan en la señalización IFN(Kawamura et al., 1994). Hay siete proteínas STAT en los mamíferos, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6, todos los cuales desempeñan algún papel en la señalización inmune innata. Sin embargo, cuando se trata de señalización a través de cualquiera de los complejos de receptores de IFN, STAT1 y STAT2 son los más importantes(Levy & Darnell, 2002).

STAT1 se fosforila en respuesta de IFN en el sitio Tyr701, Ser708 y Ser727 y STAT2 se activa una vez se fosforila en la tirosina 690 (Tyr690). La quinasa TNK1 (Tirosinquinasa) y RIG-I (Gen inducible de ácido retinoico) potencian la fosforilación de la tirosina (Tyr701) y serina (Ser727) (J. Hou et al., 2014). La CDK8 (ciclina nuclear dependiente de quinasa 8) también fosforila la serina (Ser727) de STAT1 (Bancerek et al., 2013; Staab, Herrmann-Lingen, & Meyer, 2013). Señales de estrés también pueden inducir la fosforilación de STAT1 en Ser727 vía la ruta p38-MAPK (Ramsauer et al., 2002).

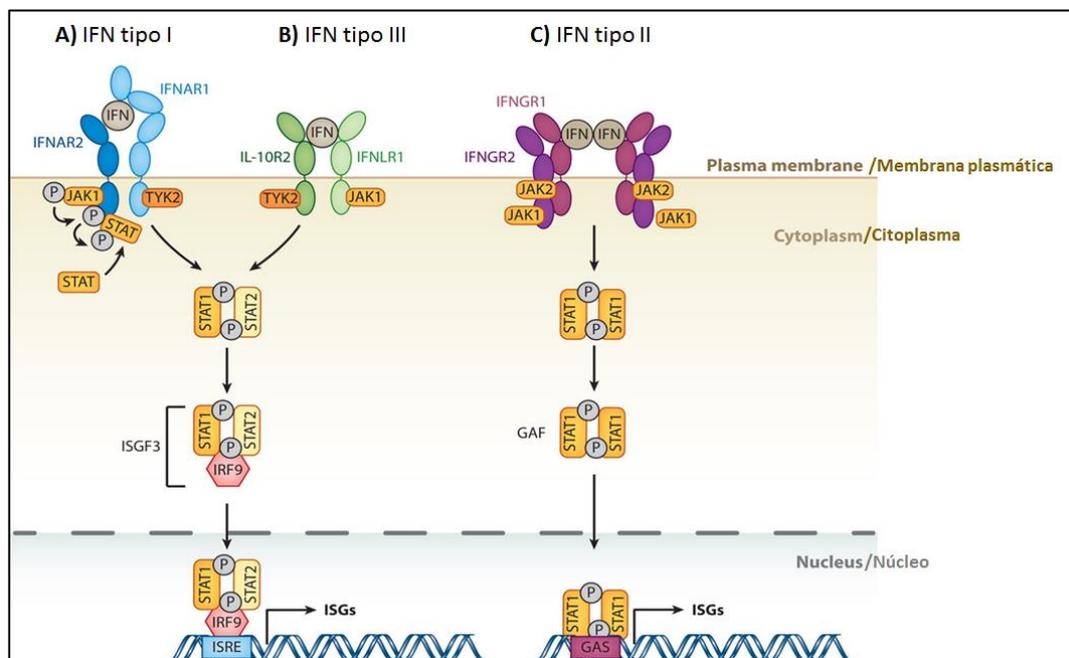


Figura 6.- Cascada de señalización de Interferón (IFN). Las tres clases de IFNs presentan distintos complejos receptores en la superficie celular A) IFN tipo I. B) IFN tipo III. C) IFN tipo II. Imagen (Schneider et al., 2014)

4.2 Regulación transcripcional de los ISGs

La organización en niveles de orden superior de la cromatina, impiden la unión de factores de transcripción y la expresión génica de ISGs, su inducción por IFN requiere de remodeladores de la cromatina, que necesita ser transformada en una estructura más flexible. En humanos, el complejo de remodelamiento de nucleosomas BAF y PBAF mantienen un estado abierto de la cromatina, permitiendo una inducción de ISGs después del estímulo por IFN (Cui et al., 2004; Yan et al., 2005). La acetilación y desace-

tilación de histonas, reacciones generalmente catalizadas por encimas como HAT(histona acetiltransferasa) o HDAC(Histonas des-acetiladas) son esenciales en el modulación de la cromatina. La actividad de HAT transforma la cromatina en una estructura más relajada, siendo un regulador positivo de la activación transcripcional de los ISGs(Bhattacharya et al., 1996; Paulson, Press, Smith, Tanese, & Levy, 2002). Uno de los mecanismos de silenciamiento se encuentra regulado por un complejo formado por FOXO3, NCOR2(corepresor nuclear 2) y HDAC3, complejo que participa en la formación de una estructura cerrada de la cromatina, limitando de esta manera la transcripción de los ISGs en condiciones basales(Litvak et al., 2012).

Otros coactivadores y corepresores también participan en la regulación transcripcional al interactuar con ISGF3 o STAT1. Entre estos tenemos Nmi(Interactor N-Myc) y DRIP150 que facilitan la activación transcripcional de ISGs. Por el contrario, recientemente se describió un corepresor, es el caso de TAF-I (Kadota & Nagata, 2014) así como proteínas inhibidoras de la actividad de STAT como son PIAS1 y PIASg (Tahk et al., 2007), los cuales limitan la transcripción de ISGs.

En los últimos años varios factores de regulación de la transcripción de ISGs han sido identificados (Figura 7). Estos esfuerzos contribuyen a la mejor comprensión de los ISGs(Mostafavi et al., 2016).

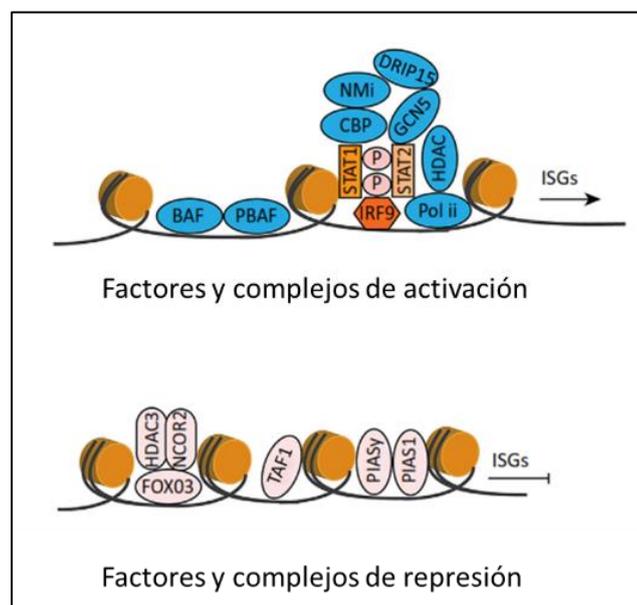


Figura 7.- Regulación transcripcional de los ISGs (genes estimulados por IFN). Se describen varios coactivadores y corepresores. Después de la estimulación con IFN, ISGF3 o STAT1 se une a la región promotora de ISG, reclutando varios remodeladores de cromatina BAF, PBAF, p300/CBP, GCN5, HAT, HDAC, MCM3, MCM5, NMI y DRIP15. Por el contrario, entre los corepresores tenemos FOXO3, TAF-I, HDAC3, entre otros. Imagen (Wang, Xu, Su, Peppelenbosch, & Pan, 2017)

4.3 ISGs con actividad antiviral

Teniendo en cuenta el gran número de ISGs activados mediante la señalización de IFN, es probable que exista redundancia considerable en el sistema, así como en su actividad antiviral. Con el fin de clasificar en grupos y definir la actividad individual de cada ISGs, varios estudios se han realizado. A través de un “screening” se validaron varios grupos de ISGs, en los cuales se observó que reducían la replicación viral significativamente comparada con el control, en total fueron 45 genes cuyos transcritos presentaron efecto antiviral, entre estos genes tenemos IFI6, IFITM3, RTP4, DDIT4, NT5C3, IFI44L, MAP3K14, IRF2, IRF7, IRF1, MDA5, RIG-I, OASL (Schoggins et al., 2011). Además, se han diseñado análisis para mirar el efecto antiviral de los ISGs mediante el uso de virus infecciosos que puedan cumplir todo su ciclo viral. En los screenings realizados los ISGs GBP1, IFI6, IFI27, IRF1, IRF9, ISG20, MX1, OAS1, PKR redujeron significativamente la actividad de la replicación (Itsui et al., 2006).

Muchos de los ISG han sido bien caracterizados, son los que muestran la actividad antiviral más potente. A continuación, se describen brevemente varios de ellos, su actividad antiviral, y en algunos casos su rol como sensores en la señalización de la respuesta inmune innata. Estos ISG representan sólo un pequeño grupo del número total de ISG producidos durante la infección (Figura 8)

Por ejemplo, CH25H (colesterol-25-hidroxilasa) afecta los virus tempranamente, presumiblemente en el evento de fusión membrana-huésped, así como en la maduración proteica de proteínas estructurales víricas y de enzimas de replicación viral. La familia IFITM (Proteínas transmembranales inducidas por IFN) inhiben el proceso de fusión endocítica de un amplio espectro de virus. TRIM5 α (Proteína tripartita de motivo 5 α) inhibe el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) deshaciendo la estructura de los complejos de la cápside del virus. Mx1 (La proteína de resistencia al mixoma 1) inhibe una amplia gama de virus al bloquear el tráfico endocítico de partículas víricas entrantes. Algunos ISG inhiben los virus degradando el RNA viral o bloqueando la traducción de los RNAm virales, como lo hace OAS (Oligoadenilato sintasa), PKR (la proteína quinasa R) y la ZAP (proteína antivírica dedo de zinc). Las proteínas de la familia de IFIT (inducidas por IFN con repeticiones tetratricopeptídicas) inhiben la traducción de proteínas y también han estado implicadas en la degradación del RNA

viral. TRIM22 inhibe la transcripción viral, la replicación o el desplazamiento de proteínas virales a la membrana plasmática. ISG15 puede inhibir la traducción, replicación o salida viral. Se ha demostrado que la viperina inhibe la replicación viral en la membrana plasmática. Finalmente, Tetherin atrapa partículas de virus maduras en la membrana plasmática y por lo tanto inhibe la liberación viral (Schneider et al., 2014)

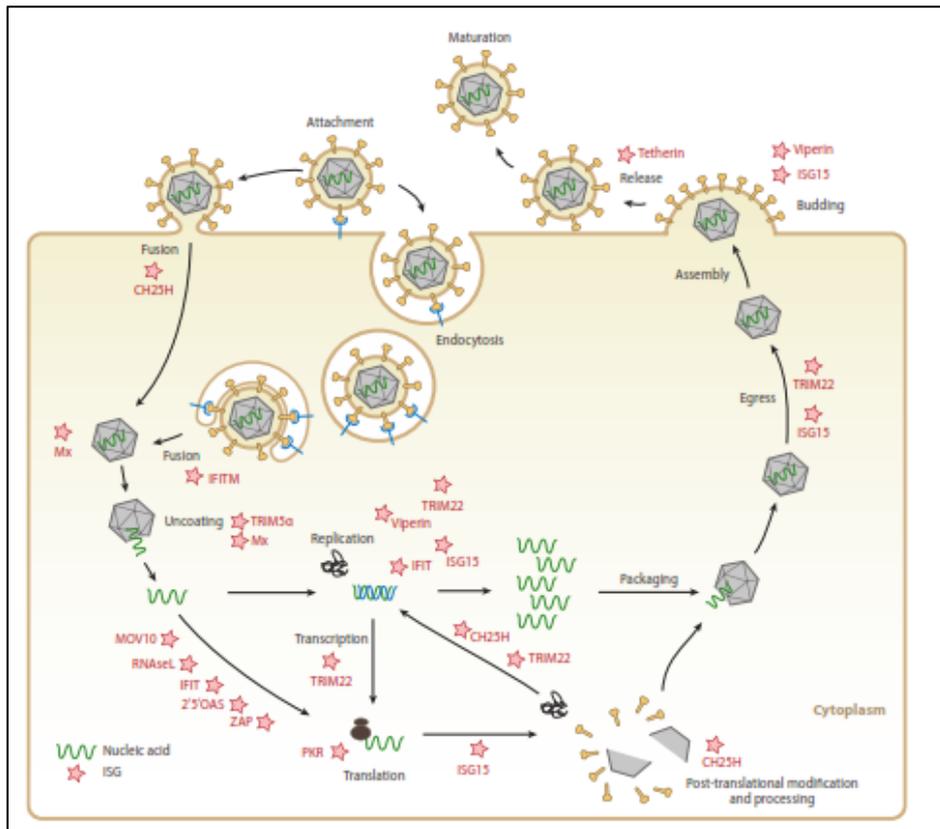


Figura 8.- Varios ISGs (estrellas) que interfieren en distintas etapas del ciclo viral. Imagen (Schneider et al., 2014)

4.3.1 Familia de las MX

Las proteínas Mx pertenecen a la superfamilia de las dinaminas con actividad de GTPasa. Estas proteínas no están presentes constitutivamente en las células normales pero son inducidas por los IFN tipo I. Las Mx poseen actividad antiviral contra varios RNA virus. La Mx1 humana se acumula en el citoplasma de las células tratadas con IFN, asociada parcialmente con el retículo endoplasmático. Se asocia con las nucleocápsides, inhibe su transporte y altera sus propiedades y bloquea en consecuencia

la replicación viral. Estos componentes virales son atrapados y redirigidos a otros lugares donde resultan inviables para la generación de nuevas partículas virales(Fainboim & Geffner, 2005).

4.3.2 ISG15

ISG15 es un gen que se induce fuertemente por el estímulo de IFN, dsRNA y virus. Codifica una proteína de 15 kDa de tipo ubiquitina. ISG15 se adhiere covalentemente a su proteína diana a través de su dominio C-terminal, gracias a la participación secuencial de tres encimas que también son inducidas por IFN. La primera evidencia que ISG15 tiene actividad antiviral fue realizada con una proteína no estructural del virus de la influenza B, y se observó que ISG15 se unía a dicha proteína. Estudios posteriores, confirmaron que la conjugación de ISG15 inhibía una gran cantidad de virus, entre los que están, los virus de la influenza A y B, HIV-1, Herpes 1. Por el contrario, no se ha visto efecto protector frente al virus de la estomatitis vesicular (VSV) y contra el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)(Lenschow et al., 2007; Pincetic, Kuang, Seo, & Leis, 2010; Yuan & Krug, 2001).

4.3.3 IFITM

La familia IFITM en humanos está compuesta por cuatro miembros IFITM1, IFITM2, IFITM3 e IFITM5. Estas proteínas han mostrado ser potentes inhibidores de la infección del virus de la influenza A(Brass et al., 2009). Varios estudios han observado que estas proteínas tienen un amplio espectro de inhibición antiviral, lo que sugiere que posiblemente su efecto inhibitorio no es a nivel de receptor(Huang et al., 2011; Schoggins et al., 2011).

Las proteínas IFITM se acumulan en el endosoma y en los lisosomas. De acuerdo con esto, los virus más afectados por IFITM son aquellos que requieren transitar por estos compartimentos, sin embargo, el mecanismo es hasta la actualidad discutido. IFITM1 inhibe al coronavirus-SARS con gran eficiencia. IFITM3 tiene una gran potencia de inhibición frente al virus de la influenza A. Por otra parte, la infección por HCV es inhibida por IFITM1, esta especificidad existente en la familia de IFITM ha sido explicada en parte por las diferencias en la localización celular de sus miembros. Como

mecanismo alternativo de actividad antiviral se ha propuesto que IFITM puede actuar un paso antes de la hemifusión viral, al afectar físicamente las propiedades de la membrana, cambiando su fluidez, la membrana tiene que ser atravesada por la partícula viral y cambios físicos de la membrana pueden impedir este proceso(K. Li et al., 2013)

4.4 Sensores de reconocimiento de patógenos

PRRs y muchos IRFs están presentes de forma basal para la detección de patógenos, pero su expresión génica puede ser reforzada y sobre-regulada por IFN. Varios de los PRRs también son genes inducidos por interferón, dando lugar a que tras la inducción, este conjunto de ISGs actúan reforzando la señalización de IFN.

Existen varios PRR, cada uno especializado en la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), a continuación, se describen algunos de ellos, especialmente los PRRs involucrados en el reconocimiento de virus.

4.4.1 Sensores de RNA

Receptores del tipo Toll (TLRs)

Los receptores del tipo Toll, son sensores innatos que detectan PAMPs de una variedad de patógenos. Muchos TLRs se expresan en la superficie celular, algunos se expresan en los endosomas, y participan en el reconocimiento de genomas virales asociados con viriones. Tras la endocitosis de los virus, los TLRs endosómicos detectan genomas virales y activan la transcripción de IFN tipo I. **TLR7** detecta los genomas virales ssRNA. **TLR3** es un sensor de los virus dsRNA. **TLR8** es filogenéticamente y funcionalmente cercano a TLR7, reconoce ssRNA. Los sensores descritos reconocen el RNA viral en el endosoma (Iwasaki, 2012).

La señalización de la cascada de TLRs , dependiendo de las circunstancias, requiere principalmente de receptores y adaptadores, entre los que se incluye el factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88). A continuación, ocurre la activación de una cascada de quinasas intracelulares y ubiquitin-ligasas, que ocasionan la transferencia de factores de transcripción incluyendo NF- κ B, AP-I y factores reguladores de IFN (IRFs).

Estos factores de transcripción se unirán a los elementos de respuesta de los genes que codifican para IFN tipo I y citoquinas(O'Neill, Golenbock, & Bowie, 2013).

Receptores del tipo RIG-I (RLRs)

Los receptores RLRs son proteínas citosólicas que reconocen las especies de RNA vírico. Expresados por la mayoría de las células humanas, los RLR incluyen tres miembros de relevancia: RIG-I, MDA5 y LGP2. **RIG-I**(El gen inducible por ácido retinoico I) reconoce y contiene un dominio C terminal de enlace para ssRNA/dsRNA. **MDA5**(Gen asociado a la diferenciación del melanoma 5), reconoce a fragmentos de dsRNA y puede iniciar la producción de IFN tipo I a través de MAVS. Finalmente, **LGP2** que es un modulador de la respuesta inmune innata a una infección viral y no un sensor de PAMPs.

Después del reconocimiento de los ssRNA/dsRNA, RIG-I y MDA5 activan el adaptador de señal MAVS, el cual desencadena una cascada de señalización. La activación de MAVS provoca la formación de un agregado de MAVS, ocasionando una amplificación en gran escala de la cascada de señalización. Esta cascada conlleva el reclutamiento de adaptadores citosólicos de moléculas, seguido de la activación de quinasas, entre ellas TBK e IKK. Finalmente, factores de transcripción específicos, como IRF3, NF- κ B y dependiendo del tipo celular IRF5 y IRF7, son transferidos al núcleo donde actúan como promotores de los genes de IFN tipo I y de citoquinas proinflamatorias (F. Hou et al., 2011)

Familia OAS

La familia OAS incluye a 4 ISGs llamados OAS1, OAS2, OAS3 y OASL(el cual codifica OAS-like protein). Las proteínas OAS1, OAS2 y OAS3 son todas enzimas que se activan al reconocer moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA). Cuando la OAS se activa cataliza la síntesis de 2'-5' oligoadenilatos, responsables de la activación de una RNasa latente, denominada la RNasa L. Esta RNasa degrada el RNA e inhibe de esta forma la replicación viral. Por otra parte, el sistema OAS-RNasa L, puede también conducir a la apoptosis en células infectadas. OASL está desprovista de actividad ligada a la 2'-5'-oligoadenilato sintasa. Sin embargo, OASL tiene una actividad

antiviral potente, que puede atribuirse a su función reguladora positiva en la señalización RIG-I(Fainboim & Geffner, 2005).

PKR

La expresión de la proteinquinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR) es inducida también por los IFN tipo I. La activación de la PKR durante la infección viral, inducida principalmente por RNA de doble cadena, provoca la fosforilación e inactivación del factor de traducción Elf-2 α , dando lugar al bloqueo de la síntesis de proteínas y la inhibición de la replicación viral. La activación de PKR puede conducir, además a la fosforilación de otros sustratos menos caracterizados, capaces de activar factores de transcripción como NF-K β . Estas vías alternativas podrían explicar la actividad proapoptótica de la PKR, importante en su actividad antiviral(Fainboim & Geffner, 2005)

Familia IFITs

La familia de proteínas inducidas por interferon con repeticiones del tetratricopéptido (IFITs), incluyen a IFIT1, IFIT2 e IFIT5.

Mediante estudios estructurales y usando modelos en células HEK293T infectadas con virus de la enfermedad de Newcastle han demostrado su capacidad de reconocer ssRNA (Pichlmair et al., 2011).

Además de su posible rol como sensor, se ha descrito que los miembros de la familia IFIT tiene un papel importante en el control del RNA invasivo. IFITs junto a otros ISGs actúan en conjunto para restringir la replicación de virus, por ejemplo, se ha observado que IFIT2 puede limitar la replicación del virus de la estomatitis vesicular (VSV)(Fensterl et al., 2012)

4.4.2 Receptores de DNA

Los receptores de DNA son moléculas que detectan DNA y activan vías de transmisión de señales que inician respuestas antimicrobianas, como la producción de interferón del tipo I.

cGAS (Enzima sintasa del GMP-AMP cíclico)

cGAS reconoce DNA citosólico, una vez reconoce el DNA, sintetiza un dinucleótido cíclico llamado GMP-AMP cíclico(GAMPc). La GAMPs interactúa con STING (Estimulador de genes de IFN) y estimula su translocación a membranas derivadas de Golgi, donde promueve la fosforilación de IRF3. El IRF3 fosforilado pasa al núcleo e induce la expresión del gen de interferón del tipo I.

IFI16

IFI16 es una proteína nuclear y citoplasmática, se ha demostrado que se une al DNA viral, para inducir citoquinas antivirales, se ha observado que la detección de DNA viral ocurre en la periferia nuclear. Los modelos actuales afirman que, al unirse al DNA viral, IFI16, al igual que otros sensores de DNA tales como cGAS, usa la cascada de señalización a través de STING / TBK-1 / IRF3(Fensterl et al., 2012)

4.4.3 Otros receptores de DNA

DAI: El activador dependiente del DNA de los factores reguladores del IFN (DAI) se une al DNA de varias fuentes microbianas y activa el IRF3, lo que conduce a una respuesta del IFN del tipo I. El DAI también activa la vía NF- κ B.

AIM2: AIM2 es otro detector de DNA que reconoce dsDNA citosólico.

TLR9: Reconoce genomas virales de DNA de doble cadena y cadena sencilla (dsDNA; ssDNA) en el endosoma. El reconocimiento a través de TLR9 no requiere replicación viral ni una secuencia motivo específica

4.4.4 Otros sensores de RNA y DNA

DDX60: Es una helicasa, que recientemente ha sido propuesta como un sensor promotor de la respuesta antiviral (Miyashita, Oshiumi, Matsumoto, & Seya, 2011). Su expresión no es constitutiva es inducida por IFNs, al igual que los RLRs. Estudios por co-inmunoprecipitación demostraron que DDX60 se une a dsRNA y DNA. Finalmente es importante mencionar que el rol de DDX60 en la ruta de Interferon tipo I, todavía se encuentra en discusión (Vabret & Blander, 2013)

Familia HMGBs: La familia de proteínas de alta movilidad del grupo de caja (HMGBs) han sido propuestas como centinelas universales de ácidos nucleicos. A través de ensayos de Knock Out (KO) verificaron que estas células, después de ser estimuladas con DNA o RNA viral, perdieron gravemente su capacidad de inducción de interferón tipo I y la inducción de citoquinas. La ausencia de HMGBs también afectó la activación de TLR3, TLR7 y TLR9 (Yanai et al., 2009).

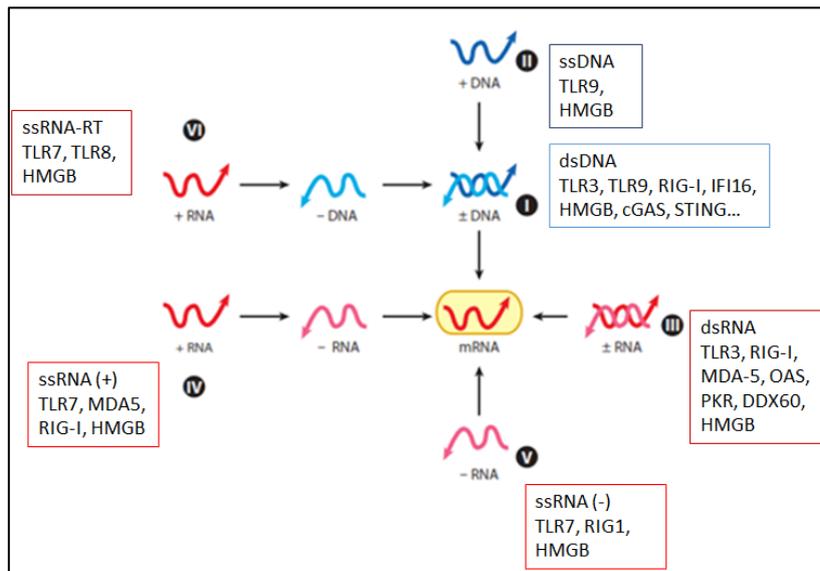


Figura 9.- Clasificación de los virus según (Baltimore, 1971) grupos del I-VI. Los grupos de virus son clasificados dependiendo de la combinación o características del genoma (DNA, RNA) viral, cadena (sencilla, doble), sentido (+ sentido, - antisentido), y modo de replicación (retro virus RT). Los sensores que reconocen los respectivos grupos de virus están indicados. Imagen (Iwasaki, 2012)

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la depleción de la histona H1 en células de cáncer de mama: proliferación y respuesta a interferón

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1** Diseñar RNA interferentes inducibles (shRNA) estables para la depleción simultanea de distintas variantes de H1 en células de cáncer de mama.
- 2** Investigar los efectos de la depleción de distintas variantes de histonas H1 sobre la proliferación:
 - Velocidad de crecimiento celular
 - Capacidad de formar colonias dependientes de anclaje
 - Capacidad de formar colonias independientes de anclaje (Soft-agar)
- 3** Analizar los efectos de la inhibición simultanea de variantes de la histona H1 sobre la respuesta a interferón.
- 4** Verificar si los efectos provocados sobre la respuesta a interferón son compensados al reestablecer la expresión de la histona H1.
- 5** Determinar a través de inhibidores y knock-downs constitutivos cuales son los posibles mecanismos por los cuales la depleción de H1 ocasiona la respuesta a interferón.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las condiciones y líneas celulares usadas en el presente trabajo se resumen en la siguiente tabla.

Línea celular	Características de la línea celular	Medio de cultivo
T47D-MTVL	Línea celular derivada de un derrame pleural de un carcinoma ductal de seno, lleva una copia integrada estable del gen indicador de luciferasa dirigida por el promotor MMTV	RPMI 1640; 10% de suero fetal bovino (FBS); 1% de penicilina y estreptomina (P/S); 1% de glutamina.
MCF7	Línea celular derivada de un derrame pleural tomada de un paciente con cáncer de seno metastásico.	MEM; 10% FBS; 1% de P/S; 1% de glutamina; 1% aminoácidos no esenciales; 1% de piruvato de sodio
HeLa	Línea celular derivada deriva de una muestra de cáncer cérvico-uterino	DMEM glutamax; 10% FBS; 1% P/S
MCF10A	Línea celular epitelial de seno, la más común usada como modelo de células normales de seno	DMEM glutamax; 10% FBS; 1% P/S; 16ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF); 0.5ug/ml de hidrocortisona; 10ug/ml de insulina.
Hek (293T)	Línea celular embrionaria de riñón humano, también conocidas como HEK 293.	DMEM glutamax; 10% FBS; 1% P/S

Tabla 3.- Líneas celulares utilizadas, descripción de sus principales características y el medio de cultivo

2. Extracción de ácidos nucleicos

2.1 Plásmidos

Se usaron varios plásmidos para generar células derivadas de T47D, MCF7 y HeLa. Didier Trono (Universidad de Ginebra) nos proporcionó los plásmidos necesarios para el sistema inducible por fármacos de RNA de interferencia, sistema mediado por los vectores lentivirales pLVTHM, ptTR-KRAB-Red, pCMC-R8.91(Dr. Trono) y pVSVG(Clontech). Se utilizaron además plásmidos diseñados previamente que contienen variantes etiquetadas H1-HA, para ser expresadas establemente en líneas celulares.

2.2 Transformación de DNA plasmídico

El primer paso es la transformación de los plásmidos y se realiza utilizando la cepa de *E. coli* STBL2 electrocompetente. En 100 μ L de células competentes se añaden 10 μ L de DNA plasmídico, se incuba la mezcla durante 15 minutos en hielo, posteriormente se incuban las células a 37°C durante 15 minutos para provocar un choque térmico que permita que las células incorporen el DNA. Rápidamente se incuba durante 2 minutos en hielo y luego se añade 800 μ L de SOC [2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 25% 1M KCl, 1% 1M MgCl₂, 1% 1M MgSO₄, 0.2% 5 M NaCl]. En el siguiente paso, se realiza la selección de las bacterias transformadas, para lo cual se incuba a 37 °C durante 30 minutos y se siembra en placas con medio selectivo LB agar con antibiótico [1% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% cloruro sódico, 2% agar, 50 μ g/ml de ampicilina].

Las placas obtenidas se utilizan para picar colonias aisladas e inocularlas en medio de cultivo LB en fase líquida [1% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, 50 μ g/ml de ampicilina]. Una vez inoculados se incuban a 30 °C durante 12 horas con agitación constante de 200 rpm

Finalmente, se realiza la obtención del plásmido a pequeña (minipreps), mediana (midipreps) o gran escala (maxipreps), utilizando el kit correspondiente.

2.3 Obtención de plásmidos a pequeña, mediana y gran escala

La obtención de DNA plasmídico se realizó utilizando el *kit Genopure Plasmid* (mini, midi o maxi) kit de Roche, basado en el método de lisis alcalina, donde se rompe la pared bacteriana utilizando cambios de pH, se sigue el protocolo indicado por el correspondiente *kit*.

2.4 Sistema fármaco-inducible y constitutivo de RNA de interferencia

Para la inhibición constitutiva de SET, TLR3, STING, MAVs, MDA5 e IFNAR, se usaron shRNAs clonados en el vector pLKO.1 de la biblioteca MISSION (Sigma-Aldrich).

Las líneas celulares T47D-MTVL con los *Knock-Downs* inducibles para las distintas variantes de H1, se establecieron como se describió previamente (Sancho et al., 2008).

Inicialmente, se generó una línea celular que expresaba el represor KRAB, sensible a Dox y con fluorescencia RedFP (ptTR-KRAB-Red). A continuación, esta línea celular se infectó con virus para la expresión de los diferentes shRNAs (pLVTHM). Las líneas celulares inducibles se seleccionaron a través de separación por citometría de flujo [FACSvantageSE (Becton Dickinson) o MoFlo (DakoCytomation, Fort Collins, Colorado, EE. UU.)] El parámetro de fluorescencia para la selección fue el de células RFP y GFP positivas, después de 3 días de tratamiento con Dox. A continuación, se amplificaron las células en ausencia de Dox durante 12 días, tiempo estimado necesario para que el sistema inducible y la expresión de H1 shRNAs se silencie.

Las secuencias diana para cada plásmido se encuentran en la siguiente tabla.

shRNA	Gen diana	Vector	Secuencia diana
156sh	H1.2	pLVTHM	AGAGCGTAGCGGAGTTTCT
555 sh	H1.3	pLVTHM	CTGCCAAGAGTCCAGCTAA
120sh	H1.4	pLVTHM	GTCCGAGCTCATTACTAAA
75sh	H1.5	pLVTHM	GGCAACTAAGAAGGCTGCC
225sh	mH1	pLVTHM	GAACAACAGCCGCATCAAG
190 sh	H1.0	pLVTHM	CGCTGACTCGCAGATCAAG
pLKO.1-puro vacío	ninguno	pLKO.1	Ninguno
161052sh	STING	pLKO.1	GCTGGCATGGTCATATTACAT
163296sh	STING	pLKO.1	GCCCGGATTCGAACTTACAAT
146651sh	MAVs	pLKO.1	CCTTACTTTATCTTGTGCCTT
149112sh	MAVs	pLKO.1	GCATTTACCAAGGGTTGGATA
50848sh	MDA5	pLKO.1	CGCAAGGAGTTCCAACCATTT
50849sh	MDA5	pLKO.1	CCAACAAAGAAGCAGTGTATA
59013sh	IFNAR1	pLKO.1	GCCAAGATTCAGGAAATTATT
59014sh	IFNAR1	pLKO.1	CCTTAGTGATTCATTCCATAT
56849sh	TLR3	pLKO.1	CCAGTTCAGAAAGACAGCTC- CAAT
pAJV400 (A)	SET	pLKO.1	GCGATTGAACACATTGATGAA
pAJV401 (B)	SET	pLKO.1	CCACCGAAATCAAATGGAAAT

Tabla 4.- RNA de interferencia utilizados con su respectivo vector, diana y secuencia diana.

2.5 Geles de agarosa para el análisis de DNA

Técnica utilizada para el análisis de DNA plasmídico, de esta manera se distinguen las tres formas posibles en que se encuentran los plásmidos tras su extracción, según el enrollamiento del DNA: superenrollado (plásmido intacto), *nickado* (plásmido con un *nick* en una de sus cadenas) y lineal (plásmido con las dos cadenas rotas). Por sus diferencias al correr en el gel de agarosa, se verifica el estado del DNA plasmídico. Se utiliza concentraciones entre 2-5% agarosa y se tiñe el gel durante 10 minutos con bromuro de etidio (0.5 ug/ml) con TBE 1X.

2.6 Extracción de RNA total

La obtención de RNA total se realizó utilizando el High Pure RNA Isolation Kit (Roche), el cual posee un tratamiento con DNasas en columna, para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico, siguiendo el protocolo y las especificaciones del producto.

2.7 Síntesis de cDNA

La obtención de cDNA se realiza utilizando 100ng de RNA total y se sintetiza con The Invitrogen SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit, el cDNA se utiliza en PCR a tiempo real (qPCR)

2.8 qPCR

La expresión genética se analiza por qPCR, el ensayo requiere el uso de SYBR Green master mix (Invitrogen), al cual se añade los oligonucleótidos específicos (*forward* y *reverse*) a una concentración de 10uM, para cada gen a ser analizado, la placa preparada es tratada y analizada en la máquina Roche 480 Light Cycler. Cada valor se corrige para el gen humano GAPDH y es representado como unidades relativas de expresión. Cada experimento se realiza por duplicado.

Todos los oligonucleótidos para los ensayos de RT-PCR se encuentran descritos en la siguiente tabla.

Gen	Nombre	Sentido	Secuencia de 5' a 3'
H1.0	RT2 H1.0 fw RT2 H1.0 rev	forward reverse	CCTGCGGCCAAGCCCAAGCG AACTTGATCTGCGAGTCAGC
H1.1	H1.1_up H1.1_low	forward reverse	CTCCTCTAAGGAGCGTGGTG GAGGACGCCTTCTTGTGAG
H1.2	H1.2 fw H1.2 rv	forward reverse	GGCTGGGGGTACGCCT TTAGGTTTGGTTCCGCCC
H1.3	H1.3RT1 fw H1.3RTm rev	forward reverse	CTGCTCCACTTGCTCCTACC GCAAGCGCTTTCTTAAGC
H1.4	H1.4RT(3) fw H1.4RT(3) rv	forward reverse	GTCGGGTTTCCTTCAAACCTCA CTTCTTCGCCTTCTTTGGG
H1.5	H1.5RT(3) fw H1.5rt(3) rv	forward reverse	CATTAAGCTGGGCCTCAAGA TCACTGCCTTTTTTCGCCCC
H1X	H1x_up H1x_low	forward reverse	TTCCTTCAAGCTCAACCG TGCCTTCTTCGCTTTGTG
GAPDH	gapdh fw gapdh rv	forward reverse	GAGTCAACGGATTTTGGTCGT TTGATTTTGGAGGGATCTCG
MAVs	F: MAVS R: MAVS	forward reverse	GGAGCAGCAGAAATGAGGAG AAGGCCCTATTCTCAGAGC
MDA5	F: MDA5 R:MDA5	forward reverse	TCTGGGGCATGGAGAATAA AAGGCCTGAGCTGGAGTTCT
STING	F:STING R:STING	forward reverse	CAGGCACTGAACATCCTCCT GTTATCAGGCACCCACAGT
IFNAR1	F: IFNAR1 R: IFNAR1	forward reverse	GCTCAGATTGGTCTCCAGA CCATCCAAAGCCCACATAAC
IFNbeta	F:IFNbeta R:IFNbeta	forward reverse	AGCACTGGCTGGAATGAGAC TCCTTGGCCTTCAGGTAATG
IFNa	F: IFNa F: IFNa	forward reverse	CAAAGACTCTCACCCCTGCT CACAGTGTAAGGTGCACATGA
IL-29	F: IL-29 R: IL-29	forward reverse	AATTGGGACCTGAGGCTTCT AGCTGGGAGAGGATGTGGT
DDX60	DDX60_F DDX60_R	forward reverse	AAGGTGTTTCCTTGATGATCTCC TGACAATGGGAGTTGATATTCC
SET	F SET R SET	forward reverse	TGGTTCCCGATATGGATGAT ATCCTCATCCCCTTCTTCGT
IFI27	F: IFI27 R: IFI27	forward reverse	TGCTCTCACCTCATCAGCAGT CACAACCTCTCCAATCACAAC
IFIT1	F: IFIT1 R: IFIT1	forward reverse	GCCTCCTTGGGTTTCGTCTATAA TCAAAGTCAGCAGCCAGTCTCA
IFIT2	F: IFIT2 R: IFIT2	forward reverse	ACGGTATGCTTGGAAACGATTG AACCCAGAGTGTGGCTGATG
IFIT3	F: IFIT3 R: IFIT3	forward reverse	CGGAACAGCAGAGACACAGA ATGGCATTTCAGCTGTGGA
IFI6	F: IFI6 R: IFI6	forward reverse	CTGTGCCCATCTATCAGCAG GGGCTCCGTCACTAGACCTT
STAT1	F: STAT1 R: STAT1	forward reverse	GTTTTCATGACCTCCTGTCAC GTGGACTCCTCCATGTTTCATC
IRF7	F: IRF7 R: IRF7	forward reverse	GAGTGGCCATAGGTGGCTC ACCACTTCGTGAACAGACAGA
IRF9	F: IRF9 R: IRF9	forward reverse	CCGTGATAATCGTGTCTGAAA CCTGGGTTACACCAATTTGG
TLR3	F: TLR3 R: TLR3	forward reverse	TCACTTGCTCATTCTCCCTT GACCTCTCCATTCTGCGC
IFIH1	F: IFIH1 R: IFIH1	forward reverse	ACCAAATACAGGAGCCATGC GCGATTTCTTCTTTTGCAG

OASL	F: OASL R: OASL	forward reverse	GGGACAGAGATGGCACTGAT AAATGCTCCTGCCTCAGAAA
RSAD2	F: RSAD2 R: RSAD2	forward reverse	GTGAGCAATGGAAGCCTGAT TCCCTACACCACCTCCTCAG
MX1	F: MX1 R: MX1	forward reverse	ACCTACAGCTGGCTCCTGAA CGGCTAACGGATAAGCAGAG
OAS2	F: OAS2 R: OAS2	forward reverse	GAGTGGCCATAGGTGGCTC ACCACTTCGTGAACAGACAGA
ISG15	F: ISG15 R: ISG15	forward reverse	TGTCGGTGTGTCAGAGCTGAAG GCCCTTGTTATTCCTCACCA
IRF1	F: IRF1 R: IRF1	forward reverse	TTTGTATCGGCCTGTGTGAATG AAGCATGGCTGGGACATCA

Tabla 5.- Oligonucleótidos utilizados con sus respectivas secuencias

3. Extractos proteicos y análisis por inmunodetección.

3.1 Extracción ácida de histona H1

La histona H1 se purificó de acuerdo al método establecido por Banks *et al.*, 2001. Se realiza la lisis celular con una solución de ácido perclórico al 5% durante 1h a 4°C, el lisado se centrifuga a máxima velocidad (≥ 12000 rpm) a 4°C por 15 minutos (min), posteriormente se precipita al añadir ácido tricloroacético (TCA) hasta una concentración final del 30%, solución que se incuba durante la noche (ON) a 4°C.

A continuación, se realizan dos lavados con 0,5ml de acetona fría (-20°C), la proteína precipitada se seca 10min a temperatura ambiente (RT) y finalmente se resuspende en 100 μ l de agua. Por último, se cuantifica a 230nm (NanoDrop) y se almacena a -80°C.

3.2 Extracción ácida total de histonas

Se basa en la solubilidad de las histonas en ácidos, condiciones bajo las cuales la mayoría de las otras proteínas nucleares precipitan.

El *pellet* de células se resuspende en 1ml de solución hipotónica [10mM Tris-HCl (ph 8.0), 1mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM de DTT, 20uM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF)] y se incuba por 30 min. El *pellet* nuclear se obtiene al centrifugar a 10000 x g por 10 min a 4 ° C. Al *pellet* nuclear se le añade 400 ul de ácido sulfúrico (H₂SO₄)(0.2M) para extraer las histonas, se realiza un *vortex* y se incuba 30 min a 4 ° C. La solución se centrifuga a 16000 x g a 4 ° C por 10min y se recolecta el sobrenadante. Al sobrenadante se le añaden 132ul de TCA al 100%, gota a gota, se mezcla ligeramente la solución y se incuba una hora en hielo para precipitar las histonas. El

precipitado se centrifuga a 16000 x g a 4 ° C por 10 minutos y se realiza un lavado del pellet con acetona fría por dos ocasiones. La histona precipitada y lavada se seca por exposición al aire, y se resuspende en agua. La concentración proteica se cuantifica a 230nm (NanoDrop) o mediante un análisis Bradford.

3.3 Extracto total de proteínas por lisis celular (RIPA)

Las células se lavan por dos ocasiones con PBS 1X, se realiza un *scraper* con lisis bufer (RIPA) con inhibidores [1mM PMSF, 1ug/ul Aprotinina, 1ug/ul de Pepstatina A, PIC 1X (coctel de inhibidores de proteasas), 1mM NaVO₄ y 20mM de b-Glycerol-fosfato]. La solución de células con lisis bufer se incuban con agitación a 4 ° C por 20min. El sobrenadante con el extracto proteico se obtiene al centrifugar a 12000rpm a 4 ° C por 20min y se cuantifica a través del ensayo Micro BCA (Pierce).

Ripa Bufer: 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 140 mM NaCl.

3.4 Fraccionamiento celular

El fraccionamiento celular se llevó a cabo utilizando el método descrito por Andersen *et al.*, 2017, con algunas modificaciones.

Alrededor de 30 millones de células se resuspenden en 1ml de Bufer A [10 mM HE-PES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl, KCl, 0.5 mM DTT, e inhibidores de proteasas: 1 mM PMSF, 10g/ml leupeptina, 0.1 unidades/ml aprotinina, 1mM ortovanadato, and 50 mM NaF] y se incubaron por 10 min en hielo. La suspensión de células se homogeniza pasándola a través de una aguja de calibre 23, alrededor de 15 veces y posteriormente a través de una aguja calibre 25, por alrededor de 10 veces. En este punto se recoge una porción de la muestra que corresponde a la fracción total obtenida. A continuación, la suspensión homogenizada se centrifuga a 228 x g por 5min a 4°C, se recoge el sobrenadante que corresponde a la fracción citoplasmática. El pellet restante se resuspende en el denominado Bufer B [0.25M sucrosa, 10 mM MgCl e inhibidores de proteasas] y se homogeniza nuevamente al pasar la suspensión a través de una aguja calibre 23 en 10 ocasiones. Posteriormente se centrifuga a 1439 x g, 5min a 4°C utilizando un colchón de sacarosa [Buffer C: 0.35M sacarosa, 0.5 mM MgCl₂ e inhibidores

de proteasas]. El *pellet* obtenido se resuspende con el Bufer C y se sonifica por 6 ciclos de 10 segundos en hielo. Inmediatamente la muestra sonicada se centrifuga con un colchón de sacarosa [Bufer D: 0.88 M sacarosa, 0.5 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas] a 2800 x g por 10min a 4°C. La fracción obtenida se recoge y corresponde a la fracción del nucleoplasma. A continuación, el *pellet* que contiene los nucléolos se lava con Bufer C, para lo cual se centrifuga a 200 x g por 2 min a 4°C. Finalmente se resuspenden los nucléolos con bufer de lisis [2% SDS, 67mM Tris-HCl, ph 6.8] y la concentración de proteína se puede cuantificar por Micro BCA.

3.5 SDS-PAGE Western Blot

La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970) permite separar las proteínas de acuerdo a su tamaño. El detergente SDS desnaturaliza las proteínas y les confiere carga negativa, las proteínas se separan en un gel de poliácridamida al aplicar un campo eléctrico.

El gel de SDS-poliacrilamida consta de dos secciones, un gel concentrador en su parte superior denominado *stacking* (4% acrilamida), que alinea las proteínas de las muestras y un gel separador llamado *running*, con un porcentaje de acrilamida, de acuerdo al tamaño de la proteína que se desea separar.

Los extractos o purificados de proteínas se someten a la electroforesis en gel (SDS-PAGE) y se transfieren a una membrana FL-Immobilon (*polyvinylidene fluoride* (PVDF)). Después se realiza el bloqueo de la membrana durante 1h a RT con *Odyssey blocking buffer* (LICOR Biosciences) para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés. En el siguiente paso, se incuba la membrana con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C y con agitación, posteriormente se incuba con el anticuerpo secundario durante 1h RT con agitación. Finalmente, la membrana es revelada mediante *Odyssey Infrared Imaging System*.

3.6 Anticuerpos primarios y secundarios

Anticuerpos policlonales específicos para el estudio de las distintas variantes de H1, así como otros anticuerpos usados en los distintos ensayos, se encuentran citados en la Tabla 6.

Anticuerpo	Descripción	Compañía	Referencia	Concentración utilizada (WB)	Tamaño banda (kDa)
Anticuerpos primarios					
anti-H1.0	Mouse	Abcam	ab11079	1/1000	30
anti-H1.2	Rabbit	Abcam	ab4086	1/500	25
anti-H1.3	Rabbit	Abcam	ab24174	1/500	27
anti-H1 phospho-T146	Rabbit	Abcam	ab3596	1/1000	32
anti-H1.5	Rabbit	Abcam	ab18208	0.5ug/ml	32
anti-H1X	Rabbit	Abcam	ab31972	1ug/ml	35
anti-H3	Rabbit	Abcam	ab1791	1/1000	17
Anti-H3K9me3	Rabbit	Abcam	ab8898	1ug/ml	17
Anti-H3K27me3	Rabbit	Millipore	07-449	0.4ug/ml	17
anti-HA tag	Rabbit	Abcam	ab9110	1/4000	-
anti-total H1 (clone AE-4)	Mouse	Millipore	05-457	1ug/ml	32-34
anti-cleaved PARP	Rabbit	Abcam	ab32064	1/1000	25
Anti-active+pro caspase 3	Rabbit	Abcam	ab184787	1/2000	32 y 17
Anti-Caspase-1	Rabbit	Abcam	ab108362	1/1000	45
Anti-nucleolin	Rabbit	Abcam	ab22758	1ug/ml	76
Anti-nucleophosmin	mouse	Abcam	ab15440	1/500	38
Anti-beta-tubulin	mouse	Sigma	T8328	1/5000	50
Anticuerpos secundarios					
Anti-rabbit	cabra	Li-Cor	925-68071	1/5000	-
Anti-mouse	cabra	Li-Cor	925-68070	1/5000	-

Tabla 6.- Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunodetección

4. Ensayos de proliferación celular, fluorescencia y ciclo celular

4.1 Análisis de proliferación celular

Las células que expresan el correspondiente shRNA (GFP positivo) se mezcla en la proporción 1:1 con la célula parental (GFP negativa) y se siembran en placa. Cada tres días, se cambia el medio de cultivo, y de acuerdo al tiempo requerido se cuantifica por FACs los porcentajes relativos de células GFP positivas y GFP negativas.

4.2 Análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie

El ensayo clonogénico, se basa en el cultivo altamente diluido de las células, de modo que se pueden detectar células individuales. La capacidad proliferativa viene determinada por la capacidad de las células individuales de dividirse y formar colonias. En

este ensayo se cultivan 17×10^3 células en una placa de 100mm de diámetro por duplicado. Después de 24h, se añade doxiciclina en las líneas que presentan el sistema inducible para el *knock-down* de las distintas variantes de H1, el medio de cultivo, así como el tratamiento con doxiciclina se reemplaza cada 72h. Al final del ensayo, las colonias celulares se lavan con PBS 1X y se realiza una tinción con una solución de cristal violeta (0.06% cristal violet-Sigma, 10% etanol, 10% ácido acético). Finalmente, las placas son escaneadas y las colonias son contadas con ImageJ, los datos se reportan como el número total de colonias en relación al número de colonias de los cultivos no tratados (Brown and Wouters, 1999).

4.3 Análisis de formación de colonias, independiente de la adherencia a la superficie (agar blando)

El ensayo de formación de colonias en agar blando se puede utilizar para estudios en los que se evalúa la capacidad invasiva de las células cancerosas. La técnica se basa en que la matriz semi-sólida, favorece selectivamente el crecimiento de células que pueden proliferar en una manera independiente de anclaje. Este rasgo se presenta principalmente por las células cancerosas, pero no por las células normales o con poca capacidad invasiva (Horibata, Vo, Subramanian, Thompson, & Coonrod, 2015). En este ensayo, se utilizan placas de 12 pocillos los cuales se preparan con una capa base que contiene 0.5% de agar (0.6ml), una vez solidificada, sobre esta capa se añade una segunda capa superior, que contiene 0.3% de agar y 1.2×10^5 células en suspensión (0.6 ml), así como el tratamiento con doxiciclina en los casos requeridos. Se añaden 200uL de medio de cultivo sobre las capas, así como doxiciclina si fuera el caso. Cada tres días se reemplaza el medio y la doxiciclina. Al final del ensayo, se lava con PBS 1X y se realiza una tinción con 0.5mg/ml de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Las colonias teñidas son escaneadas y posteriormente contadas con ImageJ. Los resultados se reportan como el número de colonias formadas en las células tratadas en relación al número de colonias formadas en las células no tratadas.

4.4 Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACs)

Esta técnica permite clasificar y seleccionar células provenientes de una muestra que contiene varias poblaciones de células, basándose en las diferencias particulares de dispersión y fluorescencia de cada célula.

Las muestras se fijan en PBS 1X : Paraformaldehído 1%, y las muestras se procesan utilizando la máquina FACS Calibur (Becton Dickinson) y se analizan los resultados usando el programa CellQuest.

4.5 Ciclo celular

Técnica basada en la tinción con yoduro de propidio (PI) y análisis por citometría de flujo. Esta tinción permite caracterizar la distribución de células a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (proporción de células en G0/1, S, G2+M, –células muertas- y poliploides)

Las células se tripsinizan, posteriormente se lavan con PBS 1X y se fijan con etanol al 70% durante toda la noche a -20°C. Después de dos lavados con PBS 1X, se les incuban con RNasa A (1mg/ml), 1h a 37°C y se añade PI (20ug/ml) durante toda la noche o 3-4h a 4°C. Por último, se añade 300µl PBS 1X y nuevamente PI(20ug/ml), se protege las muestras de la luz y se analiza en el citómetro de flujo.

5. Producción de virus e infección

Técnica que permite generar partículas víricas que presenten el plásmido que codifica para un shRNA. Para ello se utilizan células 293T (con una eficiencia de transfección de más del 80%), se purifican las partículas víricas y se infectan las líneas celulares en las que se desea generar un *knock-down* de una determinada proteína. Este procedimiento inicia con la transfección de los plásmidos [5µg pCMV-VSV-G(plásmido de envoltura), 15µg pCMV-R8.91(vector de empaquetamiento, codifica para gag, pol, tat y rev) y 10µg shRNAs(plKO.1) o shH1 (pLVTHM)], mediante el uso de fosfato de calcio en 2.5×10^6 células 293T. En este punto, el ión Ca^{+2} se asocia al grupo fosfato del DNA que junto al HBS (*Hepes-Buffered Saline*) forman un fino precipitado que facilitará la unión del complejo a la superficie celular y su posterior

entrada por endocitosis. Se añade el precipitado a las células lentamente y se incuba durante 6-10h. A continuación, se retira el medio, se lava con PBS 1X y se añade medio nuevo. El medio se recoge cada 24h durante 2 días, se realiza un filtrado para eliminar restos celulares (tamaño del poro del filtro: 0,45µm) y se ultracentrifuga a 4°C por 1h 30min a 26000rpm, en un gradiente de sacarosa. El *pellet* se resuspende en 1ml de medio. Para la infección se emplean distintas dosis víricas y se espinocula 2h a 1200 rpm (RT).

Tras una incubación de 24h, se seleccionan las células mediante tratamiento con 2 µg/ml de puromicina (Sigma) o mediante selección por fluorescencia (*sorting*) dependiendo del caso.

6. Tratamientos

Las moléculas con su respectiva concentración, tiempo y su mecanismo de acción se reporta en la tabla 7.

Nombre de la molécula	Concentraciones utilizadas	Tiempo del tratamiento	Efecto esperado del tratamiento
Doxiciclina (Sigma-Aldrich)	2.5 ug/ml	1-12 días; Típicamente 6 días	Fármaco para la inducción del sistema de <i>Knock-down</i> para H1.
Puromicina (Thermo-Fisher)	2ug/ml	3 d	Inhibe la síntesis de proteínas liberando las cadenas polipeptídicas naciente, antes de completar su síntesis. Utilizada para seleccionar las células que han incorporado la resistencia Puromicina (Pu-roR)
Ruxolitinib (Selleckchem)	1uM	12h, 3d	Inhibidor de JAK1 y JAK2.
BX795 (Selleckchem)	0.5uM	12h, 3d	Inhibidor de la actividad catalítica de TBK1 / IKKε bloqueando su fosforilación.
2-Aminopurina (Santa Cruz)	10mM	3d	Inhibidor de la proteína quinasa (PKR), activada por RNA de doble cadena (dsRNA)
Camptotecina (Sigma-Aldrich)	10uM	4h	Inhibidor de la topoisomerasa I, interfiere con la función esencial de la topoisomerasas en la replicación del DNA, induce apoptosis por mecanismo no bien establecidos.
Estaurosporina (Sigma-Aldrich)	1uM	4h	Estaurosporina es un potente inhibidor no específico de quinasas, incluyendo la quinasa C. Esta molécula induce apoptosis por mecanismos poco conocidos.

Interferon Beta (IFNβ Sigma)	0.15 ug/ml	8h	Biomolécula que mediante la unión con receptores específicos en la superficie de las células humanas inicia una cascada de eventos intracelulares que llevan a la expresión de numerosos genes (ISGs), importantes en la respuesta inmunitaria.
--	------------	----	---

Tabla 7.- Moléculas utilizadas con sus respectivas concentraciones, tiempo de exposición al tratamiento y efectos esperados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio del efecto de la depleción simultánea de distintas variantes de la histona H1 sobre la respuesta a interferón.

1.1 Diseño de RNA interferentes (shRNA) estables inducibles para inhibir distintas variantes H1 en líneas celulares de cáncer de mama.

Hemos generado líneas celulares estables en las células de cáncer de mama T47D y MCF7 que inhiben la expresión simultánea de variantes de la histona H1, con el fin de estudiar el efecto de dicha inhibición a nivel celular y en la expresión génica. Se utilizó un sistema de expresión inducible, el cual contiene un vector regulador (Lv-tTR-KRAB-Red) y el vector pLVTHM, que codifica la expresión de los shRNAs de las distintas variantes, así como de un marcador fluorescente GFP. El vector pTr-KRAB produce el represor tTR fusionado al dominio KRAB de Kox1 en humanos (Deuschle et al 1995). tTR-KRAB puede modular la transcripción de un vector que tenga integrado en su promotor una secuencia tetO. En la ausencia de doxiciclina (Dox), tTR-KRAB se une específicamente al tetO y suprime la transcripción llevada a cabo por la polimerasa II y polimerasa III, a una distancia de hasta 3kb desde su sitio de unión, a través de la formación de heterocromatina (Bellefroid et al 1991, Deuschle et al 1995, Senatore et al 1999 y Maciej y Didier 2003). Por otra parte, en la presencia de doxiciclina (Dox), tTr-KRAB es desplazado de tetO, permitiendo la expresión del correspondiente shRNA y el marcador GFP.

Los shRNA para inhibir H1.0, H1.2, H1.3 y H1.5 han sido previamente elegidos, diseñados, y validados en un estudio previo en nuestro laboratorio (Sancho 2008)

Dichos shRNAs constan de 19 o 21 nucleótidos reversos homólogos complementarios de las regiones más divergente de los diferentes genes dianas que codifican las distintas variantes de H1 como se indica en los materiales y métodos.

En la tesis doctoral llevada a cabo por Lluís Millán en el año 2013 en nuestro laboratorio se diseñó un shRNA específico para inhibir la variante H1.4, además de un RNA interferente con la capacidad de inhibir a nivel de proteína las variantes H1.2 y H1.4 denominado mH1 shRNA.

Para establecer los dobles knock-down, hemos infectado con un segundo RNA de interferencia a células previamente seleccionadas para inhibir una variante. En el caso de las células H1.4/H1.2 shRNA y H1.4/H1.5 shRNA las células de origen infectadas

fueron las células H1.4 shRNA en ambos casos y para establecer las células H1.2/H1.5 shRNA se infectó las células H1.2 shRNA.

Para establecer los triples knock-downs, se infectaron los dobles knock-downs previamente diseñados, siendo infectados H1.2/H1.5 shRNA y H1.4/H1.5 shRNA con el RNA interferente H1.3sh para obtener las células H1.2/H1.5/H1.3 shRNA y H1.4/H1.5/H1.3 shRNA.

Los respectivos shRNAs utilizados y las combinaciones realizadas se resumen en la Tabla 8.

Línea celular	Simple knock-down	Doble knock-down	Triple knock-down
T47D	H1.2 sh	H1.2/H1.5 sh	H1.2/H1.5/H1.3 sh
	H1.4 sh	H1.4/H1.2 sh	n/a
		H1.4/H1.5 sh	H1.4/H1.5/H1.3 sh
	mH1 sh	n/a	n/a
	H1.3 sh		
	H1.5 sh		
	H1.0 sh		
	H1X		
CTRL (Rd) sh			
MCF7	H1.2 sh		
	H1.4 sh		
	H1X		
	mH1 sh		
HeLa	H1.2 sh		
	H1.4 sh		

Tabla 8.- shRNAs establecidos y utilizados para inhibir las distintas variantes de H1.

1.1.1 Inhibición de múltiples variantes en células T47D con el shRNA multi H1 inducible.

Las inhibiciones de las diferentes variantes se analizaron por ensayos western blot usando anticuerpos específicos. Los análisis de los extractos de histona total de muestras correspondientes a distintos días de tratamiento con Dox, revelaron que los niveles de proteína en las células mH1shRNA muestran una fuerte reducción de H1.2 y H1.4 a partir de los tres días de tratamiento con Dox. Se observó que H1.3 sufre una ligera inhibición en los primeros días evaluados, alcanzando una inhibición superior a partir del día 9 de tratamiento con Dox. Además, se advirtió que H1.5 mantiene sus niveles de proteína estables mientras que, H1X y H1.0 presentaron una tendencia a incrementarse, indicando un posible efecto compensatorio en el caso de estas variantes (Figura 10A)

Los efectos de la depleción de mH1 shRNA sobre la expresión génica de las variantes de histona H1 se cuantificaron a través de retro-transcripción y posterior real-time (RT-qPCR)(Figura 10B). Las variantes H1.2 y H1.3 presentaron inhibiciones cercanas al 80% y 70% respectivamente, por otra parte, H1.4 y H1.5 redujeron su expresión en un 50%, por otra parte, H1X sufrió una ligera reducción de su expresión, mientras que H1.0 mostró un incremento cercano al 50%.

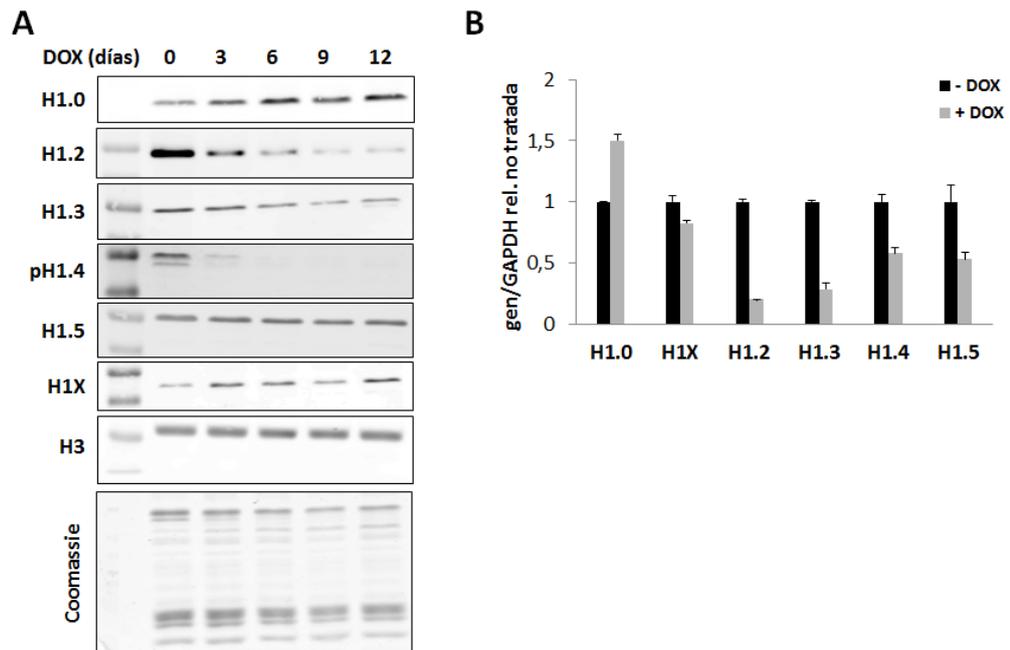


Figura 10.- Análisis por western blot y RT-qPCR de extractos totales de histonas y RNA A) Las células mH1 shRNA fueron tratadas con Dox por 12 días, los análisis de inmunodetección se realizaron con los anticuerpos indicados. B) Análisis de expresión de los genes que codifican para ciertas variantes de H1.

Con el propósito de determinar si existe una reducción del contenido global de histonas H1 al inducir con doxiciclina el mH1 shRNA por 6 días, se realizó una cuantificación aproximativa de extractos total de histonas, separados en un gel SDS-page, posteriormente teñidos con coomassie y cuantificados con ImageJ software (Figura 11).

Los resultados mostraron, que los perfiles de cuantificación de bandas presentan tres picos bien diferenciados en las células no tratadas (día 0), a los tres días de tratamiento con Dox, el pico correspondiente a H1.2 decreció claramente, al igual que se notó una ligera disminución del pico denominado rest H1s(Incluyen: H1.5, H1.4, H1.3 y H1X), se observó que el comportamiento de estos dos picos siguen una tendencia decreciente en el tiempo. Por el contrario, el pico correspondiente a H1.0, se incrementó después

de tres días de tratamiento con Dox, este incremento mantuvo una tendencia creciente. (Fig 11A)

Al cuantificar con el software ImageJ, se confirmó que los porcentajes de H1.2 disminuyeron al igual que el conjunto de variantes rest H1s y se verificó el incremento del porcentaje relativo de H1.0. Finalmente, los resultados indicaron que el porcentaje de la suma total del contenido de H1 se redujo entre un 20-40% en las células en las que se deplecionó múltiples variantes con el mH1 shRNA.

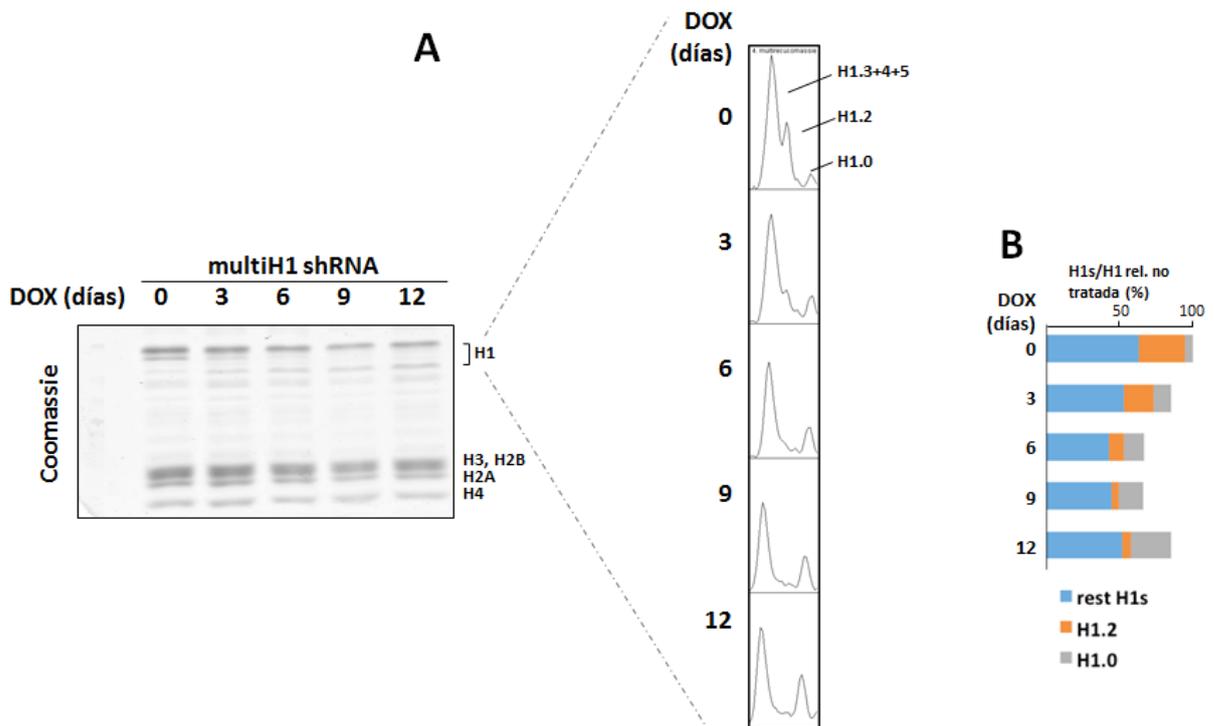


Figura 11.- Tinción Coomassie de extractos totales de histonas de células T47D mH1 shRNA separadas en un gel SDS-page. A) Perfiles de las bandas correspondientes a H1, obtenidas con ImageJ. B) Cuantificación porcentual de contenido total de H1

1.1.2 Inhibición de H1.4 y H1.2 en células T47D con el shRNA H1.4/H1.2 inducible.

Con el propósito de determinar si los efectos sobre la expresión del grupo de genes inducidos por IFN, es debido a una reducción del contenido global de las histonas H1 o es un efecto específico acontecido por la depleción de un grupo de variantes en concreto, se establecieron dobles knock-down, de las parejas de subtipos más probables por ser las que presentaron reducción en el mH1shRNA, conjuntamente con otras combinaciones de variantes.

Entre los sistemas inducibles establecidos de dos variantes tenemos a las células T47D H1.4/H1.2 shRNA. Los análisis de los extractos de histona total de muestras correspondientes a seis días de tratamiento con Dox, revelaron que los niveles de proteína en las células H1.4/H1.2 shRNA muestran una reducción de H1.2 y pH1.4. Se observó que el nivel de proteína de H1.3 se redujo ligeramente mientras que H1.0 y H1.5 incrementaron sus niveles de proteína, indicando un posible efecto compensatorio en el caso de estas variantes (Figura 12A)(Izquierdo et al, en revisión).

Se cuantificó también la expresión génica de las distintas variantes a través de RT-qPCR(Figura 12B). Los niveles relativos de expresión después de seis días de tratamiento con Dox mostraron que H1.2 y H1.4 se inhibieron más de un 50%, por otra parte, H1.0, H1.3 y H1.5 se incrementaron debido posiblemente a efectos compensatorios.

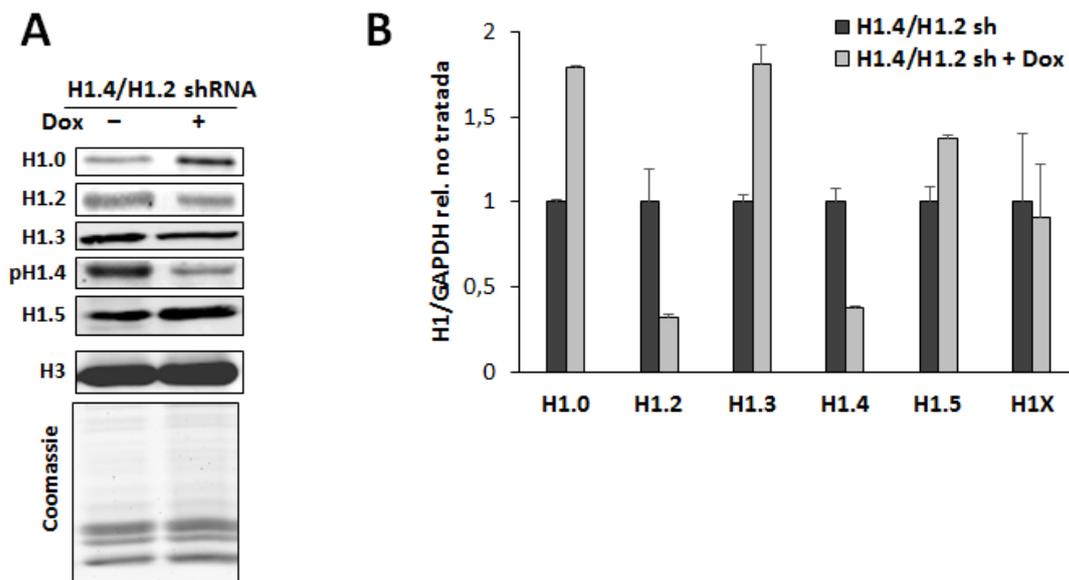


Figura 12.- Análisis por western blot y RT-qPCR de extractos totales de histonas y RNA A) Las células T47D H1.4/H1.2 shRNA fueron tratadas con Dox por 6 días, los análisis de inmunodetección se realizaron con los anticuerpos indicados(Izquierdo et al, en revisión). B) Análisis de expresión de los genes que codifican para ciertas variantes de H1.

Además, extractos totales de histonas se separaron en un gel SDS-page, posteriormente se tiñeron con comassie y se cuantificaron usando el software ImageJ (Figura 13).

Los resultados mostraron que los perfiles de cuantificación de bandas presentan tres picos bien diferenciados en las células no tratadas (-Dox). En las células tratadas con Dox, el pico correspondiente a H1.2 decreció claramente, mientras que el pico correspondiente a H1.0 se incrementó considerablemente (Figura 13A)

La cuantificación con ImageJ confirmó que el porcentaje de H1.2 disminuye y se verificó el incremento del porcentaje relativo de H1.0, ambos comparados con los porcentajes obtenidos en muestras de células no tratadas(-Dox). Finalmente, los resultados indicaron que el porcentaje de la suma total del contenido de H1 se redujo un 15% en las células en las que se deplecionó H1.4 y H1.2.

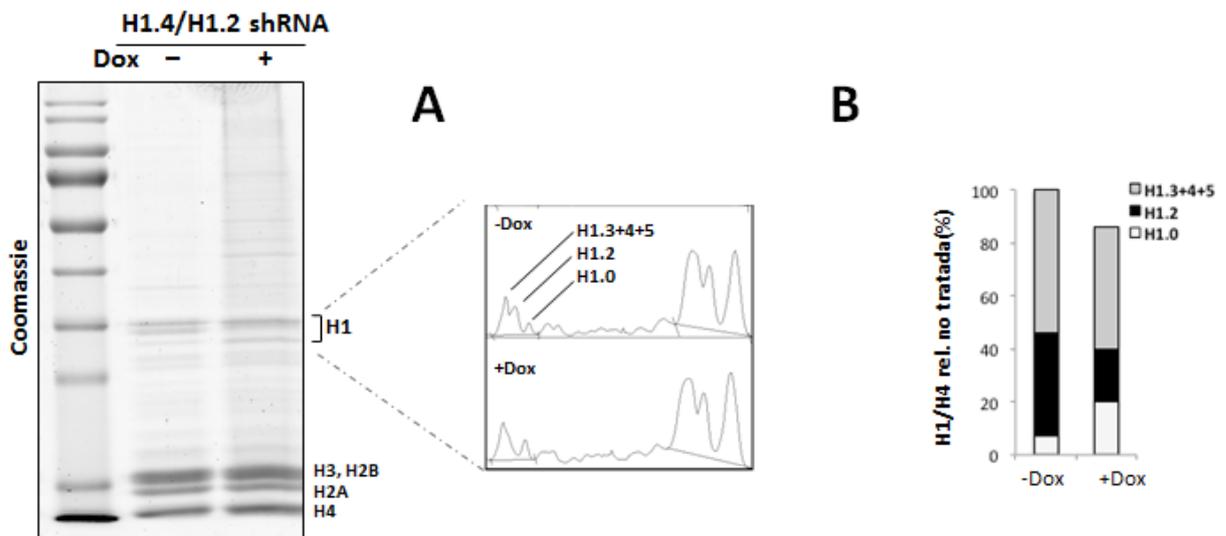


Figura 13.- Tinción Coomassie de extractos totales de histonas de células T47D H1.4/H1.2 shRNA separadas en un gel SDS-page. A) Perfiles de las bandas correspondientes a H1, obtenidas con ImageJ B) Cuantificación porcentual de contenido total de H1

1.1.3 Inhibición de H1.2 y H1.5 en células T47D con el shRNA H1.2/H1.5 inducible.

Las células T47D H1.2/H1.5 shRNA se establecieron con el fin de inhibir las variantes H1.2 y H1.5. La depleción a nivel de proteína de las variantes dianas se determinó a través de análisis por western blot con sus anticuerpos específicos.

Los análisis de los extractos de histona total revelaron que los niveles de proteína de H1.2 y H1.5 en las células tratadas con doxiciclina es menor que los niveles reportados en las células no tratadas (Figura 14A).

Los análisis de expresión génica por RT-qPCR mostraron que las variantes H1.2 y H1.5 de células tratadas con Dox decrecieron su expresión alcanzando valores inferiores al 50% en comparación con sus respectivas expresiones relativas en células no tratadas. (Figura 14B).

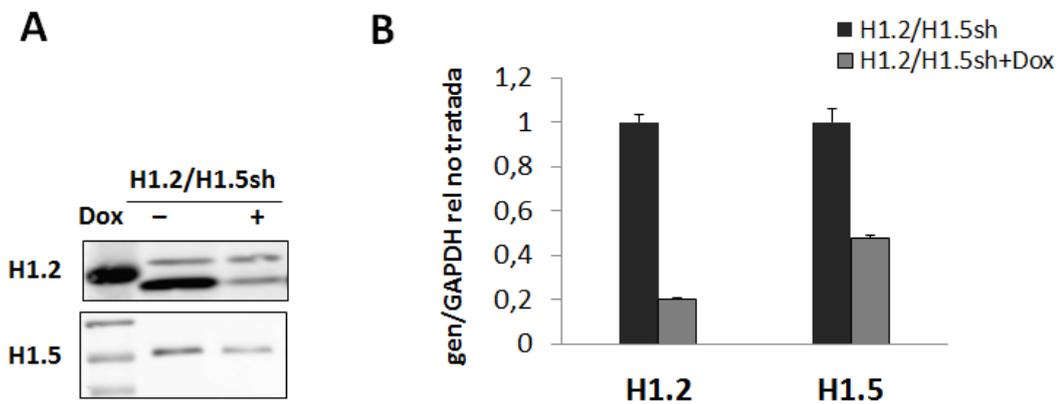


Figura 14.- Análisis por western blot y RT-qPCR de extractos totales de histonas y RNA A) Las células T47D H1.2/H1.5 shR-NA fueron tratadas con Dox por 6 días, los análisis de inmunodetección se realizaron con los anticuerpos indicados. B) Análisis de expresión de los genes que codifican para H1.2 y H1.5.

Extractos totales de histonas se separaron en un gel SDS-page, posteriormente se tiñeron con comassie y se cuantificaron usando el software ImageJ (Figura 15).

Los resultados mostraron que los perfiles de cuantificación de bandas presentan tres picos bien diferenciados en las células no tratadas (-Dox). En las células tratadas con Dox, el pico correspondiente a H1.2 decreció claramente, mientras que el pico correspondiente a H1.0 se incrementó considerablemente (Figura 15A)

La cuantificación con ImageJ confirmó que el porcentaje de H1.2 disminuye y se verificó el incremento del porcentaje relativo de H1.0, ambos comparados con los porcentajes obtenidos en muestras de células no tratadas(-Dox). Finalmente, los resultados indicaron que el porcentaje de la suma total del contenido de H1 se redujo un 13% en las células en las que se deplecionó H1.2 y H1.5(Figura 15B).

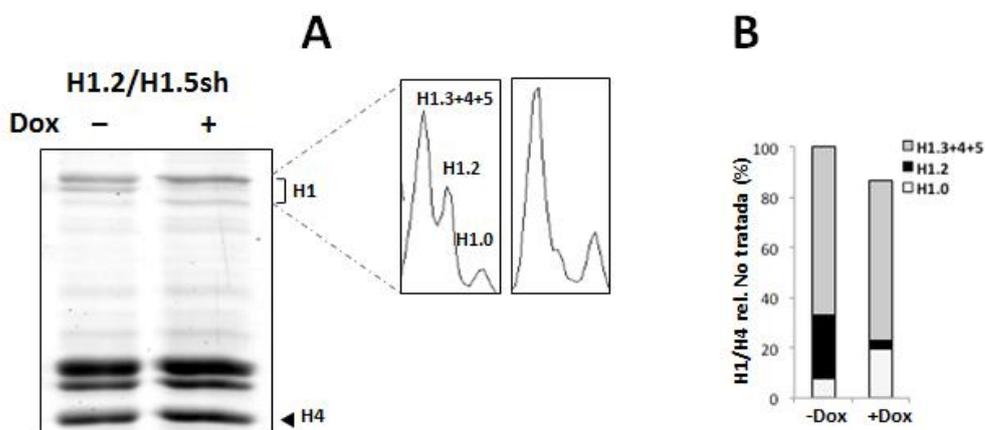


Figura 15.-Tinción Coomassie de extractos totales de histonas de células T47D H1.2/H1.5 shRNA separadas en un gel SDS-page. A) Perfiles de las bandas correspondientes a H1, obtenidas con ImageJ B) Cuantificación porcentual de contenido total de H1

1.1.4 Inhibición de H1.4 y H1.5 en células T47D con el shRNA H1.4/H1.5 inducible.

Las células T47D H1.4/H1.5 shRNA se establecieron con el fin de inhibir las variantes H1.4 y H1.5. Los análisis por western blot de los extractos de histona total revelaron que los niveles de proteína de H1.4 y H1.5 en las células tratadas con doxiciclina es menor que los niveles reportados en las células no tratadas (Figura 16A).

Los análisis de expresión génica por RT-qPCR mostraron que las variantes H1.4 y H1.5 de células tratadas con Dox decrecieron su expresión alcanzando valores inferiores al 50% en comparación con sus respectivas expresiones relativas en células no tratadas. (Figura 16B)

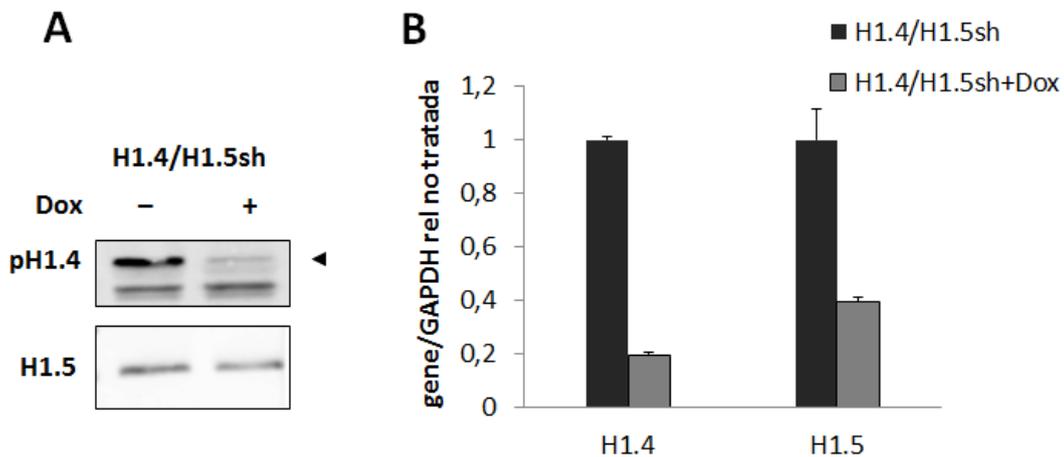


Figura 16.- Análisis por western blot y RT-qPCR de extractos totales de histonas y RNA A) Las células T47D H1.2/H1.5 shR-NA fueron tratadas con Dox por 6 días, los análisis de inmunodetección se realizaron con los anticuerpos indicados. B) Análisis de expresión de los genes que codifican para H1.4 y H1.5.

Extractos totales de histonas se separaron en un gel SDS-page, posteriormente se tiñeron con comassie y se cuantificaron usando el software ImageJ (Figura 17)

Los resultados mostraron que los perfiles de cuantificación de bandas presentan tres picos bien diferenciados en las células no tratadas (-Dox). En las células tratadas con doxiciclina(+Dox), el pico correspondiente a H1.2 no se vio alterado, mientras que el pico correspondiente a H1.3, H1.4 y H1.5 se redujo considerablemente (Figura 17A)

La cuantificación con ImageJ confirmó que el porcentaje de H1.2 y H1.0 no sufren cambios importantes, mientras que el picó correspondiente a H1.3, H1.4 y H1.5 se redujo considerablemente comparado con los porcentajes obtenidos en muestras de células no tratadas(-Dox). Finalmente, los resultados indicaron que el porcentaje de la

suma total del contenido de H1 se redujo aproximadamente un 40% en las células en las que se deplecionó H1.4 y H1.5 (Figura 17B).

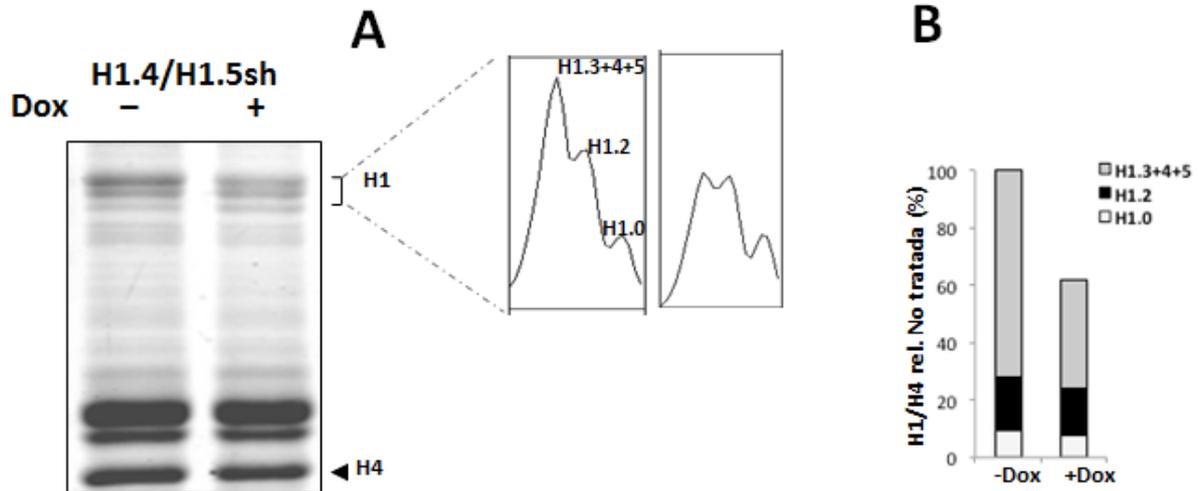


Figura 17.- Tinción Coomassie de extractos totales de histonas de células T47D H1.4/H1.5 shRNA separadas en un gel SDS-page. A) Perfiles de las bandas correspondientes a H1, obtenidas con ImageJ B) Cuantificación porcentual de contenido total de H1

1.1.5 Inhibición de múltiples variantes en células MCF7 con el shRNA multi H1 inducible.

Con el fin de verificar si los efectos observados sobre el grupo de genes inducidos por IFN se reproducen en una línea celular diferente a T47D, se añadió el sistema inducible de knock-down mH1 shRNA a la línea celular MCF7, posteriormente se verificó la inhibición proteica a través de ensayos de inmunodetección western blot. Los resultados obtenidos indicaron que H1.2 y pH1.4 disminuyen, mientras que H1.5 y H1.0 muestran un aumento en sus correspondientes señales, por otra parte, el nivel de H1.3 se mantuvo estable (Figura 18A)

La expresión génica de las distintas variantes de H1, después del tratamiento con Dox, fue semicuantificada a través de RT-qPCR. Los niveles relativos mostraron que los valores de expresión de H1.1, H1.2 y H1.5 sufren una disminución superior al 50% al compararlos con los niveles de expresión que muestran las células no tratadas (Figura 18B)

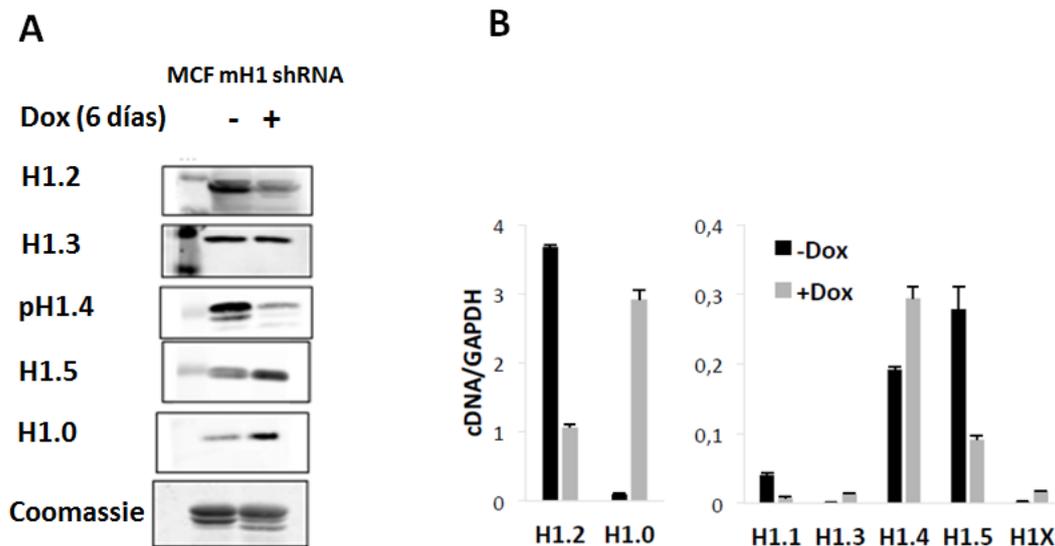


Figura 18.- Análisis por western blot y RT-qPCR de extractos totales de histonas y RNA A) Las células MCF7 mH1 shRNA fueron tratadas con Dox por 6 días, los análisis de inmunodetección se realizaron con los anticuerpos indicados. B) Análisis de expresión de los genes que codifican para ciertas variantes de H1.

Los datos obtenidos demostraron que la línea celular MCF7 mH1 shRNA inhibe eficientemente a nivel de proteína las variantes H1.2 y H1.4, además que se produce un incremento en la señal de H1.0 y H1.5.

1.2 La inhibición de múltiples variantes de H1 con el mH1 shRNA induce la expresión de genes estimulados por IFN(ISGs)

Como se ha descrito previamente, se ha desarrollado un shRNA con la capacidad de reducir la expresión de varias variantes, mientras que a nivel de proteína las variantes H1.2 y H1.4 se vieron deplecionadas al ser analizadas por ensayos de inmunodetección western-blot. H1.3 también se ha visto deplecionada en algunas ocasiones. El mH1 shRNA causa una sobreexpresión de H1.0, tanto a nivel de mRNA como también a nivel de proteína (Figura 10-11)

La inducción del mH1 shRNA afectó un sinnúmero de genes, entre los que se encontraron sobrerregulados muchos genes inducidos por IFN(ISGs). Análisis por Microarrays y mediante comparaciones con bases de datos de Interferoma(Contienen microarrays de células tratadas con interferón) se confirmó que 36% de los genes sobrerregulados y 18% de los genes deprimidos en el mH1 knock-down se encontraban descritos como genes que responden a cortos o largos períodos de tratamiento con IFN (Izquierdo et al, en revisión).

Primero se confirmó por RT-qPCR la inducción de varios ISGs en mH1sh después de seis días de tratamiento con Dox, como control de este análisis se utilizaron muestras obtenidas de células que contienen un shRNA random (RDsh) con igual tiempo de tratamiento de Dox (Figura 19).

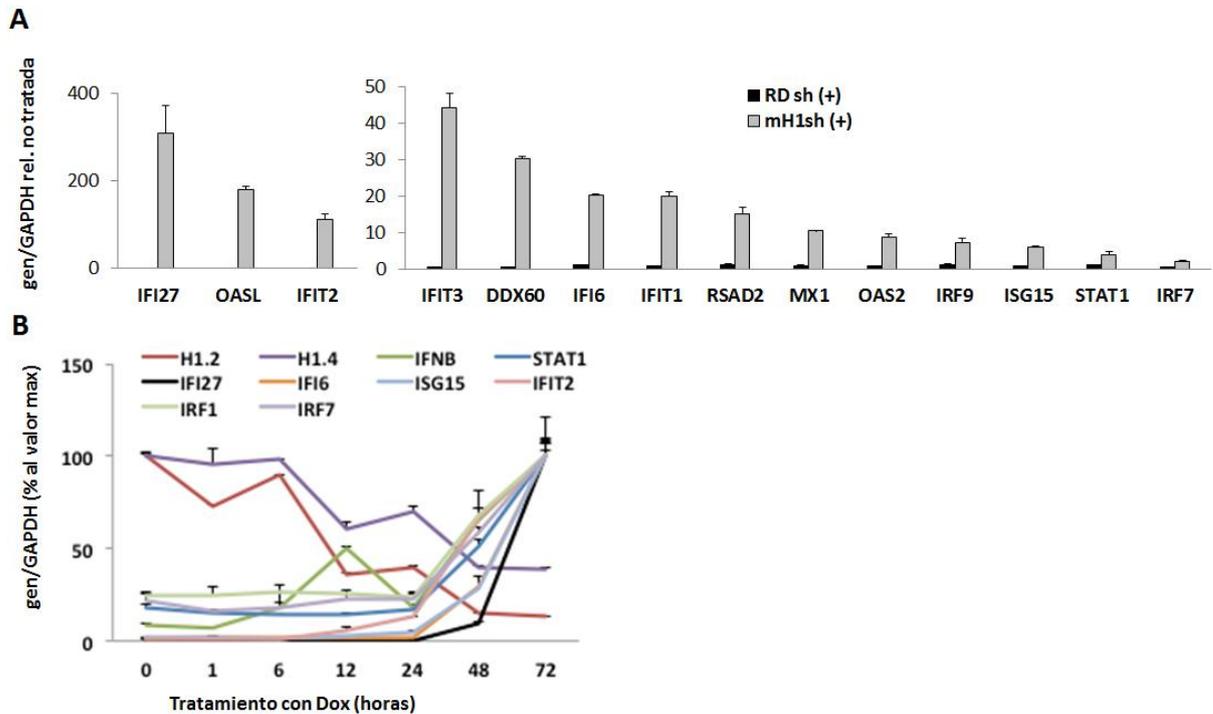


Figura 19.- Inducción de los ISGs en células T47D mH1 shRNA A) Expresión de ISGs cuantificado por RT-qPCR, en células mH1 shRNA, así como en el control RD shRNA, tra-tadas con Dox por 6 días. Los valores reportados corresponden a la expresión del gen corregido por GAPDH y relacionados a las células no tratadas. B) Expresión de variantes de H1 e ISGs a lo largo de distintos tiempos de tratamiento de doxiciclina. Los valores indicados se encuentran corregidos por GAPDH y relacionados al punto más alto de expresión.

Varios de los ISGs analizados muestran altas inducciones, IFI27 (300 veces), OASL (190 veces) e IFIT2(100 veces). El resto de ISGs analizados presentan valores de inducción de entre 3-50 veces por sobre los valores de expresión sobre las muestras de células no tratadas. (Figura 19A).

Con el fin de analizar la dinámica del efecto de inducción de los ISGs, se realizaron curvas de expresión a diferentes tiempos durante 3 días de tratamiento con dox, se observó que H1.2 y H1.4 fueron significativamente inhibidos a partir de las 12h (Figura B). La sobrerregulación de los ISGs se observaron inicialmente a las 48 horas de tratamiento con dox y sigue una tendencia creciente hasta las 72 horas, entre los genes analizados tenemos IFI27, IFI6, IFIT2, IRF1, IRF7, ISG15 y STAT1. En el caso del

gen que codifica para IFN- β (IFNB) mostró una sobreexpresión a las 12 horas, para posteriormente mostrar otro pico de inducción a las 48 horas. (Figura 3B)

En curvas de tiempo de 12 días de tratamiento con dox, la expresión de ISGs se incrementó progresivamente (Figura 19B)

La inducción de ISGs no fue observado en KDs individuales de las variantes como se muestra en los análisis realizados por RT-qPCR. La Figura 20B muestra la ausencia de inducción de los ISGs en las líneas establecidas para el KD inducible de H1.2 en T47D, MCF7 y HeLa. Así como también no existió inducción en las células control con el RD shRNA evaluado. Los valores de la expresión del gen que codifica para H1.2 se reportan como control del correcto funcionamiento del sistema inducible de los distintos shRNAs. Se observó que los niveles de expresión de H1.2 se reducen de acuerdo a lo esperado, en todas las muestras de las líneas celulares evaluadas, a excepción de las muestras correspondientes a las células control donde no existió inhibición (Figura 20A).

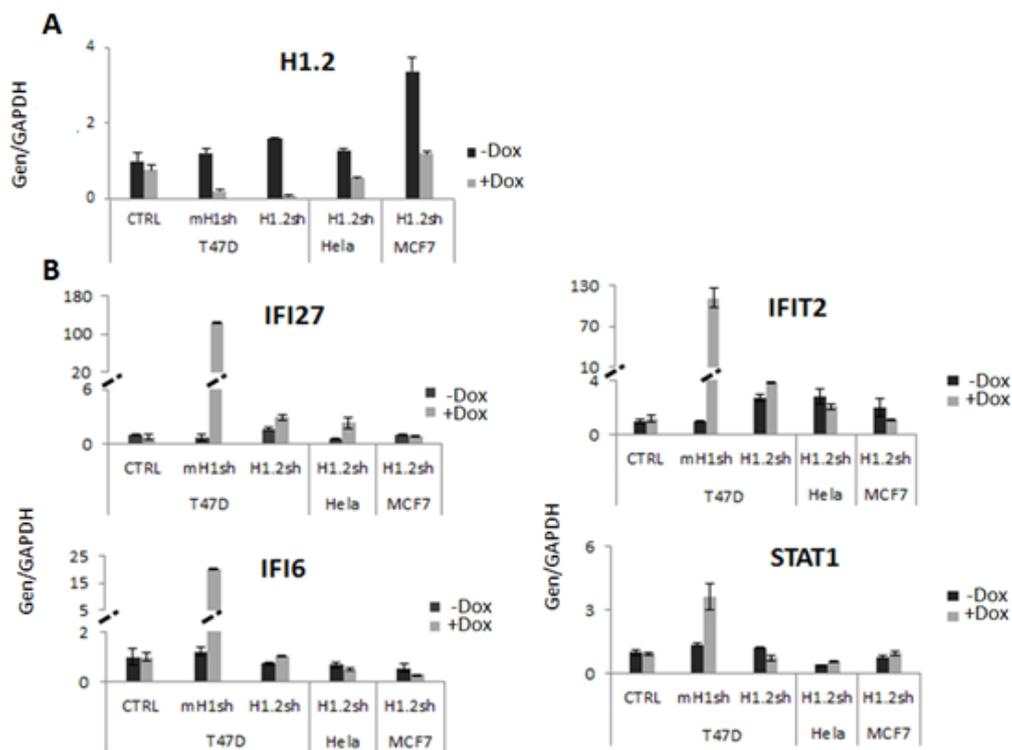


Figura 20.- Expresión del gen H1.2 y de los ISGs en las líneas T47D, HeLa y MCF7 señaladas A) Niveles relativos de expresión de H1.2 corregido por GAPDH. B) Niveles relativos de expresión de ISGs corregido por GAPDH

1.3 La depleción combinada de H1.2 y H1.4 en células T47D con shRNAs específicos es suficiente para promover la inducción de los genes estimulados por IFN(ISGs)

Los ISGs no se vieron sobrerregulados al deplecionarse individualmente la variante H1.2 y no fue observado al inhibirse la variante H1.4(Figura 21A). El efecto de sobre-regulación se reportó en células mH1 shRNA que deplecionan simultáneamente a nivel de proteína al menos las variantes H1.2 y H1.4. Con el fin de confirmar la especificidad funcional de estas dos variantes, el shRNA inducible para H1.2 se introdujo en las células T47D originarias para inhibir la variante H1.4, para obtener una nueva línea celular H1.4/H1.2sh como se ha descrito y caracterizado previamente.

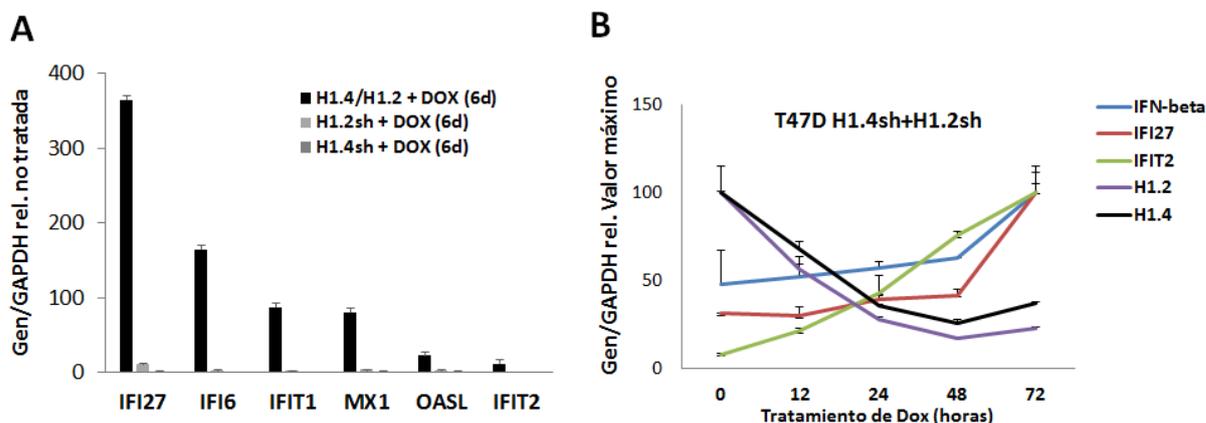


Figura 21.- Inducción de los ISGs en células T47D H1.4/H1.2 shRNA, H1.2 shRNA y H1.4 shRNA A) Expresión de ISGs cuantificado por RT-qPCR, en las células indicadas, tratadas con Dox por 6 días. Los valores reportados corresponden a la expresión del gen corregido por GAPDH y relacionados a las células no tratadas correspondientes. B) Expresión de variantes de H1 e ISGs a lo largo de distintos tiempos de tratamiento de doxiciclina en células T47D H1.4/H1.2 shRNA. Los valores indicados se encuentran corregidos por GAPDH y relacionados al punto más alto de expresión.

Los ISGs fueron fuertemente inducidos después del correspondiente tratamiento con doxiciclina(Dox) en las células H1.4/H1.2 shRNA (Figura 21A). Se reportan valores de grandes incremento en los genes evaluados, en el caso de IFI27 alrededor de (380 veces) , IFI6(160 veces), IFIT1(94 veces), MX1(89 veces), OASL(28 veces) y IFIT2(12 veces).Los valores de inducción obtenidos son semejantes a los valores de expresión relativa correspondientes a las células T47D mH1 shRNA en varios de estos

genes, existen variaciones en la intensidad de la inducción de los distintos ISGs evaluados, pero en general el grupo de ISGs son altamente inducidos tanto en el caso de las células mH1 shRNA como en las células H1.4/H1.2 shRNA.

Con el fin de analizar la dinámica del efecto de inducción de los ISGs y la reducción de H1.2 y H1.4, se realizaron curvas de expresión a diferentes tiempos durante 3 días de tratamiento con Dox, se observó que H1.2 y H1.4 fueron notablemente inhibidos a partir de las 12h (Figura 21B). La sobrerregulación de los ISGs se observaron inicialmente a las 48 horas de tratamiento con Dox y sigue una tendencia creciente hasta las 72 horas, entre los genes analizados tenemos IFI27, IFIT2. En el caso del gen que codifica para IFN- β (IFNB) muestra una sobrerregulación a las 72 horas.

Esto indica que la combinación del KD de H1.2 y H1.4 en células T47D, es suficiente para promover la respuesta a IFN y validan los resultados obtenidos en las células con el mH1 shRNA.

1.4 La depleción simultánea de H1.2 y H1.5 causa la sobrerregulación de los ISGs, pero a niveles inferiores de los obtenidos en las células H1.4/H1.2 shRNA.

La depleción simultánea de H1.2 y H1.5 causó la sobrerregulación de los ISGs (Figura 22B). Sin embargo, los valores obtenidos de incremento de la inducción son menores a los observados al inhibir las variantes H1.4 y H1.2. (Figura 22A). No se observó sobrerregulación al combinar la depleción de las variantes H1.4 y H1.5 (Figura 22A)

Estos resultados sugieren que la depleción de H1.2 es fundamental pero no suficiente para inducir la respuesta a IFN. Por otro lado, el contenido total de histonas H1 en las células que inhiben H1.4/H1.5 o H1.2/H1.5 no mostró una relación causal del efecto de inducción de los ISGs, debido a que por ejemplo en el caso de las células en las que se deplecionó H1.4 y H1.5 su contenido total de histonas fue inferior al contenido total de H1 de las células en las que se deplecionó H1.2 y H1.4, sin embargo, dichas células no indujeron la respuesta a IFN.

Esta característica indica que la inducción de la respuesta a IFN presenta una posible especificidad de variante y no es producto de una reducción del contenido total de H1.

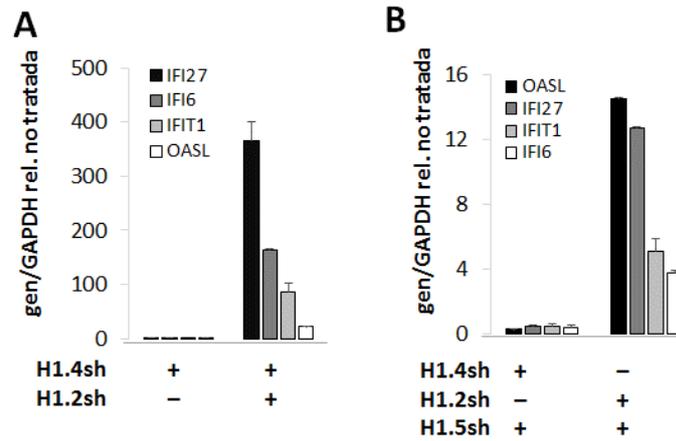


Figura 22.- Niveles relativos de expresión de los ISGs después de 6 días de tratamiento con Dox en células A) T47D H1.4 shRNA, H1.4/H1.2 shRNA, B) H1.2/H1.5 shRNA y H1.4/H1.5 shRNA. Valores de A) y B) corregidos por GAPDH y relacionados a sus correspondientes células no tratadas.

Finalmente, las células con el sistema inducible H1.4/H1.5 shRNA y H1.2/H1.5 shRNA fueron infectadas con el shRNA inducible para inhibir la variante H1.3(Figura 23A). Al analizar la expresión de los ISGs se observó que en el caso de las células que tienen las variantes H1.4/H1.5/H1.3 inhibidas, la expresión de los ISGs se mantiene inalterada, por otra parte en el caso de las células que tienen las variantes H1.2/H1.5/H1.3 inhibidas sufrieron un incremento de la expresión de los ISGs en comparación a las células que tienen inhibidas las variantes H1.2/H1.5, pero los valores obtenidos se mantienen por debajo de los reportados en la células que tienen deplecionadas las variantes H1.2 y H1.4(Figura 23B).

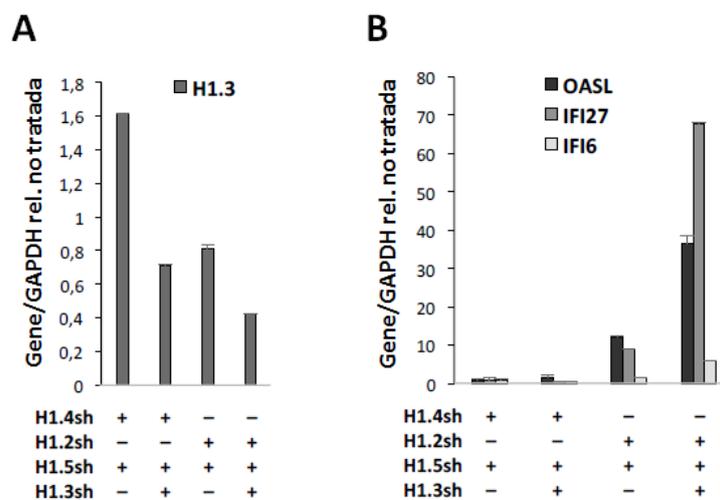


Figura 23.- Expresión del gen que codifica para H1.3 y de varios ISGs cuantificado por RT-qPCR, en las células indicadas, tratadas con Dox por 6 días. A) Expresión génica relativa de H1.3. B) Niveles relativos de expresión de los ISGs indicados. Los valores reportados en A) y B) corresponden a la expresión del gen corregido por GAPDH y relacionados a las células no tratadas correspondientes.

1.5 MCF7 mH1 shRNA induce la respuesta a IFN.

Con el fin de observar si el efecto sobre la expresión de ISGs, de la múltiple inhibición de variantes de H1 a través del mH1 shRNA es exclusivo de las células T47D, se estableció en otra línea celular el sistema inducible para inhibir las múltiples variantes de H1 como se mencionó anteriormente.

Se comprobó que la inducción de los ISGs debido a la depleción de al menos H1.4 y H1.2 simultáneamente, no es un efecto único de las células T47D al observarse en las células MCF7 la inducción de varios ISGs después del tratamiento con doxiciclina (Figura 24).

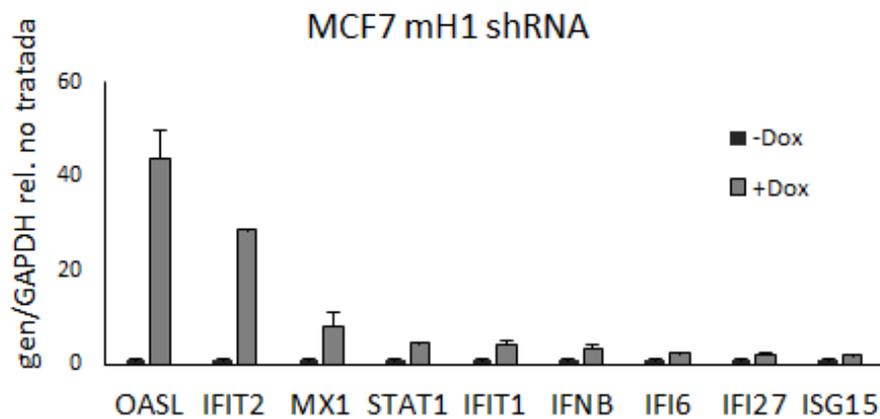


Figura 24.- Niveles relativos de expresión de los ISGs indicados en células MCF7 mH1 shRNA. Los valores reportados co-rresponden a la expresión del gen después de 6 días de tratamiento con Dox corregido por GAPDH y en relación a las células no tratadas(-Dox).

1.6 Ensayo de recuperación por sobreexpresión de distintas variantes de H1 re-establecen parcialmente los niveles basales de los ISGs

Para verificar si la inducción de los ISGs en las células T47D mH1 shRNA puede revertirse mediante la sobreexpresión de variantes de H1, se infectó estas células con lentivirus expresando GFP y las variantes H1.2, H1.3 y H1.4 marcadas con el péptido hemaglutinina(HA). La eficiencia de la infección se confirmó por análisis de citome-

tría de flujo FACS, se obtuvo valores de células GFP positivas entre el 89-98%. Ejemplo de dicho análisis de las células mH1sh sobreexpresando H1.3HA se indica en la Figura 25A.

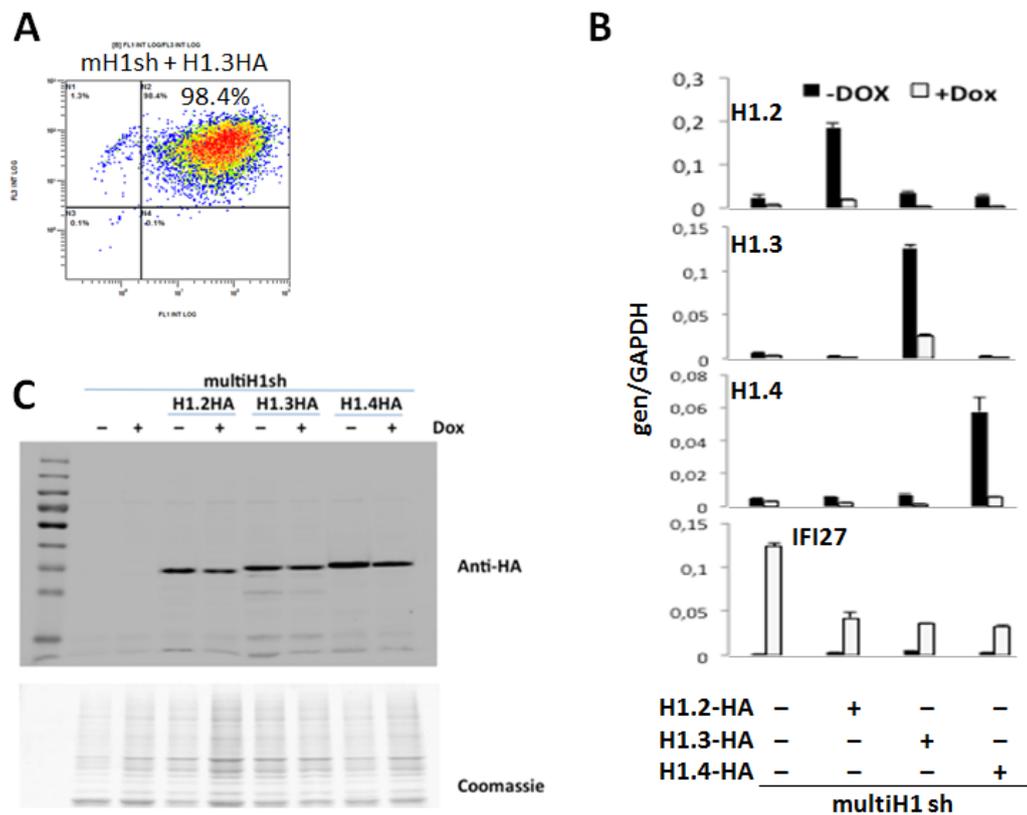


Figura 25.- Análisis de FACS, RT-qPCR y western blot en células que expresan las variantes de H1 etiquetadas HA y con el gen marcador GFP-fluorescente A) El ejemplo muestra la doble fluorescencia de las células mH1 shRNA/H1.3HA. RFP-positivas por el sistema inducible reprimido (sin Dox) mH1 shRNA y GFP-positivas por el marcador de fluorescencia acoplado a la variante etiquetada de H1.3HA. B) Expresión génica corregida por GAPDH de las variantes de H1 y de IFI27. C) Inmunodetección de HA, de extractos totales de histonas de las muestras indicadas.

La expresión de las variantes de H1 (Figura 25B) mostró que las variantes se sobreexpresaron adecuadamente, se observó que las variantes sobre-expresadas son sensibles a la inhibición al mH1 shRNA, sin embargo, la expresión se mantuvo por niveles similares a los observados en células parentales, lo que produjo una compensación parcial del efecto del multiH1 KD sobre la inducción de IFI27, uno de los ISGs con mayor inducción observado (Figura 27B). Ensayos de inmunodetección confirmó la

presencia de las variantes de H1 sobre-expresadas marcadas HA incluso después de la inducción del knock-down (Figura 25C)

El efecto de sobreexpresión de ISGs fue parcialmente complementado con todas las variantes analizadas, incluso mediante la sobreexpresión de H1.3, indicando que la inducción de respuesta a interferón por depleción de H1 no es totalmente específica de variantes.

1.7 Los niveles basales de los ISGs se reestablecen después de la inactivación del sistema inducible mH1 shRNA a través del lavado y remoción de doxiciclina.

Con el fin de determinar si el efecto de inducción de la respuesta a interferón es reversible con la recuperación de la expresión de los niveles basales de expresión de las variantes de H1, se retiró y lavó la doxiciclina en células mH1 shRNA, a las que se hizo un tratamiento previo de 3 días con doxiciclina, posteriormente se añadió medio de cultivo y se mantuvo en crecimiento dichas células durante varios días. En paralelo otro grupo de células se mantuvo en crecimiento y bajo tratamiento de doxiciclina. Se tomaron muestras a diferentes días de crecimiento de ambos grupos de células y se evaluaron las muestras por RT-qPCR.

La recuperación de la acumulación del transcrito de las variantes de H1 se observó al día 9 de crecimiento sin doxiciclina (Figura 26A). Después de esta recuperación, los ISGs reestablecieron eficientemente sus valores basales de expresión (Figura 26B), lo que indica que la inducción de la respuesta a IFN puede ser revertido por la recuperación de expresión de la histona H1.

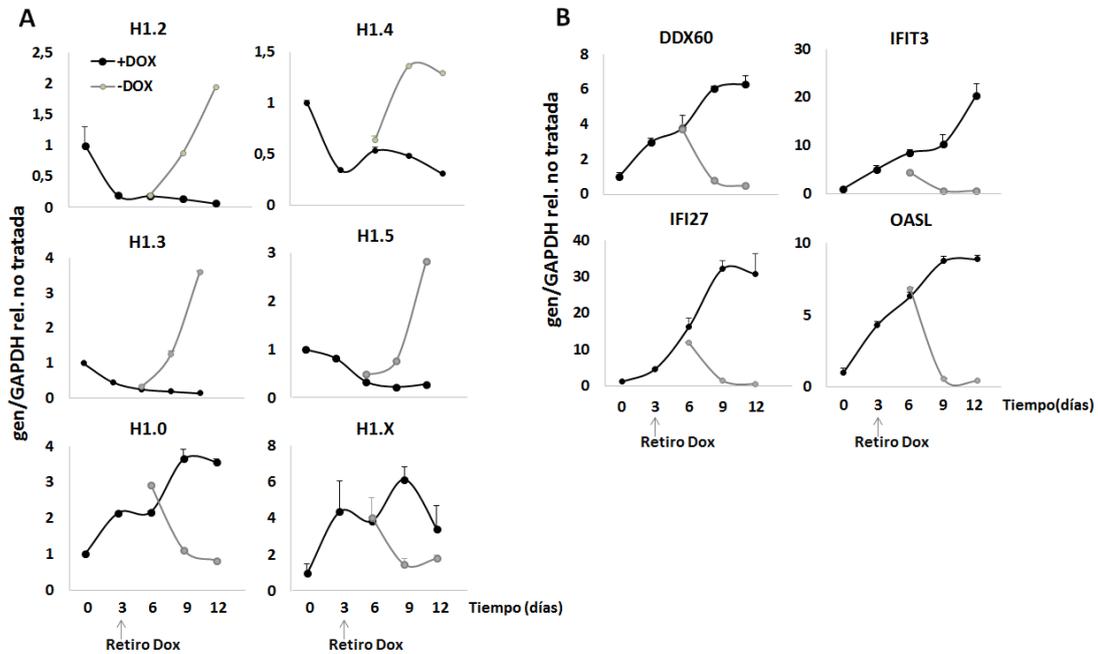


Figura 26.- Expresión de variantes de H1 e ISGs a lo largo de distintos tiempos de tratamiento de doxiciclina (línea negra) y después del lavado y remoción de la doxiciclina (línea gris) en células T47D mH1 shRNA. A) expresión de las variantes de H1 y B) Expresión de los ISGs. En A) y B) los valores indicados se encuentran corregidos por GAPDH y relacionados con el valor reportado al tiempo 0.

1.8 Síntesis de interferón después de la depleción de múltiples variantes (mH1 shRNA)

La depleción de H1 sugiere que se reproduce o induce la respuesta a IFN, por ejemplo, mediante la producción de interferón. Esta respuesta se induce a nivel celular cuando DNA o RNAs extraños, son reconocidos por sensores citosólicos o endosomales los cuales desencadenan una cascada de señalización, llevando a la activación y transcripción de factores de respuesta a IFN (IRFs), que posteriormente se transfieren al núcleo. Estos IRFs se unen y regulan los promotores de genes que codifican la transcripción de interferón y de otros genes que contienen regiones ISRE. El IFN es secretado al medio extracelular, donde se une y activa receptores superficiales, para activar la ruta de señalización de la quinasa JAK-STAT y posterior activación de genes inducidos por IFN tipo I (ISGs), o la activación de genes por IFN tipo II a través de sitios activados por gamma (GAS). La inducción de ISGs dan como resultado una respuesta antiviral y tiene efectos antitumorales a través de ciertos ISGs que producen efectos antiproliferativos y proapoptóticos.

Como se reportó anteriormente, la inducción del gen que codifica para interferón- β (IFNB) se indujo a poco tiempo de la adición de Dox (Figura 19B), se analizó también

la expresión de interferón alfa(IFNA), y no se observó sobreexpresión de dicho gen.(Figura 27)

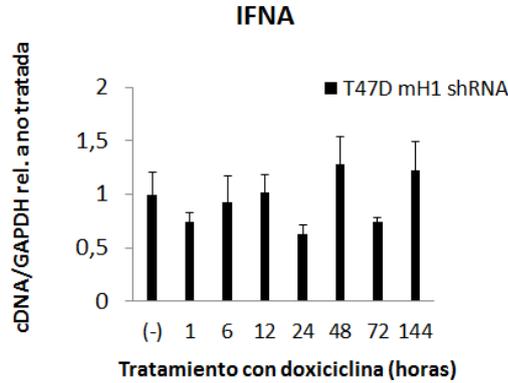


Figura 27.- Niveles de expresión relativos del gen que codifica para interferón alfa a distintos tiempos de tratamiento con doxiciclina, corregido por GAPDH en relación a las células no tratadas (-).

A continuación, se probó si existe producción de IFN y con la consiguiente liberación al medio extracelular, para lo cual el medio de cultivo de células mH1 shRNA tratadas 3 días con doxiciclina se transfirió y añadió a células *wild-type* T47D, finalmente se cuantificó la expresión de los ISGs (Figura 28).

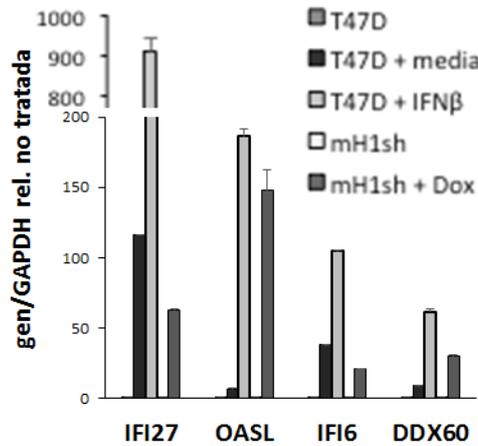


Figura 28.- Niveles de expresión relativos de varios ISGs en las células indicadas. T47D célula *wild-type*, T47D+media (co-rresponde a las células *wild-type* a las que se les transfirió el medio de cultivo de células T47D mH1 shRNA tratadas por 3 días con Dox).

Los datos de expresión de los ISGs mostraron que el medio de cultivo proveniente de células mHs shRNA tratadas con doxiciclina fue capaz de estimular la sobreexpresión de los ISGs en las células T47D *wild-type*. El nivel de expresión alcanzado en el caso

del gen IFI27 fue superior al observado en las células mH1 shRNA tratadas con dox por 3 días, pero fue inferior a la expresión registrada en las células tratadas con interferón- β comercial (0.15ug).

En los otros ISGs analizados, la sobreexpresión inducida por el medio transferido a las células T47D es menor que los niveles de expresión de las células mH1 shRNA tratadas con dox y tratadas con interferón- β comercial (0.15ug).

1.9 La combinación de IFN- β comercial y la depleción simultánea de las variantes H1.2 y H1.4 muestran un efecto sinérgico en la sobreexpresión de los ISGs.

Con el fin de indagar si la producción y secreción de interferón- β previamente descrito es el único mecanismo por el cual la inhibición de múltiples variantes de H1 produce el efecto de la respuesta a interferón, se diseñó un ensayo en el cual se combinó la inhibición de las variantes H1.2 y H1.4 junto al tratamiento con interferón- β comercial (0.15ug).

Primero se confirmó que las células T47D son sensibles al interferón- β (0.15 ug/ml) comercial provocando una inducción de la expresión de los ISGs comparable a la sobreexpresión ocasionada al deplecionar las variantes H1.4 y H1.2 (Figura 29).

La inducción de los ISGs no se incrementó al tratar las células con una concentración superior (1.2 ug/ml) lo que indicó que la señal de inducción por la ruta de señalización del interferón- β se encontraba saturada (Figura 29)

Por otra parte, se combinó el tratamiento con IFN- β junto a la inhibición simultánea de H1.2 y H1.4(Dox), se observó que existe un efecto sinérgico en la inducción de los genes ISGs, lo que nos sugirió que la sobreexpresión de los ISGs no es únicamente debido a la síntesis de interferón y que existen otros mecanismos de inducción involucrados (Figura 29).

Finalmente, se verificó que al combinar la inhibición individual de H1.2 junto al tratamiento con IFN- β no se potencia el efecto de inducción de ISGs, resultado similar al obtenido al combinar la inhibición individual de H1.4 junto al tratamiento con IFN- β (Figura 29).

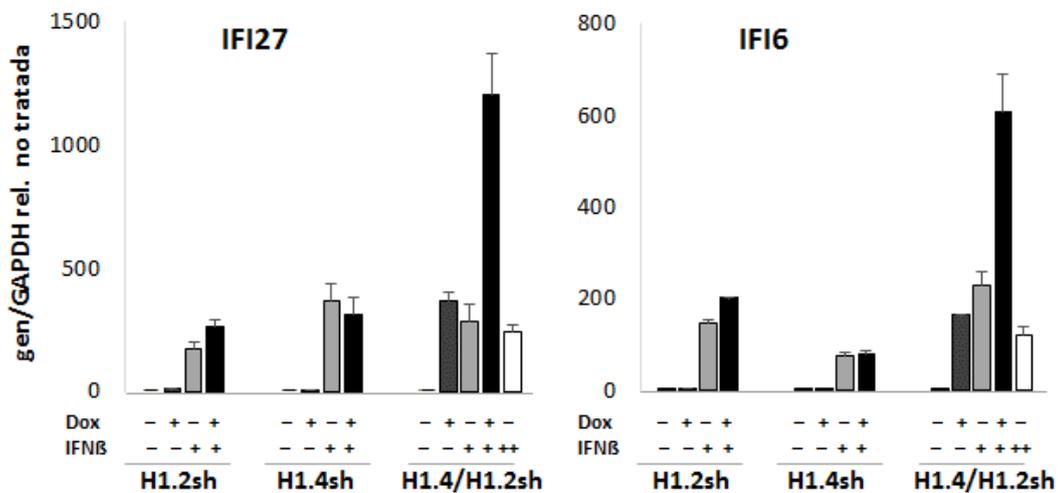


Figura 29.- Niveles de expresión relativos de IFI27 e IFI6 en las células indicadas. T47D (H1.2 shRNA, H1.4 shRNA y H1.4/H1.2 shRNA). Las células indicadas han sido tratadas con IFN-β(+)(0.15ug/ml) o (++) (1.2ug/ml) por 8 horas. El tratamiento de doxiciclina en las células señaladas tuvo una duración de 6 días.

1.10 Los inhibidores 2-aminopurine, BX795 y Ruxolitinib disminuyen la respuesta interferón inducida por la inhibición múltiple de variantes de H1.

Se realizó estudios con inhibidores con el fin de analizar si el bloqueo en distintos puntos de la cascada de reconocimiento y señalización de la respuesta a interferón ocasionan cambios en el efecto observado al inhibir múltiples variantes de la histona H1.

Los resultados previamente expuestos nos indicaron que la inhibición de múltiples variantes ocasionó la secreción de interferón al medio de cultivo, probablemente IFN-β debido a su sobreexpresión observada a nivel transcripcional, y que dicho medio tenía la capacidad de estimular células T47D wild-type. Por este motivo se utilizó el inhibidor Ruxolitinib, conocido inhibidor de JAK1 y JAK2, a través de este bloqueo Ruxolitinib inhibe la transducción de señales de JAK-STAT y la consiguiente transcripción de los ISGs cuando son estimulados por interferón del tipo I (Ostojic, Vrhovac, & Verstovsek, 2011; Stewart, Randall, & Adamson, 2014) (Figura 30). El resultado de este tratamiento con el inhibidor y la depleción de H1 combinada ocasionó que la inducción de los genes inducidos por IFN decrezca en relación a las células que fueron únicamente deplecionadas sus múltiples variantes de H1, lo que comprueba que la estimulación por IFN es parte del efecto observado y sugiere un rol importante de la histona H1 en la regulación de la transcripción del gen que codifica para IFN-β.

A continuación, se evaluó a través del inhibidor BX795 si el efecto ocasionado de la depleción de H1 presenta algún evento clave previo a la ruta JAK-STAT. Este inhibidor es específico de TBK1, así como la consiguiente fosforilación, transferencia al núcleo y actividad transcripcional de IRF3, el cuál es un factor regulador de IFN (Clark, Plater, Peggie, & Cohen, 2009)(Figura 30). Al combinar la depleción de las múltiples variantes y el tratamiento con BX795, se encontró que los valores de expresión relativa de los genes inducidos por interferón son notablemente menores que los reportados en los valores de expresión en células únicamente deplecionadas, sugiriendo que el efecto en la inducción de los ISGs son ocasionados no solamente por la estimulación por IFN, existe además algún acontecimiento previo entre los que pueden estar involucrados el reconocimiento y señalización de dsRNA, ssRNA, dsRNA, RNA:DNA o dsDNA. Para profundizar en el estudio de las distintas etapas previas a la estimulación con interferón en las que H1 puede cumplir un rol, utilizamos otro inhibidor llamado 2-aminopurina, descrito como inhibidor de PKR (Proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena) (Figura 30), se menciona que la activación de esta enzima ocurre mediante la interacción de RNA de doble hebra(dsRNA) con sus dominios de dsRBD(dominios de unión a dsRNA). La inhibición de PKR y su consiguiente unión a dsRNA, bloquea eventos de transcripción en la expresión del gen humano que codifica para IFN- β en células estimuladas por virus o por dsRNA sintético poly(I):poly(C). Lo que ha sido señalado como evidencia que 2-aminopurine inhibe la expresión de genes activados por dsRNA en varias líneas celulares(Marcus & Sekellick, 1988; Wathelet, Clauss, Paillard, & Huez, 1989; Zinn, Keller, Whittemore, & Maniatis, 1988). Los resultados al combinar la depleción de las múltiples variantes de H1 con el tratamiento con 2-aminopurine

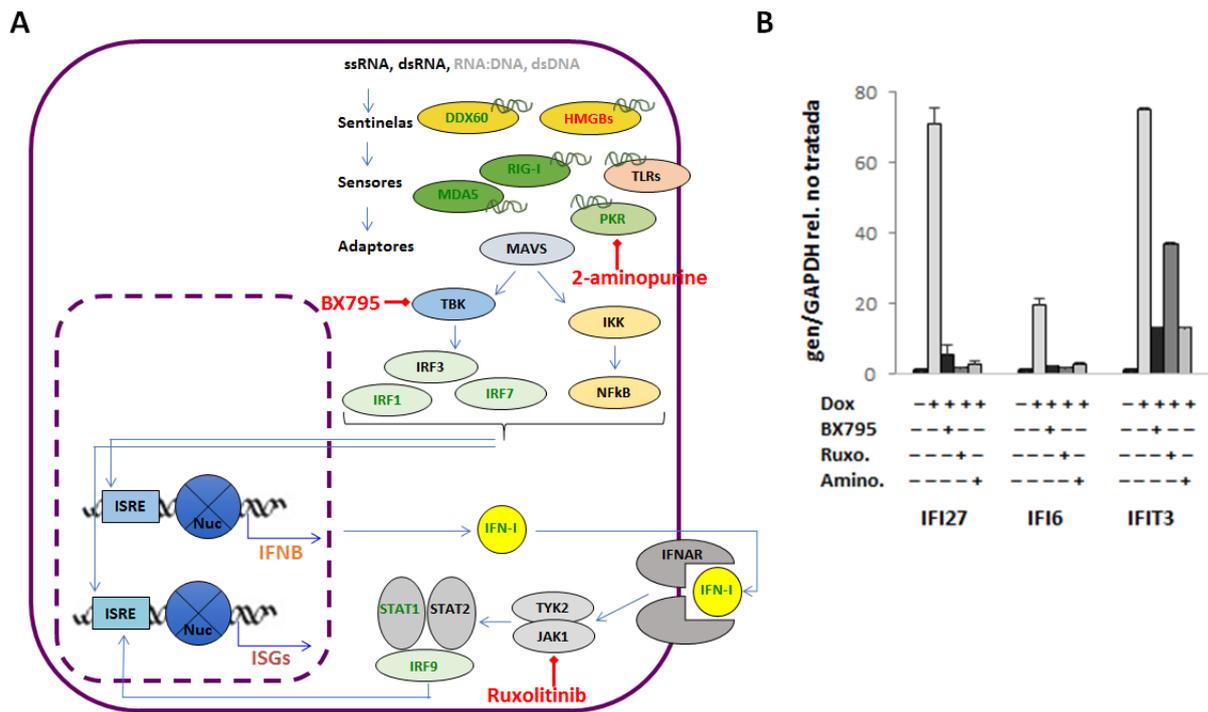


Figura 30.- A) Dianas de los inhibidores (en rojo) 2-aminopurine, BX795 y Ruxolitinib representados en un modelo simplificado de la respuesta a interferón inducido por ssRNA, dsRNA, RNA:DNA, dsDNA. B) células T47D mH1 shRNAtiH1sh fueron tratadas o no con Dox, 0.5μM BX795, 1μM ruxolitinib o 10mM 2-aminopurine. La expresión génica está corregida por GAPDH y en relación a su respectiva muestra no tratada.

1.11 Knock downs constitutivos de sensores de DNA y RNA citosólicos afectan en diferente medida la respuesta a interferón inducida por la depleción de múltiples variantes de H1

Se introdujeron shRNAs en las células mH1 shRNA para deplecionar varios de los sensores y adaptadores involucrados en el reconocimiento o señalización de la respuesta a DNA o RNA citosólicos, entre los que tenemos MDA5, TLR3, MAVS y STING.

MDA5 (Gen asociado a la diferenciación del melanoma 5), reconoce a fragmentos de dsRNA e inicia la producción de IFN tipo I a través de MAVS, los resultados del knock down de dicho sensor junto a la simultanea inhibición de las múltiples variantes de H1 ocasionó una reducción en el efecto obtenido por la inhibición de múltiples variantes de H1, lo que sugiere que este sensor forma parte del mecanismo que se induce al inhibir las variantes de H1 (Figura 31A)

Otro sensor de dsRNA al que se deplecionó conjuntamente con las múltiples variantes de H1 fue TLR3, los resultados confirmaron que al igual que MDA5, el reconocimiento de dsRNA se encuentran implicados en el efecto que ocasionó la depleción de H1 en la sobre-regulación de los ISGs (Figura 31B)

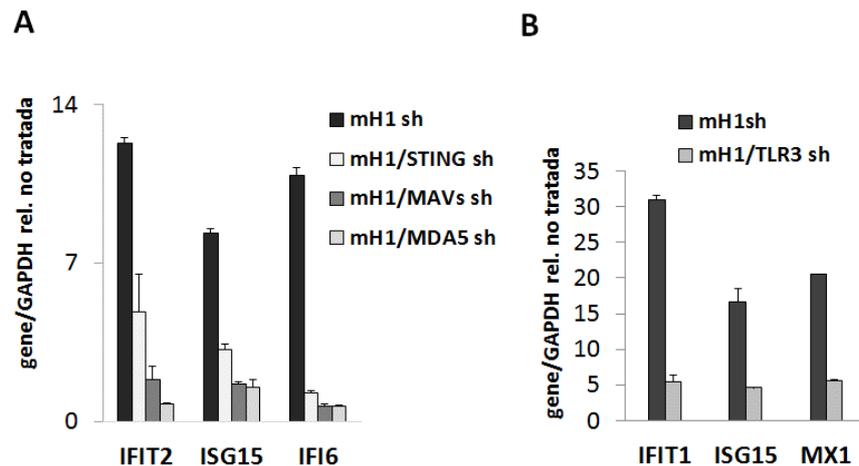


Figura 31.- Niveles relativos de expresión de ISGs en células T47D mH1 shRNA sin y con depleción A) STING, MAVS, MDA5. B) T47D mH1 shRNA con depleción de TLR3. En A) y en B) las células fueron tratadas con Dox por 6 días. La expresión génica está corregida por GAPDH y en relación a su respectiva muestra no tratada.

Se realizaron los Knock down de un intermediario y un adaptador de señal denominados MAVS y STING respectivamente, involucrados en la señalización de reconocimiento de RNA y DNA respectivamente. Los resultados mostraron que al inhibir las múltiples variantes de H1 en células con un Knock down de MAVS, se redujo el incremento en la expresión de los ISGs en comparación con el incremento reportado en células sin depleción de MAVS. Por otro lado, al inhibir las múltiples variantes en células con el adaptador STING deplecionado, los valores de expresión relativos de los ISGs son menores al compararlos con las células sin depleción de STING (Figura 31A)

Si los resultados se analizan en conjunto, se puede mencionar que la depleción de MDA5 es el evento que más disminuye el efecto en el incremento de la expresión de los ISGs por la inhibición de múltiples variantes, mientras que la depleción de STING evitó menos la sobreexpresión de los ISGs (Figura 31A-B). Esto nos sugiere que probablemente la estimulación de los sensores viene dada principalmente por dsRNA.

2. Efectos de la depleción de la histona H1 en células de cáncer de mama: proliferación.

2.1 La depleción simultánea de múltiples variantes de H1 (mH1sh) afecta drásticamente el crecimiento celular.

Se analizó el efecto de la depleción de varios subtipos de la histona H1 sobre la proliferación celular, primero se cuantificó la velocidad de crecimiento en relación a células wild-type para lo cual se mezclaron en una relación 1:1, células con el sistema inducible para la inhibición de la correspondiente variante [RFP-positiva(-Dox); RFP/GFP(+Dox)] con células T47D wild-type (RFP-negativas y GFP-negativas) y se evaluó el porcentaje entre las dos poblaciones a través del tiempo bajo la presencia de doxiciclina (Figura 33). Si la depleción de las distintas variantes afecta la proliferación, el porcentaje de células fluorescentes (shRNAs) se reduce en relación a las células parentales que no tiene fluorescencia.

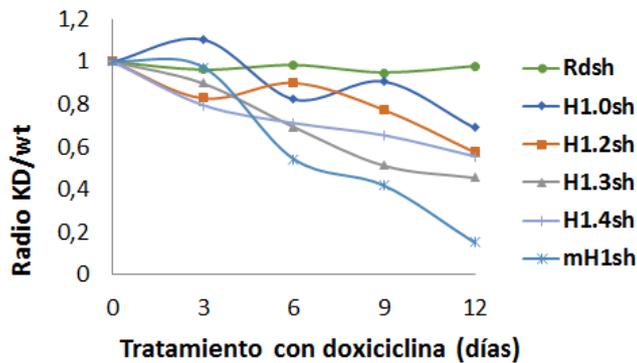


Figura 33.- Representación gráfica de los porcentajes de variación de las proporciones RFP/GFP-positivos frente a RFP/GFP negativos (Radio KD/wt) de las distintas variantes indicadas. Los datos han sido obtenidos a diferentes tiempos de tratamiento con Dox

Una reducción drástica en la velocidad de crecimiento se observó en las células mH1 shRNA a partir de los 6 días de tratamiento con doxiciclina y continúa hasta el día 12, en el caso de las células H1.3 shRNA redujeron su proporción a partir del día 9; por otra parte, la depleción de H1.4 y H1.2 disminuyeron la proliferación celular a partir del día 12. No se observaron diferencias notables entre las proporciones de las células Rd shRNA y H1.0 shRNA en relación a la proporción de células parentales durante el tratamiento con doxiciclina (Figura 33).

2.2 La depleción de múltiples variantes de H1 (mH1 shRNA) así como la depleción de H1.2 de forma individual afectan drásticamente el crecimiento independiente de anclaje.

La mayoría de las células de mamíferos prefieren adherirse a una superficie, generalmente las células son capaces de regular su proliferación a través de una dependencia al anclaje pero este mecanismo de control se pierde en células malignas. Por este motivo el crecimiento independiente del anclaje es considerado un indicador de tumorigénesis y capacidad invasiva de varios tipos celulares.

El ensayo utilizado para medir el efecto de la depleción de las distintas variantes de H1 sobre la capacidad tumorigénica fue el denominado crecimiento celular en agar blando (*soft agar*)(Figura 34)

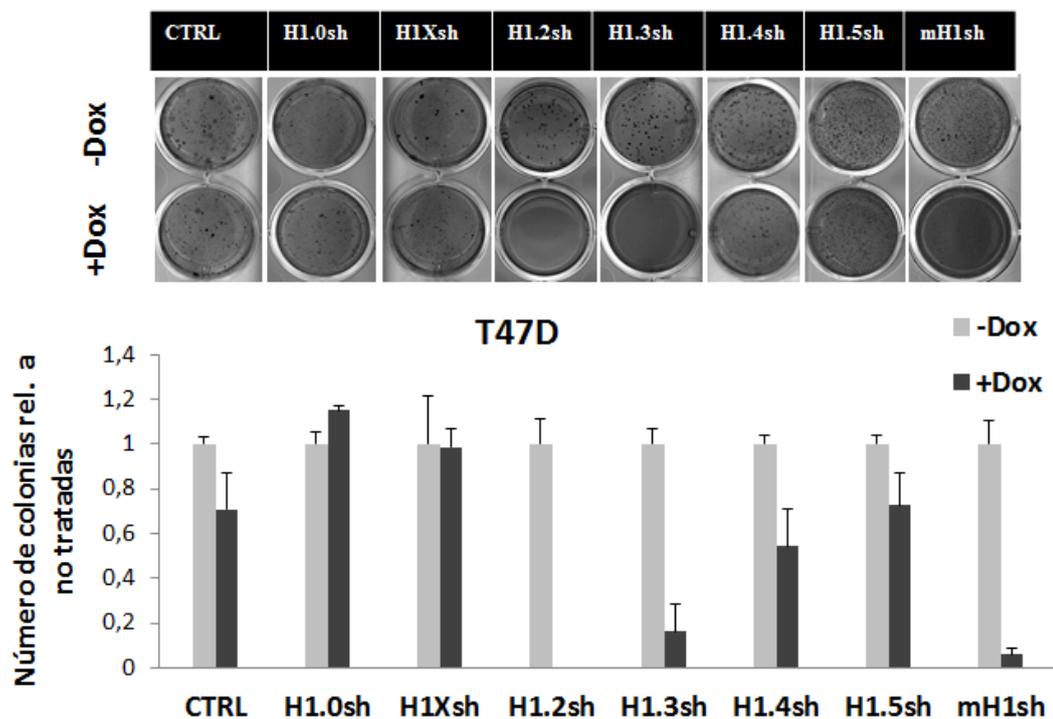


Figura 34.- Formación de colonias independientes de anclaje en células T47D. Las líneas celulares indicadas fueron sembradas en soft-agar, tratadas o no con doxiciclina. Las células fueron contadas después de 21 días con ImageJ.

Nuestros resultados indicaron que la depleción de H1.2 afectó drásticamente la formación de colonias en soft-agar al igual que la depleción múltiple de histonas H1 de las células mH1 shRNA que también inhibe la variante H1.2.

Por otra parte, la depleción individual de H1.3, H1.4 y H1.5 afecta la capacidad de crecimiento pero en menor medida, mientras que efectos leves fueron los observados en el caso de H1.0 y H1X.

Con el fin de verificar si este efecto se reproduce en otras líneas celulares, el ensayo de soft-agar se llevó a cabo en células MCF y HeLa (Figura 35).

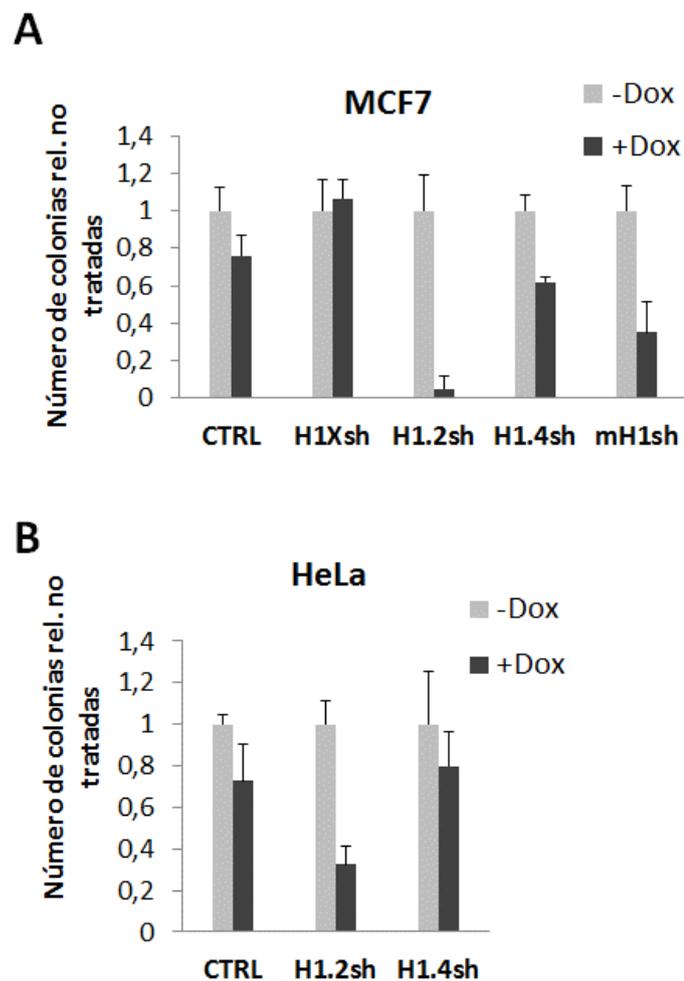


Figura 35.- Formación de colonias independientes de anclaje de células A) MCF7 y B) HeLa. Las líneas celulares indicadas fueron sembradas en soft-agar, tratadas o no con doxiciplina. Las células fueron contadas después de 21 días con ImageJ.

Se observó que la depleción de H1.2 tanto en células MCF7 (Figura 35A) como en HeLa(Figura 35B) afectó notablemente la capacidad de crecimiento en agar blando en similar medida a lo observado en células T47D.

En conclusión, se sugiere que H1.2 podría ser requerida en el mantenimiento de la capacidad tumorigénica de las células T47D, MCF7 y HeLa

2.3 La depleción individual de H1.2 y H1.3, así como la inhibición combinada mH1sh, afectaron intensamente la capacidad de formación de colonias dependientes de anclaje en células T47D.

Se evaluó el efecto de la depleción de distintas variantes de H1 sobre la habilidad individual de una célula de continuar su replicación y por consiguiente formar una colonia anclada a una superficie.

El ensayo utilizado para medir el efecto de la depleción de las distintas variantes de H1 sobre la capacidad de formar colonias dependientes de anclaje fue el llamado clonogenic assay (Figura 36)

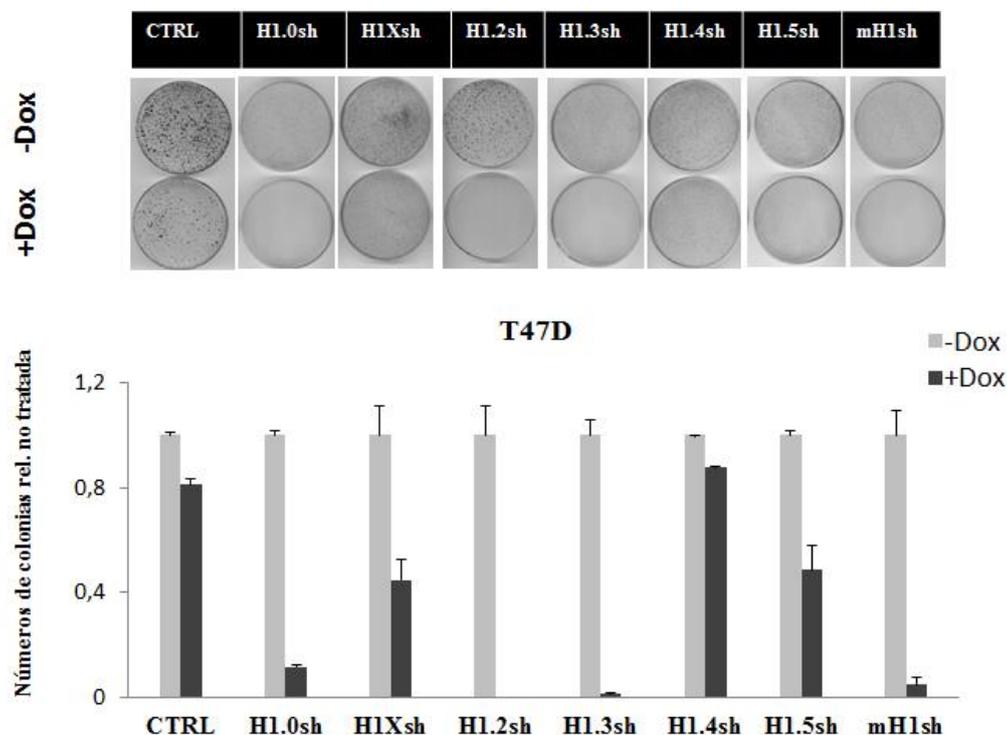


Figura 36.- Formación de colonias dependientes de anclaje en células T47D. Las líneas celulares indicadas fueron tratadas o no con doxiciclina. Las células fueron contadas después de 21 días con ImageJ y los valores representan el número de colonias en relación a las células no tratadas.

Se encontró que la depleción de H1.2 y H1.3 en células T47D afectaron drásticamente la capacidad individual de replicación. El knock down de H1.0 también afectó notablemente la formación de colonias. Además, la depleción de múltiples variantes (mH1sh) impidió la formación de colonias en concordancia al hecho de presentar inhibida la variante H1.2. Finalmente, las depleciones del resto de variantes evaluadas reportaron ligeros efectos sobre dicha capacidad de crecimiento celular.

Con el fin de verificar si este efecto se reproduce en otras líneas celulares, el ensayo de formación de colonias dependientes de anclaje se llevó a cabo en células MCF7 y HeLa(Figura 37)

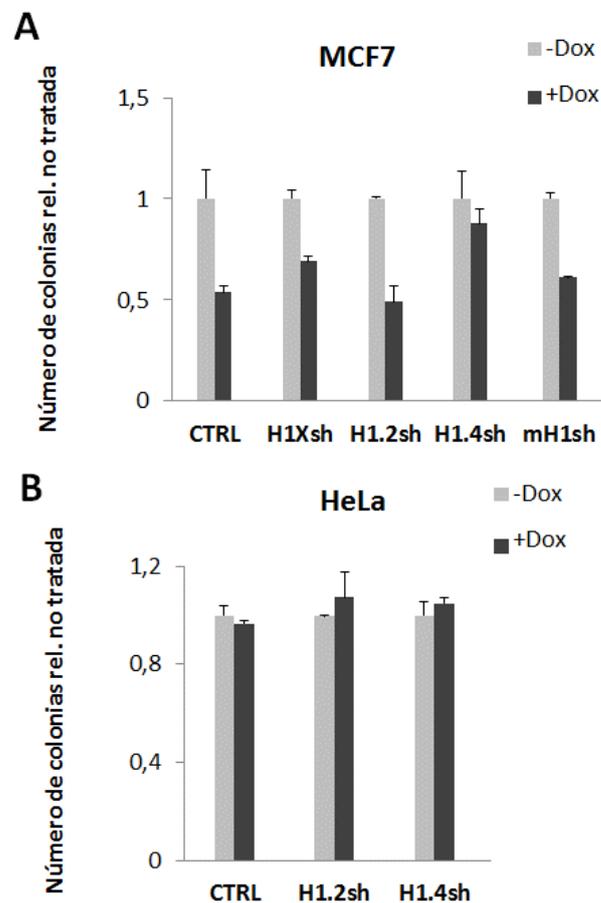


Figura 37.- Formación de colonias dependientes de anclaje en células A) MCF7 y B) HeLa. Las líneas celulares indicadas fueron tratadas o no con doxiciclina. Las células fueron contadas después de 21 días con ImageJ y los valores representan el número de colonia

Se observó que la depleción de las variantes de H1 evaluadas en células MCF7 afectaron ligeramente la capacidad de crecimiento en este tipo de ensayo y el efecto es considerablemente menor al observado en células T47D(Figura 37A).

En HeLa(Figura 37B) la depleción no afectó la capacidad de crecimiento celular bajo estas condiciones de estrés.

CONCLUSIONES

1. Conclusiones

- Los RNA interferentes inducibles (shRNA) estables diseñados han permitido por primera vez estudiar el efecto de la depleción simultánea de distintas variantes de la histona H1 sobre la expresión génica y proliferación en células de cáncer de mama.
- La depleción de múltiples variantes de H1 (mH1sh) afectó drásticamente la proliferación celular, mientras que la inhibición de H1.0 afectó levemente la proliferación celular.
- La variante H1.2 es la variante que se muestra más esencial para el crecimiento en forma de colonias de las distintas líneas celulares testadas, tanto en condiciones dependiente o independiente de anclaje, lo que sugiere que al inhibir dicha variante las células pierden su capacidad metastásica.
- La depleción simultánea de H1.2 y H1.4 indujo una fuerte respuesta a interferón (IFN) y la inducción de genes estimulados por IFN (ISGs), efecto que no se observó en depleciones individuales de variantes de histonas H1.
- La depleción combinada de H1.2 y H1.4 produjo la sobreexpresión y síntesis de Interferón, el IFN sintetizado indujo la respuesta a IFN en células T47D y activó la ruta JAK-STAT, principal ruta involucrada en la activación de la transcripción de ISGs.
- La inhibición de H1.2 y H1.4 junto al tratamiento con IFN β comercial muestran un efecto sinérgico en la sobreexpresión de ISGs, lo que sugiere que existen otros mecanismos de inducción de los ISGs además de la estimulación por el IFN sintetizado.
- Análisis con inhibidores y knock downs constitutivos de sensores de ácidos nucleicos y adaptadores de la respuesta a IFN nos sugieren que la depleción de H1.2 y H1.4 desencadena la activación de la ruta IFN aguas arriba (upstream) de los genes ISGs o IFN, posiblemente por la aparición de ácidos nucleicos extraños en el citoplasma.

BIBLIOGRAFÍA

- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., & Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*, *103*(4), 667-678.
- Allan, J., Hartman, P. G., Crane-Robinson, C., & Aviles, F. X. (1980). The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature*, *288*(5792), 675-679. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1038/288675a0>
- Allan, J., Mitchell, T., Harborne, N., Bohm, L., & Crane-Robinson, C. (1986). Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location. *Journal of Molecular Biology*, *187*(4), 591-601.
- Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K. L., Lam, Y. W., Steen, H., ... Lamond, A. I. (2017). Directed Proteomic Analysis of the Human Nucleolus. *Current Biology*, *12*(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00650-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00650-9)
- Bancerek, J., Poss, Z. C., Steinparzer, I., Sedlyarov, V., Pfaffenwimmer, T., Mikulic, I., ... Kovarik, P. (2013). CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response. *Immunity*, *38*(2), 250-262. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.017>
- Banks, G. C., Deterding, L. J., Tomer, K. B., & Archer, T. K. (2001). Hormone-mediated Dephosphorylation of Specific Histone H1 Isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(39), 36467-36473. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104641200>
- Bhattacharya, S., Eckner, R., Grossman, S., Oldread, E., Arany, Z., D'Andrea, A., & Livingston, D. M. (1996). Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature*, *383*(6598), 344-347. <https://doi.org/10.1038/383344a0>
- Bio-Social Methods Collaborative. (2013). Genome Structure. Recuperado a partir de <http://biosocialmethods.isr.umich.edu/epigenetics-tutorial/epigenetics-tutorial-genome-structure/>
- Bolen, C. R., Ding, S., Robek, M. D., & Kleinstein, S. H. (2014). Dynamic expression

- profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *59(4)*, 1262-1272. <https://doi.org/10.1002/hep.26657>
- Bonnefoy, E., Bandu, M. T., & Doly, J. (1999). Specific binding of high-mobility-group I (HMGI) protein and histone H1 to the upstream AT-rich region of the murine beta interferon promoter: HMGI protein acts as a potential antirepressor of the promoter. *Molecular and Cellular Biology*, *19(4)*, 2803-2816.
- Brass, A. L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., ... Elledge, S. J. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*, *139(7)*, 1243-1254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.017>
- Braunschweig, U., Hogan, G. J., Pagie, L., & van Steensel, B. (2009). Histone H1 binding is inhibited by histone variant H3.3. *The EMBO Journal*, *28(23)*, 3635-3645. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.301>
- Cao, K., Lailier, N., Zhang, Y., Kumar, A., Uppal, K., Liu, Z., ... Fan, Y. (2013). High-Resolution Mapping of H1 Linker Histone Variants in Embryonic Stem Cells. *PLOS Genetics*, *9(4)*, e1003417. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003417>
- Clark, K., Plater, L., Peggie, M., & Cohen, P. (2009). Use of the Pharmacological Inhibitor BX795 to Study the Regulation and Physiological Roles of TBK1 and I κ B Kinase ϵ : A DISTINCT UPSTREAM KINASE MEDIATES SER-172 PHOSPHORYLATION AND ACTIVATION. *The Journal of Biological Chemistry*, *284(21)*, 14136-14146. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000414>
- Clausell, J., Happel, N., Hale, T. K., Doenecke, D., & Beato, M. (2009). Histone H1 Subtypes Differentially Modulate Chromatin Condensation without Preventing ATP-Dependent Remodeling by SWI/SNF or NURF. *PLoS ONE*, *4(10)*, e0007243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007243>
- Cota, P., Shafa, M., & Rancourt, D. E. (2013). Stem Cells and Epigenetic

- Reprogramming. En D. Bhartiya & N. B. T.-P. S. C. Lenka (Eds.) (p. Ch. 09). Rijeka: InTech. <https://doi.org/10.5772/55983>
- Cui, K., Taylor, P., Liu, H., Chen, X., Ozato, K., & Zhao, K. (2004). The chromatin-remodeling BAF complex mediates cellular antiviral activities by promoter priming. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(10), 4476-4486.
- Daujat, S., Zeissler, U., Waldmann, T., Happel, N., & Schneider, R. (2005). HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(45), 38090-38095. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500229200>
- Doenecke, D., & Alonso, A. (1996). Organization and expression of the developmentally regulated H1(o) histone gene in vertebrates. *The International Journal of Developmental Biology*, *40*(1), 395-401.
- Duarte, R. F., & Frank, D. A. (2000). La vía JAK-STAT de señalización intracelular y su repercusión en oncogénesis, inmunomodulación y desarrollo. *Medicina Clínica*, *114*(6), 227-234. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(00\)71252-8](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(00)71252-8)
- Fainboim, L., & Geffner, J. (2005). *Introducción a la Inmunología Humana* (quinta).
- Fan, Y., Nikitina, T., Morin-Kensicki, E. M., Zhao, J., Magnuson, T. R., Woodcock, C. L., & Skoultchi, A. I. (2003). H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(13), 4559-4572.
- Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T. J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E. E., ... Skoultchi, A. I. (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell*, *123*(7), 1199-1212. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.028>
- Fan, Y., Sirotkin, A., Russell, R. G., Ayala, J., & Skoultchi, A. I. (2001). Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1(0) replacement subtype. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(23), 7933-7943.

<https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.7933-7943.2001>

Fensterl, V., Wetzel, J. L., Ramachandran, S., Ogino, T., Stohlman, S. A., Bergmann, C. C., ... Sen, G. C. (2012). Interferon-induced Ifit2/ISG54 protects mice from lethal VSV neuropathogenesis. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002712. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002712>

Finch, J. T., & Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(6), 1897-1901. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC430414/>

Gonzalez-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., & Raz, E. (2012). Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews. Immunology*, 12(2), 125-135. <https://doi.org/10.1038/nri3133>

Harshman, S. W., Young, N. L., Parthun, M. R., & Freitas, M. A. (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Research*, 41(21), 9593-9609. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt700>

Honda, K., Takaoka, A., & Taniguchi, T. (2006). Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, 25(3), 349-360. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.009>

Honda, K., & Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews. Immunology*, 6(9), 644-658. <https://doi.org/10.1038/nri1900>

Horibata, S., Vo, T. V., Subramanian, V., Thompson, P. R., & Coonrod, S. A. (2015). Utilization of the Soft Agar Colony Formation Assay to Identify Inhibitors of Tumorigenicity in Breast Cancer Cells, (99), e52727. <https://doi.org/doi:10.3791/52727>

Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q.-X., & Chen, Z. J. (2011). MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate

- immune response. *Cell*, 146(3), 448-461.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.041>
- Hou, J., Zhou, Y., Zheng, Y., Fan, J., Zhou, W., Ng, I. O. L., ... Cao, X. (2014). Hepatic RIG-I predicts survival and interferon-alpha therapeutic response in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 25(1), 49-63.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.11.011>
- Huang, I.-C., Bailey, C. C., Weyer, J. L., Radoshitzky, S. R., Becker, M. M., Chiang, J. J., ... Farzan, M. (2011). Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathogens*, 7(1), e1001258. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001258>
- Itsui, Y., Sakamoto, N., Kurosaki, M., Kanazawa, N., Tanabe, Y., Koyama, T., ... Watanabe, M. (2006). Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *Journal of Viral Hepatitis*, 13(10), 690-700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00732.x>
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*, 14(1), 36-49. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1038/nri3581>
- Iwasaki, A. (2012). A virological view of innate immune recognition. *Annual Review of Microbiology*, 66, 177-196. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150203>
- Izzo, A., Kamieniarz-Gdula, K., Ramirez, F., Noureen, N., Kind, J., Manke, T., ... Schneider, R. (2013). The genomic landscape of the somatic linker histone subtypes H1.1 to H1.5 in human cells. *Cell Reports*, 3(6), 2142-2154. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.003>
- Izzo, A., Kamieniarz, K., & Schneider, R. (2008). The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biological Chemistry*, 389(4), 333-343. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.037>

- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1074-1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
- Kadota, S., & Nagata, K. (2014). Silencing of IFN-stimulated gene transcription is regulated by histone H1 and its chaperone TAF-I. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7642-7653. <https://doi.org/10.1093/nar/gku485>
- Kamieniarz, K., Izzo, A., Dunder, M., Tropberger, P., Ozretic, L., Kirfel, J., ... Schneider, R. (2012). A dual role of linker histone H1.4 Lys 34 acetylation in transcriptional activation. *Genes & Development*, 26(8), 797-802. <https://doi.org/10.1101/gad.182014.111>
- Karetsou, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C. Y., Tsolas, O., Becker, P. B., & Papamarcaki, T. (1998). Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucleic Acids Research*, 26(13), 3111-3118.
- Kasinsky, H. E., Lewis, J. D., Dacks, J. B., & Ausio, J. (2001). Origin of H1 linker histones. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(1), 34-42. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0237rev>
- Kato, K., Okuwaki, M., & Nagata, K. (2011). Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 19), 3254-3265. <https://doi.org/10.1242/jcs.083139>
- Kawamura, M., McVicar, D. W., Johnston, J. A., Blake, T. B., Chen, Y. Q., Lal, B. K., ... Ortaldo, J. R. (1994). Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), 6374-6378.
- Kim, T. K., & Maniatis, T. (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Molecular Cell*, 1(1), 119-129.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*, 184(4139), 868. Recuperado a partir de

<http://science.sciencemag.org/content/184/4139/868.abstract>

- Kornberg, R. D., & Lorch, Y. (2017). Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. *Cell*, *98*(3), 285-294. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81958-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81958-3)
- Kotenko, S. V, Gallagher, G., Baurin, V. V, Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., ... Donnelly, R. P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology*, *4*(1), 69-77. <https://doi.org/10.1038/ni875>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*(4), 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Krishnakumar, R., Gamble, M. J., Frizzell, K. M., Berrocal, J. G., Kininis, M., & Kraus, W. L. (2008). Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5864), 819-821. <https://doi.org/10.1126/science.1149250>
- Lenschow, D. J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V, Lutz, A., Wolff, T., ... Virgin, H. W. 4th. (2007). IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(4), 1371-1376. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607038104>
- Levy, D. E., & Darnell, J. E. J. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *3*(9), 651-662. <https://doi.org/10.1038/nrm909>
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, *128*(4), 707-719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Li, J.-Y., Patterson, M., Mikkola, H. K. A., Lowry, W. E., & Kurdistani, S. K. (2012). Dynamic distribution of linker histone H1.5 in cellular differentiation. *PLoS Genetics*, *8*(8), e1002879. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002879>

- Li, K., Markosyan, R. M., Zheng, Y.-M., Golfetto, O., Bungart, B., Li, M., ... Liu, S.-L. (2013). IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion. *PLOS Pathogens*, 9(1), e1003124. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003124>
- Litvak, V., Ratushny, A. V, Lampano, A. E., Schmitz, F., Huang, A. C., Raman, A., ... Aderem, A. (2012). A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. Litvak, V. et al. (2012) «A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses.», *Nature*. England, 490(7420), pp. 421-425. doi: 10. *Nature*, 490(7420), 421-425. <https://doi.org/10.1038/nature11428>
- Lomvardas, S., & Thanos, D. (2002). Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture. *Cell*, 110(2), 261-271.
- Lu, X., & Hansen, J. C. (2004). Identification of specific functional subdomains within the linker histone H10 C-terminal domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 8701-8707. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311348200>
- Luque, A., Collepardo-Guevara, R., Grigoryev, S., & Schlick, T. (2014). Dynamic condensation of linker histone C-terminal domain regulates chromatin structure. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7553-7560. <https://doi.org/10.1093/nar/gku491>
- Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M. J., LePage, C., ... Hiscott, J. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene*, 237(1), 1-14.
- Marcus, P. I., & Sekellick, M. J. (1988). Interferon induction by viruses. XVI. 2-Aminopurine blocks selectively and reversibly an early stage in interferon induction. *The Journal of General Virology*, 69 (Pt 7), 1637-1645. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1637>
- Mayor, R., Izquierdo-Bouldstridge, A., Millan-Arino, L., Bustillos, A., Sampaio, C., Luque, N., & Jordan, A. (2015). Genome distribution of replication-independent

- histone H1 variants shows H1.0 associated with nucleolar domains and H1X associated with RNA polymerase II-enriched regions. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7474-7491. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.617324>
- Millan-Arino, L., Islam, A. B. M. M. K., Izquierdo-Bouldstridge, A., Mayor, R., Terme, J.-M., Luque, N., ... Jordan, A. (2014). Mapping of six somatic linker histone H1 variants in human breast cancer cells uncovers specific features of H1.2. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4474-4493. <https://doi.org/10.1093/nar/gku079>
- Millán-Ariño, L., Islam, A. B. M. M. K., Izquierdo-Bouldstridge, A., Mayor, R., Terme, J.-M., Luque, N., ... Jordan, A. (2014). Mapping of six somatic linker histone H1 variants in human breast cancer cells uncovers specific features of H1.2. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4474-4493. <https://doi.org/10.1093/nar/gku079>
- Millán Ariño, L. (2013). *GENOMIC DISTRIBUTION AND FUNCTIONAL SPECIFICITY OF HUMAN HISTONE H1 SUBTYPES*. Universitat Pompeu Fabra.
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., ... Taniguchi, T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*, 54(6), 903-913.
- Miyashita, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., & Seya, T. (2011). DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 31(18), 3802-3819. <https://doi.org/10.1128/MCB.01368-10>
- Mostafavi, S., Yoshida, H., Moodley, D., LeBoite, H., Rothamel, K., Raj, T., ... Benoist, C. (2016). Parsing the Interferon Transcriptional Network and Its Disease Associations. *Cell*, 164(3), 564-578. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.032>
- O'Neill, L. A. J., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013, junio). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*. England. <https://doi.org/10.1038/nri3446>
- Öberg, C., & Belikov, S. (2012). The N-terminal domain determines the affinity and

- specificity of H1 binding to chromatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(2), 321-324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.157>
- Orrego, M., Ponte, I., Roque, A., Buschati, N., Mora, X., & Suau, P. (2007). Differential affinity of mammalian histone H1 somatic subtypes for DNA and chromatin. *BMC Biology*, 5, 22. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-22>
- Ostojic, A., Vrhovac, R., & Verstovsek, S. (2011). Ruxolitinib: a new JAK1/2 inhibitor that offers promising options for treatment of myelofibrosis. *Future Oncology (London, England)*, 7(9), 1035-1043. <https://doi.org/10.2217/fon.11.81>
- Parseghian, M. H., & Hamkalo, B. A. (2001). A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: an elusive cast of characters and their characteristics. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 79(3), 289-304.
- Paulson, M., Press, C., Smith, E., Tanese, N., & Levy, D. E. (2002). IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff. *Nature Cell Biology*, 4(2), 140-147. <https://doi.org/10.1038/ncb747>
- Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C.-A., Gorna, M. W., Baumann, C. L., Burkard, T. R., ... Superti-Furga, G. (2011). IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nature Immunology*, 12(7), 624-630. <https://doi.org/10.1038/ni.2048>
- Pincetic, A., Kuang, Z., Seo, E. J., & Leis, J. (2010). The Interferon-Induced Gene ISG15 Blocks Retrovirus Release from Cells Late in the Budding Process. *Journal of Virology*, 84(9), 4725-4736. <https://doi.org/10.1128/JVI.02478-09>
- Prakash, K. (2016). Chromatin Architecture Advances from High-Resolution Single Molecule DNA Imaging. *Springer Theses*.
- Pray-Grant, M. G., Daniel, J. A., Schieltz, D., Yates, J. R. 3rd, & Grant, P. A. (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature*, 433(7024), 434-438. <https://doi.org/10.1038/nature03242>

- Prokunina-Olsson, L., Muchmore, B., Tang, W., Pfeiffer, R. M., Park, H., Dickensheets, H., ... O'Brien, T. R. (2013). A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nature Genetics*, 45(2), 164-171. <https://doi.org/10.1038/ng.2521>
- Quénet, D., McNally, J. G., & Dalal, Y. (2012). Through thick and thin: the conundrum of chromatin fibre vevesing in vivo *EMBO reports*, 13(11), 943 LP-944. Recuperado a partir de <http://embor.embopress.org/content/13/11/943.abstract>
- Ramsauer, K., Sadzak, I., Porras, A., Pilz, A., Nebreda, A. R., Decker, T., & Kovarik, P. (2002). p38 MAPK enhances STAT1-dependent transcription independently of Ser-727 phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 12859-12864. <https://doi.org/10.1073/pnas.192264999>
- Rando, O. J. (2007). Chromatin structure in the genomics era. *Trends in Genetics : TIG*, 23(2), 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.12.002>
- Ray-Gallet, D., Gerard, A., Polo, S., & Almouzni, G. (2005). [Variations on the topic of the «histone code»]. *Medecine sciences : M/S*, 21(4), 384-389. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005214384>
- Reis, L. F., Ho Lee, T., & Vilcek, J. (1989). Tumor necrosis factor acts synergistically with autocrine interferon-beta and increases interferon-beta mRNA levels in human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(28), 16351-16354.
- Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., & Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 [angst] resolution. *Nature*, 311(5986), 532-537. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1038/311532a0>
- Robert, K., McGinty, & Song, T. (2014). *Histone, Nucleosome, and Chromatin Structure*. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8624-4_1
- Roque, A., Ponte, I., & Suau, P. (2016). Interplay between histone H1 structure and

- function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(3), 444-454.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.09.009>
- Ryals, J., Dierks, P., Ragg, H., & Weissmann, C. (1985). A 46-nucleotide promoter segment from an IFN-alpha gene renders an unrelated promoter inducible by virus. *Cell*, 41(2), 497-507.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 778-809, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>
- Sancho, M., Diani, E., Beato, M., & Jordan, A. (2008). Depletion of Human Histone H1 Variants Uncovers Specific Roles in Gene Expression and Cell Growth. *PLOS Genetics*, 4(10), e1000227. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000227>
- Santos-Rosa, H., & Caldas, C. (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 41(16), 2381-2402. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.010>
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bernstein, B. E., Karabetsou, N., Morillon, A., Weise, C., ... Kouzarides, T. (2003). Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Molecular Cell*, 12(5), 1325-1332.
- Sarg, B., Helliger, W., Talasz, H., Forg, B., & Lindner, H. H. (2006). Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6573-6580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508957200>
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, 32, 513-545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>

- Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P., & Rice, C. M. (2011). A diverse array of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*, *472*(7344), 481-485. <https://doi.org/10.1038/nature09907>
- Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual Review of Biochemistry*, *75*, 243-269. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142422>
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M. J., Davie, J. R., & Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science (New York, N.Y.)*, *311*(5762), 844-847. <https://doi.org/10.1126/science.1124000>
- Shogren-Knaak, M., & Peterson, C. L. (2006). Switching on chromatin: mechanistic role of histone H4-K16 acetylation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *5*(13), 1361-1365. <https://doi.org/10.4161/cc.5.13.2891>
- Silvennoinen, O., Ihle, J. N., Schlessinger, J., & Levy, D. E. (1993). Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature*, *366*(6455), 583-585. <https://doi.org/10.1038/366583a0>
- Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P., & Michiels, T. (2008). IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathogens*, *4*(3), e1000017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000017>
- Staab, J., Herrmann-Lingen, C., & Meyer, T. (2013, julio). CDK8 as the STAT1 serine 727 kinase? *JAK-STAT*. <https://doi.org/10.4161/jkst.24275>
- Stewart, C. E., Randall, R. E., & Adamson, C. S. (2014). Inhibitors of the Interferon Response Enhance Virus Replication In Vitro. *PLoS ONE*, *9*(11), e112014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112014>

- Tahk, S., Liu, B., Chernishof, V., Wong, K. A., Wu, H., & Shuai, K. (2007). Control of specificity and magnitude of NF-kappa B and STAT1-mediated gene activation through PIASy and PIAS1 cooperation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(28), 11643-11648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701877104>
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., & Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review of Immunology*, *19*, 623-655. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.623>
- Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., & Patel, D. J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature Structural & Molecular Biology*, *14*(11), 1025-1040. <https://doi.org/10.1038/nsmb1338>
- Terme, J.-M., Sesé, B., Millán-Ariño, L., Mayor, R., Belmonte, J. C. I., Barrero, M. J., & Jordan, A. (2011). Histone H1 Variants Are Differentially Expressed and Incorporated into Chromatin during Differentiation and Reprogramming to Pluripotency. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(41), 35347-35357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.281923>
- Terme, J. M., Millán-Ariño, L., Mayor, R., Luque, N., Izquierdo-Bouldstridge, A., Bustillos, A., ... Jordan, A. (2014). Dynamics and dispensability of variant-specific histone H1 Lys-26/Ser-27 and Thr-165 post-translational modifications. *FEBS Letters*, *588*(14), 2353-2362. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.035>
- Thoma, F., Koller, T., & Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *The Journal of Cell Biology*, *83*(2), 403 LP-427. Recuperado a partir de <http://jcb.rupress.org/content/83/2/403.abstract>
- Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., ... Mailand, N. (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature*, *527*(7578), 389-393. Recuperado a partir

de <http://dx.doi.org/10.1038/nature15401>

- Torres, C. M., Biran, A., Burney, M. J., Patel, H., Henser-Brownhill, T., Cohen, A.-H. S., ... Scaffidi, P. (2016). The linker histone H1.0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity. *Science*, 353(6307). Recuperado a partir de <http://science.sciencemag.org/content/353/6307/aaf1644.abstract>
- Vabret, N., & Blander, J. M. (2013). Sensing Microbial RNA in the Cytosol. *Frontiers in Immunology*, 4, 468. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00468>
- Valente, G., Ozmen, L., Novelli, F., Geuna, M., Palestro, G., Forni, G., & Garotta, G. (1992). Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *European Journal of Immunology*, 22(9), 2403-2412. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220933>
- Walter, M. R., Windsor, W. T., Nagabhushan, T. L., Lundell, D. J., Lunn, C. A., Zauodny, P. J., & Narula, S. K. (1995). Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature*, 376(6537), 230-235. <https://doi.org/10.1038/376230a0>
- Wang, W., Xu, L., Su, J., Peppelenbosch, M. P., & Pan, Q. (2017). Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes. *Trends in Microbiology*, 25(7), 573-584. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.001>
- Wathelet, M. G., Clauss, I. M., Paillard, F. C., & Huez, G. A. (1989). 2-Aminopurine selectively blocks the transcriptional activation of cellular genes by virus, double-stranded RNA and interferons in human cells. *European Journal of Biochemistry*, 184(3), 503-509.
- Widom, J. (1998). STRUCTURE, DYNAMICS, AND FUNCTION OF CHROMATIN IN VITRO. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 27, 285-327.
- Wilks, A. F. (1989). Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), 1603-1607.

- Wilks, A. F., Harpur, A. G., Kurban, R. R., Ralph, S. J., Zürcher, G., & Ziemiecki, A. (1991). Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, *11*(4), 2057-2065. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC359893/>
- Yan, Z., Cui, K., Murray, D. M., Ling, C., Xue, Y., Gerstein, A., ... Wang, W. (2005). PBAF chromatin-remodeling complex requires a novel specificity subunit, BAF200, to regulate expression of selective interferon-responsive genes. *Genes & Development*, *19*(14), 1662-1667. <https://doi.org/10.1101/gad.1323805>
- Yanai, H., Ban, T., Wang, Z., Choi, M. K., Kawamura, T., Negishi, H., ... Taniguchi, T. (2009). HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*, *462*(7269), 99-103. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1038/nature08512>
- Yuan, W., & Krug, R. M. (2001). Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *The EMBO Journal*, *20*(3), 362-371. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.362>
- Zinn, K., Keller, A., Whittemore, L. A., & Maniatis, T. (1988). 2-Aminopurine selectively inhibits the induction of beta-interferon, c-fos, and c-myc gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, *240*(4849), 210-213.
- Zlatanova, J., Gaiafa, P., & van Holde, K. (2000). Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. *The FASEB Journal*, *14*(12), 1697-1704. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0869rev>
- Zlatanova, J., Seebart, C., & Tomschik, M. (2007). Nap1: taking a closer look at a juggler protein of extraordinary skills. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *21*(7), 1294-1310. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7199rev>

