



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE UN PROMOTOR IDENTIFICADO
EN EL INTRÓN 5 DEL GEN *RUNX1* COMO CAUSA DE SUSCEPTIBILIDAD DE ESA
REGIÓN A DAÑO EN EL ADN POR TRATAMIENTO CON ETOPÓSIDO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, ÁREA
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

POR: Nicolás Alberto Schnake Mamut

PROFESORA GUÍA: Dra. Soraya Elisa Gutiérrez Gallegos

Concepción, Chile 2021

Tabla de Contenido

Índice de Tablas	VI
Índice de Figuras	VII
Índice de Abreviaturas	X
1. Resumen.....	XII
2. Abstract	XIV
3. Introducción	1
3.1. Leucemia mieloide aguda secundaria	1
3.2. Etopósido y t-AML.....	2
3.3. Translocaciones cromosómicas en linfomas y leucemias	5
3.4. Translocación cromosómica (8;21): genes <i>RUNX1</i> y <i>ETO</i>	10
3.5. Regiones BCR	14
3.6. Mecanismos epigenéticos	17
3.7. RNAs no codificantes	18
3.8. Estructura de cromatina y transcripción.....	19

3.9. Regiones de quiebre cromosomal en <i>RUNX1</i> : promotor putativo	22
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos.....	24
6. Materiales y Métodos.....	25
6.1. Análisis de datos de DNase-seq y ChIP-seq de H3K4me3	26
6.2. Predicción de sitios de inicio de transcripción con <i>software</i> YAPP	25
6.3. Análisis de datos de CAGE	27
6.4. Análisis de datos de EST	28
6.5. Cultivo celular.....	29
6.6. Análisis de expresión del nuevo ncRNA	29
6.7. Mapeo del intrón 5 de <i>RUNX1</i> para evaluar localización del nuevo ncRNA.....	30
6.8. Tratamiento con etopósido	32
6.9. Pre-tratamiento con flavopiridol seguido de tratamiento con etopósido	32

6.10. Análisis de efectividad de inhibición de transcripción	32
6.11. Análisis de generación de daño de quiebre de doble hebra del DNA en región BCR3 por tratamiento con etopósido	35
6.12. Cálculo de concentración de etopósido en tratamientos	35
7. Resultados.....	37
7.1. Las regiones BCR2 y BCR3 del intrón 5 del gen <i>RUNX1</i> presentan características similares al promotor de un gen de referencia	37
7.2. El promotor putativo de la región BCR3 da origen a un nuevo ARN largo no codificante.....	50
7.3. La expresión del nuevo lncRNA es independiente de la expresión del gen <i>RUNX1</i>	53
7.4. El tratamiento con etopósido induce daño en el ADN en la región BCR3, en células que expresan el nuevo lncRNA	60
7.5. La inhibición de la transcripción previene el daño en el ADN inducido por tratamiento con etopósido en la región BCR3	62
8. Discusión.....	66
8.1. Caracterización del intrón 5 del gen <i>RUNX1</i>	66

8.2. Nuevo RNA largo no codificante.....	68
8.3. Actividad transcripcional como causa de susceptibilidad a la generación de DSBs	71
8.4. Proyecciones	77
9. Bibliografía	82



Índice de Tablas

Tabla 1. Coordenadas genómicas de las regiones analizadas	26
Tabla 2. Pares de partidores usados en el mapeo del intrón 5 del gen <i>RUNX1</i> para evaluar localización del nuevo ncRNA.....	31
Tabla 3. Análisis de <i>hotspots</i> de HS DNasal en base a datos de ENCODE	38
Tabla 4. Análisis de <i>hotspots</i> de H3K4me3 en base a datos de ENCODE	39
Tabla 5. Análisis de TSSs predichos en base a datos de CAGE	47
Tabla 6. ESTs localizados en el intrón 5 del gen <i>RUNX1</i>	51
Tabla 7. Cruzamiento de sets de datos de HS DNasal, H3K4me3 y CAGE .	57
Tabla 8. La expresión del nuevo lncRNA no se correlaciona con la expresión del mRNA del gen <i>RUNX1</i>	70

Índice de Figuras

Figura 1. El etopósido posee dos mecanismos de generación de DSBs	3
Figura 2. La t(8;21) es una de las translocaciones cromosómicas frecuentes en pacientes de t-AML.....	6
Figura 3. La t(8;21) da origen a la proteína de fusión RUNX1/ETO.....	11
Figura 4. En el intrón 5 del gen RUNX1 se han identificado tres BCRs	13
Figura 5. Curvas estándar en base a número inicial de copias para el análisis de efectividad de inhibición de transcripción con flavopiridol	34
Figura 6. Las regiones BCR2 y BCR3 del intrón 5 del gen <i>RUNX1</i> presentan HS DNasal y H3K4me3	40
Figura 7. La presencia de HS DNasal y H3K4me3 es una característica de regiones promotoras	42
Figura 8. La presencia de H3K4me3 no es una característica común de las regiones de quiebre cromosomal.....	43
Figura 9. Los promotores putativos identificados en las regiones BCR2 y BCR3 presentan potenciales TSSs	45

Figura 10. La densidad de INR presente en las regiones BCR2 y BCR3 es comparable a un promotor conocido.....	46
Figura 11. El promotor putativo en la región BCR3 presenta la mayor cantidad de TSSs antisentido respecto al mRNA del gen <i>RUNX1</i>.....	48
Figura 12. Los TSSs identificados en base a datos de CAGE coinciden con el TSS real de un gen de referencia	49
Figura 13. ESTs reportados en el intrón 5 del gen <i>RUNX1</i> colocalizan con los promotores putativos identificados.....	52
Figura 14. El promotor putativo identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen <i>RUNX1</i> es funcional	54
Figura 15. El nuevo lncRNA se expresa en células mieloides de médula ósea.....	55
Figura 16. Los datos bioinformáticos obtenidos previamente permiten predecir la expresión del nuevo lncRNA en células HUVEC.....	58
Figura 17. Las regiones desde las que se expresa el nuevo lncRNA coinciden con la secuencia identificada en base a ESTs	59
Figura 18. El tratamiento con etopósido induce quiebres de la doble hebra del ADN en la región BCR3 en células que expresan el nuevo lncRNA	61

Figura 19. El tratamiento con flavopiridol es efectivo en la inhibición de la transcripción64

Figura 20. La inhibición de la transcripción con flavopiridol previene el daño en el DNA inducido por tratamiento con etopósido65

Figura 21. La actividad transcripcional del promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* influye en la susceptibilidad de esa región a daño por tratamiento con etopósido en células mieloides76



Índice de Abreviaturas

AML	: Leucemia mieloide aguda
RNA Pol II	: RNA polimerasa II
lncRNA.....	: RNA largo no codificante
ncRNA	: RNA no codificante
BCR	: Región de quiebre cromosomal
CAGE.....	: Análisis de expresión génica por CAP
DSB	: Quiebre de la doble hebra del DNA
EST.....	: Marcador de secuencia expresada
H3K4me3.....	: Trimetilación de lisina 4 de la histona H3, marca epigenética
HMM	: Modelo oculto de Markov
HS DNasal.....	: Hipersensibilidad a DNasa I
INR.....	: Iniciador, elemento de promotor basal
MPO.....	: Mieloperoxidasa
NHD	: Dominio con homología <i>nerfy</i>
PCR	: Reacción en cadena de polimerasa
P-TEFb	: Factor positivo de elongación de la transcripción
qPCR	: Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
RHD	: Dominio con homología <i>runt</i>
RT-PCR	: PCR con transcriptasa reversa
RT-qPCR	: qPCR con transcriptasa reversa

t(8;21): Translocación cromosómica (8;21)
t-AML: Leucemia mieloide aguda secundaria
TFIID.....: Factor de inicio de transcripción IID
TOP2: Topoisomerasa II
TSS.....: Sitio de inicio de transcripción



1. Resumen

El gen *RUNX1*, reconocido como el regulador maestro de la hematopoyesis definitiva en humanos, participa en condiciones patológicas en diversas translocaciones cromosomales recíprocas asociadas a leucemia mieloide aguda. Una de las más frecuentes encontrada tanto en pacientes de leucemia mieloide aguda *de novo*, como secundaria, es la translocación cromosómica (8;21), en la que el gen *RUNX1* se recombina con el gen *ETO*. En el gen *RUNX1*, los sitios de quiebre de la doble hebra del ADN que dan origen a esta translocación se encuentran en el intrón 5, confinados en tres regiones denominadas BCR1, BCR2 y BCR3. Se desconoce qué determina que estas regiones sean más susceptibles a sufrir quiebres en la doble hebra del DNA. No obstante, trabajo previo en nuestro laboratorio sugirió la posible existencia de un promotor putativo en la región BCR3. Teniendo esto en consideración, el objetivo de este estudio fue evaluar el estado de actividad transcripcional del promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*, y su correlación con daño por tratamiento con etopósido en distintas líneas celulares. Para ello, en primer lugar, se caracterizó el intrón 5 del gen *RUNX1* usando datos de DNase-seq y CHIP-seq para la marca epigenética H3K4me3, encontrándose que las regiones BCR2 y BCR3 exhibían presencia de hipersensibilidad a DNase y asociación de H3K4me3 similar a lo encontrado

regularmente en un promotor conocido. Luego, mediante análisis de lectura de secuencia para identificar elementos de promotor basal y posibles TSSs, en conjunto a datos de CAGE y de EST, obtenidos de ENCODE, se determinó que el promotor putativo de la región BCR3 da origen a un nuevo RNA largo no codificante, el que fue detectado en la línea celular mieloide KG-1 mediante RT-PCR. Una vez confirmado que el promotor de la región BCR3 era activo, se realizó tratamiento con etopósido, droga que induce la generación de quiebres en la doble hebra del DNA, observándose mediante qPCR que en células KG-1 el tratamiento con etopósido producía daño en el DNA en la región BCR3. Por el contrario, en la línea celular Colo320, en la que no se transcribe el nuevo RNA largo no codificante, no se observó daño en la región BCR3 asociado al tratamiento con etopósido. Finalmente, al inhibir la transcripción en células KG-1 haciendo un pre-tratamiento con flavopiridol, se previno el daño producido en la región BCR3 por tratamiento con etopósido. En conjunto, los resultados obtenidos muestran que el promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* es activo, y que la actividad transcripcional del mismo se correlaciona con la susceptibilidad de la región BCR3 a sufrir quiebres en la doble hebra del ADN inducidos por tratamiento con etopósido.

2. Abstract

RUNX1 gene, recognized as the master regulator of definitive hematopoiesis in humans, participates in pathological conditions in several reciprocal chromosomal translocations associated with acute myeloid leukemia. One of the most frequent, found in patients of both *de novo* and secondary acute myeloid leukemia, is the chromosomal translocation (8;21), in which *RUNX1* gene recombines with the *ETO* gene. Within *RUNX1* gene, the DNA double strand breakpoints that originate this translocation are found in intron 5, confined in three regions denominated BCR1, BCR2 and BCR3. It is unknown what determines that these regions are more susceptible to suffer DNA double strand breaks. Nonetheless, previous work in our lab pointed out the possible existence of a putative promoter in the region BCR3. Taking that into consideration, the aim of this study was to evaluate the transcriptional state of the promoter identified at the BCR3 region located in intron 5 of the *RUNX1* gene, and its correlation with damage induced by etoposide treatment in hematopoietic cells. To this end, we characterized *RUNX1* gene intron 5 using DNase-seq and the epigenetic mark H3K4me3 ChIP-seq data, finding that the regions BCR2 and BCR3 exhibit both DNaseI hypersensitivity and H3K4me3 similar to a *bona fide* promoter. Then, we performed analyses of sequence reading, in order to identify core promoter elements and possible TSSs, along

with CAGE and EST data, obtained from ENCODE. Our results showed that the putative promoter in the region BCR3 originated a novel long non-coding RNA, which was detected in the myeloid cell line KG-1 through RT-PCR. Once confirmed that the promoter in the region BCR3 was active, treatment with etoposide, a drug that induces the generation of DNA double strand breaks, was performed. It was observed through qPCR that etoposide treatment produced DNA damage in the region BCR3. On the contrary, in Colo320 cells, in which the novel long non-coding RNA was not detected, no damage was observed in the BCR3 region after etoposide treatment. Finally, pre-treatment of KG-1 cells with flavopiridol, a transcription inhibitor, prevented the damage induced by etoposide treatment in the BCR3 region. Taken together, our results showed that the promoter identified in *RUNX1* intron 5 BCR3 region is active, and that its transcriptional activity correlates with the susceptibility of the BCR3 region to DNA double strand breaks induced by etoposide treatment.

3. Introducción

3.1. Leucemia mieloide aguda secundaria

La leucemia mieloide aguda secundaria (t-AML) es un tipo de cáncer hematológico que se desarrolla como un efecto adverso asociado principalmente a tratamientos quimioterapéuticos. Al igual que la leucemia mieloide aguda *de novo* (AML), se caracteriza por una proliferación descontrolada de células progenitoras mieloides en la médula ósea, las que pueden migrar a la sangre periférica. Si bien t-AML posee características a nivel de aberraciones genómicas similares a AML, es más agresiva, y en general no responde bien a los tratamientos quimioterapéuticos habituales para AML, en que se administran drogas como la citarabina, o el ácido trans-retinoico. De hecho, menos del 15% de los pacientes de t-AML sobrevive más de cinco años (Ruiz Argüelles, 2009).

Distintos estudios indican que un 2-12% de los pacientes de distintos tipos de cáncer no hematológicos, cuya quimioterapia incluye la droga etopósido, desarrolla t-AML de 3 a 5 años post-tratamiento (Ezoe, 2012; Hulegårdh y cols., 2015; Milosevic y cols., 2012; Preiss y cols., 2010). Si bien se han buscado drogas alternativas al uso de etopósido en quimioterapia (Igawa y cols., 2018; Kang y cols., 2011; Kim y cols., 2019), actualmente sigue siendo considerado el tratamiento de elección para pacientes de cáncer de pulmón

(Dingemans y cols., 2021), el tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial (Sung y cols., 2021).

3.2. Etopósido y t-AML

El etopósido es un compuesto derivado de podofilotoxinas, moléculas cuya actividad principal es la inhibición de la enzima topoisomerasa II (Reyhanoglu y Tadi, 2020). La topoisomerasa II es una enzima encargada de disminuir la tensión torsional generada por el superenrollamiento de la doble hebra del DNA en los procesos de replicación y transcripción. En mamíferos, se han descrito dos formas codificadas en genes distintos: topoisomerasa II α (TOP2A) y topoisomerasa II β (TOP2B). Ambas formas difieren fundamentalmente hacia el extremo C-terminal, en una región denominada dominio variable, el que se cree les confiere su función en diferentes etapas del ciclo celular. TOP2A se expresa principalmente en células en división activa, y es una enzima esencial para el proceso de crecimiento celular, a diferencia de TOP2B, que, si bien no es esencial para el crecimiento, participa en el proceso de transcripción. Las topoisomerasas ejercen su función en dos pasos: primero clivan la doble hebra del DNA, lo que disminuye la tensión torsional del superenrollamiento, y luego ligan los fragmentos generados (Lang y cols., 1998; Nitiss, 2009a) (Figura 1A). Al inhibir el etopósido la actividad ligasa de topoisomerasa II, se acumula daño en el genoma producto de la replicación y

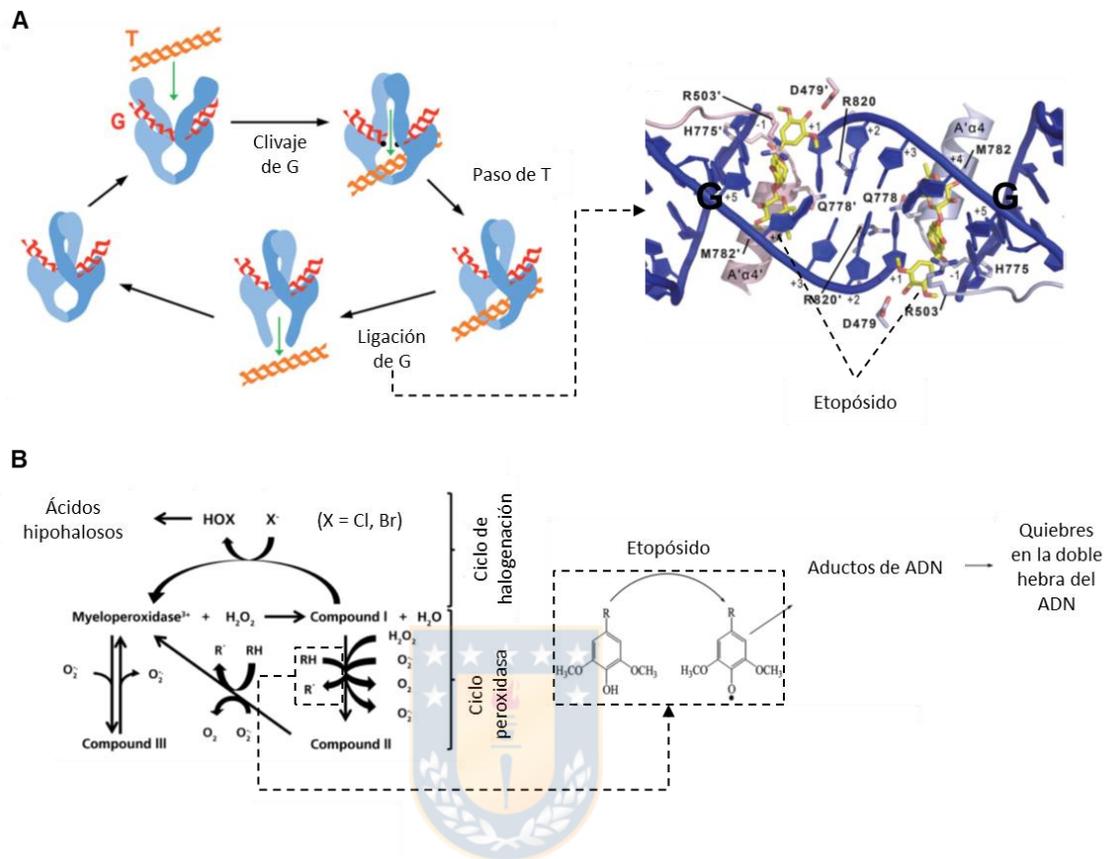


Figura 1. El etopósido posee dos mecanismos de generación de DSBs. A: En el primer mecanismo, el etopósido inhibe la actividad ligasa de la enzima topoisomerasa II. La función de topoisomerasa II es disminuir la tensión torsional del DNA, para ello cliva una de las hebras denominada G, luego permite el paso de la hebra T, y finalmente vuelve a ligar G. En presencia de etopósido, dos moléculas de la droga producen impedimento estérico en el sitio activo de la enzima, teniendo como consecuencia que los extremos de la hebra G clivada no puedan acercarse lo suficiente para ser ligados. Este mecanismo ocurre en todos los tipos celulares [modificado de (Martínez-García y cols., 2014; Wu y cols., 2011)]. **B:** El segundo mecanismo ocurre en células de tipo mielóide, y aprovecha la actividad de la enzima mieloperoxidasa. La actividad de esta enzima está dividida en dos ciclos que compiten entre sí dependiendo de la concentración de sustratos. En el ciclo de halogenación se obtienen como productos ácidos hipohalosos; y en el ciclo peroxidasa se produce la oxidación de distintas moléculas, entre ellas etopósido. Los radicales libres de etopósido pueden generar aductos de DNA, y estos aductos dar origen a quiebres en la doble hebra del DNA [modificado de (Attia, 2010; Davies, 2011)].

transcripción, lo que induce apoptosis principalmente en células cuya tasa de replicación es alta, como es el caso de las células tumorales (Hande, 1998; Nitiss, 2009b; Pommier, 2013; Tamaro y cols., 2013), generando acumulación de DSBs durante la fase S, y produciendo arresto del ciclo celular en el *checkpoint* G2/M, lo que conduce a apoptosis (Nam y cols., 2010). No obstante, etopósido no distingue entre células cancerosas y normales, por lo que su efecto se extiende a todas las células del cuerpo.

En células de tipo mieloide, además del daño producido por la inhibición de topoisomerasa II, se ha descrito que debido a la acción de la enzima mieloperoxidasa (MPO), la molécula de etopósido se oxida, transformándose en un radical libre que es capaz de dañar el DNA (Fan y cols., 2006) (Figura 1B). MPO es una enzima encargada de la producción de ácidos hipohalosos responsables de la acción defensiva de células de sangre periférica, y se expresa en todo el linaje celular mieloide, desde progenitores hasta leucocitos (Zaki y cols., 1990). El efecto de generación de radicales libres de etopósido se ve aumentado en presencia de sustratos de MPO, principalmente peróxido de hidrógeno, y se forman en los primeros minutos luego de la incorporación de etopósido en las células (Papież y cols., 2016; Vlasova y cols., 2011). Aún más, se ha descrito que la expresión de MPO aumenta la inducción de daño en el DNA mediado por topoisomerasa II (Atwal y cols., 2017). Esto sugiere que las células de tipo mieloide podrían verse más afectadas por el tratamiento con etopósido respecto a otros tipos celulares normales.

Para que se desarrolle t-AML como consecuencia del tratamiento con etopósido, es necesario que en las células hematopoyéticas de los pacientes ocurra daño a nivel genómico que produzca dos efectos de desregulación principales: un aumento en la proliferación de células progenitoras mieloides, y un bloqueo en su diferenciación (Gilliland y Griffin, 2002; Rosenbauer y Tenen, 2007). Esto se conoce como el modelo de doble hit para el desarrollo de leucemia mieloide aguda. En aproximadamente el 75% de los pacientes esta desregulación se asocia a aberraciones genómicas (Figura 2). En pacientes de t-AML se ha observado una gran variedad de aberraciones a nivel genómico: desregulación de genes, deleciones, inserciones, inversiones y translocaciones (Hong y He, 2017). Dentro de las translocaciones, una de las más frecuentes es la translocación cromosómica (8;21), o t(8;21), presente en alrededor del 5% de pacientes de t-AML (Kayser y cols., 2011). En esta aberración cromosomal se intercambian fragmentos del brazo largo de los cromosomas 8 y 21, lo que produce la recombinación los genes *RUNX1* y *ETO*.

3.3. Translocaciones cromosómicas en linfomas y leucemias

Los linfomas y las leucemias son tipos de cáncer que afectan al sistema hematológico. Se caracterizan por la proliferación descontrolada de algún tipo celular en los nódulos linfáticos, en el caso de los linfomas, o en la médula ósea, en el caso de las leucemias (Ruiz Argüelles, 2009).

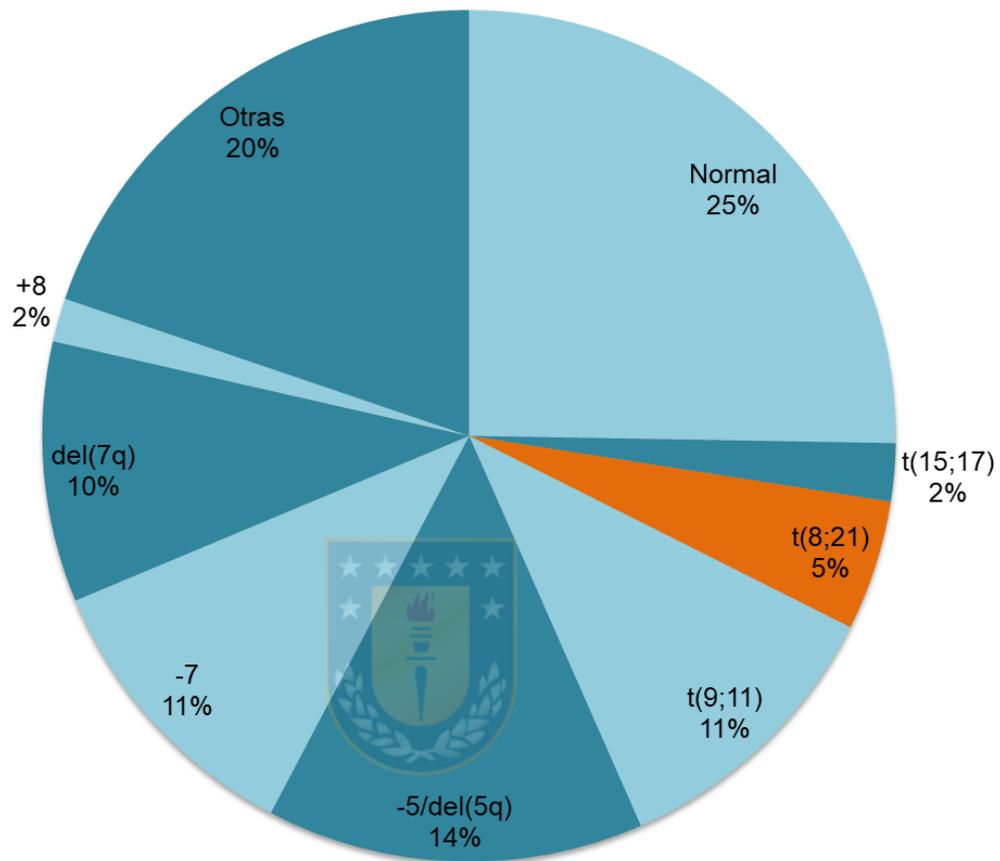


Figura 2. La t(8;21) es una de las translocaciones cromosómicas frecuentes en pacientes de t-AML. En pacientes de t-AML se ha encontrado una gran variedad de aberraciones cromosómicas, aproximadamente el 75% de los pacientes presenta alguna translocación, deleción o inserción (Kayser y cols., 2011).

En pacientes de estos tipos de cáncer se ha identificado una amplia variedad de aberraciones a nivel cromosomal (Huret y cols., 2013). Dentro de los distintos tipos de aberraciones genómicas, las translocaciones cromosomales tienen particular relevancia, ya que es el tipo de aberración más frecuente encontrado en pacientes tanto de linfomas, en particular linfomas no-Hodgkin, como de leucemias (Burmeister y Thiel, 2001; Pratap y Scordino, 2019; Wan y cols., 2018). Una posible consecuencia de las translocaciones es la recombinación de genes, lo que puede resultar en la ganancia de función de alguno de los genes involucrados, lo que se ejemplificará a continuación, mencionando translocaciones cromosomales presentes en linfomas y leucemias, y el mecanismo por el que favorecen el desarrollo de cáncer.

Respecto a los linfomas, tenemos como ejemplo la translocación (8;14), la más frecuente encontrada en pacientes de linfoma de Burkitt, un tipo de linfoma no-Hodgkin. En esta translocación se recombinan los genes *IGH* y *MYC*. A causa de la recombinación el gen *MYC* pasa a ser controlado por un *enhancer* del gen *IGH*, lo que resulta en una expresión constitutiva de la proteína MYC (van den Berg y Stevens-Kroef, 2017), un factor de transcripción que promueve el crecimiento celular (Stine y cols., 2015).

En cuanto a las leucemias de tipo linfoide, considerando translocaciones cromosomales frecuentes y el mecanismo molecular por el que favorecen el

desarrollo de leucemia, tenemos como ejemplos las translocaciones (4;11) y (1;14).

- En la translocación (4;11) se recombinan los genes *MLL (KMT2A)* y *AF4 (AFF1)*. La proteína de fusión MLL-AF4 induce un aumento en la expresión de los genes blanco de la proteína MLL, entre los que está el gen *HOXA9* (Faramand y Dalia, 2018), asociado a la proliferación de células madre hematopoyéticas (Argiropoulos y Humphries, 2007).
- En la translocación (1;14) se recombinan los genes *TAL1 (SCL)* y *TCR α* (Huret, 1998). La proteína TAL1 normal está involucrada en la activación del ciclo celular en células progenitoras mieloides. En condiciones normales, TAL1 no se expresa en células linfoides, sin embargo, al producirse esta translocación en progenitores linfoides el gen *TAL1* pasa a ser controlado por el promotor del gen *TCR α* (receptor de células T). La expresión anormal de TAL1 en células linfoides incide en el desarrollo de leucemia (Porcher y cols., 2017).

Por último, en las leucemias de tipo mieloides, por mencionar algunos ejemplos enfocados en las translocaciones cromosomales más frecuentes y el mecanismo molecular por el que estas aberraciones favorecen el desarrollo de leucemia, tenemos las translocaciones (9;22), (15;17), (9;11), y (8;21).

- En la translocación (9;22), también conocida como cromosoma Philadelphia, se recombinan los genes *BCR* y *ABL*. La proteína de fusión

BCR-ABL es una tirosina kinasa activada de forma constitutiva, y afecta diversas vías de señalización que promueven la transformación a células de leucemia (Turhan, 2000). Entre estas se encuentran la vía MAPK, que aumenta la proliferación; y la vía PI3K/AKT, que aumenta la resistencia de las células de leucemia a la apoptosis (Bavaro y cols., 2019).

- En la translocación (15;17) se recombinan los genes *PML* y *RAR α* . La proteína de fusión PML-RARA actúa como dominante negativa de la proteína RARA normal (Poddighe y Weghuis, 2016), interaccionando con correpresores transcripcionales, como N-CoR, lo que bloquea la diferenciación de células mieloides en la etapa de promielocitos (Liquori y cols., 2020).
- En la translocación (9;11) se recombinan los genes *MLL* (*KMT2A*) y *AF9* (*MLLT3*) (Knijnenburg y Beverloo, 2016). La proteína de fusión MLL-AF9 induce un aumento en la expresión de los genes blanco de la proteína MLL, entre los que está el gen *HOXA9* (Krivtsov y cols., 2006), asociado a la proliferación de células madre hematopoyéticas (Argiropoulos y Humphries, 2007).
- En la translocación (8;21) se recombinan los genes *RUNX1* (*AML1*) y *ETO* (*RUNX1T1*). La proteína de fusión RUNX1-ETO actúa como dominante negativa de la proteína RUNX1 normal (Kroes y Stevens-Kroef, 2017), ya que es capaz de interaccionar con correpresores

transcripcionales, en particular N-CoR, mSin3A y HDACs, bloqueando la diferenciación de células mieloides (Licht, 2001; Lin y cols., 2017).

3.4. Translocación cromosómica (8;21): genes *RUNX1* y *ETO*

El gen *RUNX1* es definido como el regulador maestro de la hematopoyesis definitiva. Codifica un factor de transcripción esencial para la correcta diferenciación de las células hematopoyéticas (Chen y cols., 2009; Drevon y Jaffredo, 2014; Okuda y cols., 2000), que se expresa tanto en células mieloides, como linfoides (Wang y cols., 2015). La proteína RUNX1 posee tres dominios fundamentales: un dominio con homología runt (RHD), un dominio de transactivación y uno de inhibición. RHD es el dominio mediante el cual la proteína reconoce su secuencia consenso en el DNA, para la regulación de la expresión de sus genes blanco (Roudaia y cols., 2009). Por otro lado, el gen *ETO* codifica una proteína cuya función no ha sido determinada a la fecha. No obstante, al poseer dominios con homología nervy (NHDs), es capaz de interaccionar con correpresores transcripcionales (Zhang y cols., 2001). La proteína de fusión RUNX1/ETO generada por la recombinación de estos genes en la t(8;21) está conformada hacia su región N-terminal por el RHD de RUNX1, fusionado con la mayor parte de la proteína ETO y sus NHDs (Figura 3). A causa de esto, la proteína recombinante RUNX1/ETO es capaz de regular

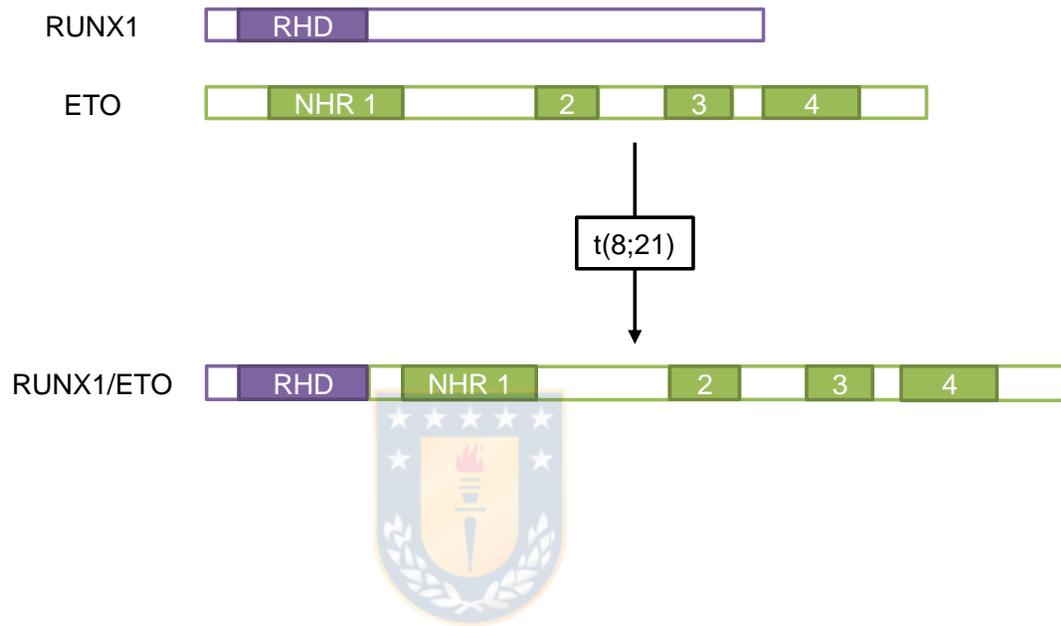


Figura 3. La t(8;21) da origen a la proteína de fusión RUNX1/ETO. Dada la estructura que posee la proteína RUNX1/ETO, es capaz de competir con la proteína RUNX1 normal por sus sitios de unión, regulando de forma negativa los genes blanco de RUNX1, e inhibiendo de esta forma la diferenciación de células hematopoyéticas.

negativamente la expresión de los genes blanco de la proteína RUNX1 normal, bloqueando de esta manera la diferenciación de células progenitoras mieloides (Licht, 2001; Lin y cols., 2017; Roudaia y cols., 2009).

A pesar del tamaño de los genes *RUNX1* (261,5kb) y *ETO* (140kb), al analizar el sitio de recombinación entre ellos, se ha determinado que los quiebres de la doble hebra del DNA que originan la t(8;21) no ocurren en cualquier parte dentro del cuerpo de cada gen, sino que se encuentran en intrones específicos: el intrón 5 del gen *RUNX1* y el intrón 1 del gen *ETO*. En el intrón 5 del gen *RUNX1* (24,8kb), se identificaron tres regiones más pequeñas involucradas en la translocación en pacientes de AML, a los que se les denominó *breakpoint cluster regions* (BCRs): BCR1 (0,8kb), BCR2 (4,2kb) y BCR3 (2,1kb) (Zhang y cols., 2002) (Figura 4). Qué determina que estos dos intrones se asocien con frecuencia en la t(8;21) no es del todo claro, ya que no poseen similitud de secuencia entre ellos, un factor que podría aumentar las probabilidades de recombinación errónea; sin embargo, existe otro factor que podría aumentar la probabilidad de recombinación, como es la distancia entre estos dos genes dentro del núcleo. Al respecto, por un lado, se ha demostrado que al estimular la vía de señalización Wnt/ β -Catenina, estos genes son trasladados a regiones espaciales cercanas dentro del núcleo (Ugarte y cols., 2015). Y, por otro lado, se ha determinado mediante ensayos de 3C que el lncRNA *RUNXOR* interacciona con los cromosomas 8 y 21, pudiendo actuar como un puente entre ellos (Wang y cols., 2014). Una mayor cercanía en el

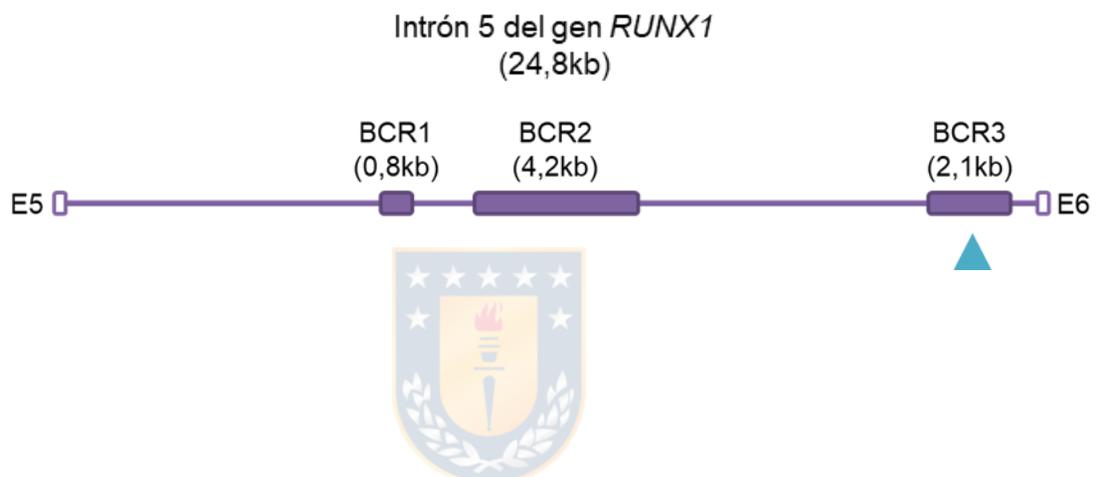


Figura 4. En el intrón 5 del gen *RUNX1* se han identificado tres BCRs. El año 2002, Zhang y colaboradores analizaron los sitios de recombinación de los genes *RUNX1* y *ETO* en pacientes de leucemia mieloide aguda que presentaban la translocación (8;21). A partir de esto, determinaron que los sitios de quiebre de la doble hebra del DNA en el gen *RUNX1* que daban origen a la t(8;21) estaban contenidos dentro del intrón 5 del gen, y se concentraban en tres regiones, las que denominaron BCRs: BCR1, BCR2 y BCR3. La punta de flecha bajo BCR3 indica la región con HS DNasal encontrada por el grupo de Zhang en líneas celulares mieloides, descrita en el mismo reporte (Zhang y cols., 2002).

núcleo entre estos dos cromosomas podría aumentar la probabilidad de recombinación errónea al ocurrir un quiebre de doble hebra de DNA. No obstante, esto no explica qué determina que las regiones BCR del intrón 5 del gen *RUNX1* sean más susceptibles a sufrir quiebres en la doble hebra del DNA. Respecto a esto, en el mismo trabajo de Zhang y cols. en células hematopoyéticas se determinó que las regiones BCR2 y BCR3 presentan sitios de corte para topoisomerasa II, y que además la región BCR3 presenta hipersensibilidad a DNasal (HS DNasal) (Zhang y cols., 2002), lo que sugiere que la cromatina en esa región está en una conformación más relajada.



3.5. Regiones BCR

Las regiones BCR son segmentos del genoma en los que, de ocurrir un quiebre de la doble hebra del DNA, este puede dar origen a una aberración cromosomal. En términos generales, se desconoce qué determina que ciertas regiones del genoma sean más susceptibles a sufrir DSBs, debido a que a la fecha no existe un criterio único e inequívoco para la identificación de regiones BCR. No obstante, una las características comunes de las regiones BCR es una mayor accesibilidad de la cromatina (Strick y cols., 2006; Strissel y cols., 1998), lo que puede determinarse analizando la presencia de HS DNasal en el genoma. Sin embargo, dado que la HS DNasal es un indicador general de accesibilidad de cromatina, es una característica que comparten las regiones

BCR con otros elementos del genoma, como por ejemplo promotores o *enhancers* (Lu y Richardson, 2004). Actualmente, se puede analizar la presencia de HS DNasal mediante ensayos de DNase-seq. En conjunto a la HS DNasal, la presencia de sitios de corte para topoisomerasa II ha sido señalada como un potencial indicador de regiones BCR (Strick y cols., 2006; Strissel y cols., 1998). Hace más de tres décadas se reportó que topoisomerasa II reconoce la secuencia consenso degenerada de 18pb (A/G)N(C/T)NNCN NG(C/T)NG(G/T)TN(T/C)N(T/C) (Spitzner y Muller, 1988), la que sigue siendo aceptada hasta hoy. No obstante, se ha determinado que la selección del sitio de corte depende no solo de la secuencia, sino también de la flexibilidad de la doble hebra del DNA en esa región, por cuanto se ha reportado que topoisomerasa II cliva preferentemente regiones más flexibles que aquellas con mayor rigidez (Jang y cols., 2019). Para la identificación de sitios de corte para topoisomerasa II, hoy en día existen disponibles técnicas asociadas a secuenciación de próxima generación, tales como ChiP-seq de topoisomerasa II o DSB-seq. Si bien identificar la presencia de HS DNasal y sitios de corte para topoisomerasa II puede ayudar a seleccionar regiones del genoma candidatas de ser BCR, no son suficientes para asegurar que una región lo es. Por esto mismo, es relevante determinar qué otras características poseen regiones BCR conocidas.

Como se mencionó anteriormente, la generación de DSBs en una región BCR puede dar origen a aberraciones cromosomales. Dentro de este espectro

se encuentran duplicaciones, deleciones, inversiones y translocaciones. En términos generales, todas estas alteraciones implican un desbalance en la estructura normal de los cromosomas, y pueden tener como consecuencia la disfunción de uno o más genes. Una duplicación consiste en la repetición de un segmento en un cromosoma, pudiendo ubicarse este segmento en forma adyacente a la región duplicada (en tándem) o no. Por otro lado, una deleción ocurre cuando un cromosoma pierde un segmento, el cual es degradado. Distinto es el caso de las inversiones, en las que un segmento de cromosoma invierte su orientación, sin que se pierda ni se agregue material genético. Por último, las translocaciones consisten en el rearreglo de segmentos dentro de un mismo cromosoma (intracromosomal), o entre cromosomas (intercromosomal). Entre estas últimas encontramos las translocaciones desbalanceadas, en las que un segmento de cromosoma es transferido hacia otro; y las translocaciones recíprocas, en las que ocurre un intercambio de segmentos entre dos cromosomas diferentes (Bhat y Wani, 2017).

Dentro de los genes que, en condiciones patológicas, participan en la generación de aberraciones genómicas, el gen *RUNX1* destaca por la cantidad de translocaciones recíprocas en las que está involucrado. Para ejemplificar, el año 2009 las translocaciones t(3;21), t(8;21), t(12;21) y t(16;21) estaban listadas dentro de las aberraciones más frecuentes encontradas en pacientes de AML (De Braekeleer y cols., 2009), y se han descrito más desde entonces (De Braekeleer y cols., 2011; Foley y cols., 2017; Moon y cols., 2013; Panagopoulos

y cols., 2016). Se desconoce qué determina que este gen sea tan propenso a la generación de DSBs que dan origen a translocaciones. Sin embargo, se sabe que para cada una de ellas el DSB en el gen *RUNX1* se produce en un intrón, destacando los intrones 5 y 6 (Nucifora y Rowley, 1995). Entre las translocaciones mencionadas, la más notable es la t(8;21), ya que es la translocación cromosómica recíproca que involucra al gen *RUNX1* más frecuente en pacientes de AML *de novo* y t-AML (Cheng y cols., 2009; Kayser y cols., 2011).



3.6. Mecanismos epigenéticos

Los mecanismos epigenéticos son parte de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de genes. Estos mecanismos actúan en distintos niveles, algunos modulando el proceso de transcripción, mientras que otros regulan la traducción de mRNAs. En términos generales, los mecanismos epigenéticos se pueden clasificar en tres grupos: los RNAs no codificantes, las modificaciones covalentes y los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP. En el primer grupo encontramos los microRNAs, los RNAs cortos no codificantes y los RNAs largos no codificantes; en el segundo, la metilación de DNA y las modificaciones post-traduccionales de histonas (Al Aboud y cols., 2021); y en el tercero, los complejos remodeladores de la familias SWI/SNF, ISWI, INO80 y CHD (Pandey, 2016).

3.7. RNAs no codificantes

Los RNAs no codificantes (ncRNA) son transcritos de RNA que no poseen un marco abierto de lectura, es decir, no codifican una proteína. Si bien originalmente se creía que correspondía a fragmentos de RNA sin ninguna función, hoy en día se sabe que cumplen roles clave para el correcto funcionamiento de las células, siendo algunos de estos reconocidos como parte de los mecanismos epigenéticos de regulación de la transcripción. Los RNAs no codificantes se clasifican de acuerdo a la longitud de sus secuencias, es así como podemos tener tres tipos generales: microRNAs (miRNA, ~20 nucleótidos), RNAs cortos no codificantes (sncRNA, menos de 200 nucleótidos) y RNAs largos no codificantes (lncRNA, más de 200 nucleótidos) (Srijyothi y cols., 2018).

Entre los ncRNA que participan en regulación de la expresión génica, cada tipo posee un mecanismo diferente. El mecanismo clásico de acción de los miRNAs involucra su hibridación con la región 3'-UTR de un mRNA blanco, produciendo represión de la traducción, realizada por los ribosomas, a través de la degradación o el secuestro de dicho mRNA (O'Brien y cols., 2018). No obstante, se ha descrito miRNAs que hibridan con la región 5'-UTR de mRNA (Ørom y cols., 2008), e incluso con regiones promotoras (Zhang y cols., 2014). Distinto es el caso de los sncRNA, ya que existen diferentes tipos, cada uno con su propia función. Entre los sncRNA se encuentran los RNAs nucleolares

pequeños (snoRNA) y RNAs nucleares pequeños (snRNA). Estos RNAs participan como guías en el proceso de maduración de mRNA y rRNA (Bratkovič y cols., 2020; Valadkhan, 2013). Los lncRNA, por su parte, actúan como guías para facilitar la interacción de distintas moléculas tanto en el citoplasma, como dentro del núcleo. De hecho, son considerados parte del sistema de andamiaje nuclear mediando interacciones DNA-DNA, acercando por ejemplo elementos regulatorios como *enhancers* o *silencers* al promotor que regulan; así como interacciones Proteína-DNA, guiando elementos *trans* regulatorios a sus elementos correspondientes en *cis*. Además de esta función, se ha descrito que actúan como señuelos de miRNAs, hibridando con ellos e impidiendo de esta forma que los miRNAs silencien sus genes blanco (Marchese y cols., 2017).



3.8. Estructura de cromatina y transcripción

El DNA dentro del núcleo se encuentra empaquetado, formando un complejo en conjunto a distintas proteínas, conocido como cromatina (Kornberg y Lorch, 1999). La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, y está conformado por un octámero de histonas, proteínas altamente conservadas, sobre el que se enrollan aproximadamente 147pb de DNA (Richmond y Davey, 2003). Las histonas base se denominan H2A, H2B, H3 y H4. Cada una de ellas posee un dominio conocido como cola de histona en su extremo N-terminal, los

que son fundamentales para el plegamiento de la cromatina, mediando la interacción entre nucleosomas (Allan y cols., 1982; Garcia-Ramirez y cols., 1992). Esto influye en el grado de compactación de la cromatina, la que puede estar en una conformación más relajada, o más compacta. Entre los factores que regulan el grado de compactación de la cromatina se encuentran los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP y las modificaciones post-traduccionales de las colas de histonas, o marcas de histonas, que son parte de los mecanismos epigenéticos de regulación de expresión génica (Bannister y Kouzarides, 2011; Pandey, 2016).

Los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP modulan el grado de compactación de la cromatina a través de la regulación del posicionamiento de nucleosomas a lo largo del genoma. Se agrupan en cuatro familias: SWI/SNF, ISWI, INO80 y CHD (Pandey, 2016). Cada familia posee características distintivas:

- Los complejos SWI/SNF se caracterizan por poseer dominios bromo (Chatterjee y cols., 2010).
- Los complejos ISWI se caracterizan por poseer dominios SANT y SLIDE (Chen y Shen, 2010).
- Los complejos INO80 se caracterizan porque su dominio ATPasa está dividido en dos segmentos (Chen y Shen, 2010).

- Los complejos CHD se caracterizan por poseer dominios cromo (Marfella e Imbalzano, 2007).

En promotores, el posicionamiento de nucleosomas puede facilitar o impedir el acceso de factores de transcripción a sus sitios de unión en el ADN, por lo que los complejos remodeladores de la cromatina tienen un papel fundamental en la regulación de la transcripción (Eberharter y Becker, 2004; Pandey, 2016). Pese a sus diferencias, todos los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP pueden ser tanto activadores, como represores transcripcionales, dependiendo de la interacción que tengan con otros elementos regulatorios de la transcripción, como por ejemplo las modificaciones post-traduccionales de histonas (Swygert y Peterson, 2014).

La presencia de distintas marcas de histonas en promotores, como por ejemplo la trimetilación de lisina 4 de histona H3 (H3K4me3) y la acetilación de lisina 27 de histona H3 (H3K27ac), se asocia con la actividad transcripcional de los genes que regulan (Karlić y cols., 2010). Esto se debe a que la conformación de la cromatina determina la accesibilidad de sitios de unión para factores de transcripción (Liscovitch-Brauer y cols., 2021; Todeschini y cols., 2014). De hecho, se ha descrito que una característica de promotores de genes activos es la presencia de HS DNasal (Mercer y cols., 2013), lo cual es un reflejo de que en esas regiones la cromatina se encuentra en una conformación más relajada, y, por lo tanto, más accesible.

3.9. Regiones de quiebre cromosomal en *RUNX1*: promotor putativo

Dado que una conformación relajada de la cromatina facilita la interacción del DNA con otras moléculas, la presencia de HS DNasal ha sido utilizada como un indicador para la identificación de elementos regulatorios de la transcripción en el genoma (Lu y Richardson, 2004; Mercer y cols., 2013; Tanaka y cols., 1998). En ese sentido, en nuestro laboratorio se ha explorado previamente la posibilidad de la existencia de elementos regulatorios en el intrón 5 del gen *RUNX1*. Análisis de datos de CHIP-seq de una línea celular hematopoyética mostraron la presencia de marcas epigenéticas asociadas a elementos regulatorios de la transcripción, en el intrón 5 del gen *RUNX1*, en particular en la región BCR3. Más aún, el clonamiento de un fragmento de la región BCR3 en el vector pGL3-Basic, que no posee promotor, mostró que esta región es capaz de modular la transcripción del gen reportero contenido en el vector de forma orientación-dependiente (Tesis de Magíster Marcela Hinojosa), lo que sugiere que se trataría de un promotor putativo. Tomando en cuenta lo anterior, surgen las preguntas: ¿Es activo el promotor putativo identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*? Y ¿Se relacionará la actividad de este promotor con la susceptibilidad de la región BCR3 a sufrir quiebres de doble hebra de DNA? En ese sentido, es posible que la actividad transcripcional de este promotor influya en la susceptibilidad a daño de quiebre de doble hebra de DNA que presenta la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*.

4. Hipótesis

La actividad transcripcional del promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* influye en la susceptibilidad de esa región a daño por tratamiento con etopósido en líneas celulares.



5.1. Objetivo General

Evaluar el estado de actividad transcripcional del promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* y su correlación con daño por tratamiento con etopósido en líneas celulares.

5.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar el promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* y el transcrito de RNA que genera.
2. Determinar el perfil de expresión del transcrito de RNA originado en la región BCR3 y evaluar su relación con la expresión del gen *RUNX1* en distintos tipos celulares.
3. Analizar la generación de daño de corte de doble hebra de DNA inducido por tratamiento con etopósido en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* y su relación con el estado de actividad transcripcional del promotor identificado en esa región en distintos tipos celulares.

6. Materiales y Métodos

6.1. Análisis de datos de DNase-seq y CHIP-seq de H3K4me3. Se analizaron datos de DNase-seq y CHIP-seq, disponibles en el servidor del proyecto ENCODE (<https://genome.ucsc.edu/encode/dataMatrix/encodeDataMatrixHuman.html>), para evaluar la presencia de hipersensibilidad a DNasaI y de la marca epigenética H3K4me3 en cuatro regiones genómicas: 1.- el intrón 5 del gen *RUNX1*; 2.- una región alrededor del TSS del gen *SNRPD3*; 3.- una región sin genes del cromosoma 1 de 25kb seleccionada al azar; y 4.- la región M-BCR del gen *BCR*. Las coordenadas de estas regiones fueron obtenidas del proyecto ENSEMBL (<http://grch37.ensembl.org/index.html>) (Tabla 1), considerando la versión del genoma humano hg19 para coincidir con la usada en ENCODE, y cada región fue subdividida en módulos de 2,5kb. En total, se consideraron 51 tipos celulares que tenían datos de DNase-seq y CHIP-seq de H3K4me3. La presencia de hipersensibilidad a DNasaI y de la marca epigenética H3K4me3 fue evaluada de forma visual, usando el UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>), contando el número de tipos celulares que presentaban, por lo menos, una señal de *hotspot* de hipersensibilidad a DNasaI o H3K4me3.

6.2. Predicción de sitios de inicio de transcripción con software YAPP. La identificación de elementos de promotor basal se realizó usando la herramienta

Región analizada	Cromosoma	Coordenadas (hg19)
Intrón 5 del gen <i>RUNX1</i>	21	36,206,899-36,231,770
Región alrededor del TSS del gen <i>SNRPD3</i>	22	24,946,471-24,956,470
Región sin genes del cromosoma 1	1	189,079,068-189,104,067
Región M-BCR del gen <i>BCR</i>	22	23,630,284-23,637,342



Tabla 1. Coordenadas genómicas de las regiones analizadas. Se indica el cromosoma en el que están localizadas las cuatro regiones que se consideraron en los análisis, y las coordenadas correspondientes a la versión del genoma humano hg19.

en línea YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor (<http://www.bioinformatics.org/yapp/cgi-bin/yapp.cgi>) en tres regiones: 1.- el intrón 5 del gen *RUNX1*; 2.- una región alrededor del TSS del gen *SNRPD3*; y 3.- una región sin genes del cromosoma 1 seleccionada al azar. Las coordenadas de estas regiones fueron obtenidas del proyecto ENSEMBL (<http://grch37.ensembl.org/index.html>), y las secuencias del sitio web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las tres secuencias fueron enviadas como *input*, considerando un puntaje de corte de 0,99.

6.3. Análisis de datos de CAGE. Se analizaron datos procesados de experimentos de CAGE disponibles en el servidor del proyecto ENCODE (<https://genome.ucsc.edu/encode/dataMatrix/encodeDataMatrixHuman.html>), para evaluar la presencia de TSS identificados usando Modelos Ocultos de Markov (HMM), basados en datos crudos de CAGE, en tres regiones: 1.- el intrón 5 del gen *RUNX1*; 2.- una región alrededor del TSS del gen *SNRPD3*; y 3.- una región sin genes del cromosoma 1 seleccionada al azar. Las coordenadas de estas regiones fueron obtenidas del proyecto ENSEMBL (<http://grch37.ensembl.org/index.html>), considerando la versión del genoma humano hg19 para coincidir con la usada en ENCODE, y cada región fue subdividida en módulos de 2,5kb. Se consideraron los 35 tipos celulares que tenían datos de CAGE. La presencia de TSSs en cada módulo fue evaluada de forma visual, usando el UCSC Genome Browser ([27](https://genome.ucsc.edu/cgi-</p></div><div data-bbox=)

bin/hgTracks), contando el número de tipos celulares que presentaban TSSs, y clasificándolos de acuerdo a su orientación de transcripción.

6.4. Análisis de datos de EST. Se analizaron datos de EST, disponibles en el servidor del proyecto ENCODE (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>), para identificar ESTs dentro del intrón 5 del gen *RUNX1*. Las coordenadas genómicas de esta región fueron obtenidas del proyecto ENSEMBL (<http://grch37.ensembl.org/index.html>), considerando la versión del genoma humano hg19 para coincidir con la usada en ENCODE. Los 53 ESTs encontrados fueron clasificados de acuerdo a su orientación de transcripción (es decir, en el mismo sentido, o antisentido) respecto al mRNA del gen *RUNX1*. Luego, se seleccionaron las siguientes secuencias antisentido: BU689215, BU684610, AW204843, BX111268, AI863417, AI798118, AI810863 y AA984901, y con ellas se realizó un alineamiento múltiple para obtener una secuencia consenso. La secuencia obtenida fue utilizada como *input* en la herramienta en línea Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastnyPAGE_TYPE=BlastSearchyLINK_LOC=blasthome), para así identificar predicciones de RNAs completos. Finalmente, las secuencias de los ncRNAs identificados fueron alineadas con la secuencia del intrón 5 del gen *RUNX1*.

6.5. Cultivo celular. Las células KG-1 fueron cultivadas en medio IMDM, suplementado con 10% FBS, L-glutamina 2Mm y 1% penicilina-estreptomicina; las células K562 y Colo320 fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementado con 10% FBS, L-glutamina 2mM y 1% penicilina-estreptomicina; las células HeLa fueron cultivadas en medio DMEM, suplementado con 10% FBS, L-glutamina 2mM y 1% penicilina-estreptomicina; y las células HUVEC fueron cultivadas en medio de crecimiento de células endoteliales. Todas las células fueron mantenidas a 37°C, con 5% de CO₂.

6.6. Análisis de expresión del nuevo ncRNA. La expresión de RNA en las distintas líneas celulares fue evaluada mediante RT-PCR, usando pares de partidores para detectar los mRNA de los genes *RUNX1* y *SNRPD3*, y otro par de partidores para detectar el nuevo RNA largo no codificante predicho. Primero, se extrajo RNA total usando el kit Purelink™ RNA mini (Ambion), y se cuantificó usando el kit Qubit® RNA BR Assay (Invitrogen) en un fluorímetro Qubit® 2.0. Luego, se convirtieron 4µg de RNA total a cDNA usando el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al finalizar, cada reacción de conversión fue diluida 1:25 (KG-1, K562, Colo320 y HeLa) o 1:5-1:10-1:20 (HUVEC), y 1µL de cada una se usó para realizar PCR, con el siguiente programa: [30s a 95°C - 30s a 58°C - 30s a 72°C] por 28 ciclos. Los pares de partidores que se usaron fueron los siguientes: [ncRNA F: AGC TCG CTG TCC TGT TCA TT; R: AGC TAG CAG

GGC CAG ACA TA] [RUNX1 F: GTC GAA GTG GAA GAG GGA AA; R: CCG ATG TCT TCG AGG TTC TC] [SNRPD3 F: TCT TCC TGC CAA GAT GTC TA; R: TAA CAT GGG TGC GTT CTT C]. Finalmente, los productos de PCR fueron resueltos usando electroforesis en geles de agarosa 1%, teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), un fluoróforo que permite visualizar DNA bajo luz UV.

6.7. Mapeo del intrón 5 del gen *RUNX1* para evaluar localización del nuevo

ncRNA. Para evaluar la localización genómica desde la que se está transcribiendo el nuevo RNA no codificante en las distintas líneas celulares, se realizó RT-PCR usando 15 pares de partidores a lo largo del intrón 5 del gen *RUNX1* (Tabla 2). Primero, se extrajo RNA total usando el kit Purelink™ RNA mini (Ambion), y se cuantificó usando el kit Qubit® RNA BR Assay (Invitrogen) en un fluorímetro Qubit® 2.0. Luego, se convirtieron 4µg de RNA total a cDNA usando el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al finalizar, cada reacción de conversión fue diluida 1:25 y 1µL de cada una se usó para realizar PCR, con el siguiente programa: [30s a 95°C - 30s a 58°C - 30s a 72°C] por 28 ciclos. Finalmente, los productos de PCR fueron resueltos usando electroforesis en geles de agarosa 1%, teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), un fluoróforo que permite visualizar DNA bajo luz UV.

Par de partidores	Dirección	Secuencia 5'-3'
A	F	AGA GTG GAC CAC AAG GGA GTA A
	R	GAA CTG TAA CCC AGC CTC AGA T
B	F	CTG TGA TCA CGG CAG CTT TTA T
	R	GAA GAG CTC ACA GTC ATT CC
C	F	GTG CAA TAG CCC CAG GTA GA
	R	GGG CAT CCT GAT TTA CAT GC
D	F	GGG ATT ATA GGC ATC CAC CA
	R	CAT ATG ACA TGA TCT CAA CCA A
E	F	AGC AGA GCC CTG TTG CTT T
	R	CCA CTT TAC CCA TCT TTC GTG
F	F	GAC TGA GCC TCT CCA AAA CG
	R	CCA GGG CCC ATG CTA TAC TA
G	F	CTG GGC ACA GAA GTG TTC CT
	R	TGA AGC CAG TTC AGT GAT GC
H	F	AGC TCG CTG TCC TGT TCA TT
	R	AGC TAG CAG GGC CAG ACA TA
I	F	AGC TCG CTG TCC TGT TCA TT
	R	AGC TAG CAG GGC CAG ACA TA
J	F	AAG AGG TCT CCC TCC TCA CA
	R	TCT GAC GCT CTC TCC TGT CA
K	F	CTC CTC TGC CTC CTC ACA GTA T
	R	AGG GAG ACA GCC CTC ATA AAC T
L	F	GTG CCA CTC TCA ACT CAG CA
	R	CAT TGT GAA ACC CCA TCT CC
M	F	GAC TCA GCC TTG GGA TGG TA
	R	TGC ACG AGG TGT CCT AAG AA
N	F	GTC CCA GGG TGA AAT CTT GA
	R	CCC CCG AAT GTT AAA TAG AGG
O	F	GGG AAC AGA GGT TGT GCA AT
	R	AAA CAA CCG TCA CCA GGA AG

Tabla 2. Pares de partidores usados en el mapeo del intrón 5 del gen *RUNX1* para evaluar localización del nuevo ncRNA. Se detallan las secuencias de los 15 pares de partidores utilizados en el análisis.

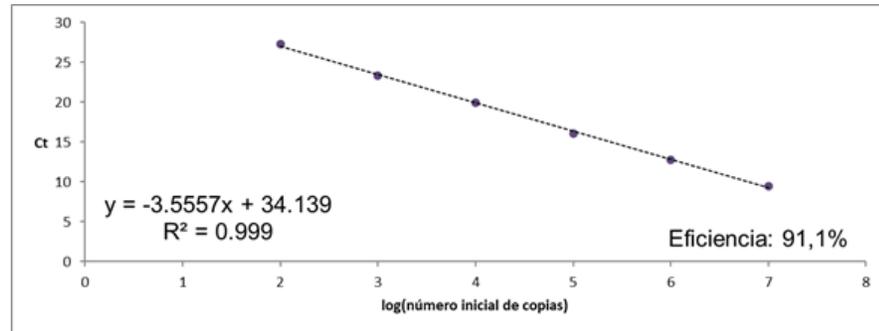
6.8. Tratamiento con etopósido. Células KG-1 y Colo320 fueron tratadas con 18 y 36mg/L de etopósido (Sigma-Aldrich), su vehículo (0,1% DMSO), o bien no tratadas por 0 y 24h a 37°C. Luego de los tiempos indicados, se extrajo DNA genómico usando el kit Genomic DNA from Blood (Macherey-Nagel).

6.9. Pre-tratamiento con flavopiridol seguido de tratamiento con etopósido. Células KG-1 fueron pre-tratadas con 0,5µM flavopiridol (Sigma-Aldrich) o su vehículo (agua) por 1h a 37°C. Pasado ese tiempo, fueron tratadas con 18 y 36mg/L de etopósido (Sigma-Aldrich), su vehículo (0,1% DMSO), o bien no tratadas por 0 y 24h a 37°C. Luego de los tiempos indicados, se extrajo DNA genómico usando el kit Genomic DNA from Blood (Macherey-Nagel); y RNA total usando el kit Purelink™ RNA mini (Ambion). Para diferenciarlas de las células KG-1 tratadas con etopósido descritas en el párrafo anterior, en adelante se les llamará “KG-1 pre-tratadas”.

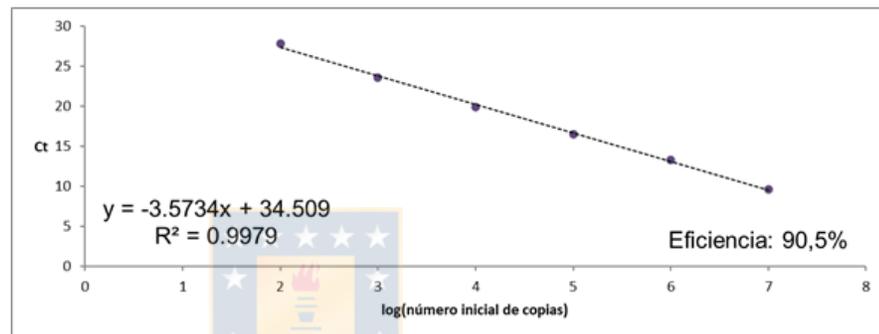
6.10. Análisis de efectividad de inhibición de transcripción. Con el fin de evaluar la efectividad de la inhibición de transcripción en células KG-1 pre-tratadas, se determinó el número inicial de copias de mRNA de los genes *ACTB* y *RUNX1*; y del ncRNA de interés. Para ello, primero se hizo una curva estándar en base a número inicial de copia para cada RNA usando RNA total de células KG-1 no tratadas. Se convirtieron 4µg de RNA total a cDNA usando el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), de acuerdo a

las instrucciones del fabricante. Al finalizar, cada reacción de conversión fue diluida 1:25 y 1µL de cada una de estas diluciones se usó para realizar PCR, con el siguiente programa: [30s a 95°C - 30s a 58°C - 30s a 72°C] por 28 ciclos. Los partidores usados fueron los siguientes: [ACTB F: GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT T; R: GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG] [RUNX1 F: GTC GAA GTG GAA GAG GGA AA; R: CCG ATG TCT TCG AGG TTC TC] [ncRNA F: AGC TCG CTG TCC TGT TCA TT; R: AGC TAG CAG GGC CAG ACA TA]. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit NucleoSpin PCR Cleanup (Macherey-Nagel) y cuantificados usando el kit Qubit® dsDNA BR (Invitrogen) en un fluorímetro Qubit® 2.0. Luego, se hizo una dilución seriada de 10⁷ a 10² copias/µL se usó 1µL por reacción de qPCR con el siguiente programa: [30s a 95°C - 30s a 58°C - 30s a 72°C] por 28 ciclos. Con los datos de Ct se hicieron tres curvas estándar (*ACTB*, *RUNX1* y ncRNA), obteniendo una ecuación de la recta para cada una de ellas (Figura 5). Finalmente, se convirtió el RNA total de células KG-1 pre-tratadas (0 y 24h) y se realizó qPCR de la misma forma antes descrita. Con los datos de Ct de células KG-1 pre-tratadas y las ecuaciones de las curvas estándar, se determinó el número inicial de copias de los genes *ACTB* y *RUNX1*; y del ncRNA de interés. La significancia estadística se determinó con el test t comparando el valor obtenido a las 0h en cada condición, con su valor correspondiente a las 24h, para los tres RNAs analizados (n=3).

ACTB



RUNX1



ARNnc

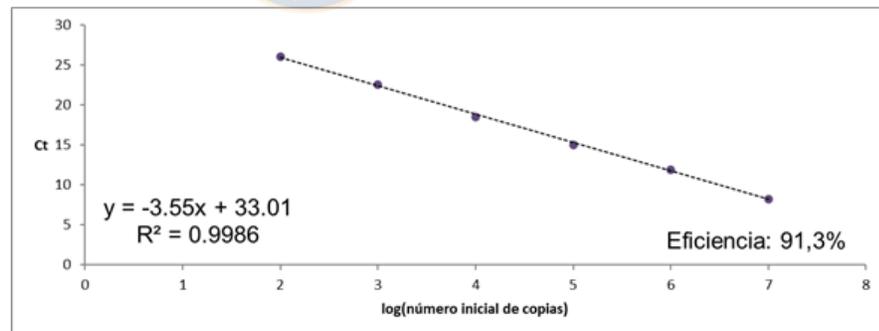


Figura 5. Curvas estándar en base a número inicial de copias para el análisis de efectividad de inhibición de transcripción con flavopiridol. Se obtuvieron curvas estándar en base a número inicial de copias para los genes *ACTB*, *RUNX1* y el nuevo ncRNA. Se determinó que la eficiencia de los tres pares de partidores está dentro del rango recomendado para análisis (90-110%). La ecuación de la recta asociada a cada una de las curvas fue utilizada en el análisis de efectividad de inhibición de transcripción.

6.11. Análisis de generación de daño de quiebre de doble hebra del DNA en región BCR3 por tratamiento con etopósido. Se realizó qPCR para detectar daño en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*, utilizando un par de partidores que amplifican un fragmento de esa región [F: CTT CCT GGT GAC GGT TGT TT; R: GTC CCA TTT CCA GGT ACA CG]. Como control, se consideró la amplificación de un fragmento del intrón 4 del gen *RUNX1* [F: GGC AAC AGA AGA ATC ACA CG; R: CCA TTG TCC CAG TCC TGA GT]. En cada reacción de qPCR, se usó 1ng de DNA genómico de células KG-1, Colo320 y KG-1 pre-tratadas, con el siguiente programa: [30s a 95°C – 30s a 64°C – 30s a 72°C] por 30 ciclos. Los datos de Ct obtenidos fueron procesados usando el método del $\Delta\Delta Ct$, comparando la amplificación del fragmento de la región BCR3, con la amplificación del fragmento control del intrón 4 del gen *RUNX1*. La significancia estadística fue evaluada con el test Mann-Whitney (n=4 para KG-1 y Colo320; n=3 para KG-1 pre-tratadas).

6.12. Cálculo de concentración de etopósido en tratamientos. En contexto clínico, se recomienda que la dosis diaria de etopósido para un paciente sean 50-100mg de etopósido por m² de área corporal (Reyhanoglu y Tadi, 2020). Para el cálculo de área corporal se utiliza la fórmula de Mosteller:

$$\text{Área corporal (m}^2\text{)} = \sqrt{\frac{\text{Estatura (cm)} \times \text{Peso (kg)}}{3600}}$$

Como variables se consideraron una estatura promedio de 171cm (Roser y cols., 2013) y un peso normal para dicha estatura de 68kg, obteniéndose un área corporal promedio aproximada de 1,8m². Por lo tanto, una dosis diaria de etopósido representativa para un adulto estaría entre 90-180mg, los que administrados de forma intravenosa en 5L de sangre corresponden a una concentración entre 18-36mg/l de etopósido. Estas concentraciones fueron las usadas en el análisis de generación de daño de quiebre de doble hebra del DNA en región BCR3 por tratamiento con etopósido.



7. Resultados

7.1. Las regiones BCR2 y BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* presentan características similares al promotor de un gen de referencia.

Considerando los datos previos obtenidos en el laboratorio, que sugieren la existencia de un promotor putativo en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* (Tesis de Magíster Marcela Hinojosa), se decidió caracterizar el intrón 5 del gen *RUNX1* evaluando la presencia y localización de *hotspots* de HS DNasal (Tabla 3) y la marca epigenética H3K4me3 (Tabla 4), en base a datos de DNase-seq y ChIP-seq de 51 tipos celulares disponibles en el servidor del proyecto ENCODE. La HS DNasal es un indicador general de accesibilidad de cromatina, y ha sido utilizado como método de identificación de regiones regulatorias potenciales en el genoma (Lu y Richardson, 2004; Mercer y cols., 2013; Tanaka y cols., 1998). La marca epigenética H3K4me3, por su parte, ha sido asociada a regiones promotoras, más específicamente alrededor de TSSs (Barski y cols., 2007; Schmid y Bucher, 2007). Sorprendentemente, los resultados muestran que en el intrón 5 del gen *RUNX1* existe presencia de *hotspots* tanto de HS DNasal, como de H3K4me3, en todos los módulos en los que fue subdividida la región. Destacan los módulos VI, IX y X, que colocalizan con las regiones BCR2 y BCR3, en los que la combinación de HS DNasal y H3K4me3 está presente en más de 35 tipos celulares (Figura 6). Como comparación, en el promotor del gen de referencia *SNRPD3* la combinación de

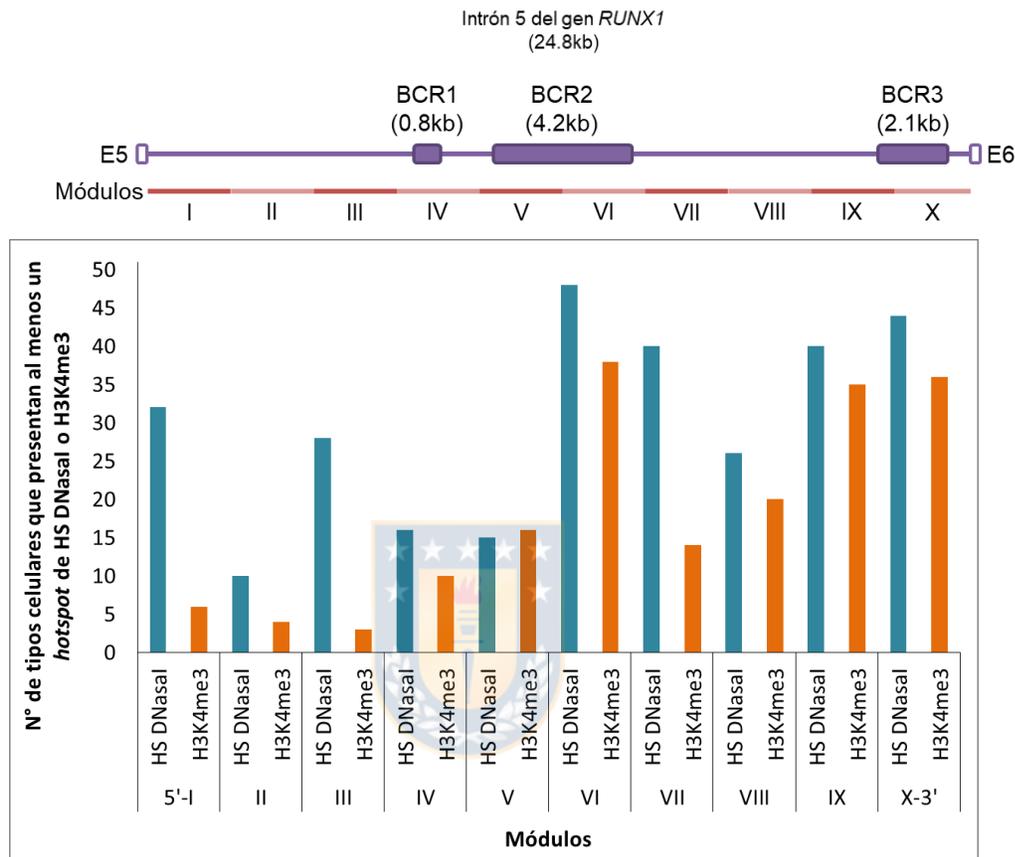


Figura 6. Las regiones BCR2 y BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* presentan HS DNaseI y H3K4me3. Se analizó la presencia de *hotspots* de HS DNaseI y H3K4me3 en 51 tipos celulares que tenían datos de DNase-seq y CHIP-seq de H3K4me3, disponibles en el servidor del proyecto ENCODE. Las barras corresponden al número de tipos celulares que presentan al menos un *hotspot* de HS DNaseI (azul) o H3K4me3 (naranja) en cada uno de los módulos de 2,5kb (I a X) en que se subdividió el intrón 5 del gen *RUNX1*.

HS DNasal y H3K4me3 está presente alrededor del TSS del gen en todos los tipos celulares analizados (Figura 7, panel izquierdo); mientras que en una región sin genes del cromosoma 1 existe escasa presencia tanto de HS DNasal como de H3K4me3 (Figura 7, panel derecho). Para evaluar la posibilidad que la presencia de HS DNasal y H3K4me3 sea una característica propia de regiones de quiebre cromosomal, se analizó también la región M-BCR del gen *BCR*, conocido por participar en la formación del cromosoma filadelfia, la translocación más frecuente en pacientes de leucemia mieloide crónica (Hagemeijer, 1987; Krishna Chandran y cols., 2019). En este caso, si bien se encontró presencia de HS DNasal en esta región, en la mayor parte de los tipos celulares existía escasa presencia de H3K4me3 (Figura 8). Estos resultados indican que la marca epigenética H3K4me3 no es una característica común de las regiones de quiebre cromosomal y sugiere la presencia de un promotor putativo tanto en la región BCR3, como BCR2, del intrón 5 del gen *RUNX1*.

A continuación, con la finalidad de determinar si los promotores putativos encontrados son funcionales, se evaluó la presencia de posibles TSSs en el intrón 5 del gen *RUNX1* usando dos estrategias. En la primera se realizó una predicción *in silico*, mediante la herramienta en línea YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor. Esta herramienta identifica secuencias de elementos de promotor basal en regiones del genoma, los que indican potenciales sitios de unión de factores de inicio de transcripción. Por otro lado, en la segunda estrategia se evaluó la presencia de TSSs identificados mediante modelos

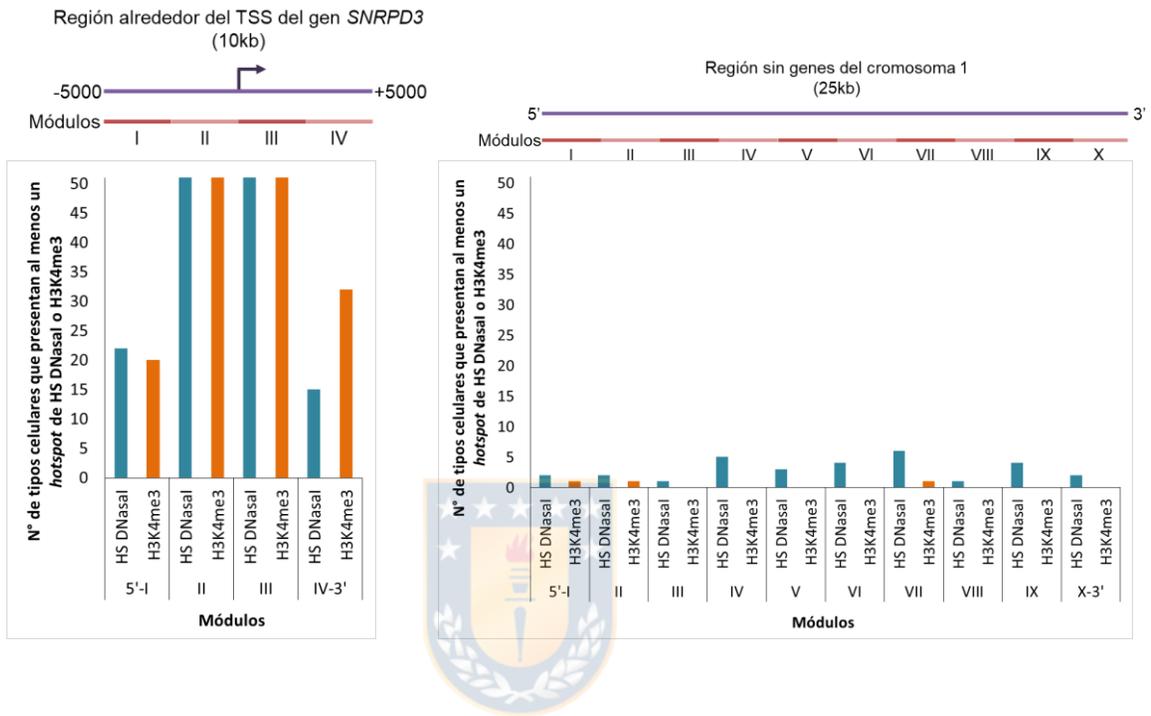


Figura 7. La presencia de HS DNasal y H3K4me3 es una característica de regiones promotoras. Se analizó la presencia de *hotspots* de HS DNasal y H3K4me3 en 51 tipos celulares que tenían datos de DNase-seq y ChIP-seq de H3K4me3, disponibles en el servidor del proyecto ENCODE. Las barras corresponden al número de tipos celulares que presentan al menos un *hotspot* de HS DNasal (azul) o H3K4me3 (naranja) en cada uno de los módulos de 2,5kb en que se subdividió una región de 10kb alrededor del TSS del gen de referencia *SNRPD3* (I a IV) (panel izquierdo); y una región de 25kb sin genes del cromosoma 1 (I a X) (panel derecho).

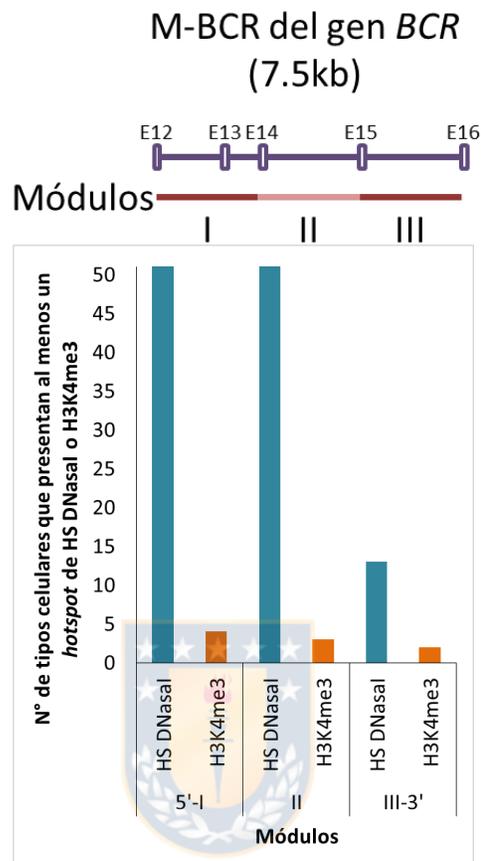


Figura 8. La presencia de H3K4me3 no es una característica común de las regiones de quiebre cromosomal. Se analizó la presencia de *hotspots* de HS DNasal y H3K4me3 en 51 tipos celulares que tenían datos de DNasa-seq y ChIP-seq de H3K4me3, disponibles en el servidor del proyecto ENCODE. Las barras corresponden al número de tipos celulares que presentan al menos un *hotspot* de HS DNasal (azul) o H3K4me3 (naranja) en cada uno de los módulos de 2,5kb (I a III) en que se subdividió la región M-BCR del gen *BCR*.

ocultos de Markov (HMM) en 35 tipos celulares, en base a datos crudos de CAGE, disponibles en el servidor del proyecto ENCODE (Tabla 5). Para la predicción *in silico*, solo se consideró el elemento de promotor basal iniciador (INR), ya que está presente en el TSS de aproximadamente el 50% de los genes humanos (Yang y cols., 2007). Dentro del intrón 5 del gen *RUNX1* se encontraron 25 INR; 7 de ellos en la región BCR2 (4,2kb), y 5 en la región BCR3 (2,1kb) (Figura 9, panel superior). Comparativamente, una región de 10kb alrededor del TSS del gen de referencia *SNRPD3*, donde se esperaba al menos 1 elemento de promotor basal, tiene 9 INR (Figura 9, panel central); y una región sin genes del cromosoma 1 de 25kb, el mismo tamaño que el intrón 5 del gen *RUNX1*, tiene solo 8 INR (Figura 9, panel inferior). Un análisis cuantitativo en estas regiones muestra que la densidad de INR en las regiones BCR2 y BCR3, es similar a lo que se observa en el promotor del gen *SNRPD3* (Figura 10). Por otra parte, el método en que se usaron datos de CAGE mostró que existen TSSs identificados en diferentes tipos celulares a lo largo del intrón 5 del gen *RUNX1*, tanto en la hebra negativa (en el mismo sentido que el mRNA del gen *RUNX1*), como en la hebra positiva (antisentido respecto al mRNA del gen *RUNX1*). Interesantemente, en el módulo X, que colocaliza con la región BCR3, 10 tipos celulares poseen TSSs identificados en la hebra positiva (Figura 11). En comparación, en la región de 10kb alrededor del TSS del gen *SNRPD3*, el módulo III presentó TSSs identificados en los 35 tipos celulares, concordando con la región en que se encuentra el TSS real de dicho gen (Figura 12, panel

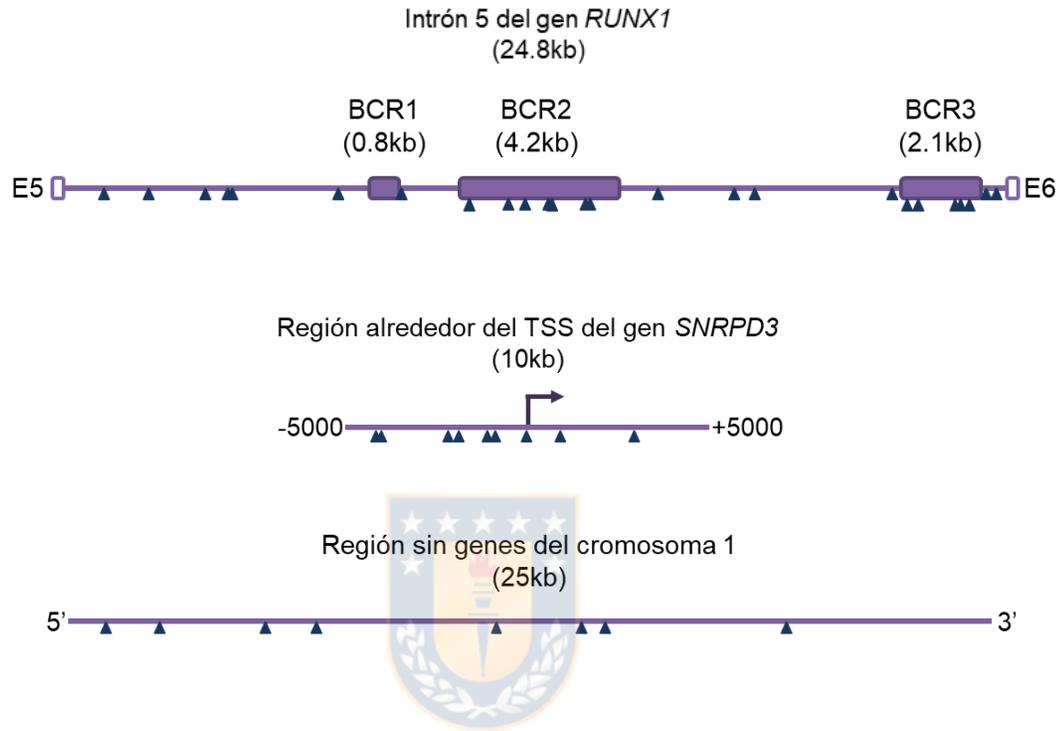


Figura 9. Los promotores putativos identificados en las regiones BCR2 y BCR3 presentan potenciales TSSs. Las puntas de flecha corresponden a elementos de promotor basal INR, identificados *in silico* mediante una lectura de secuencia realizada con el *software* en línea YAPP en el intrón 5 del gen *RUNX1* (panel superior); una región de 10kb alrededor del TSS del gen *SNRPD3* (panel central); y una región de 25kb sin genes del cromosoma 1 (panel inferior).

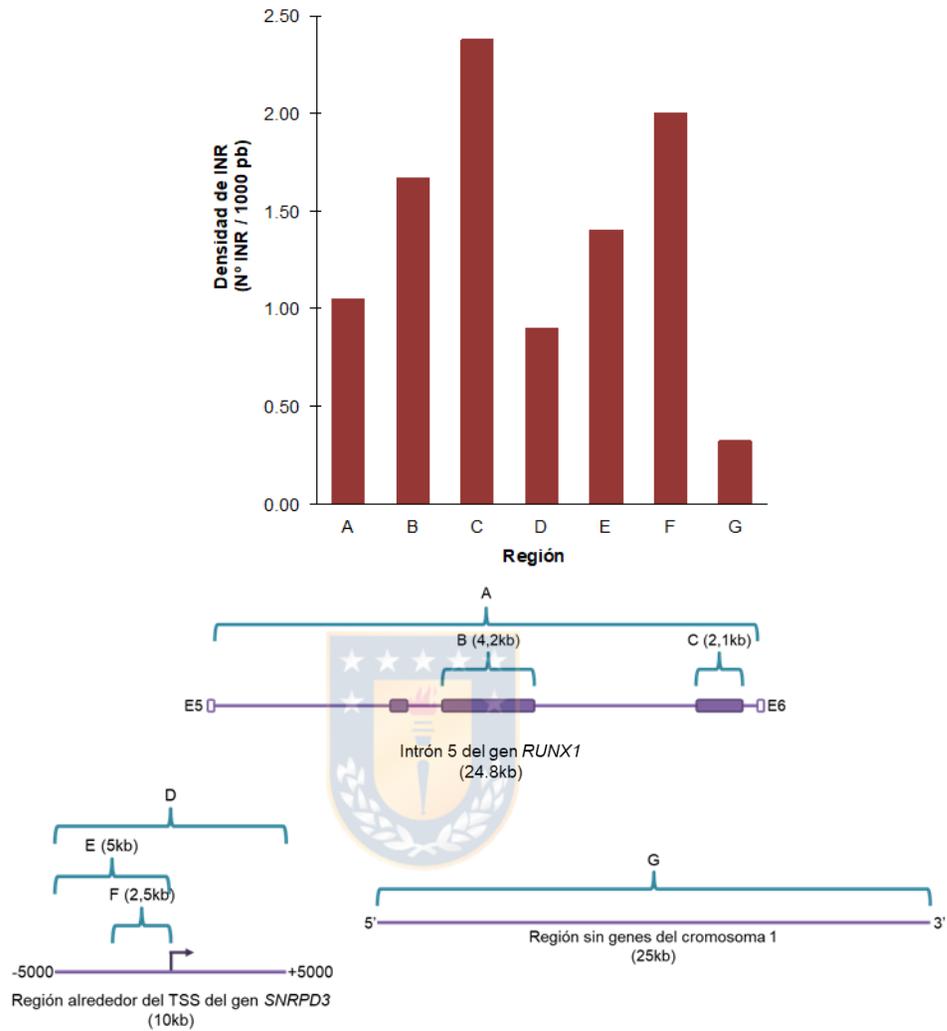


Figura 10. La densidad de INR presente en las regiones BCR2 y BCR3 es comparable a un promotor conocido. Las barras representan la cantidad de INR identificados mediante el software en línea YAPP por cada 1000pb en cada una de las regiones indicadas (A-G). Las regiones BCR2 y BCR3 corresponden a las letras B y C, respectivamente.

Tipo celular Hebra	Intrón 5 del gen RUVK1										Región alrededor del TSS del gen SVEP23							Región sin genes del cromosoma 1							
	5-1	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X-3	5-1	II	III	IV-3	5-1	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X-3	
A549	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
AG04460																									
BJ																									
CD20+																									
CD34+ Mobilized																									
GM12878																									
H1hESC																									
H9aF																									
H9aEC																									
H9C																									
HeLa-S3																									
HepG2																									
HFDFC																									
HMEFC																									
IMSC-AT																									
IMSC-BM																									
IMSC-UC																									
HOB																									
HPC-PL																									
HPEFC																									
HSaVEC																									
HUVEC																									
HVMF																									
HVP																									
IMR90																									
K562																									
MCF-7																									
Monocytes-CD14+																									
NDF																									
N-EK																									
NHEK1M2																									
NHEK1M2																									
SAMC																									
SKNSH																									
SKNSHRA																									

Tabla 5. Análisis de TSSs identificados en base a datos de CAGE. Cada fila corresponde a un tipo celular de los 35 en total y cada columna corresponde a uno de los módulos de 2,5kb en que subdividieron las 3 regiones analizadas detalladas en la **Tabla 1**. El color blanco indica 0 TSS; verde claro indica 1 TSS predicho; y verde oscuro indica 2 o más TSSs.

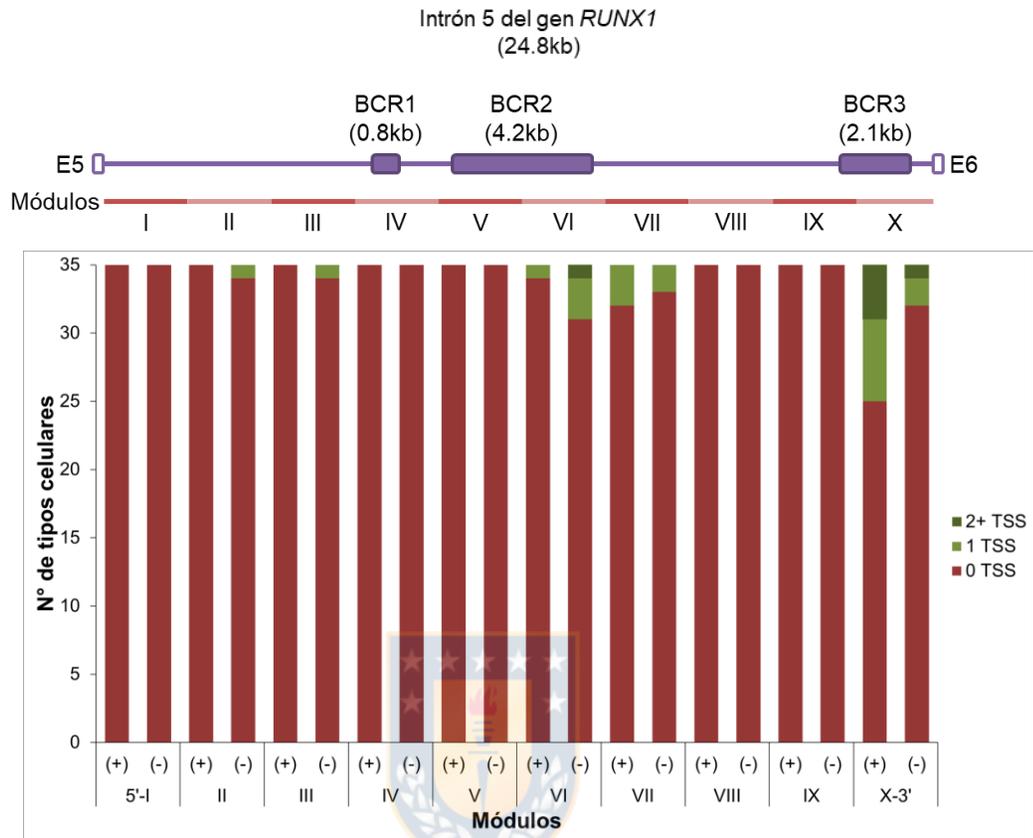


Figura 11. El promotor putativo en la región BCR3 presenta la mayor cantidad de TSS antisentido respecto al mRNA del gen *RUNX1*. Las barras corresponden al número total de tipos celulares que presentaban TSS en la hebra positiva o negativa, identificados mediante HMM usando datos CAGE, en cada uno de los módulos de 2,5kb (I a X) en que se subdividió el intrón 5 del gen *RUNX1*. Se consideraron los 35 tipos celulares que tenían datos de CAGE, disponibles en el servidor del proyecto ENCODE.

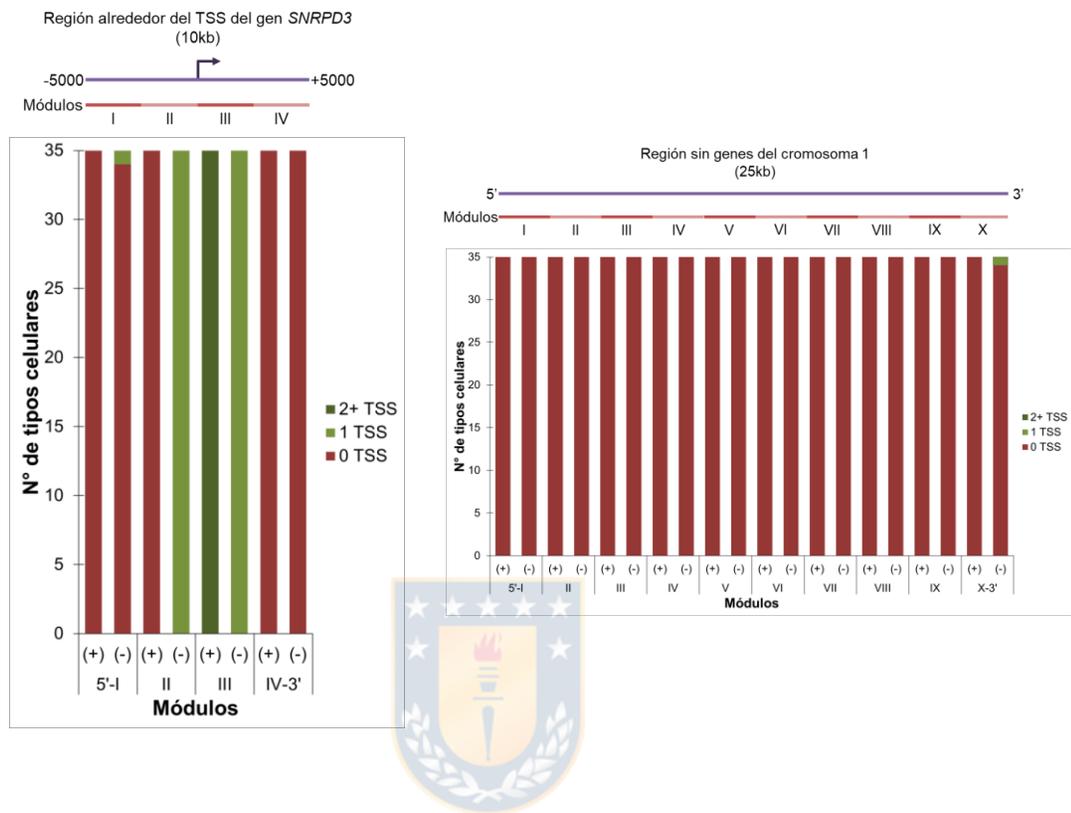


Figura 12. Los TSSs identificados en base a datos de CAGE coinciden con el TSS real de un gen de referencia. Las barras corresponden al número total de tipos celulares que presentaban TSSs en la hebra positiva o negativa, identificados mediante HMM usando datos CAGE, en cada uno de los módulos de 2,5kb en que se subdividió una región de 10kb alrededor del TSS del gen de referencia *SNRPD3* (I a IV) (panel izquierdo); y una región de 25kb sin genes del cromosoma 1 (I a X) (panel derecho). Se consideraron los 35 tipos celulares que tenían datos de CAGE, disponibles en el servidor del proyecto ENCODE.

izquierdo); y en la región sin genes del cromosoma 1 (25kb), solo se encontró 1 predicción en un solo tipo celular (Figura 12, panel derecho). Por consiguiente, la presencia de TSSs identificados en el intrón 5 del gen *RUNX1* sugiere la existencia de transcritos de RNA originados en los promotores putativos ubicados en las regiones BCR2 y BCR3.

7.2. El promotor putativo de la región BCR3 da origen a un nuevo RNA largo no codificante.

Tomando en consideración la información anterior, se decidió identificar transcritos de RNA completos que se pudieran estar originando en las regiones BCR2 o BCR3. Para ello se analizaron datos de EST, disponibles en el servidor del proyecto ENCODE. En total se encontraron 53 EST en el intrón 5 del gen *RUNX1*, 28 de la hebra negativa (en el mismo sentido que el mRNA de *RUNX1*) y 25 de la hebra positiva (antisentido respecto al mRNA de *RUNX1*) (Tabla 6). Luego, se seleccionó un grupo de EST antisentido, que colocalizaban con la región BCR2, y se realizó un alineamiento múltiple para obtener una secuencia común entre ellos (Figura 13). Esta secuencia obtenida del alineamiento de ESTs se usó como *input* en la herramienta en línea BLASTn, encontrando que presentaba similitud con una secuencia correspondiente a un lncRNA no caracterizado, transcrito en orientación antisentido respecto al gen *RUNX1*, y que presenta poli(A). Al alinear esta secuencia con el intrón 5 del gen *RUNX1*, se determinó que su promotor se encontraba en la región BCR3

Nº	Código del EST	Orientación de transcripción respecto al gen <i>RUNX1</i>
1	BG954421	Sentido
2	BF821024	Sentido
3	DA167014	Antisentido
4	DA842113	Antisentido
5	DB187324	Antisentido
6	DA034664	Antisentido
7	BU744279	Sentido
8	BF749999	Antisentido
9	BF749766	Sentido
10	CV358744	Sentido
11	CV358662	Sentido
12	BF910744	Sentido
13	BF832792	Sentido
14	L25451	Antisentido
15	DB347703	Sentido
16	DB328483	Sentido
17	AW809470	Antisentido
18	CB250656	Antisentido
19	H54939	Sentido
20	CV425537	Antisentido
21	BE143887	Antisentido
22	BU689215	Antisentido
23	BU684610	Antisentido
24	AW204843	Antisentido
25	BX111268	Antisentido
26	AW839916	Sentido
27	AW516704	Sentido
28	AW276996	Sentido
29	AI863417	Antisentido
30	AI798118	Antisentido
31	AI810863	Antisentido
32	AA984901	Antisentido
33	FN122377	Sentido
34	AA300316	Sentido
35	FN092147	Sentido
36	GD148376	Sentido
37	BF329777	Sentido
38	BF329741	Sentido
39	BF329737	Sentido
40	BF329671	Antisentido
41	BF359278	Antisentido
42	BF329668	Antisentido
43	BE829940	Sentido
44	CV402700	Antisentido
45	CV402728	Antisentido
46	BF370623	Sentido
47	BF772705	Sentido
48	BF889377	Antisentido
49	CN265131	Sentido
50	FN156650	Antisentido
51	BQ423640	Sentido
52	BG982167	Sentido
53	BF326313	Sentido

Tabla 6. ESTs localizados en el intrón 5 del gen *RUNX1*. Se identificaron 53 ESTs en total en el intrón 5 del gen *RUNX1*, y fueron clasificados de acuerdo a su orientación de transcripción respecto del mRNA del gen *RUNX1*.

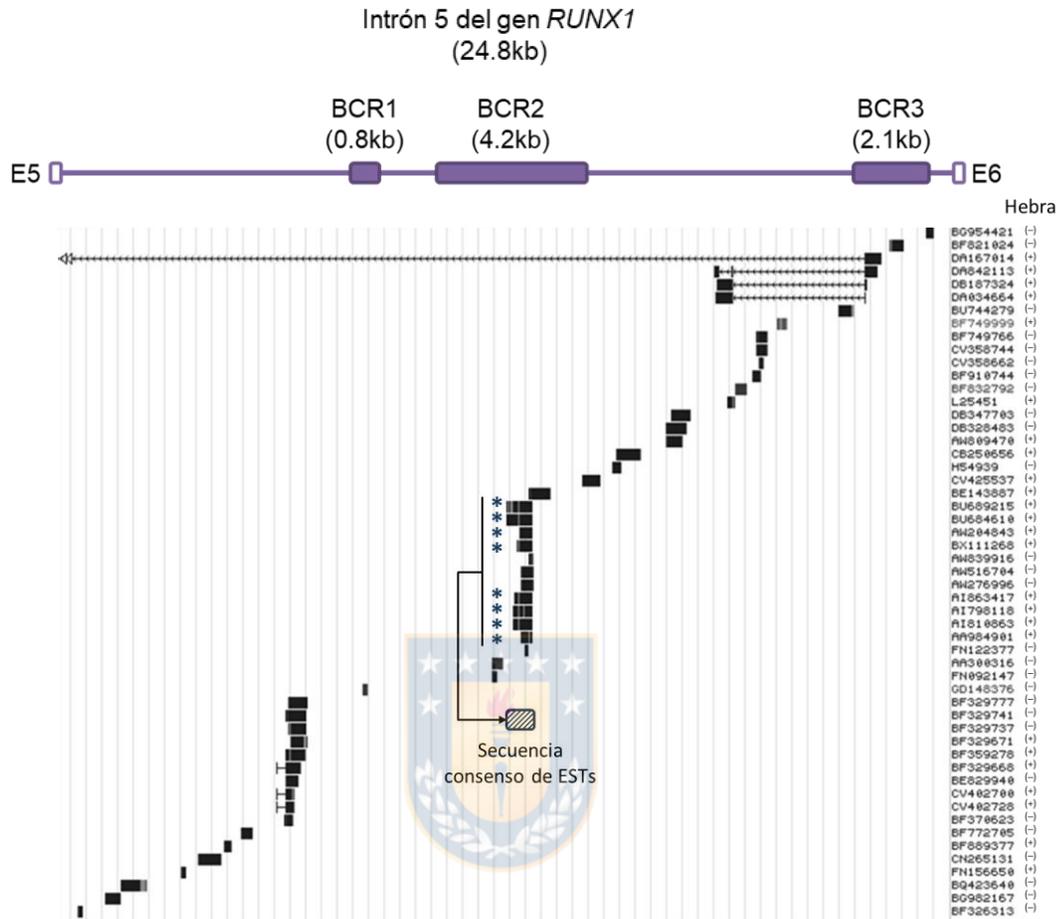


Figura 13. ESTs reportados en el intrón 5 del gen *RUNX1* colocalizan con los promotores putativos identificados. Los rectángulos negros corresponden a ESTs identificados en el intrón 5 del gen *RUNX1*, 28 en la hebra negativa (en el mismo sentido respecto al mRNA de *RUNX1*) y 23 en la hebra positiva (antisentido respecto al mRNA del gen *RUNX1*). Los 8 ESTs antisentido indicados con un * fueron seleccionados para realizar un alineamiento múltiple, con el que se obtuvo una secuencia común entre dichos ESTs.

(Figura 14). En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el promotor identificado en la región BCR3 es funcional.

7.3. La expresión del nuevo lncRNA es independiente de la expresión del gen *RUNX1*.

Con el propósito de determinar si el promotor identificado en la región BCR3 es funcional, se decidió evaluar la expresión del lncRNA no caracterizado identificado previamente (que en adelante llamaremos “nuevo lncRNA”), realizando RT-PCR con RNA proveniente de cuatro líneas celulares, de las cuales tres expresan *RUNX1* (Figura 15B): dos de origen hematopoyético (KG-1 y K562), y una de cáncer de colon (Colo320). La cuarta línea celular utilizada, HeLa, proveniente de cáncer cérvico uterino, no expresa *RUNX1*. Interesantemente, de estas líneas celulares, solo en la línea celular de origen hematopoyético KG-1 se detectó expresión del nuevo lncRNA (Figura 15A). Como control de expresión, se amplificó un fragmento del mRNA del gen de referencia *SNRPD3* (Figura 15C).

Luego, con la finalidad de validar los datos bioinformáticos previamente obtenidos, y determinar si en base a estos se podía predecir la expresión del nuevo lncRNA, se realizó un cruzamiento de los sets de datos de DNase-seq, ChIP-seq de H3K4me3 y CAGE. Los tres sets de datos tenían 12 tipos celulares en común, y de estos, se seleccionó la línea celular HUVEC, ya que en la región BCR3 presenta tanto HS DNasal, como la marca epigenética H3K4me3

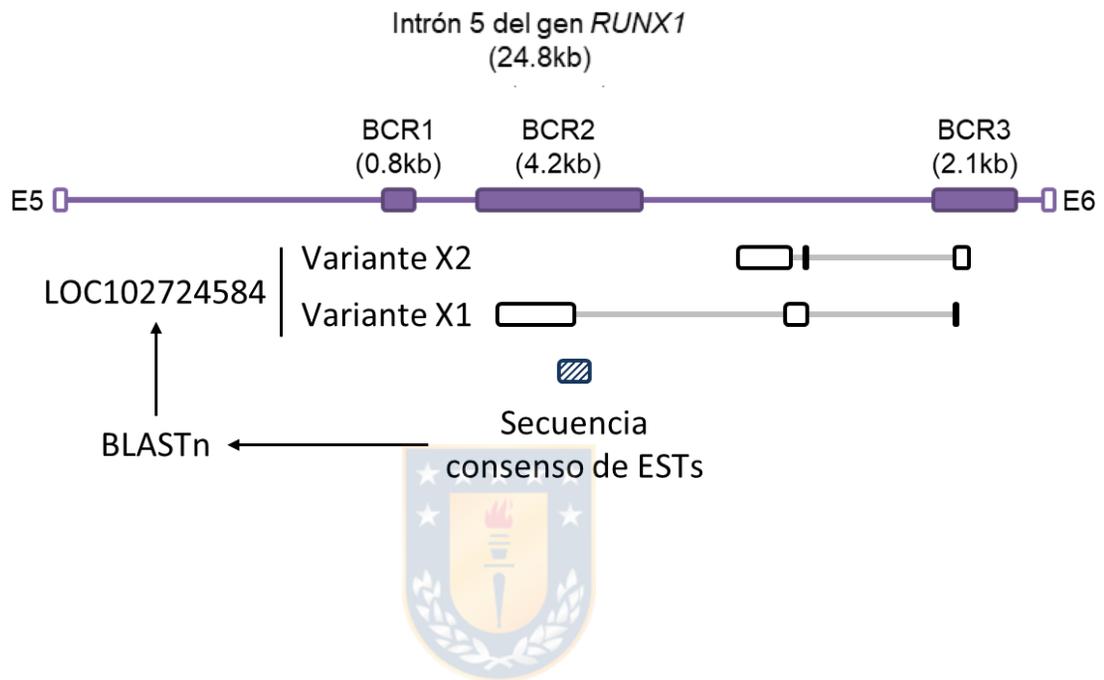


Figura 14. El promotor putativo identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* es funcional. La secuencia consenso de ESTs fue utilizada como *input* en la herramienta en línea BLASTn, y se encontró similitud con una secuencia de RNA predicha no caracterizada: LOC102724584, variante X1. Esta secuencia comparte el mismo código con una variante X2, ambas antisentido respecto al ARNm del gen *RUNX1*.

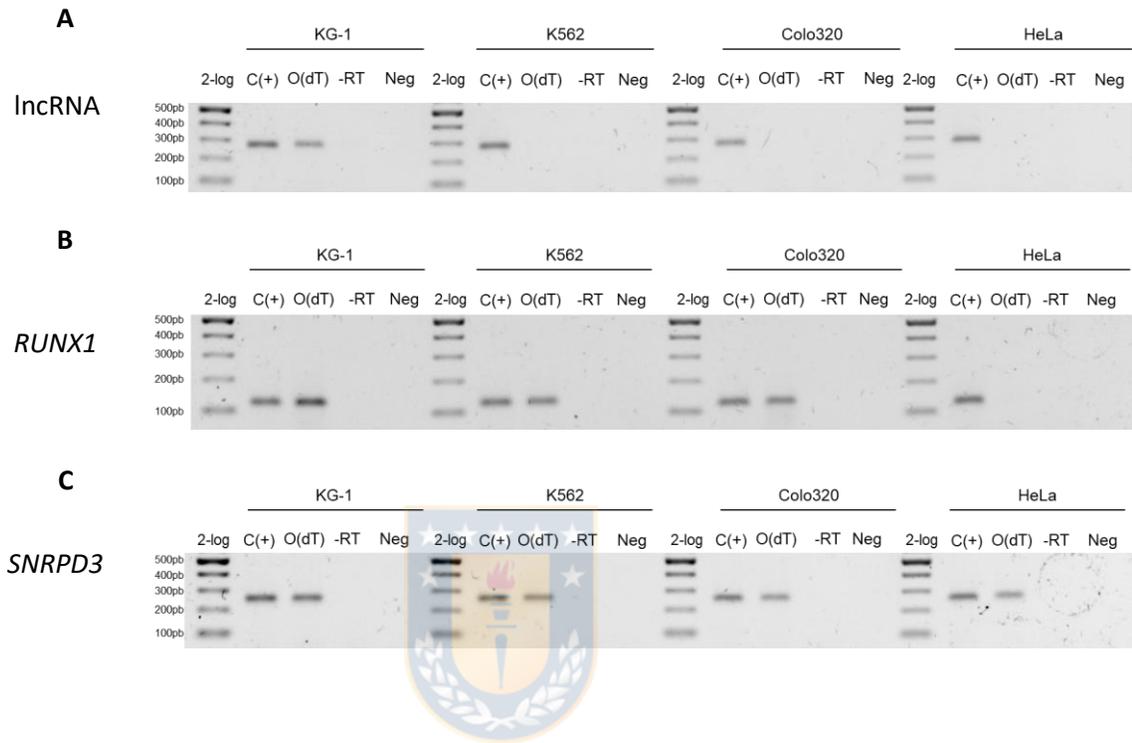


Figura 15. El nuevo lncRNA se expresa en células mieloides de médula ósea. Se realizó RT-PCR para detectar la expresión del nuevo lncRNA (A); del mRNA del gen *RUNX1* (B); y del mRNA del gen de referencia *SNRPD3* (C) en células KG-1, K562, Colo320 y HeLa. 2-log: marcador de tamaño de DNA; C(+): control positivo; O(dT): ADNc obtenido mediante RT usando oligo(dT) como partidor; -RT: control de reacción de RT sin retrotranscriptasa; Neg: control negativo de la PCR (agua).

y, en base a los datos de CAGE, TSS en la hebra positiva (Tabla 7), lo que sugiere que estas células expresan el nuevo lncRNA. Los resultados de RT-PCR obtenidos muestran que, efectivamente, existe expresión del nuevo lncRNA en células HUVEC (Figura 16, panel superior), en las que, sin embargo, no se detectó expresión del gen *RUNX1* (Figura 16, panel inferior).

A continuación, con la finalidad de corroborar si el RNA que se había pesquisado en los ensayos de PCR anteriores correspondía al nuevo lncRNA, se realizó un mapeo mediante PCR convencional utilizando 15 pares de primarios a lo largo del intrón 5 del gen *RUNX1*, identificados con una letra de la A a la O (Figura 17A). Como control positivo se realizó PCR usando DNA genómico como molde (Figura 17B). Los resultados muestran que en células KG-1 hay amplificación en los pares G, H, I, y en menor medida M (Figura 17C), los que se ubican en regiones que coinciden con el nuevo lncRNA mostrado en la Figura 14. En células Colo320, K562 y HeLa no se observó amplificación en ninguno de los pares de primarios utilizados (Figura 17D).

En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de este nuevo lncRNA es independiente de la expresión del gen *RUNX1*, y se origina en un promotor que se localiza en la región BCR3, una de las regiones de quiebre cromosomal del gen *RUNX1*.

Intrón 5 <i>RUNX1</i>	Módulo X		
Tipo celular	HS DNasal	H3K4me3	TSS hebra +
SKMC			
HeLa-S3			
H1-hESC			
AG04450			
BJ			
GM12878			
K562			
Monocytes CD14+			
HepG2			
MCF-7			
A549			
HUVEC			

Tabla 7. Cruzamiento de sets de datos de HS DNasal, H3K4me3 y CAGE. Con la finalidad de identificar tipos celulares en que se pudiera estar expresando el nuevo lncRNA, se realizó un cruzamiento de los sets de datos de HS DNasal, H3K4me3 y CAGE. En total, se encontraron 12 tipos celulares comunes entre los sets, y de estos, en 4 se identificó presencia (verde) de HS DNasal, H3K4me3 y TSSs en la hebra positiva en el módulo X del intrón 5 del gen *RUNX1*: HeLa-S3, HepG2, A549 y HUVEC.

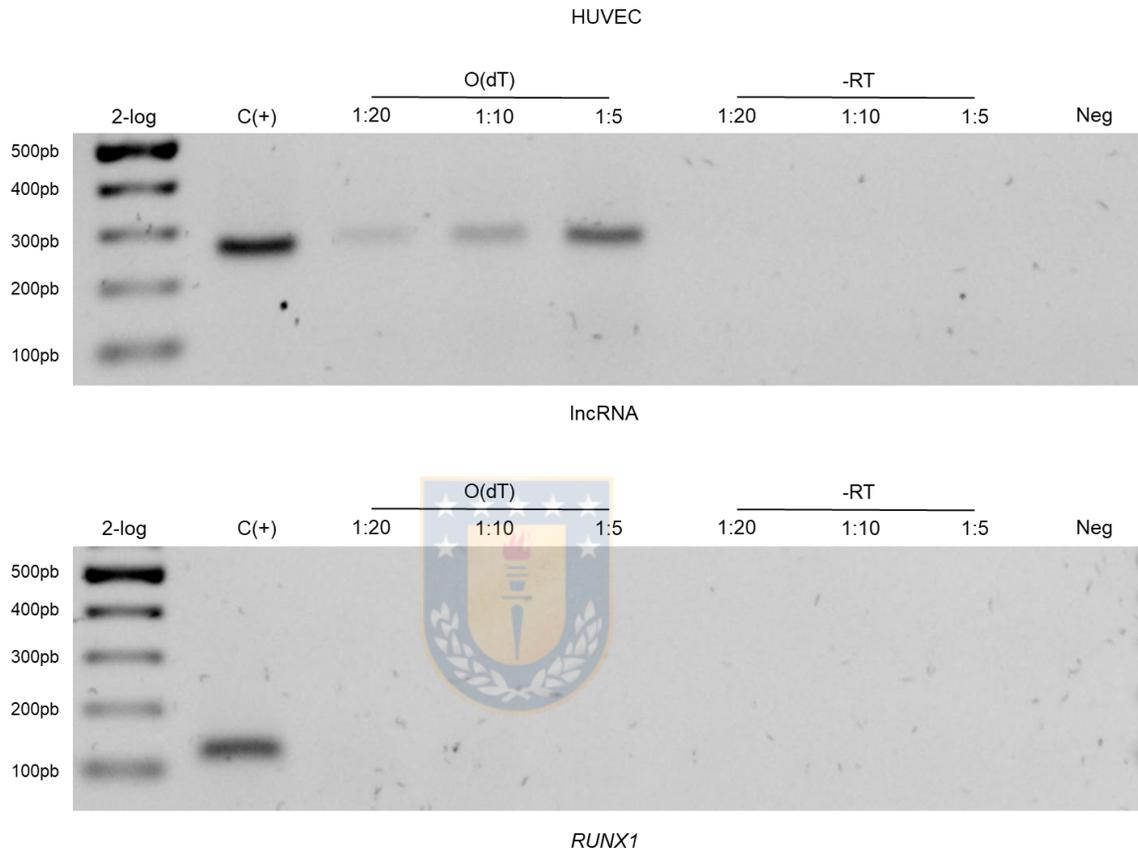


Figura 16. Los datos bioinformáticos obtenidos previamente permiten predecir la expresión del nuevo lncRNA en células HUVEC. Se realizó RT-PCR para detectar la expresión del lncRNA predicho y del mRNA del gen *RUNX1* en células HUVEC, las que fueron seleccionadas debido a que en la región BCR3 presentaban HS DNasal, H3K4me3, y un TSS en la hebra positiva predicho en base a datos de CAGE. C(+): control positivo; O(dT): ADNc obtenido mediante RT usando oligo(dT) como partidor; -RT: control de reacción de RT sin retrotranscriptasa; Neg: control negativo de la PCR (agua).

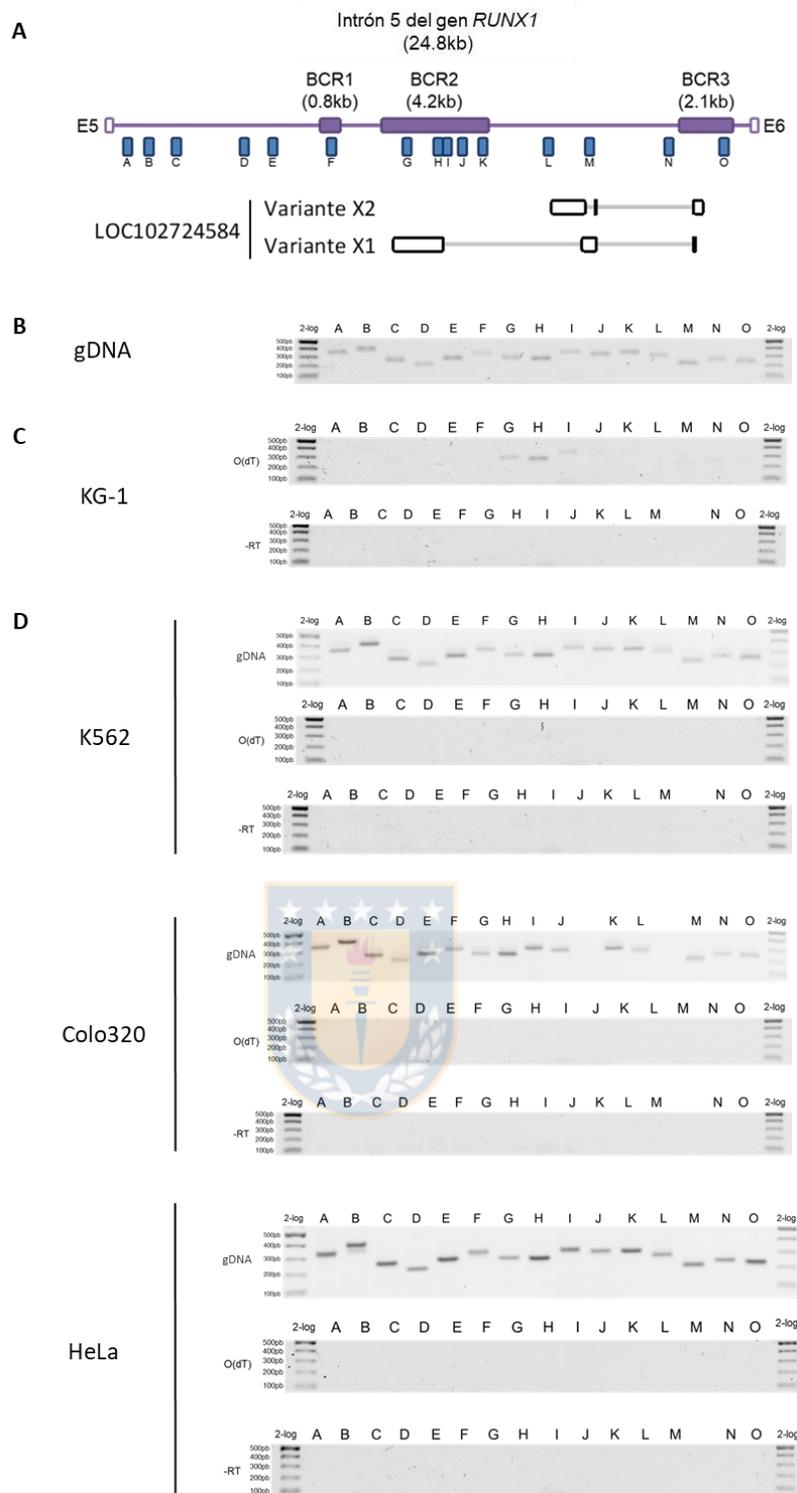


Figura 17. Las regiones desde las que se expresa el nuevo lncRNA coinciden con la secuencia identificada en base a ESTs. Se realizó RT-PCR usando 15 pares de partidores (A-O) a lo largo del intrón 5 del gen *RUNX1* (A), para analizar la expresión de la secuencia de RNA predicha en células KG-1 (C), K652, Colo320 y HeLa (D). gDNA: control positivo (ADN genómico usado como molde) (B y D); 2-log: marcador de tamaño de DNA; O(dT): ADNc obtenido mediante RT usando oligo(dT) como partidor; -RT: control de reacción de RT sin retrotranscriptasa. Las condiciones de PCR y número de ciclos (28) son idénticos para todas las muestras.

7.4. El tratamiento con etopósido induce daño en el DNA en la región BCR3, en células que expresan el nuevo lncRNA.

Considerando que la expresión del nuevo lncRNA en células KG-1 sugiere que la cromatina en su promotor (la región BCR3) es accesible para permitir la unión de maquinaria de inicio de transcripción, esta accesibilidad podría determinar una mayor probabilidad de generación de daño en el DNA. Para poner a prueba esta hipótesis, se decidió realizar un análisis de generación de quiebres en la doble hebra del DNA en la región BCR3 en células KG-1, post-tratamiento con la droga etopósido (18 y 36mg/L) por 24h, mediante qPCR. En este análisis se evaluó la amplificación de un fragmento de la región BCR3, relativa a la amplificación de un fragmento del intrón 4 del gen *RUNX1* usado como control, puesto que no presenta hipersensibilidad a DNasaI. El mismo análisis se realizó en células Colo320, ya que en estas células no se detectó el nuevo lncRNA, pero sí expresan el mRNA del gen *RUNX1*. Los resultados muestran una disminución significativa de la amplificación relativa del fragmento de la región BCR3 en células KG-1, tratadas con 36mg/L de etopósido por 24h (Figura 18A, panel derecho), lo cual no se observa en células Colo320 en las mismas condiciones (Figura 18B, panel derecho). Estos resultados muestran que el tratamiento con etopósido generó quiebres en la doble hebra del DNA en la región BCR3 en células KG-1, que expresan el nuevo lncRNA; y no en células Colo320, que no lo expresan. Esto sugiere que la expresión del mRNA del gen *RUNX1* no tendría incidencia

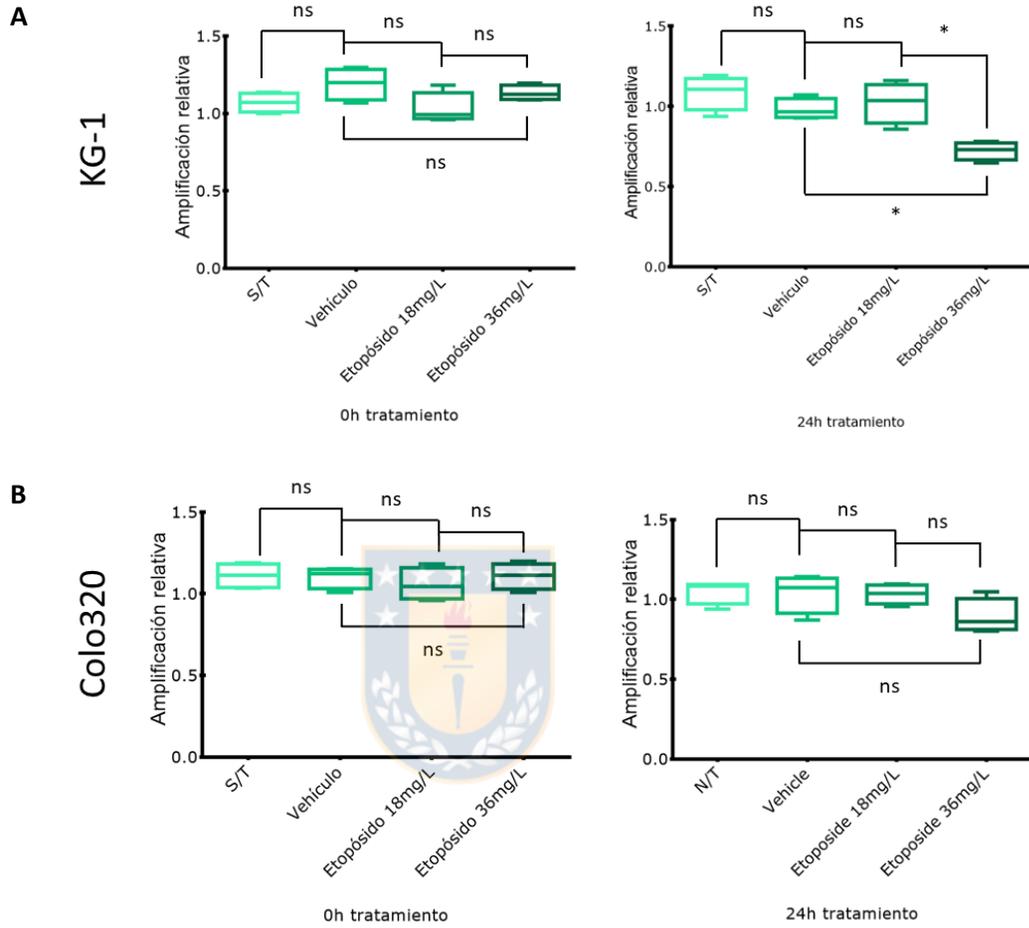


Figura 18. El tratamiento con etopósido induce quiebres de la doble hebra del DNA en la región BCR3 en células que expresan el nuevo lncRNA. Células KG-1 (**A**) y Colo320 (**B**) fueron tratadas con 18 o 36mg/L de etopósido, su vehículo, o bien no tratadas (S/T) por 0 y 24h. Pasado ese tiempo se extrajo DNA genómico y se realizó qPCR amplificando un fragmento de la región BCR3, y un fragmento control del intrón 4 del gen *RUNX1*. Los datos de Ct fueron procesados mediante el método del $\Delta\Delta Ct$, y de esta forma se determinó la amplificación relativa del fragmento de la región BCR3, respecto a la amplificación del fragmento del intrón 4 del gen *RUNX1*. El símbolo * representa $p < 0,05$; y ns representa $p > 0,05$ de acuerdo al test Mann-Whitney. (n=4 para KG-1 y Colo320).

en la generación de DSBs en la región BCR3 a causa del tratamiento con etopósido, y que uno de los factores que podría estar influyendo es la transcripción del nuevo lncRNA.

7.5. La inhibición de la transcripción previene el daño en el DNA inducido por tratamiento con etopósido en la región BCR3.

En vista de los resultados anteriores, existe la posibilidad de que la transcripción del nuevo lncRNA pudiera estar determinando una mayor susceptibilidad a daño por tratamiento con etopósido en la región BCR3. Para poner a prueba esta hipótesis, se decidió hacer un ensayo de inhibición de transcripción con flavopiridol previo al tratamiento con etopósido. Esta droga impide la fosforilación de la RNA polimerasa II durante la etapa de iniciación (Chao y Price, 2001), por lo tanto no ocurre elongación, y de esta manera se bloquea la transcripción mediada por esta polimerasa. Se trataron células KG-1 con 0,5 μ M de flavopiridol (KG-1 pre-tratadas) y su vehículo (agua) por 1h; y posteriormente se realizó el tratamiento con etopósido tal como ya se describió por 0 y 24h. Pasado ese tiempo se extrajo RNA total y DNA genómico. El RNA total fue utilizado para realizar RT-qPCR con la finalidad de determinar el número inicial de copias de los genes *ACTB* y *RUNX1*; así como del nuevo lncRNA. Se seleccionó el mRNA del gen *ACTB* como control, ya que se conoce su vida media al inhibir transcripción (Leclerc y cols., 2002). Los resultados muestran que en células KG-1 pre-tratadas, a las 24h hay una disminución

significativa del número inicial de copias de los tres RNAs analizados en todas las condiciones del tratamiento con etopósido (Figura 19B), mientras que en las tratadas previamente con agua no se observa un cambio significativo (Figura 19A). Esto muestra que el tratamiento con etopósido no altera el número inicial de copias de los RNAs analizados, y que efectivamente se inhibió la transcripción mediada por RNA polimerasa II a través del tratamiento con flavopiridol. Por otra parte, el DNA genómico extraído fue utilizado para realizar el análisis de daño de quiebre de doble hebra del DNA mediante qPCR, tal como se describió previamente. En este caso, se observó que en células KG-1 tratadas con agua previo el tratamiento con etopósido, a las 24h hay una disminución significativa de la amplificación relativa del fragmento de la región BCR3 en la condición con 36mg/L de etopósido (Figura 20A, panel derecho). En contraste, en la misma condición en células KG-1 pre-tratadas, no se observa un cambio significativo en la amplificación relativa (Figura 20B, panel derecho).

En conjunto, los resultados muestran que la inhibición de la transcripción con flavopiridol previene la generación de daño de quiebre de doble hebra de DNA por tratamiento con etopósido en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*.

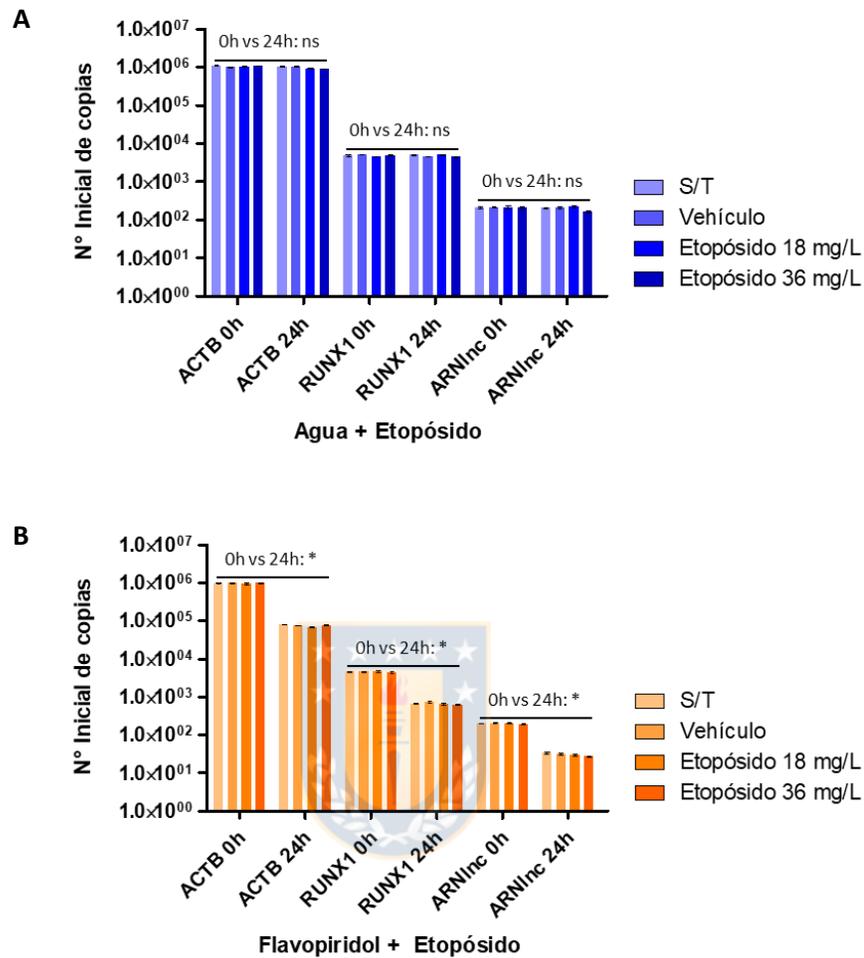


Figura 19. El tratamiento con flavopiridol es efectivo en la inhibición de la transcripción. Células KG-1 (A) y KG-1 pre-tratadas (flavopiridol 0,05µM por 1h) (B) fueron tratadas con 18 o 36mg/L de etopósido, su vehículo, o bien no tratadas (S/T) por 0 y 24h. Pasado ese tiempo se extrajo RNA total y se realizó RT-qPCR para amplificar un fragmento del mRNA del gen *ACTB*; del mRNA del gen *RUNX1*; y del nuevo lncRNA. Los datos de Ct fueron utilizados para determinar el número inicial de copias de los tres RNAs a 0 y 24h. El símbolo * representa $p < 0,05$; y ns representa $p > 0,05$ de acuerdo al test t, realizando una comparación entre 0h vs 24h para cada uno de los RNAs. (n=3 para KG-1 y KG-1 pre-tratadas).

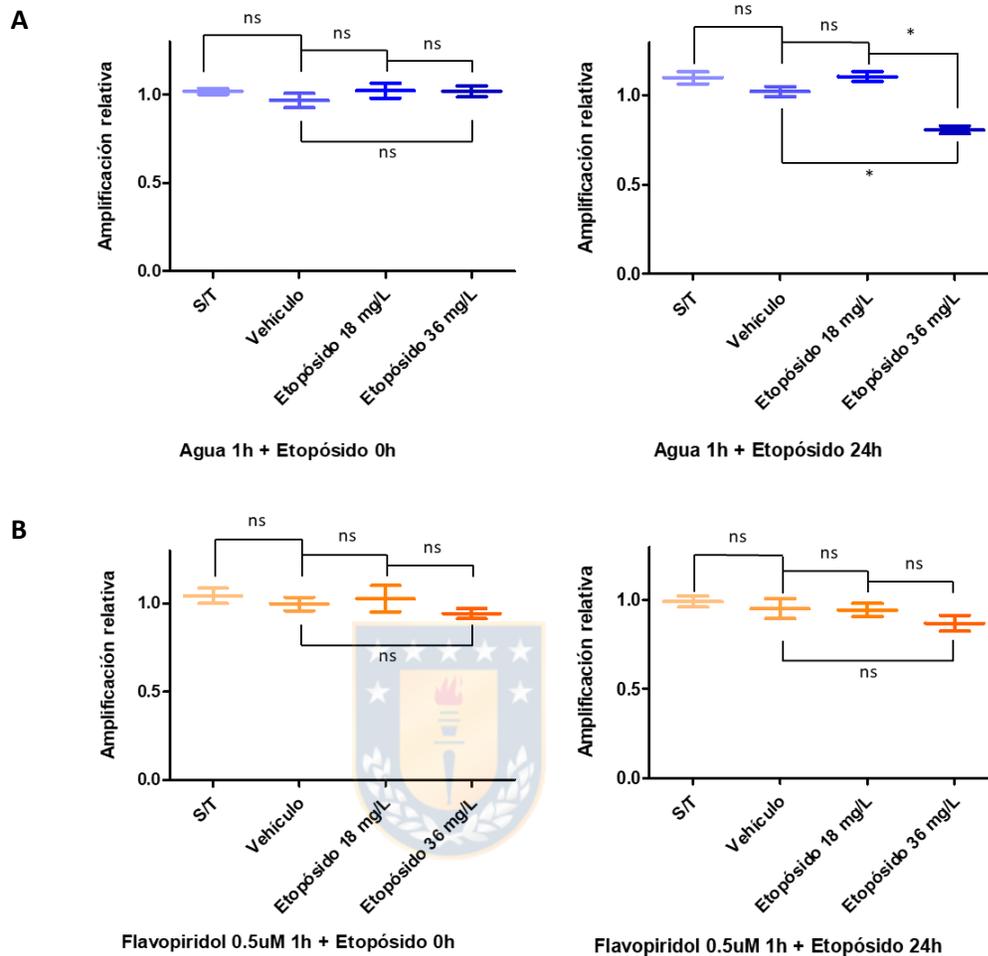


Figura 20. La inhibición de la transcripción con flavopiridol previene el daño en el DNA inducido por tratamiento con etopósido. Células KG-1 (**A**) y KG-1 pre-tratadas (flavopiridol 0,05 μ M por 1h) (**B**) fueron tratadas con 18 o 36mg/L de etopósido, su vehículo, o bien no tratadas (S/T) por 0 y 24h. Pasado ese tiempo se extrajo DNA genómico y se realizó qPCR amplificando un fragmento de la región BCR3, y un fragmento control del intrón 4 del gen *RUNX1*. Los datos de Ct fueron procesados mediante el método del $\Delta\Delta$ Ct, y de esta forma se determinó la amplificación relativa del fragmento de la región BCR3, respecto a la amplificación del fragmento del intrón 4 del gen *RUNX1*. El símbolo * representa $p < 0,05$; y ns representa $p > 0,05$ de acuerdo al test Mann-Whitney. (n=3 para KG-1 y KG-1 pre-tratadas).

8. Discusión

8.1. Caracterización del intrón 5 del gen *RUNX1*

En el estudio hecho por Zhang y colaboradores el año 2002, para el caso de la t(8;21), se determinó en distintas líneas celulares hematopoyéticas que, de las regiones BCR identificadas en el intrón 5 del gen *RUNX1*, BCR2 y BCR3 presentaban un sitio de corte para topoisomerasa II; y BCR3 además presentaba HS DNasal (Zhang y cols., 2002). En el presente estudio, pudimos confirmar la presencia de HS DNasal en las regiones BCR2 y BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* no solo en células de tipo mieloide, sino que en diversos tipos celulares, tanto hematopoyéticos, como no hematopoyéticos. Además, se encontró la presencia de distintos elementos que sugieren la existencia de un promotor funcional en el intrón 5 del gen *RUNX1*. De particular relevancia es la presencia de la marca epigenética H3K4me3 en la región BCR3, comúnmente encontrada alrededor de TSSs de genes activos, ya que participa en el reclutamiento del factor general de inicio de transcripción TFIID (Vermeulen y cols., 2007). El factor general de inicio de transcripción TFIID, conocido por interactuar con el elemento de promotor basal TATA *box*, también interactúa con el elemento de promotor basal INR en promotores que no poseen TATA *box* (Kaufmann y Smale, 1994; Yang y cols., 2007). A través de un análisis de lectura de secuencia, en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* se

encontró una densidad de elementos INR similar a la región proximal del promotor del gen de referencia *SNRPD3* (Figura 9 y Figura 10). El que un gen esté activo implica que la conformación de la cromatina en su promotor es más relajada, lo cual ayudaría a explicar la susceptibilidad de la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* a sufrir DSBs.

Respecto a la frecuencia de las aberraciones genómicas, si bien la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*, que posee un elemento regulatorio, está asociada a una translocación cromosómica considerada frecuente en pacientes de AML, no todas las regiones genómicas que participan en translocaciones frecuentes poseen un elemento regulatorio. De acuerdo a los resultados obtenidos, al comparar la Figura 6 con la Figura 8, en las que se muestra el análisis de presencia de HS DNAsal y H3K4me3 en las regiones BCR del intrón 5 del gen *RUNX* (Figura 6), y la región M-BCR del gen *BCR* (Figura 8), dos regiones del genoma involucradas en translocaciones cromosómicas consideradas frecuentes, sólo en el intrón 5 del gen *RUNX1* se exhibe una presencia marcada de la marca epigenética H3K4me3, la que se asocia a regiones promotoras. Así como la presencia de sitios de corte para topoisomerasa II, la presencia de elementos regulatorios no es una característica común de todas las regiones BCR; puede ser relevante el que existan BCRs asociados a un elemento *cis* regulatorio, y BCRs no asociados a un elemento *cis* regulatorio.

8.2. Nuevo RNA largo no codificante

En este trabajo, el conjunto de datos que apuntaban a la existencia de un promotor funcional en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* (Figuras 6-12), permitió la identificación de un nuevo lncRNA originado en este promotor, antisentido respecto a la orientación de transcripción del gen *RUNX1* (Figuras 15-17). De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de datos de CAGE y ESTs (Figuras 11-14), se trata de un lncRNA anidado, es decir, que se encuentra dentro del *locus* de un gen codificante huésped (Boivin y cols., 2018). Los ncRNA anidados pueden transcribirse en orientación sentido o antisentido respecto de su gen huésped, y sus promotores se encuentran frecuentemente en un intrón (Rearick y cols., 2011). Esto no es un evento extraño, puesto que se sabe que al menos el 50% de los genes codificantes poseen al menos un ncRNA anidado, el que puede ser de cualquiera de los tipos de ncRNA. Aproximadamente el 50% de los miRNA y snoRNA conocidos están en el *locus* de un gen huésped, su orientación de transcripción es en el mismo sentido que el gen huésped, y normalmente es coordinada (Boivin y cols., 2018). De hecho, se sabe que algunos snoRNA anidados se originan durante el proceso de *splicing* de un gen codificante (Kiss y Filipowicz, 1995). Por su parte, aproximadamente el 40% de los lncRNA conocidos se encuentran anidados en el *locus* de un gen codificante huésped (Derrien y cols., 2012), y de estos un 80% se transcribe en orientación antisentido respecto a su huésped (Boivin y cols., 2018). El promotor de estos lncRNA se encuentra normalmente en un

intrón (Rearick y cols., 2011), sus TSSs presentan marcas epigenéticas similares a los TSSs de genes codificantes, como la H3K4me3 (Derrien y cols., 2012); y a diferencia de los miRNA y sncRNA, la expresión de lncRNA anidados no se correlaciona con la expresión de su gen huésped (Ning y cols., 2017). De acuerdo a nuestros resultados, el nuevo lncRNA descrito cumple con las características mencionadas de los lncRNA anidados, incluyendo la falta de correlación con la expresión del gen *RUNX1*, pudiendo identificar en diferentes líneas celulares los cuatro casos posibles de correlación de expresión (Tabla 8). Tienen especial relevancia los resultados obtenidos en células HUVEC, en las que a partir del cruzamiento de los sets de datos de HS DNasal, H3K4me3 y CAGE, se predijo, y posteriormente detectó expresión del nuevo lncRNA, pero no del mRNA del gen *RUNX1* (Figura 16). De esta forma se valida la utilización en conjunto de los datos recopilados (HS DNasal, H3K4me3 y CAGE) para predecir la expresión del nuevo lncRNA. Dado que los partidores usados en la detección del gen *RUNX1* amplifican un fragmento del mRNA que codifica parte del dominio RHD de la proteína RUNX1, dominio que comparten todas sus isoformas, el no detectar el mRNA de *RUNX1* sugiere que el nuevo lncRNA es una molécula independiente y no el mRNA de una isoforma de la proteína RUNX1.

		Expresión ARNm gen <i>RUNX1</i>	
		+	-
Expresión nuevo ARNlnc	+	KG-1	HUVEC
	-	K562, Colo320	HeLa

Tabla 8. La expresión del nuevo lncRNA no se correlaciona con la expresión del mRNA del gen *RUNX1*. En el análisis realizado por RT-PCR se consideraron las líneas celulares hematopoyéticas mieloides KG-1 y K562; y las líneas celulares no hematopoyéticas HUVEC, Colo320 y HeLa.

8.3. Actividad transcripcional como causa de susceptibilidad a la generación de DSBs.

Para que un gen sea transcrito, es necesaria la interacción de factores de inicio de transcripción con el promotor correspondiente a ese gen, lo cual es posible solo si la cromatina en la región promotora se encuentra en una conformación relajada y, por lo tanto, accesible para permitir la interacción Proteína-DNA. Para ello, es fundamental que previo a la iniciación de la transcripción exista remodelación de la cromatina en la región promotora. Este proceso es mediado por distintos complejos remodeladores de cromatina, como por ejemplo los de la familia SWI/SNF (Tang y cols., 2010). Su acción tiene como consecuencia el desplazamiento de nucleosomas en la región promotora de un gen, lo que expone los sitios de unión para factores de inicio de transcripción (Lorch y Kornberg, 2015).

En el caso del promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*, la hipótesis planteada es que la actividad transcripcional del promotor en esa región aumenta la susceptibilidad a sufrir DSBs. Para evaluar esta posibilidad se trataron células KG-1 (que expresan *RUNX1* y el nuevo lncRNA) y células Colo320 (que expresan *RUNX1*, pero no el nuevo lncRNA) con la droga etopósido, con la finalidad de evaluar la generación de DSBs en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con etopósido induce la generación de DSBs en la región

BCR3 solo en la línea celular KG-1, es decir, en células en que el promotor identificado está activo. Ya que ambas líneas celulares expresan el gen *RUNX1*, nuestros resultados sugieren, además, que la transcripción del gen *RUNX1* no es condición suficiente para la generación de DSBs en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* a causa del tratamiento con etopósido.

Teniendo en consideración que el mecanismo principal de generación de DSBs como consecuencia del tratamiento con etopósido es la inhibición de topoisomerasa II, los resultados obtenidos se podrían explicar por la acción de topoisomerasa II en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*, a causa del superenrollamiento del DNA en el promotor del nuevo lncRNA, debido a la apertura de la doble hebra del DNA durante el proceso de transcripción, lo que aumenta la tensión torsional del DNA en esa región. El DNA superenrollado en la región BCR3 es reconocido por topoisomerasa II, y, por consiguiente, el tratamiento con etopósido induce la generación de DSBs. Esta interpretación es apoyada por estudios en los que se muestra que existe superenrollamiento de DNA alrededor de TSSs, que el grado de superenrollamiento es directamente proporcional a la tasa de transcripción de un gen, y que topoisomerasa II es reclutada río arriba de los TSSs de genes transcripcionalmente activos (Kouzine y cols., 2013; Naughton y cols., 2013).

Adicionalmente, en estudios recientes se plantea que la fragilidad del DNA en algunas regiones del genoma, en particular TSSs, puede estar

asociada a que topoisomerasa II reconoce distintos tipos de estructura secundaria del DNA en esas regiones (Szlachta y cols., 2020). Un ejemplo de ello es el gen *MLL*, en cuyo *locus* se ha determinado que la actividad transcripcional induce la formación de *loop anchors*, un tipo de estructura secundaria del DNA que es reconocida por topoisomerasa II, lo que favorecería la generación de DSBs en ese gen (Gothe y cols., 2019).

Una vez determinado que el promotor era activo en la línea celular mieloide KG-1, ya que expresa el nuevo lncRNA descrito previamente, y teniendo en consideración los resultados previos que sugieren que la transcripción del nuevo lncRNA influye en la generación de DSBs en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* inducidos por tratamiento con etopósido, se decidió realizar un pre-tratamiento de células KG-1 con la droga flavopiridol, con la finalidad de inhibir la transcripción mediada por RNA polimerasa II. El flavopiridol inhibe la fosforilación del dominio carboxi-terminal de RNA polimerasa II mediada por P-TEFb durante la iniciación (Chao y Price, 2001), proceso clave que le permite a la enzima pasar a la etapa de elongación (Price, 2000). Al inhibir la transcripción mediada por RNA polimerasa II en células KG-1 pre-tratadas con flavopiridol y posteriormente tratarlas con etopósido, se determinó que no se producía daño en el DNA en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* a causa del tratamiento con etopósido; a diferencia de las células KG-1 a las que se las había pre-tratado con agua, el vehículo de flavopiridol, en las que sí se observó daño en la región BCR3 (Figuras 18-20).

Dado el mecanismo de acción del flavopiridol, es posible que al quedar detenida la RNA polimerasa II en etapa de iniciación en el promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*, impida físicamente el acceso de topoisomerasa II al DNA en la región BCR3, o bien que por el hecho de inhibir la transcripción disminuya el superenrollamiento del DNA en esa región, y, como consecuencia, el tratamiento con etopósido no indujo la generación de DSBs. Por otro lado, es necesario considerar que las células KG-1, al ser de tipo mieloide, expresan la enzima mieloperoxidasa. Es conocido que la actividad de mieloperoxidasa en células mieloides induce la generación de radicales libres de etopósido, los que por una parte pueden producir DSBs directamente (Vlasova y cols., 2011), y por otra, aumentar la generación de DSBs asociados a la inhibición de topoisomerasa II, con un efecto más significativo sobre TOP2B (Atwal y cols., 2017), la forma de topoisomerasa II que participa en el proceso de transcripción (Madabhushi, 2018).

Si bien al inhibir la transcripción se estaría previniendo el efecto de aumento de generación de DSBs mediados por topoisomerasa II que tienen los radicales libres de etopósido, es importante señalar que debido al mecanismo de inhibición de transcripción que tiene flavopiridol, que detiene la RNA polimerasa en la etapa de iniciación, no es posible determinar si los radicales libres de etopósido producen DSBs de forma directa en la región BCR3, ya que existe la posibilidad de que el impedimento físico producido por la detención de

la RNA polimerasa prevenga el acceso de radicales libres de etopósido, generados por mieloperoxidasa, a la región BCR3.

En un contexto clínico, el daño inducido en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* a causa del tratamiento con etopósido, observado en células de tipo mieloide de médula ósea, podría representar uno de los primeros eventos que conduciría a la generación de la t(8;21) mucho antes del desarrollo de t-AML, dado que, al tener la región BCR3 elementos que la hacen más susceptibles a sufrir DSBs, aumenta la probabilidad de que esta región participe en la formación de aberraciones cromosomales, y más aún si se toma en consideración que los regímenes de tratamiento con etopósido contemplan la administración de múltiples dosis.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se propone el siguiente modelo: En la línea celular mieloide KG-1, el promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* se encuentra activo, evidenciado por la expresión del nuevo lncRNA. Al estar activo, la apertura de la doble hebra en el TSS produce superenrollamiento del DNA río arriba del TSS del nuevo lncRNA, el DNA superenrollado es reconocido por topoisomerasa II, y finalmente esto causa la generación de DSBs inducidos por el tratamiento con etopósido (Figura 21A). En contraste, en la línea celular de cáncer de colon Colo320, en donde el promotor no se encuentra activo, ya que no hay expresión del nuevo lncRNA, no hay superenrollamiento del DNA y por consiguiente el

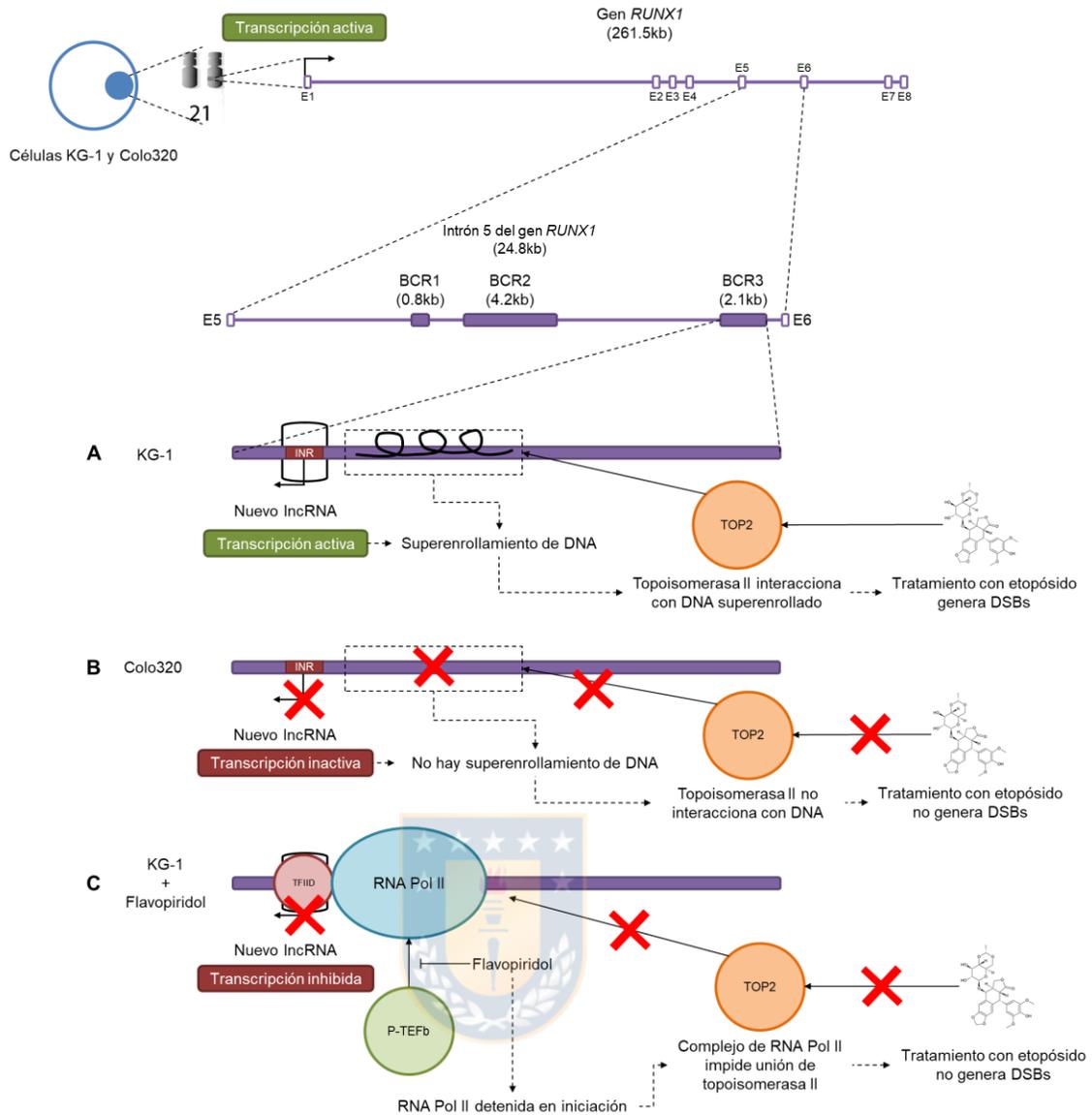


Figura 21. La actividad transcripcional del promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* influye en la susceptibilidad de esa región a daño por tratamiento con etopósido en líneas celulares. Tanto en células KG-1, como Colo320, se expresa el gen *RUNX1*. **A:** En condiciones normales, en células KG-1 se transcribe el nuevo lncRNA, lo que implica que la apertura de la doble hebra de DNA aumenta la tensión torsional en la región río arriba de los INR, induciendo superenrollamiento de DNA. El DNA superenrollado es reconocido por topoisomerasa II y por consiguiente el tratamiento con etopósido genera DSBs. **B:** En células Colo320, por el contrario, no se transcribe el nuevo lncRNA, por lo que no se produce superenrollamiento del DNA en la región BCR3. Al no haber superenrollamiento topoisomerasa II no actúa en esa región, y el tratamiento con etopósido no genera DSBs. **C:** Al realizar el pre-tratamiento con flavopiridol en células KG-1, se inhibe la fosforilación de RNA Pol II por P-TEFb, lo que hace que RNA Pol II quede detenida en el proceso de iniciación. Como consecuencia este complejo produce impedimento físico que impide que topoisomerasa II acceda al DNA, por lo que no se generan DSBs en esa región por el tratamiento con etopósido.

tratamiento con etopósido no induce la generación de DSBs en esa región (Figura 21B). Por último, al inhibir la transcripción mediada por RNA polimerasa II en células KG-1 utilizando la droga flavopiridol, la RNA polimerasa II queda detenida en la etapa de iniciación de transcripción en el TSS del promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*; lo que produce ya sea un impedimento físico para la interacción de la topoisomerasa II en esa región, o bien que no se acumule superenrollamiento por no haber transcripción, y, por consiguiente, el tratamiento con etopósido no genera DSBs (Figura 21C). En conclusión, la actividad transcripcional en el promotor identificado en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* influye en la susceptibilidad de esa región a sufrir DSBs.



8.4. Proyecciones

En el presente estudio se analizó uno de los factores que influyen en la susceptibilidad de una región de quiebre cromosomal intragénica, localizada en el intrón 5 del gen *RUNX1*, a sufrir DSBs: la actividad transcripcional. En dicha región se identificó un promotor desconocido y también la expresión de un nuevo lncRNA anidado. A partir de este estudio se desprenden las siguientes proyecciones:

En primer lugar, de forma global, considerando la gran cantidad de aberraciones cromosomales conocidas a la fecha, asociadas tanto a leucemia,

como a otros tipos de cáncer, la metodología aplicada puede ser utilizada para caracterizar otras regiones de quiebre cromosomal con el fin de evaluar la presencia de potenciales elementos regulatorios, que estén incidiendo en la susceptibilidad de esas regiones a sufrir DSBs.

En relación a los resultados obtenidos, si bien el ensayo de inhibición de transcripción con flavopiridol sugiere que hay unión de RNA polimerasa II en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*, en células KG-1, esto podría confirmarse mediante ensayos de ChIP-qPCR o ChIP-seq para RNA polimerasa II.

Siguiendo en la misma línea, a partir del ensayo de generación de DSBs por tratamiento con etopósido, sabemos que se induce daño en el DNA en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* en células KG-1. No obstante, el siguiente paso es determinar si este daño contribuye a la formación de la translocación (8;21), evaluando la presencia de la t(8;21) en las células al finalizar cada tratamiento de 24h, mediante qPCR, por ejemplo.

En cuanto al daño en el DNA inducido por tratamiento con etopósido, se sabe que los DSBs inducidos en células KG-1, al ser células mieloides, se pueden producir a través de dos mecanismos: inhibición de topoisomerasa II y radicales libres de etopósido generados por la acción de mieloperoxidasa. Sin embargo, desconocemos la contribución neta que tiene cada mecanismo, en particular el mecanismo de generación de DSBs por radicales libres de

etopósido, en el daño observado en células KG-1. En ese sentido, se puede evaluar la contribución del mecanismo de generación de DSBs por radicales libres de etopósido, inhibiendo, por ejemplo, la formación de radicales libres, mediante la adición de antioxidantes durante el tratamiento con etopósido en células KG-1.

Asociado al punto anterior, con la finalidad de evaluar la contribución que tienen los radicales libres en el daño al DNA en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*, se pueden realizar ensayos utilizando agentes genotóxicos cuyo efecto principal de generación de daño en el DNA sea mediante el aumento de estrés oxidativo, como por ejemplo peróxido de hidrógeno.

Respecto al ensayo de inhibición de transcripción, considerando el mecanismo que tiene flavopiridol, que detiene a RNA polimerasa II en la etapa de iniciación, queda como interrogante determinar si es el mecanismo específico que tiene flavopiridol lo que previene el daño en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1* al ocasionar un impedimento físico para la acción de topoisomerasa II o de los radicales libres de etopósido. Para evaluar esto se pueden utilizar inhibidores de transcripción que tengan mecanismos diferentes al que tiene flavopiridol, previo al tratamiento con etopósido.

En cuanto al nuevo lncRNA, es necesario completar la caracterización de esta molécula. En primer lugar, para conocer su secuencia exacta, los pasos a seguir son realizar RACE-PCR para determinar la extensión del RNA, conocer

su tamaño mediante northern blot, y obtener su secuencia completa a través de secuenciación.

En cuanto a la función del nuevo lncRNA, dado que se sabe que los lncRNA pueden participar en la regulación de expresión de distintos genes, inicialmente se pueden realizar ensayos de pérdida de función con la finalidad de determinar a qué procesos celulares está asociado, haciendo *knockdown* del nuevo lncRNA mediante siRNA. Posteriormente, se puede evaluar si el nuevo lncRNA participa en la regulación de expresión del gen *RUNX1*, considerando que ambos se encuentran en el mismo *locus* y de acuerdo a la literatura es un fenómeno relativamente común que los lncRNA anidados participen en la regulación de su gen huésped. Además, teniendo en cuenta que los lncRNA pueden interactuar con distintas moléculas (DNA, RNA, proteínas), es posible que el nuevo lncRNA influya en la formación de la translocación (8;21) u otras, ayudando en el acercamiento de cromosomas en el núcleo. Para evaluar esto se pueden realizar ensayos de ChIP, hibridación *in situ* y captura de conformación de cromosomas (3C) para determinar si existe interacción del nuevo lncRNA con distintos cromosomas.

Finalmente, respecto a las regiones BCR, dado que los resultados obtenidos sugieren que el superenrollamiento de DNA es un factor relevante en la generación de DSBs, se puede en primera instancia corroborar la presencia de superenrollamiento de DNA en la región BCR3 del intrón 5 del gen *RUNX1*, y

posteriormente establecer una comparación con otras regiones BCR conocidas, que pueden estar o no asociadas a un elemento regulatorio de la transcripción, partiendo por las regiones BCR del gen *ETO* que participan en la formación de la t(8;21). Así mismo, considerando que para el gen *MLL* se ha descrito que la estructura secundaria de DNA en su región BCR favorece la generación de DSBs (Gothe y cols., 2019), se puede evaluar la presencia de distintos tipos de estructura secundaria de DNA, tanto en las regiones BCR del intrón 5 del gen *RUNX1*, como en las regiones BCR de otros genes involucrados en diferentes aberraciones cromosomales, con la finalidad de evaluar si existen un patrones comunes de estructura secundaria de DNA en regiones BCR.



9. Bibliografía

- Al Aboud, N., Tupper, C., y Jialal, I. (2021). *Genetics, Epigenetic Mechanism*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30422591>
- Allan, J., Harborne, N., Rau, D. C., y Gould, H. (1982). Participation of core histone "tails" in the stabilization of the chromatin solenoid. *J Cell Biol*, 93(2), 285-297. <https://doi.org/10.1083/jcb.93.2.285>
- Argiropoulos, B., y Humphries, R. K. (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene*, 26(47), 6766-6776. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210760>
- Attia, S. M. (2010). Deleterious effects of reactive metabolites. *Oxid Med Cell Longev*, 3(4), 238-253. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.13246>
- Atwal, M., Lishman, E. L., Austin, C. A., y Cowell, I. G. (2017). Myeloperoxidase Enhances Etoposide and Mitoxantrone-Mediated DNA Damage: A Target for Myeloprotection in Cancer Chemotherapy. *Mol Pharmacol*, 91(1), 49-57. <https://doi.org/10.1124/mol.116.106054>
- Bannister, A. J., y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 21(3), 381-395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., . . . Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823-837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- Bavaro, L., Martelli, M., Cavo, M., y Soverini, S. (2019). Mechanisms of Disease Progression and Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myeloid Leukemia: An Update. *Int J Mol Sci*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246141>
- Bhat, T. A., y Wani, A. A. (2017). *Chromosome structure and aberrations*. Springer.
- Boivin, V., Deschamps-Francoeur, G., y Scott, M. S. (2018). Protein coding genes as hosts for noncoding RNA expression. *Semin Cell Dev Biol*, 75, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.016>

- Bratkovič, T., Božič, J., y Rogelj, B. (2020). Functional diversity of small nucleolar RNAs. *Nucleic Acids Res*, 48(4), 1627-1651. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1140>
- Burmeister, T., y Thiel, E. (2001). Molecular genetics in acute and chronic leukemias. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127(2), 80-90. <https://doi.org/10.1007/s004320000159>
- Chao, S. H., y Price, D. H. (2001). Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem*, 276(34), 31793-31799. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102306200>
- Chatterjee, N., Sen, P., y Bartholomew, B. (2010). Chapter 282 - The SWI/SNF and RSC Nucleosome Remodeling Complexes. In R. A. Bradshaw y E. A. Dennis (Eds.), *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)* (pp. 2345-2356). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00282-5>
- Chen, M., y Shen, X. (2010). Chapter 284 - The INO80 Chromatin Remodeling Complex. In R. A. Bradshaw y E. A. Dennis (Eds.), *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)* (pp. 2363-2368). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00284-9>
- Chen, M. J., Yokomizo, T., Zeigler, B. M., Dzierzak, E., y Speck, N. A. (2009). Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature*, 457(7231), 887-891. <https://doi.org/10.1038/nature07619>
- Cheng, Y., Wang, Y., Wang, H., Chen, Z., Lou, J., Xu, H., . . . Jin, J. (2009). Cytogenetic profile of de novo acute myeloid leukemia: a study based on 1432 patients in a single institution of China. *Leukemia*, 23(10), 1801-1806. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.107>
- Davies, M. J. (2011). Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr*, 48(1), 8-19. <https://doi.org/10.3164/jcfn.11-006FR>
- De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Le Bris, M. J., Férec, C., y De Braekeleer, M. (2011). RUNX1 translocations and fusion genes in malignant hemopathies. *Future Oncol*, 7(1), 77-91. <https://doi.org/10.2217/fon.10.158>
- De Braekeleer, E., Férec, C., y De Braekeleer, M. (2009). RUNX1 translocations in malignant hemopathies. *Anticancer Res*, 29(4), 1031-1037.

- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., . . . Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22(9), 1775-1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Dingemans, A. C., Früh, M., Ardizzoni, A., Besse, B., Faivre-Finn, C., Hendriks, L. E., . . . clinicalguidelines@esmo.org, E. G. C. E. a. (2021). Small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.03.207>
- Drevon, C., y Jaffredo, T. (2014). Cell interactions and cell signaling during hematopoietic development. *Exp Cell Res*, 329(2), 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.10.009>
- Eberharter, A., y Becker, P. B. (2004). ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J Cell Sci*, 117(Pt 17), 3707-3711. <https://doi.org/10.1242/jcs.01175>
- Ezoe, S. (2012). Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *Int J Environ Res Public Health*, 9(7), 2444-2453. <https://doi.org/10.3390/ijerph9072444>
- Fan, Y., Schreiber, E. M., Giorgianni, A., Yalowich, J. C., y Day, B. W. (2006). Myeloperoxidase-catalyzed metabolism of etoposide to its quinone and glutathione adduct forms in HL60 cells. *Chem Res Toxicol*, 19(7), 937-943. <https://doi.org/10.1021/tx0600595>
- Faramand, R., y Dalia, S. (2018). t(4;11)(q21;q23) KMT2A/AFF1. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 22(1), 30-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.4267/2042/68755>
- Foley, N., Van Ziffle, J., Yu, J., Qi, Z., Grenert, J. P., Yeh, I., . . . Mannis, G. N. (2017). Acute myeloid leukemia with t(14;21) involving RUNX1 and SYNE2: A novel favorable-risk translocation? *Cancer Genet*, 216-217, 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2017.07.002>
- Garcia-Ramirez, M., Dong, F., y Ausio, J. (1992). Role of the histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. *J Biol Chem*, 267(27), 19587-19595.
- Gilliland, D. G., y Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100(5), 1532-1542. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0492>

- Gothe, H. J., Bouwman, B. A. M., Gusmao, E. G., Piccinno, R., Petrosino, G., Sayols, S., . . . Roukos, V. (2019). Spatial Chromosome Folding and Active Transcription Drive DNA Fragility and Formation of Oncogenic MLL Translocations. *Mol Cell*, 75(2), 267-283.e212. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.015>
- Hagemeijer, A. (1987). Chromosome abnormalities in CML. *Baillieres Clin Haematol*, 1(4), 963-981. [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(87\)80034-3](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(87)80034-3)
- Hande, K. R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 34(10), 1514-1521.
- Hong, M., y He, G. (2017). 2016 Revision to the WHO Classification of Acute Myeloid Leukemia. *J Transl Int Med*, 5(2), 69-71. <https://doi.org/10.1515/jtim-2016-0041>
- Hulegårdh, E., Nilsson, C., Lazarevic, V., Garelius, H., Antunovic, P., Rangert Derolf, Å., . . . Lehmann, S. (2015). Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: a report from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Am J Hematol*, 90(3), 208-214. <https://doi.org/10.1002/ajh.23908>
- Huret, J. (1998). t(1;7)(p32;q34). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2(1), 20-21. <https://doi.org/https://doi.org/10.4267/2042/32103>
- Huret, J. L., Ahmad, M., Arsaban, M., Bernheim, A., Cigna, J., Desangles, F., . . . Dessen, P. (2013). Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D920-924. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1082>
- Igawa, S., Shirasawa, M., Ozawa, T., Nishinarita, N., Okuma, Y., Ono, T., . . . Naoki, K. (2018). Comparison of carboplatin plus etoposide with amrubicin monotherapy for extensive-disease small cell lung cancer in the elderly and patients with poor performance status. *Thorac Cancer*, 9(8), 967-973. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12772>
- Jang, Y., Son, H., Lee, S. W., Hwang, W., Jung, S. R., Byl, J. A. W., . . . Lee, S. (2019). Selection of DNA Cleavage Sites by Topoisomerase II Results from Enzyme-Induced Flexibility of DNA. *Cell Chem Biol*, 26(4), 502-511.e503. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.12.003>
- Kang, K., Oh, S. H., Yun, J. H., Jho, E. H., Kang, J. H., Batsuren, D., . . . Nho, C. W. (2011). A novel topoisomerase inhibitor, daurinol, suppresses growth

of HCT116 cells with low hematological toxicity compared to etoposide. *Neoplasia*, 13(11), 1043-1057. <https://doi.org/10.1593/neo.11972>

Karlič, R., Chung, H. R., Lasserre, J., Vlahovicek, K., y Vingron, M. (2010). Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(7), 2926-2931. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909344107>

Kaufmann, J., y Smale, S. T. (1994). Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev*, 8(7), 821-829. <https://doi.org/10.1101/gad.8.7.821>

Kayser, S., Döhner, K., Krauter, J., Köhne, C. H., Horst, H. A., Held, G., . . . AMLSG, G.-A. (2011). The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*, 117(7), 2137-2145. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301713>

Kim, D. W., Kim, H. G., Kim, J. H., Park, K., Kim, H. K., Jang, J. S., . . . Heo, D. S. (2019). Randomized Phase III Trial of Irinotecan Plus Cisplatin versus Etoposide Plus Cisplatin in Chemotherapy-Naïve Korean Patients with Extensive-Disease Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res Treat*, 51(1), 119-127. <https://doi.org/10.4143/crt.2018.019>

Kiss, T., y Filipowicz, W. (1995). Exonucleolytic processing of small nucleolar RNAs from pre-mRNA introns. *Genes Dev*, 9(11), 1411-1424.

Knijnenburg, J., y Beverloo, H. B. (2016). t(9;11)(p21;q23) KMT2A/MLLT3. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 20(12), 613-615. <https://doi.org/https://doi.org/10.4267/2042/66949>

Kornberg, R. D., y Lorch, Y. (1999). 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)

Kouzine, F., Gupta, A., Baranello, L., Wojtowicz, D., Ben-Aissa, K., Liu, J., . . . Levens, D. (2013). Transcription-dependent dynamic supercoiling is a short-range genomic force. *Nat Struct Mol Biol*, 20(3), 396-403. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2517>

Krishna Chandran, R., Geetha, N., Sakthivel, K. M., Suresh Kumar, R., Jagathnath Krishna, K. M. N., y Sreedharan, H. (2019). Impact of Additional Chromosomal Aberrations on the Disease Progression of

- Chronic Myelogenous Leukemia. *Front Oncol*, 9, 88.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00088>
- Krivtsov, A. V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M. C., Wang, Y., Faber, J., . . . Armstrong, S. A. (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, 442(7104), 818-822.
<https://doi.org/10.1038/nature04980>
- Kroes, W., y Stevens-Kroef, M. (2017). t(8;21)(q22;q22) RUNX1/RUNX1T1. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 21(2), 52-55.
<https://doi.org/https://doi.org/10.4267/2042/68158>
- Lang, A. J., Mirski, S. E., Cummings, H. J., Yu, Q., Gerlach, J. H., y Cole, S. P. (1998). Structural organization of the human TOP2A and TOP2B genes. *Gene*, 221(2), 255-266.
- Leclerc, G. J., Leclerc, G. M., y Barredo, J. C. (2002). Real-time RT-PCR analysis of mRNA decay: half-life of Beta-actin mRNA in human leukemia CCRF-CEM and Nalm-6 cell lines. *Cancer Cell Int*, 2(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/1475-2867-2-1>
- Licht, J. D. (2001). AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*, 20(40), 5660-5679.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204593>
- Lin, S., Mulloy, J. C., y Goyama, S. (2017). RUNX1-ETO Leukemia. *Adv Exp Med Biol*, 962, 151-173. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2_11
- Liquori, A., Ibañez, M., Sargas, C., Sanz, M., Barragán, E., y Cervera, J. (2020). Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single. *Cancers (Basel)*, 12(3).
<https://doi.org/10.3390/cancers12030624>
- Liscovitch-Brauer, N., Montalbano, A., Deng, J., Méndez-Mancilla, A., Wessels, H. H., Moss, N. G., . . . Sanjana, N. E. (2021). Profiling the genetic determinants of chromatin accessibility with scalable single-cell CRISPR screens. *Nat Biotechnol*. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00902-x>
- Lorch, Y., y Kornberg, R. D. (2015). Chromatin-remodeling and the initiation of transcription. *Q Rev Biophys*, 48(4), 465-470.
<https://doi.org/10.1017/S0033583515000116>

- Lu, Q., y Richardson, B. (2004). DNaseI hypersensitivity analysis of chromatin structure. *Methods Mol Biol*, 287, 77-86. <https://doi.org/10.1385/1-59259-828-5:077>
- Madabhushi, R. (2018). The Roles of DNA Topoisomerase II β in Transcription. *Int J Mol Sci*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19071917>
- Marchese, F. P., Raimondi, I., y Huarte, M. (2017). The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol*, 18(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1348-2>
- Marfella, C. G., y Imbalzano, A. N. (2007). The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res*, 618(1-2), 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.07.012>
- Martínez-García, B., Fernández, X., Díaz-Ingelmo, O., Rodríguez-Campos, A., Manichanh, C., y Roca, J. (2014). Topoisomerase II minimizes DNA entanglements by proofreading DNA topology after DNA strand passage. *Nucleic Acids Res*, 42(3), 1821-1830. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1037>
- Mercer, T. R., Edwards, S. L., Clark, M. B., Neph, S. J., Wang, H., Stergachis, A. B., . . . Stamatoyannopoulos, J. A. (2013). DNase I-hypersensitive exons colocalize with promoters and distal regulatory elements. *Nat Genet*, 45(8), 852-859. <https://doi.org/10.1038/ng.2677>
- Milosevic, J. D., Puda, A., Malcovati, L., Berg, T., Hofbauer, M., Stukalov, A., . . . Kralovics, R. (2012). Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, 87(11), 1010-1016. <https://doi.org/10.1002/ajh.23309>
- Moon, Y., Horsman, D. E., Humphries, R. K., y Park, G. (2013). A Novel Translocation Involving RUNX1 and HOXA Gene Clusters in a Case of Acute Myeloid Leukemia with t(7;21)(p15;q22). *Immune Netw*, 13(5), 222-226. <https://doi.org/10.4110/in.2013.13.5.222>
- Nam, C., Doi, K., y Nakayama, H. (2010). Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway. *Histol Histopathol*, 25(4), 485-493. <https://doi.org/10.14670/HH-25.485>
- Naughton, C., Avlonitis, N., Corless, S., Prendergast, J. G., Mati, I. K., Eijk, P. P., . . . Gilbert, N. (2013). Transcription forms and remodels supercoiling domains unfolding large-scale chromatin structures. *Nat Struct Mol Biol*, 20(3), 387-395. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2509>

- Ning, Q., Li, Y., Wang, Z., Zhou, S., Sun, H., y Yu, G. (2017). The Evolution and Expression Pattern of Human Overlapping lncRNA and Protein-coding Gene Pairs. *Sci Rep*, 7, 42775. <https://doi.org/10.1038/srep42775>
- Nitiss, J. L. (2009a). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*, 9(5), 327-337. <https://doi.org/10.1038/nrc2608>
- Nitiss, J. L. (2009b). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 9(5), 338-350. <https://doi.org/10.1038/nrc2607>
- Nucifora, G., y Rowley, J. D. (1995). AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*, 86(1), 1-14.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., y Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Okuda, T., Takeda, K., Fujita, Y., Nishimura, M., Yagyu, S., Yoshida, M., . . . Abe, T. (2000). Biological characteristics of the leukemia-associated transcriptional factor AML1 disclosed by hematopoietic rescue of AML1-deficient embryonic stem cells by using a knock-in strategy. *Mol Cell Biol*, 20(1), 319-328.
- Panagopoulos, I., Torkildsen, S., Gorunova, L., Ulvmoen, A., Tierens, A., Zeller, B., y Heim, S. (2016). RUNX1 truncation resulting from a cryptic and novel t(6;21)(q25;q22) chromosome translocation in acute myeloid leukemia: A case report. *Oncol Rep*, 36(5), 2481-2488. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5119>
- Pandey, S. (2016). Chromatin Remodeling Complexes: The Regulators of Genome Function. *Global Journal of Zoology*, 1, 007-013. <https://doi.org/10.17352/gjz.000003>
- Papież, M. A., Krzyściak, W., Szade, K., Bukowska-Straková, K., Kozakowska, M., Hajduk, K., . . . Jozkowicz, A. (2016). Curcumin enhances the cytogenotoxic effect of etoposide in leukemia cells through induction of reactive oxygen species. *Drug Des Devel Ther*, 10, 557-570. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S92687>
- Poddighe, P. J., y Weghuis, D. O. (2016). t(15;17)(q24;q21) PML/RARA. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 20(12), 620-624. <https://doi.org/https://doi.org/10.4267/2042/66951>

- Pommier, Y. (2013). Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol*, 8(1), 82-95. <https://doi.org/10.1021/cb300648v>
- Porcher, C., Chagraoui, H., y Kristiansen, M. S. (2017). SCL/TAL1: a multifaceted regulator from blood development to disease. *Blood*, 129(15), 2051-2060. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-754051>
- Pratap, S., y Scordino, T. S. (2019). Molecular and cellular genetics of non-Hodgkin lymphoma: Diagnostic and prognostic implications. *Exp Mol Pathol*, 106, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.11.008>
- Preiss, B. S., Bergmann, O. J., Bergman, O. J., Friis, L. S., Sørensen, A. G., Frederiksen, M., . . . Denmark, A. S. G. o. S. (2010). Cytogenetic findings in adult secondary acute myeloid leukemia (AML): frequency of favorable and adverse chromosomal aberrations do not differ from adult de novo AML. *Cancer Genet Cytogenet*, 202(2), 108-122. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2010.06.013>
- Price, D. H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, 20(8), 2629-2634. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.8.2629-2634.2000>
- Rearick, D., Prakash, A., McSweeney, A., Shepard, S. S., Fedorova, L., y Fedorov, A. (2011). Critical association of ncRNA with introns. *Nucleic Acids Res*, 39(6), 2357-2366. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1080>
- Reyhanoglu, G., y Tadi, P. (2020). *Etoposide*. StatPearls. Retrieved 15 Oct 2020 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491787>
- Richmond, T. J., y Davey, C. A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936), 145-150. <https://doi.org/10.1038/nature01595>
- Rosenbauer, F., y Tenen, D. G. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*, 7(2), 105-117. <https://doi.org/10.1038/nri2024>
- Roser, M., Appel, C., y Ritchie, H. (2013). *Human Height*. Retrieved 16 Oct 2020 from <https://ourworldindata.org/human-height>
- Roudaia, L., Cheney, M. D., Manuylova, E., Chen, W., Morrow, M., Park, S., . . . Speck, N. A. (2009). CBFbeta is critical for AML1-ETO and TEL-AML1 activity. *Blood*, 113(13), 3070-3079. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-147207>

- Ruiz Argüelles, G. J. (2009). *Fundamentos de hematología* (4a Ed. ed.). Ed. Médica Panamericana.
- Schmid, C. D., y Bucher, P. (2007). ChIP-Seq data reveal nucleosome architecture of human promoters. *Cell*, 131(5), 831-832; author reply 832-833. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.017>
- Spitzner, J. R., y Muller, M. T. (1988). A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II. *Nucleic Acids Res*, 16(12), 5533-5556. <https://doi.org/10.1093/nar/16.12.5533>
- Sriyothi, L., Saravanaman, P., Prathama, T., Cheemala, A., y Baluchamy, S. (2018). Roles of Non-Coding RNAs in Transcriptional Regulation. In. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76125>
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L., y Dang, C. V. (2015). MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov*, 5(10), 1024-1039. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0507>
- Strick, R., Zhang, Y., Emmanuel, N., y Strissel, P. L. (2006). Common chromatin structures at breakpoint cluster regions may lead to chromosomal translocations found in chronic and acute leukemias. *Hum Genet*, 119(5), 479-495. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0146-9>
- Strissel, P. L., Strick, R., Rowley, J. D., y Zeleznik-Le, N. J. (1998). An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region. *Blood*, 92(10), 3793-3803.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., y Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swygert, S. G., y Peterson, C. L. (2014). Chromatin dynamics: interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim Biophys Acta*, 1839(8), 728-736. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.013>
- Szlachta, K., Manukyan, A., Raimer, H. M., Singh, S., Salamon, A., Guo, W., . . . Wang, Y. H. (2020). Topoisomerase II contributes to DNA secondary structure-mediated double-stranded breaks. *Nucleic Acids Res*, 48(12), 6654-6671. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa483>

- Tammaro, M., Barr, P., Ricci, B., y Yan, H. (2013). Replication-dependent and transcription-dependent mechanisms of DNA double-strand break induction by the topoisomerase 2-targeting drug etoposide. *PLoS One*, 8(11), e79202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079202>
- Tanaka, H., Zhao, Y., Wu, D., y Hersh, L. B. (1998). The use of DNase I hypersensitivity site mapping to identify regulatory regions of the human cholinergic gene locus. *J Neurochem*, 70(5), 1799-1808.
- Tang, L., Nogales, E., y Ciferri, C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog Biophys Mol Biol*, 102(2-3), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.001>
- Todeschini, A. L., Georges, A., y Veitia, R. A. (2014). Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation. *Trends Genet*, 30(6), 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.002>
- Tsukiyama, T., Bogenschutz, N., Kwong, T., Rodriguez, J., Unnikrishnan, A., y Yadon, A. (2010). Chapter 283 - ISWI Chromatin Remodeling Complexes. In R. A. Bradshaw y E. A. Dennis (Eds.), *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)* (pp. 2357-2362). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00283-7>
- Turhan, A. (2000). t(9;22)(q34;q11) in CML. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 4(4), 205-208. <https://doi.org/https://doi.org/10.4267/2042/37674>
- Ugarte, G. D., Vargas, M. F., Medina, M. A., León, P., Necuñir, D., Elorza, A. A., . . . De Ferrari, G. V. (2015). Wnt signaling induces transcription, spatial proximity and translocation of fusion gene partners in human hematopoietic cells. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-638494>
- Valadkhan, S. (2013). The role of snRNAs in spliceosomal catalysis. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 120, 195-228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381286-5.00006-8>
- van den Berg, E., y Stevens-Kroef, M. (2017). t(8;14)(q24;q32) / t(2;8)(p12;q24) / t(8;22)(q24;q11). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 21(2), 56-59. <https://doi.org/https://doi.org/10.4267/2042/68159>
- Vermeulen, M., Mulder, K. W., Denissov, S., Pijnappel, W. W., van Schaik, F. M., Varier, R. A., . . . Timmers, H. T. (2007). Selective anchoring of TFIID

to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*, 131(1), 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.016>

Vlasova, I. I., Feng, W. H., Goff, J. P., Giorgianni, A., Do, D., Gollin, S. M., . . . Yalowich, J. C. (2011). Myeloperoxidase-dependent oxidation of etoposide in human myeloid progenitor CD34+ cells. *Mol Pharmacol*, 79(3), 479-487. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068718>

Wan, T. S. K., Hui, E. K. C., y Ng, M. H. L. (2018). Significance of Cytogenetics in Leukemia Diagnostics. *Current Genetic Medicine Reports*, 6(4), 165-175. <https://doi.org/10.1007/s40142-018-0147-8>

Wang, H., Li, W., Guo, R., Sun, J., Cui, J., Wang, G., . . . Hu, J. F. (2014). An intragenic long noncoding RNA interacts epigenetically with the RUNX1 promoter and enhancer chromatin DNA in hematopoietic malignancies. *Int J Cancer*, 135(12), 2783-2794. <https://doi.org/10.1002/ijc.28922>

Wang, M., Herrmann, C. J., Simonovic, M., Szklarczyk, D., y von Mering, C. (2015). Version 4.0 of PaxDb: Protein abundance data, integrated across model organisms, tissues, and cell-lines. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400441>

Wu, C. C., Li, T. K., Farh, L., Lin, L. Y., Lin, T. S., Yu, Y. J., . . . Chan, N. L. (2011). Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science*, 333(6041), 459-462. <https://doi.org/10.1126/science.1204117>

Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M., y Martinez, E. (2007). Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*, 389(1), 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.09.029>

Zaki, S. R., Austin, G. E., Swan, D. C., Hooper, W. C., Greer, P. W., Evatt, B. L., y Chan, W. C. (1990). Studies of myeloperoxidase gene expression at the cellular level by in situ hybridization. *Leukemia*, 4(12), 813-818.

Zhang, J., Hug, B. A., Huang, E. Y., Chen, C. W., Gelmetti, V., Maccarana, M., . . . Lazar, M. A. (2001). Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction. *Mol Cell Biol*, 21(1), 156-163. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.156-163.2001>

Zhang, Y., Fan, M., Zhang, X., Huang, F., Wu, K., Zhang, J., . . . Zhang, H. (2014). Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with

promoter TATA-box motifs. *RNA*, 20(12), 1878-1889.
<https://doi.org/10.1261/rna.045633.114>

Zhang, Y., Strissel, P., Strick, R., Chen, J., Nucifora, G., Le Beau, M. M., . . . Rowley, J. D. (2002). Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), 3070-3075. <https://doi.org/10.1073/pnas.042702899>

Ørom, U. A., Nielsen, F. C., y Lund, A. H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, 30(4), 460-471. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>

