



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El lncRNA- α GT regula en *cis* al gen adulto α D en pollo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Tania Verónica Omaña Guzmán

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Félix Recillas Targa
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Viviana Valadez Graham
[Instituto de Biotecnología](#)
Dr. Alfredo Torres Larios
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad Universitaria, CDMX. Octubre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**A mis padres,
mis hermanos,
y todos aquellos que me acompañaron.**

Este trabajo no es resultado de un proceso individual, sino del esfuerzo, la amistad, empatía y apoyo de muchos.
Gracias.

En memoria del Dr. Alfredo Torres Larios, quien siempre estuvo presente de manera constructiva para mi proyecto y formación, nunca destructiva.

INDICE

RESUMEN
ABSTRACT
ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN ERITROPOYESIS

1. Regulación transcripcional y dinámica cromatínica en la eritropoyesis
 - Factores de transcripción
 - Estructura cromatínica y secuencias regulatorias
2. RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y su actividad regulatoria
 - lncRNAs en la eritropoyesis

II. ANTECEDENTES

1. Modelo de diferenciaci3n eritroide en pollo
2. El locus de α -globina como modelo de estudio durante el recambio de expresi3n de genes globina durante la diferenciaci3n eritroide terminal en pollo.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IV. HIP3TESIS

V. OBJETIVO

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

VII. MATERIALES Y M3TODOS

1. An3lisis bioinformaticos
 - 1.1 An3lisis de secuenciaci3n de RNA
 - 1.2 An3lisis de datos de inmunoprecipitaci3n de cromatina (ChIP-seq) y accesibilidad de la cromatina (ATAC-seq).
 - 1.3 An3lisis de motivos
 - 1.4 An3lisis de Hi-C
 - 1.5 An3lisis de UMI-4C
 - 1.6 Visualizaci3n de datos
 - 1.7 An3lisis estadístico
2. Cultivo celular
3. Extracci3n de RNA y RT-qPCR

4. Generación de células HD3 estables que expresan el sistema CRISPRa
5. Clonación de secuencias guías en plásmidos.
6. Análisis de la *trans*-activación

VIII. RESULTADOS

1. Dinámica transcripcional en la diferenciación terminal eritroide en pollo
 - 1.1 Dinámica cromatínica en las regiones reguladoras de lo lncRNAs diferencialmente expresados
2. La expresión del *lncRNA- α GT* y su configuración cromatínica son específicas de la diferenciación eritroide terminal en pollo
3. *Trans*-activación del *lncRNA- α GT* mediante CRISPRa
 - 3.1 Implementación del sistema de *trans*-activación CRISPR-dCas9-VP64 en células HD3.
 - 3.2 *Trans*-activación del *lncRNA- α GT* y su efecto en los genes globina π , α^D y α^A

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

X. CONCLUSIONES

XI. PERSPECTIVAS

XII. BIBLIOGRAFÍA

XIII. ANEXOS

RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la tutoría del Dr. Félix Recillas Targa del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité Tutor que dirigió el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Félix Recillas Targa. Instituto de Fisiología celular

Dra. Viviana Valadez Graham Instituto de Biotecnología

Dr. Alfredo Torres Larios † Instituto de Fisiología Celular

Se reconoce y agradece especialmente al candidato a Dr. Hober Nelson Núñez por su asesoría y apoyo académico y para la realización de todos los análisis computacionales descritos en este trabajo.

Se reconoce y agradece al M. en C. Gustavo Tapia Urzúa por la obtención experimental de los datos de ATAC-seq, CHIP-seq y UMI-4C analizados en este trabajo.

Se reconoce y agradece al candidato a Dr. Josué Angel Cerecedo Castillo por el apoyo para realizar los análisis de HiC.

Se reconoce y agradece la asesoría técnica de la Biol. Georgina Guerrero Avedaño durante la realización de los experimentos para el estudio del *lncRNA- α GT*.

Se reconoce todo el apoyo de la laboratorista Gianelli Cortés.

Se agradece el apoyo de la Dra. Laura Ongay Larios y la Bióloga Guadalupe Códiz Huerta de la Unidad de Biología Molecular en la secuenciación de DNA.

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento del proyecto DGAPA-PAPIIT IN203917 e IN203629, además del financiamiento otorgado por CONACyT A1-S-1-11844.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la beca CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) número 41736.

Finalmente se agradece las valiosas observaciones realizadas por los miembros del jurado:

Dra. Lorena Aguilar Arnal Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. José Luis Reyes Taboada Instituto de Biotecnología

Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez

Instituto de Fisiología Celular

Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra Instituto Nacional de Cancerología

RESUMEN

La diferenciación eritroide es un proceso altamente regulado y esencial a través del desarrollo de todos los vertebrados que comprende varios estadios en los que las células son funcional y morfológicamente distintas. Esto se debe a la expresión diferencial de genes. Por esto, la eritropoyesis se ha utilizado como un modelo de estudio para entender la forma en la que se regula transcripcionalmente el encendido/apagado de genes, así como la dinámica cromatínica y los moduladores que participan en este proceso. Los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) han demostrado ser reguladores estadio específicos de la expresión génica, tanto a través del producto de la transcripción como de la activación de los elementos reguladores que pueden actuar como enhancer sobre sus genes blanco. En este trabajo hicimos un análisis de la dinámica de la expresión de los lncRNAs, así como de la accesibilidad cromatínica en sus regiones promotoras en un modelo en el que no se había hecho previamente, el pollo. Además utilizamos estos análisis para caracterizar la dinámica del *lncRNA- α GT* asociado al dominio de α -globina de pollo. Este transcrito es el único caracterizado en el modelo eritroide terminal de pollo. Nuestros resultados muestran que el modelo utilizado de la diferenciación eritropoyética terminal *in vitro* recapitula características observadas en humano y ratón: los lncRNAs tienen una expresión dinámica y específica, los lncRNAs que aumentan su expresión también tienen mayor accesibilidad en sus secuencias regulatorias y están enriquecidos con sitios de unión al factor transcripcional Klf1, el cual también aumenta su expresión. La misma dinámica se observa particularmente en el *lncRNA- α GT* dentro del locus α -globina de pollo. Los análisis de accesibilidad y expresión mostraron que es específico de la diferenciación eritroide terminal, al igual que los genes globina. Además, encontramos un enriquecimiento en la unión del factor YY1 en la región promotora del *lncRNA- α GT* y un aumento en la interacción entre éste y el promotor del gen α^D . Esto concuerda con un aumento en las interacciones dentro de un dominio definido por CTCF. Finalmente, al transactivar la región promotora del *lncRNA- α GT* utilizando el sistema CRISPR-dCas9-VP64 observamos que esto afecta específicamente la expresión del gen α^D incrementándola, sin afectar al gen embrionario π y tampoco al gen adulto α^A . Es

más, la trans-activación fue suficiente para activar la transcripción de α^D en un contexto en el que no se expresa.

Estos resultados nos muestran que el *lncRNA- α GT* se activa en la diferenciación eritroide terminal y actúa sobre el gen α^D , activándolo. Debido a que este ensayo de ganancia de función contempla la activación del elemento regulatorio y a las observaciones que sugieren que la activación podría estar sucediendo por la interacción, mediada por YY1, entre los promotores *lncRNA- α GT* y α^D , proponemos que el promotor del *lncRNA- α GT* podría estar actuando como enhancer.

Estos resultados muestran la complejidad con la que los lncRNAs pueden intervenir en la regulación transcripcional durante la diferenciación y la importancia de abordar su estudio contemplando su versatilidad, además de la importancia de utilizar modelos en los que los mecanismos de regulación pueden estar conservados en vertebrados.

ABSTRACT

Erythroid differentiation is a highly regulated process and it's essential through vertebrate development. It involves many cell stages, each one functional and morphologically different. These differences are because the differential expression of genes. That's why erythropoiesis has been used as differentiation model to study transcriptional regulation in gene activation/inactivation, including chromatin dynamics and other specific modulators implied in this process. LncRNAs have been described as cell stage gene expression modulators, both as transcripts and through regulatory sequence activation. These regulatory sequences can act as enhancer-like over target genes. The present study we analyzed lncRNAs expression dynamic as well as chromatin accessibility dynamic in lncRNAs promoter using a chicken model. We also analyzed these dynamics in the locus of *lncRNA- α GT* (the only lncRNA described in chicken erythroid differentiation) embedded in the α -globin domain. We observed that the chicken *in vitro* terminal differentiation shares some characteristics with human and murine models: expression of lncRNAs is dynamic and stage-specific, as well as chromatin accessibility which increase on regulatory sequences in up-regulated lncRNAs, the regulatory sequences of differentially expressed lncRNAs are enriched in the transcriptional factor Klf1 motifs, and Klf1 is upregulated during terminal differentiation.

We found a similar dynamic in the expression of *lncRNA- α GT*, which is expressed specifically in terminal differentiated cells, and its promoter accessibility increases, as well as expression and accessibility of α -globin genes. We also found an enrichment of YY1 binding in *lncRNA- α GT* promoter element and an increased interaction with the α^D promoter. Finally we used CRISPR-dCas9-VP64 to transactivate the *lncRNA- α GT*. This assay resulted in an increase of α^D expression, but not in embryonic π globin gene or in the other adult α^A globin gene. Moreover, the activation in the *lncRNA- α GT* promoter was sufficient to activate α^D gene expression in a repressive chromatin context. Our results show that the *lncRNA- α GT* expression is erythroid-terminal specific and it acts in *cis* increasing specifically α^D expression. Trans-activation effects also includes the possibility of the regulatory element activation, and the observations that suggest that the activation involve an interaction

increase of YY1 within the *lncRNA- α GT* and α^D promoters. These results lead us to propose an enhancer-like function of the *lncRNA- α GT* promoter.

These results shows the transcriptional regulatory function complexity drive by lncRNAs during cell differentiation, and the many experimental approaches needed for their characterization because of their multifunctional roles. Also, it is important to study conserved transcriptional regulation mechanisms in vertebrate models.

ABREVIATURAS

ATAC-seq: *Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing* (secuenciación de Ensayo de Accesibilidad a la Cromatina por Transposasa)

ChIP-seq: *Chromatin Immunoprecipitation sequencing* (secuenciación de Inmunoprecipitación a la cromatina)

RNA-seq: *RNA sequencing* (secuenciación de RNA)

RT-qPCR: *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

RBC: *Red blood cell* (eritrocito circulante)

sgRNA: *single guide RNA* (RNA de guía única)

RNAm: RNA mensajero

TSS: Transcription start site (sitio de inicio de la transcripción)

lncRNA: RNA largo no codificante

eRNA: enhancer RNA

TF: Factor de transcripción

RNA PolII: RNA Polimerasa II

CTCF: *CCCTC binding factor* (factor de unión a CTCF)

YY1: factor de transcripción Ying-Yang 1

Klf1/EKLF: Erythroid krüppel-like factor

FOG: Friend of GATA

DHS: *DNase hypersensitivity* (hipersensibilidad a la DNasa)

FDR: *False Discovery Rate* (Tasa de falso descubrimiento)

CRISPRa: activación por CRISPR

I. INTRODUCCIÓN

La evolución de la multicelularidad en los metazoarios implica el surgimiento y diversificación de mecanismos de regulación de la expresión génica. Dicha regulación génica es dinámica y controlada de manera espacio-temporal y tipo celular específica. Asimismo, es esencial para el adecuado desarrollo y mantenimiento del organismo (Margueron & Reinberg 2010; Bulger & Groudine 2011).

La regulación de la expresión génica permite que en un mismo organismo con células que contienen la misma secuencia de DNA se forma por diferentes tipos celulares, con diferentes características y funciones. Esto implica que cada tipo celular expresa genes diferencialmente, mediante mecanismos que permiten el encendido y apagado de genes. Los procesos regulatorios por medio de los que se regula este encendido y apagado de genes están codificados tanto a nivel de la secuencia del DNA (en las secuencias regulatorias) como de la composición y estructura de la cromatina. Esto determina la interacción de las secuencias regulatorias en el DNA con los factores de transcripción (TF por sus siglas en inglés), los cuales a su vez controlan la activación de programas transcripcionales linaje-específicos (Reik, 2007; Hemberger et al., 2009). Uno de los procesos biológicos más importantes en los que se han estudiado estos mecanismos regulatorios es la diferenciación celular, en los cuales se conocen los cambios globales en la expresión de genes, los factores de transcripción implicados y los cambios que sufre la cromatina (Reik, 2007; Hemberger et al., 2009; Xie et al., 2013; Burton & Torres-Padilla, 2014). Particularmente, la diferenciación de los eritrocitos es un proceso altamente coordinado a través del desarrollo y esencial durante toda la vida en los vertebrados.

ERITROPOYESIS

La eritropoyesis es el proceso de proliferación y diferenciación celular que produce eritrocitos circulantes los cuales se encargan del transporte de oxígeno y dióxido de

carbono (CO₂) durante la respiración celular. Es un sistema ampliamente utilizado para el estudio de los programas de diferenciación celular, tanto genéticos como epigenéticos. De manera general, la diferenciación celular comienza desde la hematopoyesis en la que se originan todos los precursores de las células sanguíneas a partir de células madre hematopoyéticas (HSCs por sus siglas en inglés) que se diferencian en precursores mieloides comprometidos (CMP) y los progenitores megacariocito-eritroides. Posteriormente, se lleva a cabo la eritropoyesis temprana caracterizada por la aparición de los progenitores eritroides denominados unidades formadoras de progenitores eritroides (conocidas como BFU-E por Burst-Forming Unit-Erythroid) (Hattangadi et al., 2011; Cheng et al., 2020) y unidades formadoras de colonia (CFU-E por Colony-Forming Unit erythroid). Subsecuentemente continúa la eritropoyesis tardía en la que la diferenciación continúa hacia proeritroblastos, eritroblastos basófilos, policromáticos y ortocromáticos. Finalmente, en la maduración, se forman los reticulocitos y los eritrocitos maduros (Figura 1) (Tsiftoglou et al., 2009; Dzierzak & Philipsen, 2013; Nandakumar et al., 2016; Barminko et al., 2016).

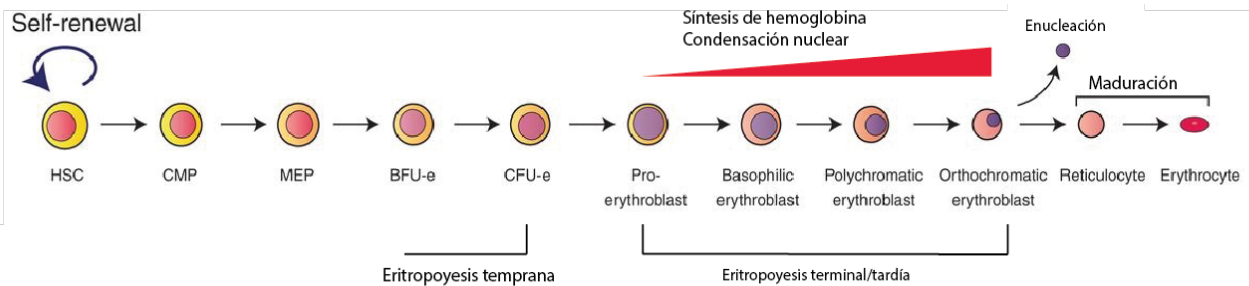


Figura 1. Estadios celulares en la diferenciación eritropoyética. La eritropoyesis empieza desde el compromiso celular de células hematopoyéticas totipotentes (HSC) hacia progenitores multipotentes (CMP por las siglas en inglés de precursores mieloides comunes) y posteriormente hacia progenitores megacariocíticos-eritroides (MEP por sus siglas en inglés). Posteriormente el compromiso celular en la eritropoyesis temprana sucede entre las células BFU-e y CFU-e. Finalmente en la eritropoyesis tardía la célula sufre varios cambios hasta la maduración. Tomado y modificado de Dzierzak & Philipsen, 2013.

En la eritropoyesis tardía ocurren numerosos cambios: los eritroblastos reducen su tamaño, empieza síntesis de hemoglobina la cual va aumentando, experimentan condensación de la cromatina, y en mamíferos, las células sufren enucleación (Figura 1) (Dzierzak & Philipsen, 2013; An et al., 2014).

En mamíferos se ha observado que durante la embriogénesis, aparece tempranamente el primer linaje eritroide “primitivo” a partir del saco vitelino formando islas de sangre. Posteriormente, los progenitores hematopoyéticos se establecen en el hígado fetal. A partir de esta etapa hay una expansión de progenitores eritropoieticos que dan origen a eritrocitos “definitivos” los cuales continuarán produciéndose en la médula ósea a partir del nacimiento y hasta la etapa adulta (Tsiftoglou et al., 2009; Dzierzak & Philipsen, 2013). En cambio, en aves, la eritropoyesis primitiva y adulta se inician en el saco vitelino hasta que se establece en la médula ósea (Sheng, 2010). Una de las diferencias principales entre los eritrocitos primitivos y los eritrocitos definitivos es la retención del núcleo en los eritrocitos primitivos, y la expresión diferencial de los genes de globinas. Al cambio de expresión de globinas embrionarias a adultas se le denomina recambio (*switch* o *switching*) de globinas (Nandakumar et al., 2016). Los eritrocitos primitivos expresan únicamente genes de globina embrionaria. Al establecerse los precursores en el hígado fetal, los eritrocitos “definitivos” empiezan a expresar predominantemente los genes de la globina adulta (Tsiftoglou et al., 2009). Durante el desarrollo la demanda de oxígeno cambia, por lo que es necesario modular la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El switch de los genes globina resulta en la síntesis de hemoglobina con mayor afinidad al oxígeno en la etapa embrionaria para lidiar con una menor disponibilidad de oxígeno (Rohlfing et al., 2016).

Los mecanismos que permiten el establecimiento y mantenimiento de estos programas de diferenciación se llevan a cabo en diferentes niveles, desde la secuencia de DNA hasta la estructura de la cromatina. Estos factores son denominados factores de transcripción eritroides los cuales pueden bloquear o promover la diferenciación desde las HSC hasta los eritrocitos. Actualmente se

conocen reguladores especiales para la diferenciación celular desde las HSC hasta los eritrocitos.

1. Regulación transcripcional y dinámica cromatínica en la eritropoyesis

Los factores de transcripción son proteínas que regulan la expresión génica uniéndose a secuencias regulatorias específicas en el DNA activando o inhibiendo la transcripción. Además de unirse al DNA contienen dominios de unión a otras proteínas, reclutando reguladores que pueden afectar la transcripción a diferentes niveles, como la accesibilidad al DNA o el reclutamiento de la maquinaria de la RNA polimerasa II. Debido a que el DNA se encuentra “empaquetado” alrededor de los nucleosomas, la unión de los TFs a sus sitios de unión depende de la accesibilidad a sus sitios de unión. Además hay TFs, conocidos como TFs pioneros, que son capaces de unirse al DNA que aún se asocia a los nucleosomas en el estado de solenoide o fibra de 30nm y pueden provocar un remodelamiento cromatínico reclutando remodeladores de la cromatina que relajan la organización nucleosomal incrementando la accesibilidad y facilitando la unión de otros TFs durante los estadios de diferenciación subsecuentes (Suter, 2020). Los elementos regulatorios en el DNA en donde se unen los TFs “activadores” son los promotores y enhancers. El promotor central de un gen está definido por contener el Sitio de Inicio de la Transcripción (TSS por sus siglas en inglés) en el extremo 5´ de un gen, además de sitios de unión de TFs y proteínas suficientes para iniciar la transcripción. Comúnmente contienen elementos característicos como la caja TATA y el elemento iniciador. Además del promotor central son necesarias secuencias proximales que modulan o incrementan la tasa de transcripción, por lo que se le denomina promotor a esa región genómica. (Andersson & Sandelin, 2020). La actividad de los promotores es suficiente para iniciar la transcripción, pero generalmente ésta es baja y puede ser suprimida o puede activarse por elementos reguladores distales llamados enhancers (Haberle & Stark, 2018). Estos elementos regulatorios activan o aumentan la transcripción sin importar su localización, orientación o distancia relativa a su promotor (o promotores) blanco (Bulger & Groudine, 2011; Kim & Shiekhattar, 2015).

Factores de transcripción

Uno de los factores de transcripción más importantes en la hematopoyesis y posteriormente en la eritropoiesis son en grupo de los factores GATA. Particularmente se ha visto que GATA-2 regula positivamente la proliferación y mantenimiento de precursores hematopoyéticos y eritroides. En células precursoras eritroides, hay expresión de GATA-2 y GATA-1, y posteriormente ocurre un “switch” en el que GATA-1 reprime la expresión de GATA-2. Este switch determina el compromiso celular hacia la diferenciación eritroide. En la siguiente fase, las células formadoras de colonia ya no expresan GATA-2. En las fases posteriores de eritropoiesis, GATA-1 está implicado en la sobrevivencia y diferenciación de las células (Tsiftoglou et al., 2009). SCL/Tal1 es un factor de transcripción necesario para eritropoyesis primitiva y definitiva. Los sitios de unión a DNA del factor de transcripción SCL/Tal1 colocalizan con sitios de unión a GATA-1 y, en células eritroides, SCL/Tal1 forma un complejo activador pentamérico uniéndose a las proteínas E2A, LMO2, Ldb1 y GATA-1, en genes específicos del linaje. La falta de cualquiera de estos factores provoca la muerte durante el desarrollo fetal debido a la falta de eritropoyesis primitiva. Otro TF característico del linaje eritroide es Klf1 (EKLF), el cual es necesario para la maduración eritroide. De hecho, los ensayos de pérdida de función durante la eritropoiesis primitiva, muestran un aumento en genes que están más relacionados con diferenciación de megacariocitos. Estudios hechos en ratón han mostrado que Klf1 es necesario en el “switch” de globina embrionaria a globina adulta, particularmente en la activación del gen de β -globina en hígado fetal, y que su ausencia provoca la pérdida de conformación de cromatina abierta en este locus. Esto concuerda con evidencia más reciente de que Klf1 tiene una función en la organización espacial de dominios transcripcionalmente activos en el locus de β -globina y otras regiones. También se ha mostrado que un 48% de los sitios de unión de Klf1 se encuentran localizados dentro de 1kb (kilo base) de distancia de un sitio de unión de GATA-1, sugiriendo que también hay una cooperación en la regulación por ambos factores (Cantor & Orkin, 2002; Tsiftoglou et al., 2009; Kerényi & Orkin, 2010; Dzierzak & Philipsen, 2013; Barminko et al., 2016). Además, la actividad de los TFs “maestros”, requiere de su interacción con

otros factores de transcripción y otros cofactores como remodeladores de la cromatina. Por ejemplo, Bgr1 la unidad catalítica del complejo remodelador de la cromatina ATP-dependiente SWI/SNF, interactúa con GATA-1, SCL/Tal1 y Klf1 incrementando su función activadora. SCL/Tal1 y Klf1 también interaccionan con correpresores y la desacetilasa de histona 1 (HDAC1). Existe evidencia de que GATA-1 interacciona también con CBP/p300, BCL11A (necesario para el “switch” de hemoglobina), GF1-b, EZH2 y su unión con la proteína FOG1 es necesaria para comprometer a las células hacia el linaje eritroide y para la maduración de los proeritroblastos. El complejo MeCPU1/NuRD interacciona con GATA-1-FOG1 en genes que son silenciados durante la eritropoyesis (por ejemplo, en gen *gata2*) (Cantor & Orkin, 2002; Kerenyi & Orkin, 2010; Tsiftoglou et al., 2009; Nandakumar et al., 2016).

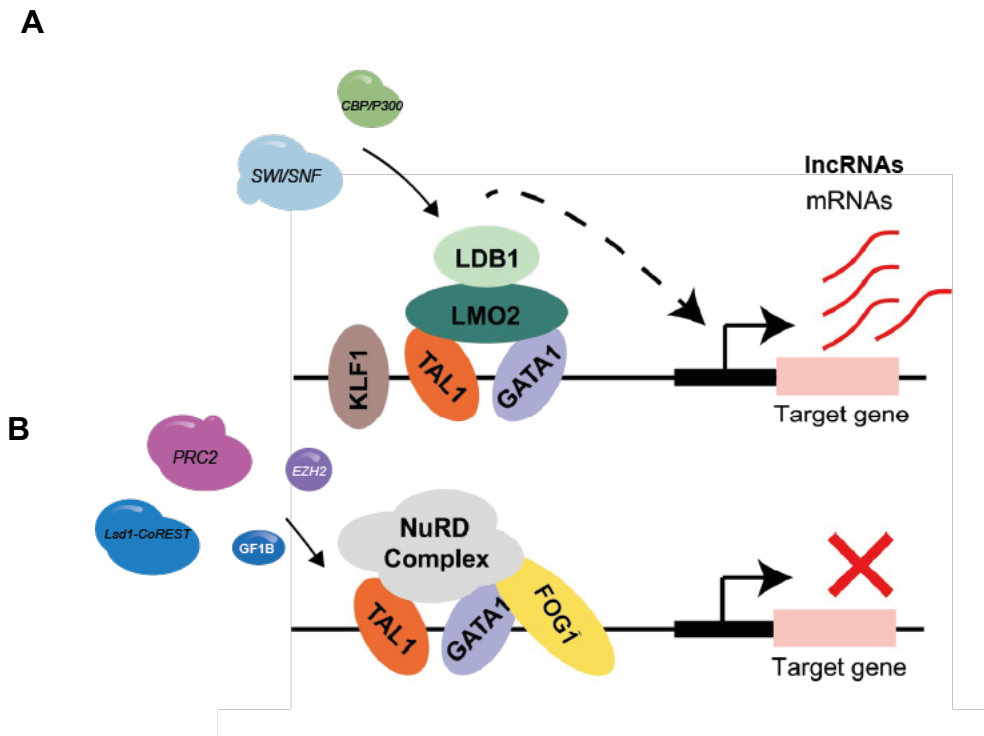
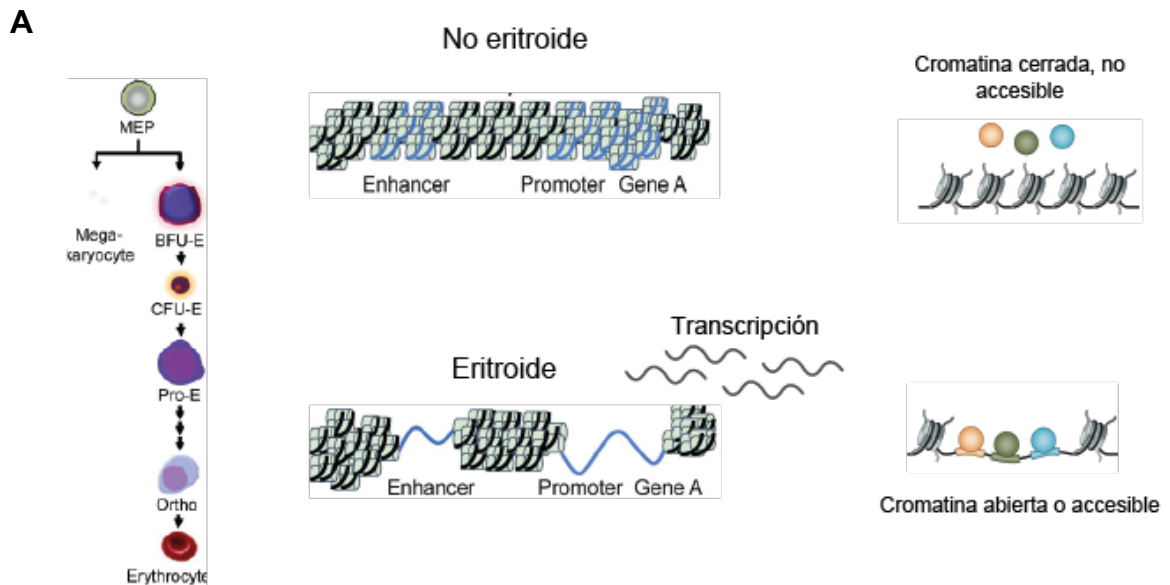


Figura 2. Los factores transcripcionales maestros definen el compromiso celular en la eritropoyesis. **A.** Los TFs maestros eritroides como GATA1, Klf1, Tal1 (se unen directamente a secuencias específicas de DNA), LDB1, LMO2 (no se unen al DNA) actúan como el centro red transcripcional en la diferenciación eritroide. Se unen más frecuentemente a enhancers y pueden interactuar con sus genes blanco mediante asas de cromatina. Estos TFs pueden reclutar directa o indirectamente complejos remodeladores de la cromatina. **B.** Los TFs maestros también pueden interactuar con otras proteínas y reclutar complejos represores como NuRD, mediando también el silenciamiento de genes durante la diferenciación. Tomado y modificado de Nandakumar et al., 2016.

Estructura cromatínica y secuencias regulatorias

Esta dinámica entre los TFs y los reguladores epigenéticos es esencial para establecer las características cromatínicas y la expresión de genes eritroides (Figura 2). Esto se asocia con un paisaje cromatínico determinado, un patrón específico de accesibilidad a la cromatina, actividad de enhancers específicos que promueven la expresión de genes específicos. La accesibilidad a la cromatina está determinada no sólo por el posicionamiento de nucleosomas, sino también por modificaciones post-traduccionales en las histonas. La acetilación está asociada a regiones transcripcionalmente activas o accesible. La metilación de histonas como H3K4me2/3 (la primera letra y numero corresponden a la histona. La segunda letra y el numero corresponden al aminoácido que se modifica. Me o ac significa la modificación metilación/acetilación) o H3K36me3 también está asociada a regiones transcripcionalmente activas, mientras que la histona H3K27me3 está asociada a cromatina inactiva y compacta (Rodrigues et al., 2021). Durante la diferenciación terminal eritroide (de eritroblastos basófilos a ortocromáticos), análisis a escala global del genoma han mostrado que la acetilación de la histona 4 disminuye, aunque la acetilación general de las histonas no disminuye. Esta modificación está asociada a la liberación de la RNA PolIII pausada. La marca en la histona H4K20me1 incrementa en la diferenciación, lo cual es necesario para la condensación cromatínica y, en mamíferos, la enucleación. Las modificaciones que reflejan transcripción activa como la histona H3K36me2/3 cambia en los genes diferencialmente expresados, enriqueciéndose en los genes que se activan (por ejemplo los genes de las globinas) y disminuyendo en aquellos que se inactivan. La

misma dinámica en la ocupación de RNA PolII. Hay evidencia de que la diferenciación terminal está asociada a la pérdida de marcas relacionadas con la elongación transcripcional pero no al aumento de marcas de heterocromatina (H3K27me2/3, H3K9me2/3 y H4K20me3). La marca en la histona H3K27me3 aumenta en la diferenciación, pero principalmente se enriquece en aquellos promotores que ya la contenían en etapas previas. Por su parte, el enriquecimiento de la RNA PolII (tanto pausada como en elongación) también disminuye a escala global, particularmente en sitios donde también disminuye la marca en la histona H3K36me3 y se enriquece en genes eritroide-específicos (Ryzhkova & Battulin, 2021; Wells & Steiner, 2022). Incluso, el silenciamiento de genes parece asociarse con el pausamiento de la RNA PolII previo a su disociación de estos genes (Murphy et al., 2021).



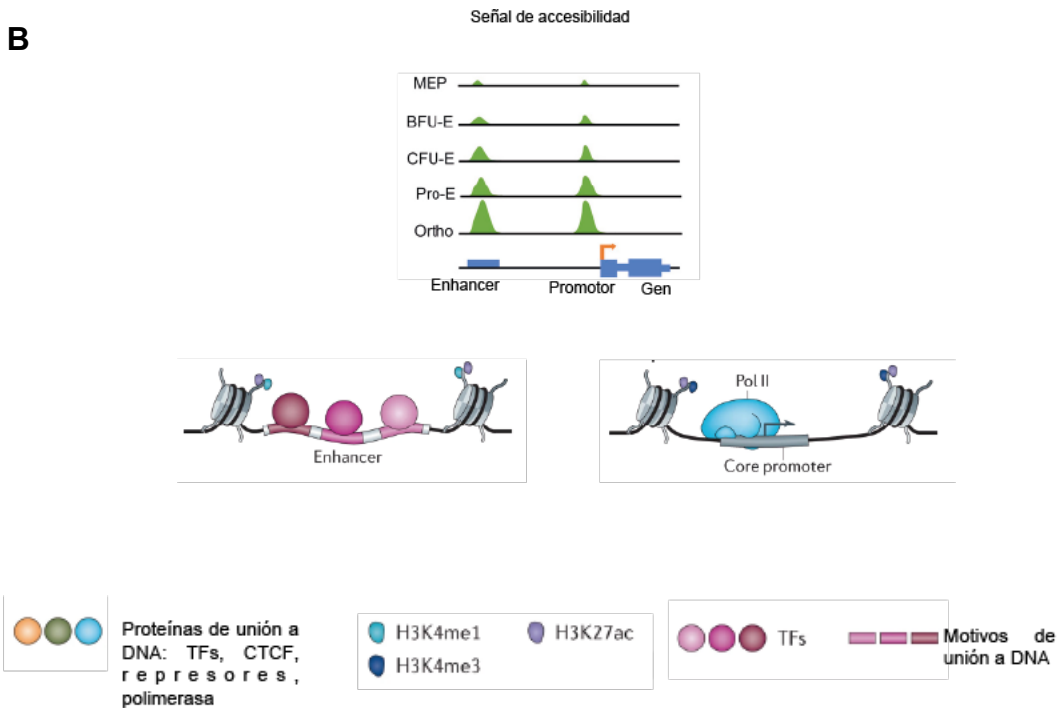


Figura 3. Dinámica cromatínica durante la diferenciación eritroide. **A.** Durante la diferenciación eritroide el paisaje epigenómico muestra patrones de regulación estadio específicos. Las regiones que ganan accesibilidad son permisivas a la unión de proteínas como TFs, proteínas arquitectónicas (CTCF, YY1), polimerasas etc. Además de que se asocian a mayor actividad transcripcional. Estas mismas regiones permanecen inaccesibles en células que no son específicas del linaje o estadio celular. Estas regiones se pueden asociar a elementos enhancer y genes con sus promotores. **B.** El incremento de accesibilidad en secuencias regulatorias durante la diferenciación está asociado con la activación de éstos. Esto también puede asociarse a la unión de TFs específicos (GATA-1, Klf1, Scl/Tal1), a modificaciones de histonas asociadas a activación y/o proteínas involucradas en la transcripción. Figura modificada de Schulz et al., 2019 y Shlyueva et al., 2014.

Estudios más específicos de la dinámica cromatínica durante la diferenciación eritroide se han enfocado en asociar sitios de accesibilidad a la cromatina (DNasa I y ATAC-seq), modificaciones post-traduccionales en las histonas, sitios de unión a TFs (ChIP-seq) y expresión génica (RNA-seq) (Figura 3). Esto ha permitido encontrar los elementos reguladores en el DNA implicados en cada una de las etapas de la eritropoyesis. Para esto se han utilizado algunas características estructurales que se le han asignado a los promotores y los enhancers: los

promotores activos se identifican por tener nucleosomas enriquecidos en las histonas K3K4me3 y H3K27ac. En los enhancers hay mayor enriquecimiento de la histona H3K27ac, y un ratio elevado de entre las histonas H3K4me1/H3K4me3. Debido a que los enhancers son las secuencias principales que determinan la identidad celular, los estudios de la dinámica regulatoria se ha centrado en caracterizar su actividad durante la diferenciación celular (Huang et al., 2016; Buenrostro et al., 2018; Ludwig et al., 2019; Schulz et al., 2019; Georgolopoulos et al., 2021; Edginton-White et al., 2023). De hecho, estudios a escala global del genoma en diferentes tipos celulares eritroides han mostrado que GATA-1 se une mayormente (85% de los sitios de unión) a elementos regulatorios distales, y en menor medida (10-15%) en las regiones promotoras. También los sitios de ocupación de SCL/Tal1 y Klf1 se encuentran en mayor medida en sitios regulatorios distales, y en menor medida en regiones promotoras (Hattangadi et al., 2011; Kerényi & Orkin, 2010). Acorde con esto, durante la eritropoyesis temprana, el número de enhancers dinámicos (que se “pierden” o se “ganan”) en la diferenciación es mayor que el número de genes diferencialmente expresados (Huang et al., 2016). Aquellos enhancers que se van perdiendo contienen sitios de unión de TFs característicos de las células HSC (ERG, HOXA9, PU1) y los que se adquieren tienen sitios de unión de los TFs eritroide-específicos. Además, el aumento en la expresión de los genes eritroides coincide con el número de enhancers activados asociados en *cis* (por proximidad) (Huang et al., 2016; Schulz et al., 2019; Georgolopoulos et al., 2021). Los mecanismos mediante los cuales los enhancers actúan sobre sus genes blanco, dependen de otras características: una vez los TFs pioneros se unen a estas secuencias y reclutan remodeladores de la cromatina, también reclutan otros coactivadores como el complejo mediador, y la RNA PolIII. Esto puede influenciar a los promotores de sus genes blanco al establecer un estado activo de la cromatina y/o aumentando la concentración local de la maquinaria transcripcional (Field & Adelman, 2020). Para ello, la secuencia enhancer debe de estar en contacto o proximidad de su secuencia blanco lo cual se ha explicado por la formación de asas de cromatina en donde dos secuencias que pueden estar hasta cientos de kilobases de distancia se acercan en un espacio tridimensional permite crear centros de

agregación de RNA PolIII y factores transcripcionales que podrían aumentar la actividad transcripcional (Bonev & Cavalli, 2016). Este modelo ha evidenciado que la organización tridimensional del genoma es otro nivel de regulación, especificidad y dinámica en la actividad de los elementos enhancer. Estas interacciones mediante la formación de asas de cromatina están facilitadas por proteínas de unión a DNA. Por ejemplo, CTCF es la proteína arquitectural mejor caracterizada en mamíferos. Se ha demostrado que las mutaciones en sus sitios de unión pueden provocar cambios en la expresión génica, y alterar la organización tridimensional de la cromatina (Valadez-Graham et al., 2004; Schoenfelder & Fraser, 2019). La habilidad de CTCF de mediar la interacción entre dos o más secuencias que linealmente se encuentran lejanas en el genoma se debe a que es capaz de formar dímeros o multímeros entre sí, y a su unión a otras proteínas. Su interacción con las cohesinas es especialmente importante para la formación de asas de cromatina (Parelho et al. 2008).

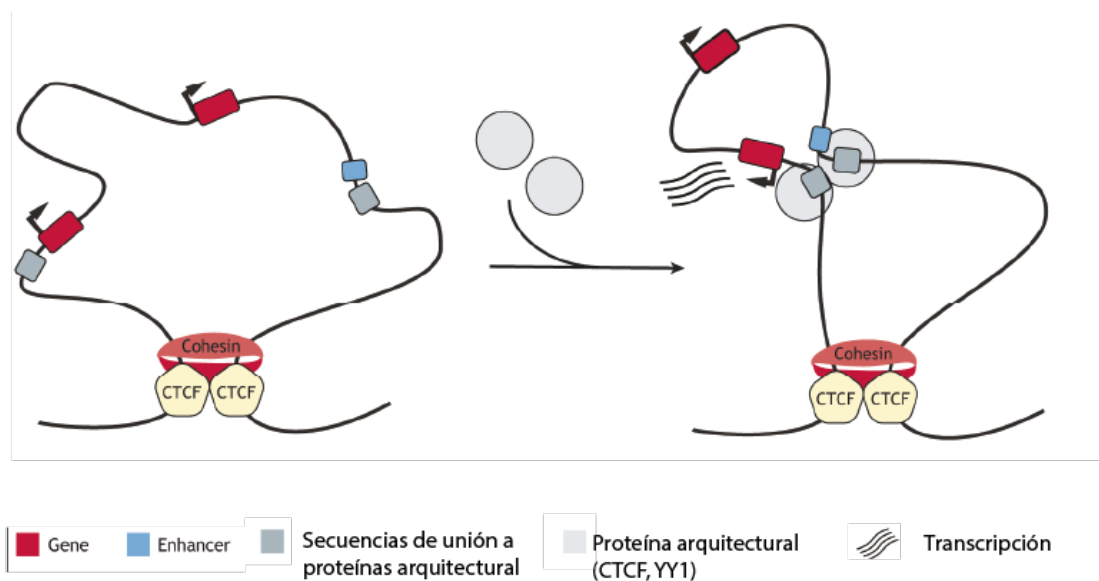


Figura 4. La formación de asas de cromatina interviene en la regulación transcripcional. Los sitios de unión a proteínas arquitecturales y la unión de estas proteínas modulan las interacciones enhancer-promotor. CTCF y la cohesina también forma asas de mayor alcance, o interacciones que definen a los Dominios Topológicamente Asociados. Tomado y modificado de Pachano et al., 2022.

Aunque CTCF se une en promotores y enhancers facilitando su interacción, se ha reportado que las interacciones mediadas por esta proteína está más asociada a la formación de asas de cromatina de mayor alcance, en las fronteras de los Dominios Topológicamente Asociados (TADs por sus siglas en inglés) que a la formación de interacciones enhancer-promotor (Phillips & Corces, 2009). Más recientemente, se encontró que muchas interacciones enhancer-promotor están mediadas por la proteína de unión al DNA YY1 (Rowley & Corces, 2018; Field & Adelman, 2020). Así mismo, la unión de YY1 en estos sitios es necesaria para mantener las estructuras cromatínicas entre los enhancers y sus promotores (Weintraub et al., 2017) (Figura 4). Otra característica de los enhancers activos es la producción de RNAs no-codificantes denominados eRNA, los cuales pueden ser necesarios para mantener la activación del enhancer o su función regulatoria sobre sus genes blanco (de Lara et al., 2019). La transcripción en un elemento enhancer es un indicador de su actividad y además también están implicados en mantener la formación de asas y reclutar proteínas estructurales. Además de los eRNA, los enhancers también pueden actuar como promotores de RNA largos no-codificantes (elncRNAs), o encontrarse dentro de un gen de lncRNA. Incluso hay evidencia que sugiere que gran parte de los lncRNAs se transcriben a partir de elementos regulatorios enhancer (Hon et al., 2017), incluso se ha sugerido que los lncRNA son un producto evolutivo de los eRNAs.

El estudio de los lncRNAs como reguladores transcripcionales se ha vuelto fundamental debido a su participación en múltiples procesos biológicos. Como se describió anteriormente, los lncRNAs pueden llevar a cabo una función a partir de las características de su secuencia, su actividad transcripcional o su transcrito.

2. RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y su actividad regulatoria

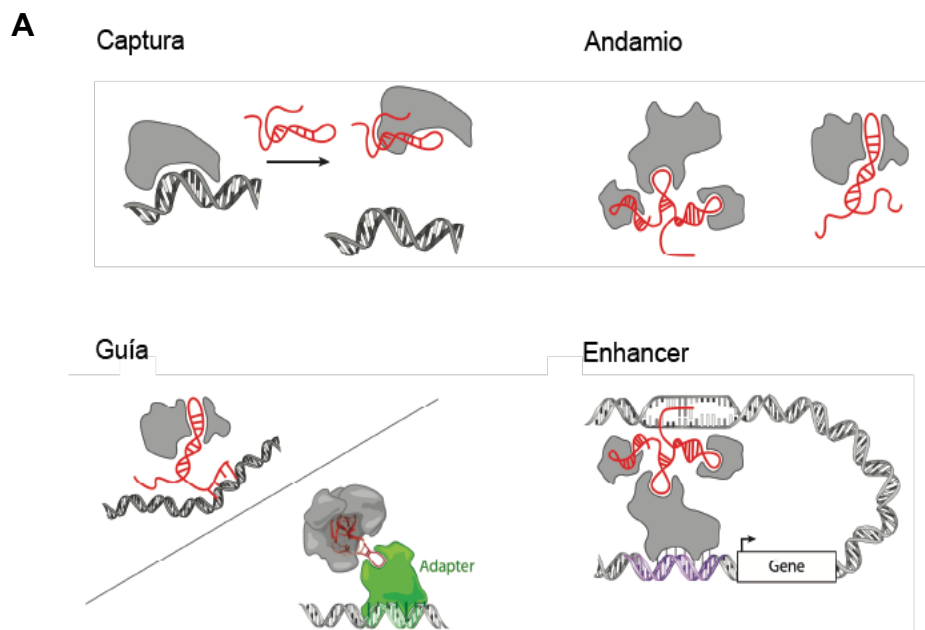
Los RNAs largos no-codificantes se definen arbitrariamente como todos aquellos transcritos no codificantes de más de 200 nucleótidos (nc) (Rinn & Chang, 2012; Guttman & Rinn, 2012; Engreitz, Ollikainen, et al., 2016; Statello et al., 2021). Actualmente Mattick et al. 2023 propusieron en una declaración consenso que se llamaran lncRNA a los transcritos con más de 500 nc, generados en su mayoría por

la RNA Pol II. Otras características que presentan la mayoría de estos transcritos (similares a los RNAm) son un *cap* de metilguanosa en su extremo 5', están poliadenilados en su extremo 3', contienen exones e intrones y son procesados (Mercer y Mattick 2012). A diferencia de los mRNA, estos transcritos presentan bajos niveles de expresión, la secuencia de nucleótidos está muy poco conservada entre especies, la mayoría se localiza en el núcleo y la eficiencia de procesamiento (*splicing*) menor a los mRNAs. Aunque estos RNAs no tienen potencial codificante, se expresan de manera dinámica y regulada durante la diferenciación celular y el desarrollo, desde la expresión común de un grupo de lncRNAs en células no diferenciadas, hacia el silenciamiento de estos y la activación transcripcional de lncRNA linaje-específico y tejido-específico. Los genes de los lncRNAs pueden encontrarse en *loci* intergénicos, sentido o antisentido con respecto a un gen codificante a proteína y pueden sobrelaparse con otros genes (Kopp & Mendell, 2018). Como se mencionó una proporción grande de los *loci* de lncRNAs se encuentran en regiones enriquecidas con marcas de histonas características de elementos de regulación transcripcional (enhancers) (Hon et al., 2017). Los lncRNAs participan en prácticamente todos los niveles de la organización genómica y de expresión génica. Particularmente, su importancia en la regulación génica durante la diferenciación y desarrollo proviene de dos características: la capacidad de estos RNAs para asociarse a proteínas como remodeladores de la cromatina o factores de transcripción, y la de transcribirse a partir de elementos enhancer característicos de cierta etapa del desarrollo. Ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes.

Gracias a la capacidad de los lncRNAs de formar interacciones RNA-proteína y RNA-DNA, se ha demostrado que los lncRNAs son capaces de interactuar con los complejos remodeladores de la cromatina responsables la metilación/desmetilación del DNA (Merry et al., 2015), modificaciones postraduccionales en las histonas (K. C. Wang et al., 2011; Colognori et al., 2019; Luo et al., 2019), factores de transcripción maestros (Ng et al., 2012) u otras proteínas regulatorias (Saldaña-Meyer et al., 2014; Kung et al., 2015; Statello et al., 2021; Mattick et al., 2023). En esta interacción el lncRNA puede funcionar como andamio (formando complejos

multiproteicos), guía (recluta a la proteína a un sitio específico en el genoma), captura (impide la unión de una proteína a su sitio blanco en el genoma) y potenciador (enhancer-like, el lncRNA tiene un efecto que activa o aumenta la transcripción de un gen y es dependiente del transcrito, no de la activación del elemento regulador y la transcripción) (Figura 5 A). Estos mecanismos permiten al transcrito llevar a cabo su función en los genes del mismo locus en el que se transcriben (función en *cis*), o bien en otro locus o cromosoma (función en *trans*) (Rinn & Chang, 2012).

Por otro lado, los lncRNAs que se transcriben a partir de regiones enhancer participan y median la actividad de éste y por lo tanto de su gen blanco. Al igual que los enhancers, los lncRNA son altamente específicos del tipo celular.



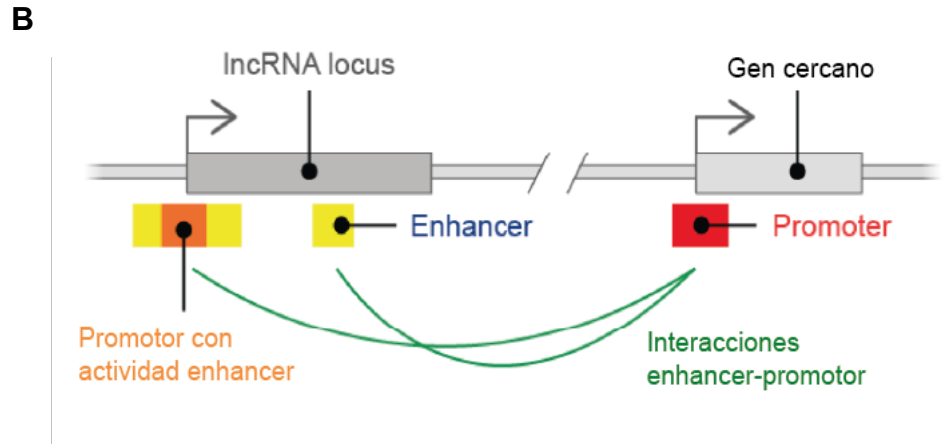


Figura 5. Mecanismos de acción de los lncRNAs. A. Mecanismos de acción mediados por el transcrito del lncRNA y su unión a proteínas. Tomado y modificado de Rinn & Chang, 2012. B. Los elementos regulatorios dentro de un loci de lncRNA también pueden influenciar la regulación génica local. Los promotores con actividad enhancer, o enhancer embebidos dentro del locus pueden llevar a cabo un efecto regulatorio. Modificado de Núñez-Martínez & Recillas-Targa, 2022.

Los elncRNAs están implicados en el mantenimiento y formación de asas de cromatina entre los enhancers dentro de su locus, y los promotores de sus genes blanco. Esto a través de diferentes mecanismos, como el reclutamiento del complejo mediador, la interacción con proteínas como CTCF (Gil & Ulitsky, 2020). Incluso hay estudios que muestran que los elncRNAs se encuentran enriquecidos en sitios de interacción enhancer-promotor, que los niveles de transcripción de estos elementos se correlacionan con el aumento en estas interacciones y que YY1 también está enriquecido específicamente en estas interacciones (Weintraub et al., 2017). El procesamiento o splicing de los elncRNA también está correlacionado positivamente con la actividad del enhancer y la activación de los genes blanco. Adicionalmente, se han encontrado evidencias en los que los promotores de los lncRNA, aunque no presenten características cromatínicas asociadas a enhancer, también pueden ejercer una actividad parecida sobre sus genes blanco (Engreitz, Haines, et al., 2016). Esto hace sentido con otros estudios que han demostrado que los promotores de genes codificantes a proteína pueden actuar como enhancers sobre otros genes (Dao et al., 2017; Núñez-Martínez & Recillas-Targa, 2022). (Figura 5B). Debido a la diversidad de mecanismos mediante los que ejercen su

función, el estudio de los lncRNAs ha sido desafiante. Por ello se utilizan estrategias computacionales y experimentales para caracterizar las funciones regulatorias que puede estar llevando a cabo, y distinguir entre el transcrito, la transcripción y/o la actividad de un elemento regulatorio dentro de su locus.

lncRNA en la eritropoyesis

Así como la estructura cromatínica, la expresión génica y la actividad de elementos regulatorios cambian durante la eritropoyesis, la transcripción no-codificante también es dinámica (Ding et al., 2016).

Hace aproximadamente una década, empezaron los esfuerzos por identificar y caracterizar los lncRNAs que participan en la hematopoyesis y eritropoyesis.

Las aproximaciones experimentales se han basado en el análisis global (mediante RNA-seq) de la expresión de los lncRNAs y su expresión diferencial en cada etapa y/o en pruebas funcionales individuales (Kulczyńska & Siatecka, 2016). Así se han encontrado lncRNAs que se expresan específicamente en los diferentes estadios de la eritropoyesis. Concordante con esto se ha determinado que la regulación de estos transcritos está mediada por los TFs específicos del linaje donde se expresan (GATA-1, Tal1, Klf1/EKLF). La mayoría de los lncRNA que se han asociado a una función particular en la eritropoyesis se han encontrado mediante ensayos de pérdida de función del transcrito, particularmente por su efecto sobre genes vecinos. Así se han descrito lncRNAs involucrados en la regulación de genes implicados en sobrevivencia de células comprometidas hacia el linaje eritroide (Hu et al., 2011), en la maduración y enucleación de eritroblastos (Alvarez-Dominguez et al., 2014; C. Wang et al., 2015), la actividad de TFs maestros de la eritropoyesis como Klf1 (Yang et al., 2022) y el recambio de globinas (Arriaga-Canon et al., 2014; Ivaldi et al., 2018; Yang et al., 2022).

El recambio de globinas se ha utilizado como un modelo en el que se integran todos los elementos previamente descritos en la regulación transcripcional durante el desarrollo y diferenciación eritroide, tanto en el dominio β -globina como en el α -globina en vertebrados. Estos dominios contienen los genes de globina embrionaria y adulta además de regiones que incluyen elementos enhancer agrupados

(descritos como sitios de hipersensibilidad a la DNAsal ó DHS eritroide-específicos, también llamados Regiones de Control del Locus ó LCR). Las secuencias regulatorias adquieren accesibilidad y se unen a TFs eritroide específicos como GATA-1 y KLF1 coincidiendo con la activación de los genes. Además, se ha encontrado que los elementos enhancer interactúan y forman asas de cromatina con los promotores de los genes globina embrionaria o adulta diferencialmente en el desarrollo (Wilber et al., 2011; Ryzhkova & Battulin, 2021). Mas recientemente se han encontrado más mecanismos que regulan este cambio de expresión dentro del locus, como la presencia de lncRNAs en el locus β -globina (Ivaldi et al., 2018; Higashi et al., 2022) y la expresión de lncRNAs transcritos a partir del elemento enhancer DHS2 (Ling et al., 2005; Gurumurthy et al., 2021). En único lncRNA descrito hasta la fecha en el dominio α -globina ha sido descrito por nuestro grupo de investigación en el modelo de pollo (Arriaga-Canon et al., 2014). Este modelo ha sido pionero e histórico en la investigación de la regulación transcripcional de los genes globina.

II. ANTECEDENTES

1. Modelo de diferenciación eritroide en pollo

El estudio de la diferenciación eritroide en el pollo ha sido fundamental para caracterizar la regulación transcripcional en la diferenciación y el desarrollo gracias a varias características: los estadios celulares en la eritropoyesis de las aves son comparables con los de los mamíferos (Figura 1). Existen modelos celulares y modelos *in vivo* para estudiar la eritropoyesis temprana y terminal así como la eritropoyesis primitiva y definitiva; la organización de los locus globina está conservada en vertebrados, por lo que es un buen modelo para entender la regulación transcripcional eritroide entre vertebrados. Por otra parte, la diferenciación celular *in vitro* recapitula la diferenciación terminal durante la eritropoyesis; el genoma de pollo comparte un patrón similar de marcas epigenéticas (modificaciones post-traduccionales en las histonas) y modificaciones

al DNA asociados a la activación o el silenciamiento de genes a los observados en mamíferos (Beacon & Davie, 2021). Este modelo es especialmente atractivo en el estudio de la maduración eritroide, debido a que las células conservan su núcleo en un estado altamente compacto por lo que es muy útil para estudiar la organización cromatinica y la regulación transcripcional en el eritrocito maduro (Penagos-Puig et al., 2023).

Particularmente nuestro grupo de investigación se ha enfocado en caracterizar y describir la regulación transcripcional en el locus α -globina de pollo en el que se han identificado diferentes secuencias regulatorias, formación de asas de cromatina, la presencia de proteínas de unión a DNA como CTCF, YY1 y TFs eritroide específicos como GATA-1 (Valadez-Graham et al., 2004; Escamilla-Del-Arenal & Recillas-Targa, 2008; Rincón-Arano et al., 2009; Furlan-Magaril et al., 2011; Ulyanov & Gavrillov, 2012; Valdes-Quezada et al., 2013). Las líneas celulares utilizadas como modelo de eritropoyesis son las células DT40 (células de linfoides) (Beacon & Davie, 2021), HD3 (eritroblastos que mantienen su capacidad de diferenciación mediante la inducción por temperatura, y no expresan los genes globina) y HD3 diferenciadas (HD3 diff, eritrocitos terminalmente diferenciados que ultraestructuralmente presentan las características de eritrocitos y expresan niveles esperados de los genes de globina adultas) (Beug et al., 1982).

Además, el único lncRNA estudiado en pollo es también el único caracterizado dentro del dominio de α -globina que tiene un papel regulador en la actividad del gen adulto α^D (Arriaga-Canon et al., 2014). En los estudios sobre la regulación transcripcional de los genes globina en el dominio α -globina de pollo, los mecanismos que activan los genes adultos en el *switch* de hemoglobina durante el desarrollo (en eritrocitos de 5 días de desarrollo a 10 días de desarrollo) (Figura 6B) recapitulan los mecanismos de activación al diferenciar las células HD3.

2. El locus de α -globina como modelo de estudio durante el recambio de expresión de genes globina durante la diferenciación eritroide en pollo.

El locus de α -globina de pollo se encuentra en el minicromosoma 14 y contiene dos genes que no corresponden a globinas, *Nprl3* (Kowalczyk et al. 2012) y *TMEM8* en sus extremos 5' y 3', respectivamente (Figura 6A). Contiene 3 genes de α -globina: un gen embrionario (gen π) y dos genes adultos (α^D y α^A). Durante los 4-5 días posteriores a la fecundación se expresa el gen embrionario (correspondiente a la eritropoyesis primitiva) π , mientras los genes adultos permanecen silenciados. Posteriormente, entre los días 6 y 7 se inicia la transcripción de los genes adultos α^D y α^A (eritropoyesis definitiva) coincidente con el inicio del silenciamiento del gen π . A los 10 días post-fecundación los eritrocitos circulantes expresan exclusivamente a los genes adultos α^D y α^A (figura 6B). Como se mencionó anteriormente, este modelo también contiene un lncRNA (*lncRNA- α GT*) implicado en la activación de los genes de α -globina adultos. Este transcrito sobrelapa con el gen antisentido *Nprl3*, (figura 6) y muestra un patrón de expresión específico del linaje eritroide. Mediante análisis bioinformáticos de la secuencia, se encontró que éste transcrito no tiene potencial codificante, y que presenta dos exones y un intrón. Estudios en el laboratorio con eritrocitos circulantes (RBC) identificaron la secuencia promotora enriquecida en la marca de histonas H3K4me3 sobre todo en embriones de 10 días de desarrollo, al igual que el promotor del gen adulto α^D . También se determinó que los niveles transcripcionales del *lncRNA- α GT* correlacionan con el aumento de expresión de los genes adultos α^D y α^A . Un ensayo de pérdida de función mediante un shRNA (*short hairpin RNA*) en RBC de pollo con 10 días de desarrollo demostró que la disminución del transcrito provoca una disminución en la expresión del gen adulto α^D . Al realizar la caracterización del *lncRNA- α GT* en células HD3 y HD3 diferenciadas, se encontraron resultados semejantes a los observados en RBC. La transcripción de este aumenta al diferenciar las células al igual que los genes adultos de globina.

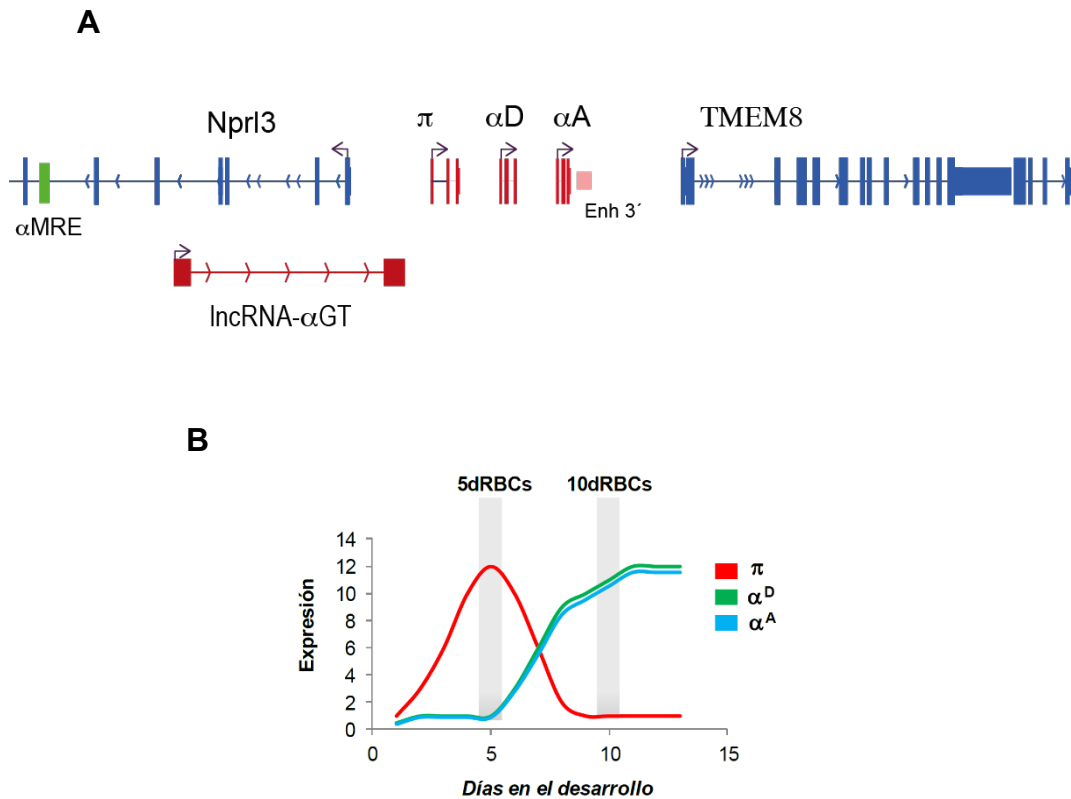


Figura 6. Dominio α -globina de pollo y la expresión diferencial de los genes globina. A. En el dominio se muestran dos elementos enhancer: enhancer 3' (*enh 3'*, rosa). Hacia el extremo 5' se encuentra el elemento α MRE (Major Regulatory Element, verde). Los genes de α -globina y el gen predicho del *lncRNA- α GT*. También se muestran los genes *Nprl3* río arriba de los genes globina, y el gen *TMEM8*, localizado hacia la región 5' del locus no es un gen globina, y su localización dentro del locus se debe a una inversión genómica. Tomado y modificado de Arriaga-Canon et al., 2014 **B.** Expresión diferencial (*switch* de hemoglobina) de los genes embrionario (π) y adultos α^D y α^A . Modificado de Valdes-Quezada et al., 2013.

El ensayo de pérdida de función del *lncRNA- α GT* en HD3 diferenciadas también demostró que esto disminuye los niveles transcripcionales, así como una disminución en el enriquecimiento de la marca de histonas H3K4me3 en el promotor del gen adulto de α^D (Arriaga-Canon et al., 2014).

Debido a la evidencia descrita, decidimos profundizar en el estudio de los mecanismos mediante los que el *lncRNA- α GT* podría regular la expresión del locus α -globina, abordando también la posibilidad de que un elemento regulador dentro

del gen del lncRNA o la propia transcripción afecten la expresión de los genes del locus.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los lncRNAs son transcritos que han demostrado tener funciones cruciales en el control de la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación celular, como la eritropoyesis. A pesar de su importancia, existen pocos estudios a escala global que han explorado su dinámica transcripcional y cromatínica durante la diferenciación eritroide en organismos modelo como el pollo. En este trabajo proponemos utilizar los datos de secuenciación masiva de transcriptoma (RNA-seq) y accesibilidad a la cromatina (ATAC-seq) para analizar la dinámica transcripcional y cromatínica de los lncRNA en la etapa terminal de la eritropoyesis. Como paradigma para entender dicha dinámica evaluamos la contribución del locus del *lncRNA- α GT* sobre los genes adyacentes en el dominio α -globina de pollo. Durante la diferenciación eritroide en pollo.

IV. HIPÓTESIS

Los lncRNA y en particular el *lncRNA- α GT* cambian dinámicamente su expresión y su estructura cromatínica durante la diferenciación celular en la eritropoyesis tardía. Estos cambios en el locus del *lncRNA- α GT* influyen en la expresión del gen adulto α^D .

V. OBJETIVO

Identificar a escala global los locus de lncRNAs con expresión y accesibilidad dinámica durante la diferenciación terminal eritroide, así como la aportación del locus del lncRNA- α GT en la regulación eritroide.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar análisis computacionales para caracterizar la dinámica transcripcional cromatínica de los locus de lncRNAs durante la eritropoyesis terminal en pollo.
- Analizar el locus del *lncRNA- α GT* desde la perspectiva transcripcional cromatínica y estructural así como su relación con la expresión de los genes de α -globina.
- Evaluar el efecto de activación endógena del locus del *lncRNA- α GT* sobre los genes de α -globina mediante el sistema CRISPRa.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Análisis Bioinformáticos

1.1 Análisis de secuenciación de RNA

Se reanalizaron los datos públicos a partir de los siguientes números de acceso; HD3, HD3-DIF y DT40 (GSE765739); aRBC, eRBC y eritroblastos (GSE206194); hígado y linfocitos (PRJEB27455). Los archivos de lecturas (fastq.gz) fueron mapeados al genoma de referencia (Galgal6) utilizando el programa RNA STAR (v2.7.10b). Posteriormente, se utilizaron los archivos de alineamiento en formato BAM y se determinaron los conteos de las lecturas mapeadas en los exones de los genes anotados por ENSEMBL (Gallus,gallus.GRCg6a.106.gtf) mediante el programa FeatureCounts (v2.0.3). Las coordenadas del *lncRNA- α GT* predichas se incluyeron en el archivo de anotación (.gtf).

Los conteos generados se normalizaron mediante el método TMM (Trimmed Mean of M-values) con el programa edgeR (v3.36.0). Los conteos normalizados se utilizaron para identificar los genes diferencialmente expresados utilizando un factor de cambio (FC) > 2 y un valor de p ajustado (FDR) menor a $p < 0.05$.

1.2 Análisis de datos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) y accesibilidad de la cromatina (ATAC-seq).

Se utilizaron los datos de ChIP-seq para CTCF y YY1, así como los de ATAC-seq generados en nuestro laboratorio (en proceso de publicación) en células HD3 y HD3 diff. Adicionalmente se analizaron los datos de ATAC-seq en células HD3, eRBC y aRBC (GSE GSE206191). Los archivos de lecturas (fastq.gz) se mapearon al genoma de referencia (Galgal6) utilizando el programa Bowtie2 (v2.5.0). Los archivos de alineamiento en formato BAM se filtraron para eliminar lecturas no mapeadas, duplicados de PCR y lecturas multimapeadas (lecturas que mapean en más de una región) utilizando el programa BAM filter (v0.5.9). Se generaron archivos de señal normalizada (archivos bigwig) mediante el programa deepTools (v3.5.2) utilizando la herramienta bamCoverage. La señal normalizada sobre las regiones P (P1-P6) fue determinada mediante la herramienta multiBigwigSummary (v3.5.2). El llamado de picos se realizó con MACS2 (v2.2.7) con los parámetros default.

1.3 Análisis de motivos

Para la búsqueda de motivos sobre los promotores de los lncRNA diferencialmente expresados se utilizaron las coordenadas genómicas a partir de 1kb (kilobases) río arriba y río abajo de los sitios de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés) anotados en ENSEMBL (GRCg6a). Posteriormente se utilizaron dichas coordenadas para escanear en búsqueda de motivos mediante la herramienta findMotifsGenome del programa HOMER (v4.11) utilizando el genoma de pollo (Galgal6) y la colección de motivos identificados por ChIP-seq en vertebrados. Los 12 motivos más significativos basándose en una distribución hipergeométrica y (valor de $p < 0.0001$) fueron seleccionados y visualizados.

1.4 Análisis de datos de Hi-C

Se utilizaron los archivos de pares válidos obtenidos a partir del procesamiento de los archivos de secuenciación de Hi-C para eRBC, aRBC, HD3 y fibroblastos publicados bajo el número de acceso GSE206192. Los pares válidos fueron convertidos a formato .hic utilizando el programa HiC-Pro (v2.11.1) y visualizados

con el programa juicibox (1.11.08). Las matrices fueron visualizadas en una ventana de las siguientes coordenadas; chr14:12471330-12553813.

1.5 Análisis de UMI-4C

Se reanalizaron los datos de UMI-4C generados en el laboratorio (en proceso de publicación) empleando el programa UMI4Cats. Los archivos fasta.gz se utilizaron para el mapeo utilizando la dependencia Bowtie2. Los archivos de alineamiento se utilizaron para identificar el número de UMIs por cada fragmento de restricción obtenido en el experimento de UMI-4C y basándose en el fragmento que sobrelapa con el promotor de lncRNA- α GT. Los UMIs obtenidos se normalizaron utilizando DESeq2 (v 2.11.40.8) y se seleccionaron aquellos que correspondieron a los fragmentos que sobrelaparon con los promotores de los genes evaluados. Los valores de UMIs normalizados fueron graficados con GraphPad Prism (v9).

1.6 Visualización de datos

Los conteos normalizados del RNA-seq se graficaron utilizando ggplot2 (v3.4.3) en R (v4.0.5). Los conteos normalizados del ATAC-seq y ChIP-seq, así como los datos de RT-qPCR fueron graficados en GraphPad Prism (v9). Las señales del RNA-seq, ChIP-seq y ATAC-seq en formato bigwig fueron visualizados en el Genome Browser de UCSC.

1.7 Análisis estadístico

Los genes diferencialmente expresados fueron identificados mediante el método de FDR (Benjamini y Hochberg) con un valor de $p < 0.05$ y un valor de cambio ± 1 en escala logarítmica de base 2. La significancia de los conteos normalizados de RNA-seq y ATAC-seq fue determinada mediante la prueba de Mann-Whitney test. Los valores de RT-qPCR fueron evaluados mediante la prueba t-student.

2. Cultivo celular

La línea celular HD3 corresponde a eritroblastos de pollo arrestados por la infección del virus AEV (Avian Erythroblastosis virus) (Beug *et al.* 1979). Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 8% de suero fetal bovino (SFB), 2% de suero de pollo (ChS) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (medio HD3).

3. Extracción de RNA y RT-PCR

Se resuspendieron las células en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y la extracción se continuó según las indicaciones proporcionadas. El ARN se resuspendió en agua libre de RNasas y fue cuantificado en el equipo de NanoDrop-2000. El RNA (5 µg por reacción) fue sometido a una reacción con DNasa. Posteriormente se generó el DNA complementario (DNAc) mediante retro-transcripción (RT) oligonucleótido-específica utilizando la enzima Transcriptasa Reversa de Promega. Después se hicieron las reacciones de PCR utilizando concentraciones de MgCl₂ y temperaturas previamente estandarizadas.

4. Generación de células HD3 estables que expresan el sistema CRISPRa

Se generó una línea celular HD3 con expresión estable del plásmido Cas9m4-VP64 (Addgene #47319). Para esto, se sembraron 2×10^5 células en un pozo de una placa de 6 pozos, y se agregó lipofectamina 2000 y el plásmido Cas9m4-VP64 en diferentes proporciones, en un volumen total de 1 ml de DMEM. Después de 6 horas de agregaron 2 ml de medio HD3 y se mantuvieron 2 días creciendo en cultivo. Después se agregó genitocina a una concentración de 0.8 mg/ml para seleccionar las células con el plásmido integrado. Se mantuvieron en selección durante una semana y después se evaluó la expresión de VP64 mediante RT-qPCR. Esta línea celular se denominó HD3-VP64.

5. Clonación de secuencias guías en plásmidos.

Se generaron plásmidos PX330 (Addgene #42230) sin el gen de la proteína Cas9, mediante su digestión con las enzimas de restricción XbaI (NEB) y NotI (NEB). Posterior a esta digestión, se purificó el fragmento de DNA a partir de un gel de agarosa, y se hizo una reacción para rellenar los extremos cohesivos para generar extremos romos utilizando la enzima Klenow (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo de la compañía, para finalmente ligar con ligasa T4 (NEB). Este plásmido se secuenció para comprobar la eliminación del gen Cas9. Una vez obtenido el plásmido PX330Cas9(-) se hizo una digestión con la enzima de restricción BbsI (NEB). Los RNAs guías se alinearon, se fosforilaron y en el sitio de BbsI. Cada una de las clonaciones fue verificada mediante secuenciación. A estos plásmidos se le denominó PX330Cas9(-)gRNA.

Las transfecciones transitorias se hicieron en la línea celular HD3-VP64 con los plásmidos PX330Cas9(-)gRNA como sigue: se sembraron 2×10^5 células en cada pozo de una placa de 6 pozos con medio DMEM. Se agregó la lipofectamina 2000 junto con los plásmidos px330Cas9(-)gRNA en un volumen total de 1 mL en diferentes proporciones (μ l de lipofectamina: μ g de plásmidos). Se dejaron incubando durante 6 horas, después de las cuales se agregó 2 mL de medio HD3. Estas células se dejaron creciendo durante 48 horas y posteriormente se les extrajo el RNA para hacer análisis mediante RT-qPCR.

6. Análisis de la *trans*-activación

Se hicieron RT-qPCRs para evaluar los niveles del transcrito *trans*-activado, utilizando un gen constitutivo para normalizar y un control negativo en el cual no se transfectó el plásmido sin ningún RNA guía clonado. Este ensayo se realizó con el kit RT-qPCR OneStep de Kapa Biosystems. El factor de cambio se obtuvo mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen & Livak, 2008), y las diferencias significativas se obtuvieron por una prueba de t de student utilizando el programa Graphpad Prisma Software.

VIII. RESULTADOS

1. Dinámica transcripcional en la diferenciación terminal eritroide en pollo

Para identificar los transcritos que se expresan diferencialmente en la diferenciación terminal eritropoyética en pollo, reanalizamos los datos previamente publicados de secuenciación del transcriptoma (RNA-seq) (Ulianov et al., 2017a) en el modelo de diferenciación *in vitro* (HD3 wt vs HD3 diff). Utilizando estos datos se identificaron genes anotados por ENSEMBL tanto para genes codificantes para proteínas (RNAm) como lncRNAs que están diferencialmente expresados. Mediante este análisis se encontraron 2,886 RNAm significativamente incrementados y 1858 RNAm disminuidos (Figura 7A). Entre los genes que aumentaron su expresión se encontraron los genes de α -globina π (HBZ), α D (HBD) y α A (HBA). En el caso de los genes globina adultos (α D y α A) se observó un mayor cambio de expresión con respecto al gen embrionario (π). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente (Beug et al., 1982; Furlan-Magaril et al., 2011; Ulianov et al., 2017b; Valdes-Quezada et al., 2013) en donde la diferenciación promueve la activación completa de los genes adultos de α -globina. Esta activación corresponde a la etapa eritroide de RBC de embriones con 10 días de desarrollo. Asimismo, los cambios de expresión genica de RNAm mostraron un aumento de reguladores maestros de la diferenciación eritroide tales como KLF1, FOG1 y BCL11A, similar a lo que ocurre en modelos de humano y ratón (Schulz et al., 2019; Georgolopoulos et al., 2021). Interesantemente, se notó que el aumento en la expresión de KLF1 fue mayor, lo cual también se ha observado en la diferenciación eritroide terminal en ratón y humano (Ludwig et al., 2019; Schulz et al., 2019). Estas observaciones demostraron que el análisis computacional logró identificar y recapitular los cambios en la expresión de genes involucrados en la diferenciación eritroide como se había mencionado. Así mismo estos hallazgos apoyan el modelo de diferenciación *in vitro* de células HD3 para el estudio del panorama regulatorio de la diferenciación eritroide en pollo.

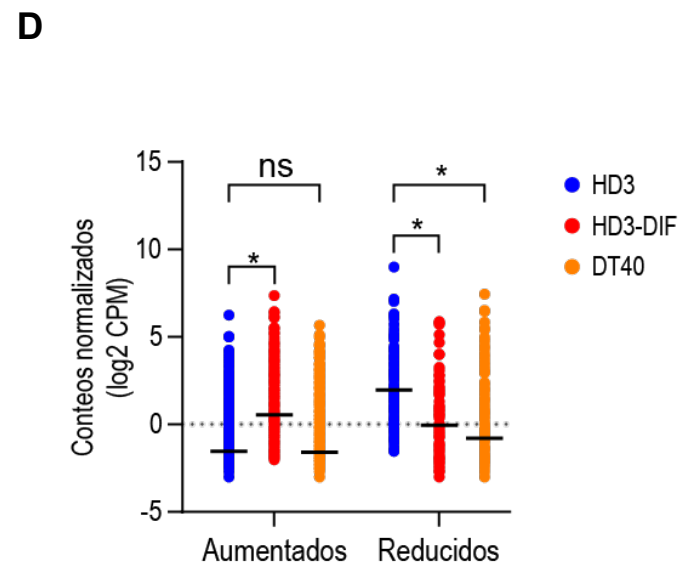
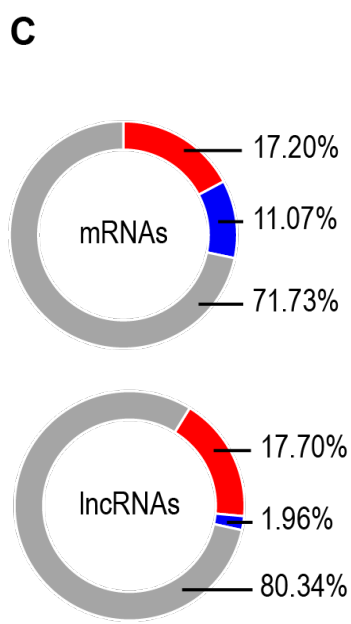
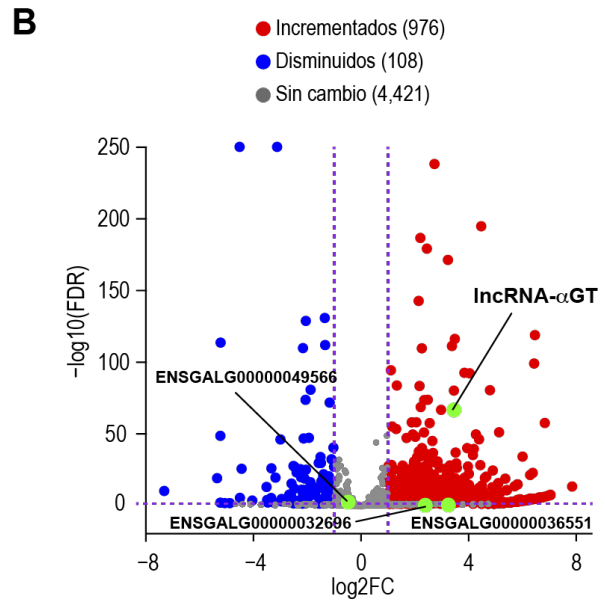
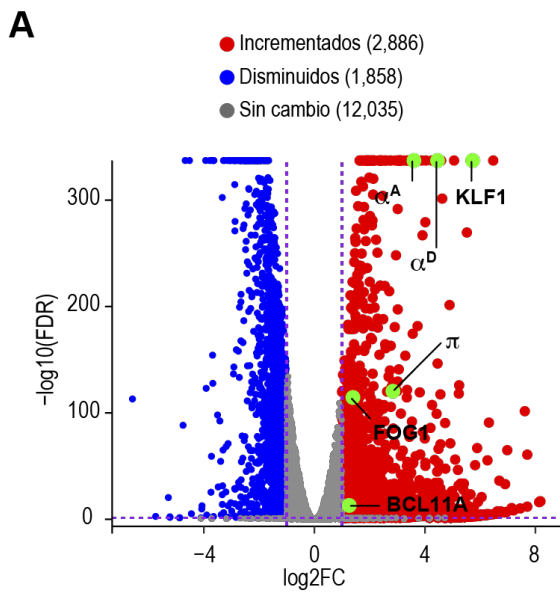


Figura 7. Expresión diferencial de genes codificantes y no-codificantes en HD3 y HD3-DIF.

A. Gráfico de volcano mostrando los mRNAs diferencialmente expresados (puntos azules y rojos) identificados en el análisis de RNA-seq de células HD3 vs HD3-DIF. Los puntos verdes representan ejemplos de RNAm eritroides. Los genes diferencialmente expresados se identificaron utilizando un $FDR < 0.05$ y $\log_2 FC \pm 1$.

B. Gráfico de volcano mostrando los lncRNAs diferencialmente expresados (puntos azules y rojos) identificados en el análisis de RNA-seq de células HD3 WT vs HD3-DIF. Los puntos verdes representan ejemplos de lncRNAs anotados. Los genes diferencialmente expresados se identificaron aquellos con $FDR < 0.05$, $\log_2 FC > 1$, $FDR < 0.05$ y $\log_2 FC \pm 1$.

C. Gráfico de pastel donde se muestra el porcentaje de genes de RNAm y lncRNAs expresados diferencialmente (aumentados en rojo y disminuidos en azul) en células HD3 y HD3-DIF. En gris se muestran los genes sin cambios de expresión. El 100% de los datos son los genes codificantes a proteínas (mRNAs) en pollo anotados en ENSEMBL y los genes de lncRNAs de pollo anotados en ENSEMBL.

D. Gráfico de puntos donde se muestran los niveles de expresión de los lncRNAs que aumentaron/disminuyeron en HD3-DIF (rojo) vs HD3 (azul) y DT40 (naranja).

Los cambios significativos en el aumento/disminución de la expresión se obtuvieron mediante la prueba de Mann-Whitney. * $p < 0.05$; ns: no significativo.

En eritrocitos de pollo también se observa un aumento de expresión de Klf1 en la etapa de desarrollo en la que se establece la expresión de los genes de α y β -globina adultas (RBC de 7 a 14 días de desarrollo embrionario) (Chervenak et al., 2006).

Además de los TFs, los lncRNAs pueden influenciar la regulación transcripcional de genes durante la diferenciación eritroide, y por lo tanto, los cambios en la expresión de lncRNAs también están acompañados por cambios en expresión de mRNAs (Alvarez-Dominguez et al., 2014; Kulczyńska & Siatecka, 2016; Xu & Shi, 2019; Yang et al., 2022). Basado en esto, se analizaron los cambios de expresión de lncRNAs anotados por ENSEMBL en pollo. Se encontraron 976 lncRNAs aumentados, mientras que 108 disminuyeron su expresión tras la inducción a la diferenciación de células HD3 (HD3-DIF) (Figura 7B). Entre los lncRNAs que aumentaron su expresión se encontró el *lncRNA- α GT*, el cual representa el único

lncRNA eritroide descrito en pollo. Adicionalmente, se exploraron otros lncRNAs anotados como tejido específico como ENSGAL00000032696 (hipotálamo), ENSGALG00000036551 y ENSGALG00000049566 (pulmón) (Jehl et al., 2020). Como se esperaba, estos lncRNAs no cambiaron de expresión de forma significativa bajo la inducción de diferenciación de HD3 indicando que, en efecto, estos ejemplos no representan lncRNAs eritroides. El porcentaje de genes que aumentaron su expresión en mRNAs y lncRNAs es similar (17.20% y 17.70%, respectivamente). Estos porcentajes indican que similar a lo que ocurre con los mRNAs, una considerable fracción de lncRNAs anotados sufren cambios de expresión asociados con la diferenciación terminal eritroide (Figura 7C). Al comparar la expresión de los lncRNAs con un incremento en HD3-DIF con su nivel de expresión en células DT40 (células linfoides), observamos que se expresan en los mismos niveles que en HD3 (Figura 7D). Este resultado sugiere que el aumento de expresión de este grupo de lncRNAs es específica de esta etapa de diferenciación celular.

1.1 Dinámica cromatínica en las regiones reguladoras de los lncRNAs diferencialmente expresados

Como se mencionó anteriormente, la dinámica transcripcional está asociada a la dinámica cromatínica, que determina la accesibilidad/inaccesibilidad a secuencias regulatorias que pueden ser reconocidas por reguladores como los TFs.

Para evaluar si las regiones regulatorias de los lncRNAs expresados diferencialmente tienen una accesibilidad dinámica y específica, analizamos los datos generados a partir de un ATAC-seq realizados en nuestro laboratorio (en proceso de publicación) en las coordenadas genómicas correspondientes a 1kb río arriba y río abajo del TSS de los lncRNAs (figura 8B). Al comparar la señal de ATAC-seq en las regiones promotoras de los lncRNAs que aumentan su expresión observamos que hay un aumento en la señal de accesibilidad a la cromatina al diferenciar las células HD3. Esto nos indica que estas regiones reguladoras podrían estar activándose durante la diferenciación eritroide terminal. En cambio, los promotores de los lncRNAs que disminuyen su expresión al diferenciar las células

HD3 no muestran un cambio significativo en la señal de accesibilidad, lo cual podría deberse a algún mecanismo de regulación que no afecta la accesibilidad a la cromatina.

Dado que estos lncRNAs y/o sus elementos regulatorios podrían estar llevando a cabo alguna función regulatoria específica en la diferenciación eritroide terminal, decidimos analizar si sus secuencias regulatorias contienen motivos de unión a TFs eritroide específicos. Debido a que no hay datos de ChIP-seq de TFs en líneas eritroides de pollo, la búsqueda se realizó utilizando motivos de unión conservados en vertebrados. Para el análisis se utilizaron las coordenadas genómicas que incluyen 1 kb río arriba y río a bajo del TSS anotado de los lncRNAs diferencialmente expresados. Los 12 motivos de unión más significativos encontrados por el programa HOMER se muestran en la figura 8A junto con el número de motivos de unión encontrados en los lncRNAs diferencialmente expresados. Como se observa, Klf1 y Klf3 están dentro de los 3 motivos mejor ranqueados en HOMER. La posibilidad de que Klf1 se esté uniendo a los promotores de los lncRNAs expresados diferencialmente concuerda con lo reportado en la diferenciación eritroide terminal en modelos de humanos donde hay un aumento de expresión de Klf1, así como un aumento en la accesibilidad de regiones regulatorias que contienen su motivo de unión durante la eritropoyesis terminal (Ludwig et al., 2019; Schulz et al., 2019). Por su parte, Klf3 es un TF que se expresa en células eritroides y otras células hematopoyéticas. Se ha encontrado que actúa como represor de genes que se silencian durante la diferenciación eritroide, además de que compite por los sitios de unión en el DNA con Klf1. Esto quiere decir que Klf3 es parte de un mecanismo fino de regulación donde Klf3 reprime los genes que Klf1 activa durante la eritropoyesis (Funnell et al., 2012; Ilsley et al., 2017).

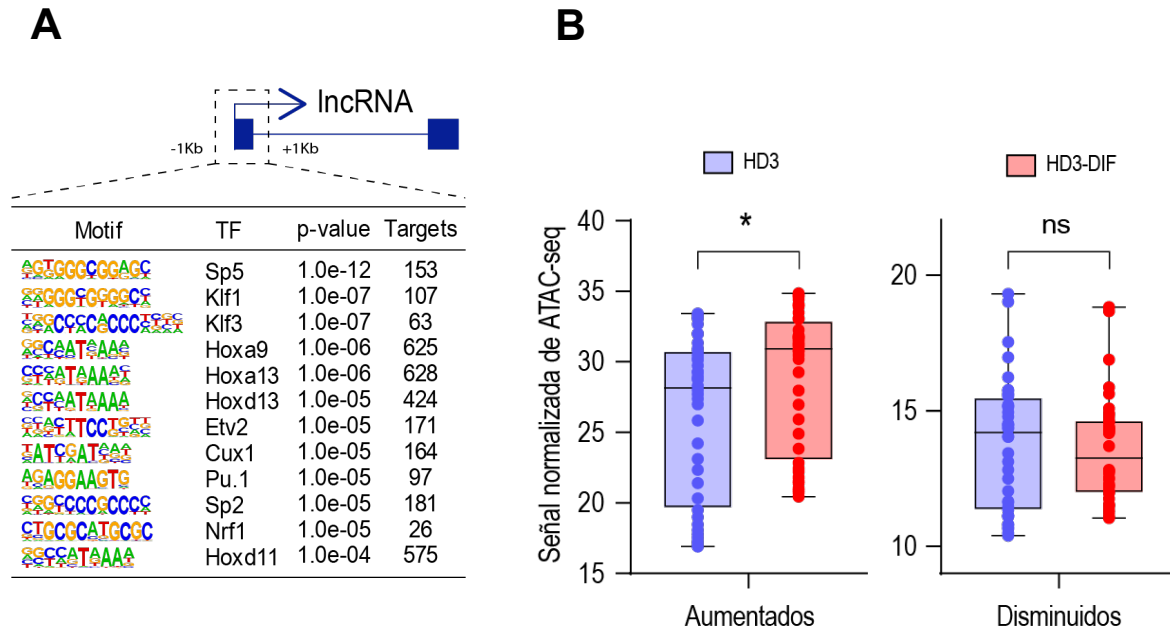


Figura 8. Unión de TFs y cambio en la accesibilidad de la cromatina en los promotores de los IncRNA expresados diferencialmente en HD3 y HD3-DIF.

A. Se muestran los 12 motivos de unión de TFs más significativos ($p < 0.0001$) encontrados por HOMER en los promotores de los IncRNA expresados diferencialmente en HD3 y HD3-DIF, además del número de motivos encontrados en estas secuencias.

B. Gráfico de caja donde se muestra la señal de ATAC-seq en las secuencias promotoras de los IncRNA que aumentaron/disminuyeron su expresión de HD3 (morado) a HD3-DIF (rojo). Se utilizó la prueba Mann-Whitney. * $p < 0.05$; ns: no significativo.

Nrf1 se ha identificado como un TF necesario para la eritropoyesis normal en el hígado fetal, aunque se desconoce el mecanismo por el que regula este proceso (Chan et al., 1998). En humano también se ha encontrado que el aumento de accesibilidad coincide con sitios que contienen el motivo de unión de Nrf1 en la diferenciación eritroide terminal (Schulz et al., 2019). Por otro lado los TFs como Etv2, HoxA9, Pu.1 también tienen una función reguladora en la diferenciación hematopoyética, pero en etapas mucho más tempranas del desarrollo y/o diferenciación. Por ejemplo, Etv2 es un regulador necesario para determinar el linaje hematopoyético durante la embriogénesis en ratón (Koyano-Nakagawa et al., 2012)

y HoxA9 tiene un papel en el mantenimiento de la pluripotencia en las células HSC y la diferenciación hacia el linaje mielóide (Georgolopoulos et al., 2021; Ren et al., 2021; Aryal et al., 2023). Pu1 es un TF maestro que determina el compromiso de los MEP hacia la mielopoiesis e inhibe el efecto de GATA-1 (Zhang et al., 2000; Tsiftoglous et al., 2009). Finalmente los TFs Sp5, Hoxa13, Hoxd13, Cux1, Sp2 no tienen un papel directo en la regulación de la diferenciación eritropoyética. Aunque estos resultados no muestran únicamente TFs específicos de la eritropoyesis, nos dan un indicio de qué TFs podrían ser utilizados para buscar nuevos sitios de unión en HD3 y HD3-DIF con técnicas como ChIP-seq.

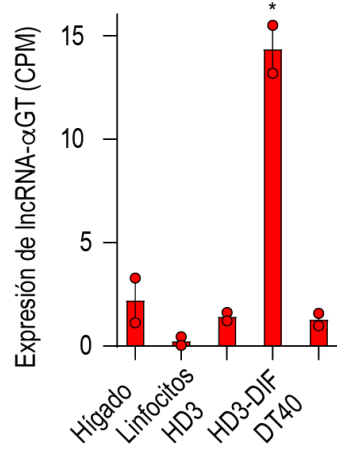
Estos datos nos sugieren que las secuencias regulatorias de los lncRNA que aumentaron su expresión durante la diferenciación muestran mayor accesibilidad en la etapa terminal de la diferenciación eritroide en pollo y que podrían estar siendo regulados por el TF eritroide específico Klf1.

Utilizando los datos genómicos obtenidos en esta parte, nos ha permitido seguir caracterizando específicamente la dinámica del *lncRNA- α GT* y su función regulatoria sobre los genes globina.

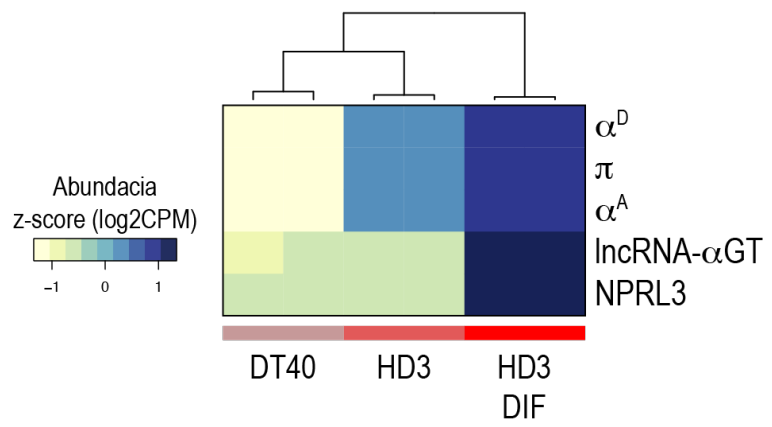
2. La expresión del *lncRNA- α GT* y su configuración cromatínica son específicas de la diferenciación eritroide terminal en pollo

Aunque ya habíamos detectado el aumento en la expresión del *lncRNA- α GT* en HD3-DIF con respecto a HD3, reanalizamos datos de RNA-seq publicados por (Ulianov et al., 2017a) para observar su expresión en una línea celular linfóide (DT40), y los datos publicados en (Foissac et al., 2019) para observar su expresión en células no eritroides (linfocitos) y células de hígado de pollo (Figura 9A). Este análisis nos mostró que la expresión del *lncRNA- α GT* es específica de la etapa eritroide terminal en pollo, y no se expresa en células de otros linajes hematopoyéticos (linfocitos y DT40) ni en células no hematopoyéticas. Este resultado coincide con lo reportado por nuestro grupo de investigación (Arriaga-Canon et al., 2014).

A



B



C

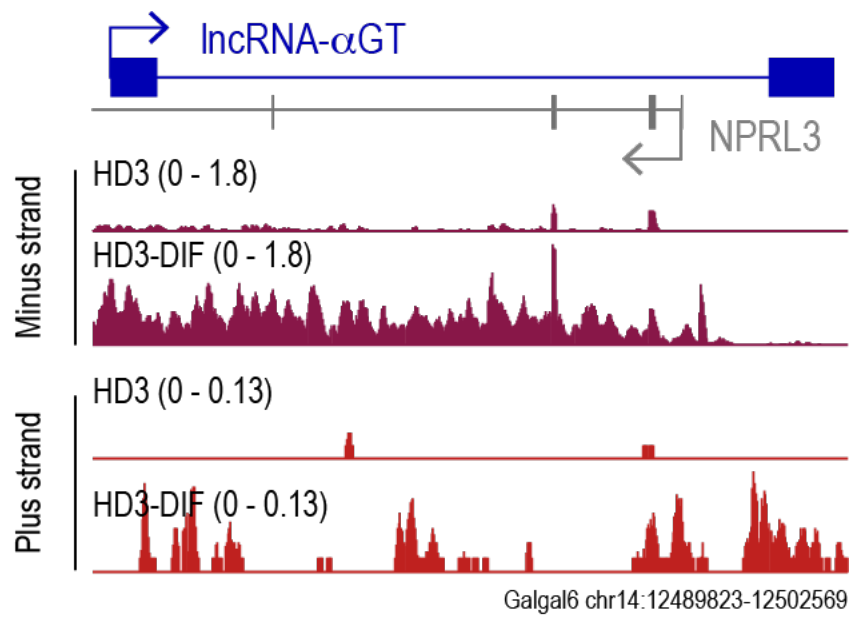


Figura 9. El lncRNA- α GT se expresa específicamente en eritrocitos de pollo.

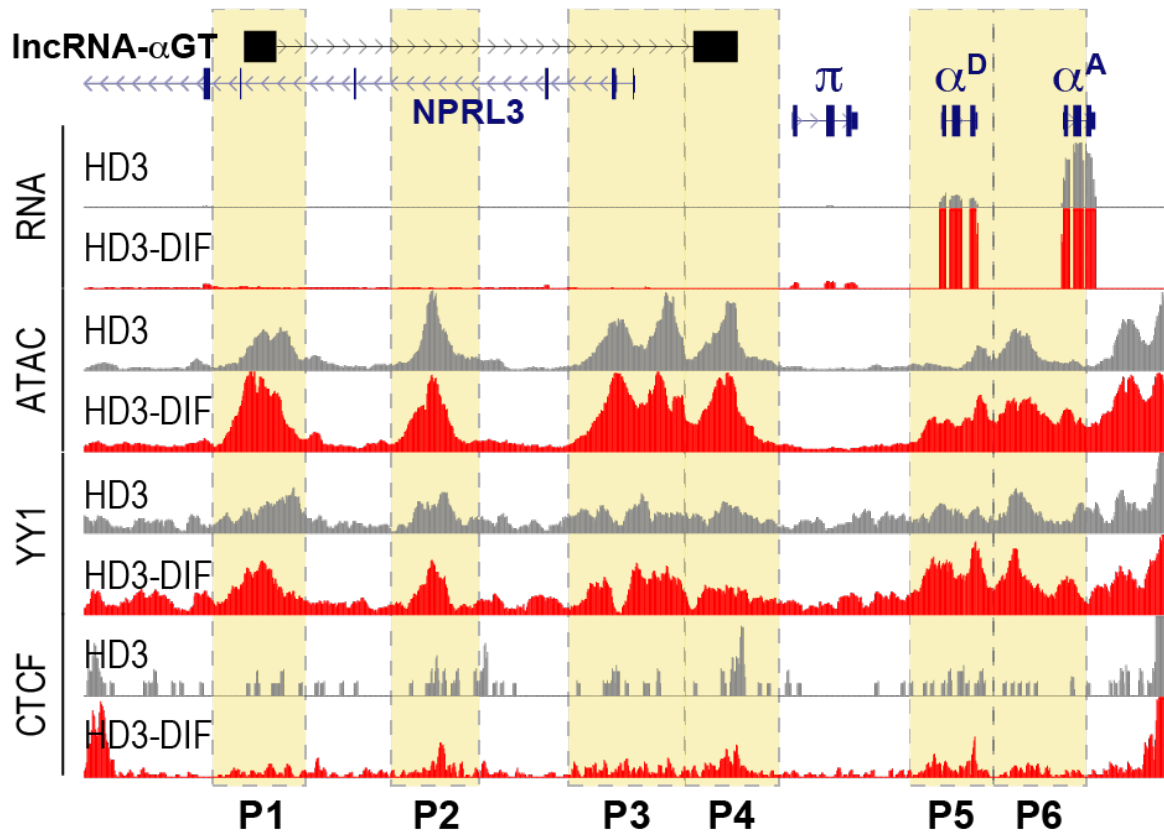
A. Gráfico de barras donde se muestra la expresión del *lncRNA- α GT* en líneas celulares eritroides (HD3, HD3-DIF) y no eritroides (DT40, linfocitos e hígado). La significancia se analizó mediante una prueba de ANOVA de una vía con $p=0.0002$ y la expresión esta normalizada a CPM (conteos por millón).

B. Mapa de calor en el que se muestra la diferencia en la expresión de los genes π , α^D , α^A , *lncRNA- α GT* y *NPRL3* en células DT40, HD3, HD3-DIF. La comparación en la expresión se obtuvo con la prueba Z-score.

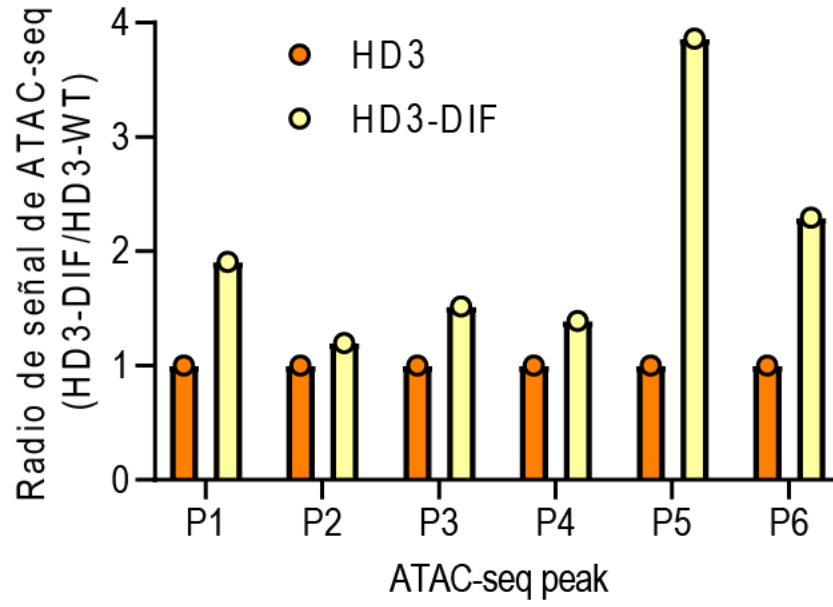
C. Visualización en Genome Browser de UCSC de la señal de RNA-seq cadena-específica en el locus del *lncRNA- α GT* en HD3 y HD3-DIF.

Además se analizaron los cambios en la expresión los genes que se encuentran dentro del locus de α -globina de pollo en la diferenciación eritroide. Como se esperaba, las células no eritroides (DT40) no expresan ninguno de los genes mostrados. De hecho, el aumento de expresión en todos los genes (con un z-score >0) se observa hasta la diferenciación de las células HD3 (Figura 9B). La magnitud del cambio es mayor en la expresión del gen del *lncRNA- α GT* y el gen antisentido *Nprl3* además de que su aumento de expresión coincide con el aumento en la expresión de los genes globina. Para mostrar el aumento de expresión del *lncRNA- α GT* de manera cadena específica, visualizamos la señal de RNA-seq proveniente de cada cadena. En la cadena positiva observamos la transcripción sentido específica del *lncRNA- α GT*. Por otro lado en la cadena negativa (antisentido) se observa la transcripción del gen *Nprl3* (Figura 9C). Estos resultados nos mostraron que los genes que se encuentran dentro del dominio α -globina de pollo se activan exclusivamente al diferenciar *in vitro* HD3. Debido a esto, nos preguntamos si la accesibilidad en la secuencia promotora del *lncRNA- α GT* también es dinámica.

A



B



C

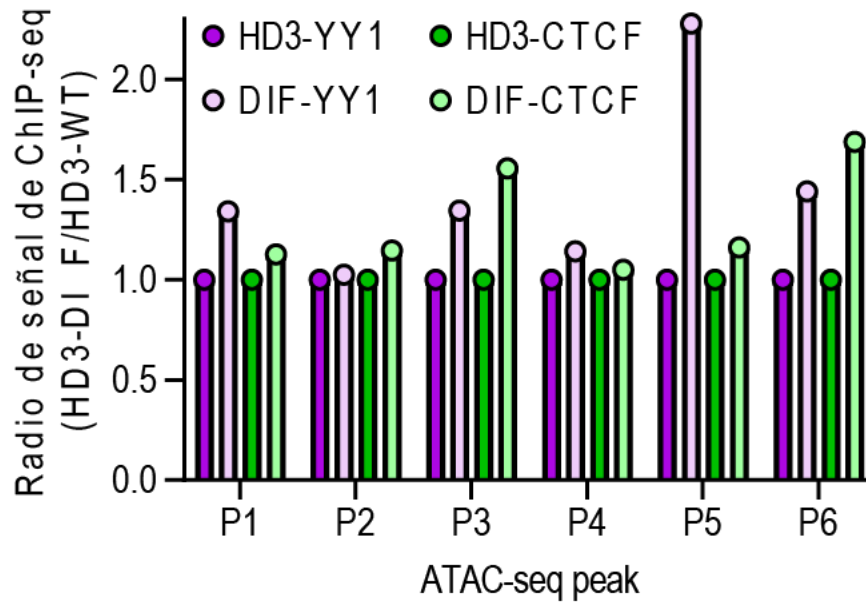


Figura 10. Cambio en la expresión, accesibilidad de la cromatina y enriquecimiento de CTCF y YY1 en los genes del *lncRNA- α GT* y α -globina de pollo en células HD3 y HD3-DIF.

A. Visualización en Genome Browser de UCSC de la señal obtenida en HD3 y HD3-DIF en los siguientes análisis: RNA-seq, ATAC-seq, ChIP-seq (CTCF y YY1) a lo largo del locus α -globina de pollo. El primer “track” representa los genes en esta región. Las regiones P fueron seleccionadas por la señal de ATAC-seq.

B. Gráfico de barras donde se observa el cambio de la señal de accesibilidad de la cromatina en las regiones P en HD3-DIF (amarillo) con respecto a la señal de HD3 (naranja).

C. Gráfico de barras del cambio de señal del ChIP-seq de YY1 y CTCF en las regiones P en las células HD3-DIF con respecto a HD3.

Para verificar esto se hizo un análisis de la señal de accesibilidad en la región promotora del *lncRNA- α GT* utilizando los datos generados de ATAC-seq (Figura 10A-B). En la figura 10A se muestra de la parte superior a la inferior: los genes globina, en gen de *lncRNA- α GT* y el gen *NPRL3* la señal obtenida del análisis de RNA-seq, ATAC-seq, ChIP-seq con YY1 y ChIP-seq con CTCF, cada una con la señal en HD3 Y HD3-DIF. Los resultados de estos análisis se visualizaron en el Genome Browser de UCSC y las coordenadas del *lncRNA- α GT* predichas previamente por nuestro grupo (Arriaga-Canon et al., 2014) se visualizaron utilizando la herramienta BLAT. Las regiones resaltadas corresponden a los sitios donde se encuentra la señal de ATAC-seq y se denominaron sitios P1-P6. La señal de RNA-seq (transcripción) que corresponde a los genes adultos de α -globina (regiones P5 y P6) aumentan en HD3-DIF, como se esperaba. En esta imagen no se aprecia el aumento de la región que corresponde al *lncRNA- α GT* debido a la escala, ya que los genes globina se expresan en mucho mayor cantidad que éste. Al comparar la accesibilidad de la cromatina, que se visualiza como señal de ATAC-seq observamos un aumento de señal en las regiones P1, P3, P5 y P6. Una vez confirmado que la activación de la expresión del *lncRNA- α GT* es consistente con el aumento en la accesibilidad en su región promotora y además corresponde con un aumento en la expresión y la accesibilidad de los genes adultos α -globina, analizamos si alguna proteína estructural (CTCF o YY1) podría estar uniéndose a la región promotora del gen del *lncRNA- α GT*. Aunque previamente se demostró que

el transcrito del *lncRNA- α GT* es necesario para la activación del gen α^D el mecanismo aún no está claro. Estudios previos han demostrado la formación de contactos entre los locus de lncRNAs con sus genes blanco formando asas mediadas por proteínas estructurales (CTCF o YY1) (Xiang et al., 2014; Gil & Ulitsky, 2020). En la Figura 10A se alcanza a ver un incremento de señal de ChIP-seq contra YY1 en P1, P3, P5 y P6. Por su parte, en la señal de CTCF no apreciamos ningún cambio en esta región. Para visualizar la proporción de los cambios previamente descritos se graficó el radio de señal de HD3 y HD3-DIF de ATAC-seq (Figura 10C) y ChIP-seq (Figura 10D) en cada una de las regiones P. Según la Figura 10C, las regiones que más cambian aumentan la accesibilidad a la cromatina son P1, P5 y P6. Esto sugiere que la configuración cromatínica en los genes representados es más abierta al diferenciarse y concuerda con el aumento de expresión, incluyendo la región P1, donde se encuentra el elemento regulatorio del *lncRNA- α GT*. Además la señal de unión de YY1 incrementa en la región P5 y en menor medida en P1, P3 y P6, y la señal de CTCF aumenta en P3 y P6 al diferenciar las células HD3. Para ver si el aumento de accesibilidad también ocurre en modelos *in vivo* se hizo un análisis de ATAC-seq con datos recientemente publicados (Penagos-Puig et al., 2023). Estos experimentos se realizaron en fibroblastos (línea celular no eritroide), HD3 (eritroblastos) eritrocitos circulantes de embriones de pollo con 10 días de desarrollo (eRBC) en los que ya se expresan los genes de α -globina adultos y eritrocitos de gallinas de 30 semanas (aRBC). En la figura 11 se puede observar la señal de ATAC-seq en las células previamente mencionadas, en donde el aumento de la accesibilidad cromatínica en el elemento regulatorio del *lncRNA- α GT* es más evidente de células HD3 a eritrocitos de pollo de 10 días de desarrollo (eRBC). Esto nos muestra que la activación de este elemento regulatorio es específico de la diferenciación eritroide terminal en pollo no sólo en células diferenciadas *in vitro* sino también e eritrocitos circulantes en los que los genes de α -globina adultos se están expresando (Figura 11).

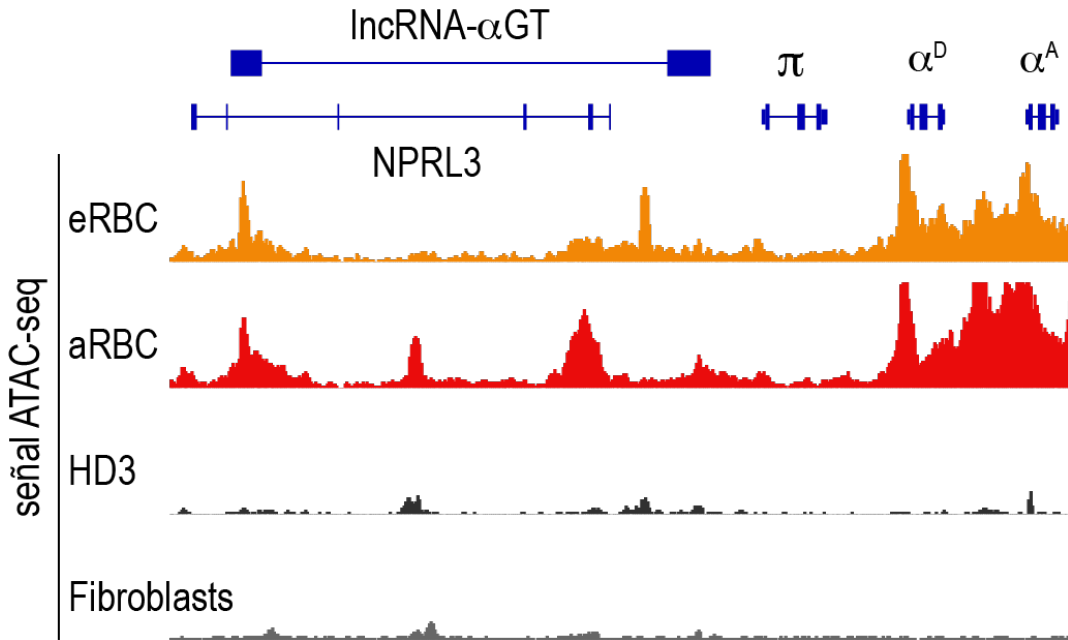


Figura 11. La señal de accesibilidad en el elemento regulatorio del *IncRNA-αGT* y los genes adultos de α -globina son específicos de la diferenciación eritroide terminal en modelos *in vivo*. Visualización en el Genome Browser de UCSC de la señal de ATAC-seq a lo largo del dominio α -globina en RBC embrionarias (10 días de desarrollo), RBC adultas (30 semanas), HD3 WT (eritroblastos) y fibroblastos (no eritroide).

El aumento de la accesibilidad en el promotor *IncRNA-αGT*, el aumento de su transcripción así como el enriquecimiento de la proteína YY1 nos sugieren que éste podría estar actuando como un elemento enhancer. Según lo reportado por nuestro grupo, el transcrito actúa específicamente activando al gen adulto α^D (Arriaga-Canon et al., 2014). Una de las formas en las que los elementos enhancer o los promotores con actividad enhancer llevan a cabo su acción activadora es a través de la formación de asas de cromatina (Schoenfelder & Fraser, 2019; Field & Adelman, 2020). Para validar si esta región puede funcionar como elemento de regulación a distancia, como lo hacen los elementos enhancer, analizamos los datos publicados de Hi-C en eRBC, aRBC, HD3 y fibroblastos de pollo (Penagos-Puig et al., 2023). Las matrices de interacción construidas a partir de los datos de Hi-C muestran principalmente dos dominios de interacción delimitados por sitios de unión de CTCF tanto en HD3 y HD3-DIF, a los que denominamos dominio 1 y dominio 2

(figura 12B). Interesantemente, el dominio 1 contiene parte del gen *Npr13*, al *lncRNA- α GT* y a los genes globina (π , α^D y α^A) los cuales coinciden con alta frecuencia de interacción en eRBC, aRBC y HD3 mostrada por pixeles en rojo, sin embargo esta frecuencia de interacción se observa en menor medida en fibroblastos (figura 12A). Así mismo, dentro del dominio 1 encontramos a los dos elementos enhancers eritroides anotados a la fecha en pollo; el elemento MRE que ha sido descrito como un enhancer que controla la expresión de los genes globina (Ulianov et al., 2017a) y el 3'-Enh (Escamilla-Del-Arenal & Recillas-Targa, 2008; Rincón-Arano et al., 2009) que regula el recambio de globinas entre el gen embrionario π y los genes adultos (α^D y α^A) (Valdes-Quezada et al., 2013). Además de estos elementos, encontramos una alta frecuencia de interacción entre el elemento regulatorio del *lncRNA- α GT* y los genes globina (señalados con la fecha negra) en eRBC, aRBC y HD3 pero no en fibroblastos. Adicionalmente, observamos que los cambios mas notables de accesibilidad de la cromatina se localizan entre el elemento regulatorio del *lncRNA- α GT* y el gen α^D (señalados con las flechas verdes). Estas observaciones sugieren que el dominio α -globina se estructura de tal forma que los elementos regulatorios y sus genes blanco se encuentran interaccionando entre sí en células eritroides, por lo que el locus del *lncRNA- α GT* podría influir en dicha estructuración y en la regulación del gen α^D en células eritroides.

Basado en estos hallazgos y el antecedente directo a este proyecto en el que el transcrito del *lncRNA- α GT* induce la expresión del gen α^D durante la eritropoyesis, sugerimos que el elemento regulatorio del *lncRNA- α GT* contribuye a la activación de α^D a través de un mecanismo similar a un enhancer. Para validar esto, utilizamos los datos generados en nuestro laboratorio (en proceso de publicación) basados en Captura Conformacional de Cromosomas UMI-4C (UMI por Unique Molecular Identifier) (en proceso de publicación) centrándonos en el elemento regulatorio del *lncRNA- α GT* (figura 12C). Este método (alternativo al Hi-C) permite identificar de forma cualitativa y cuantitativa las interacciones que existen entre una

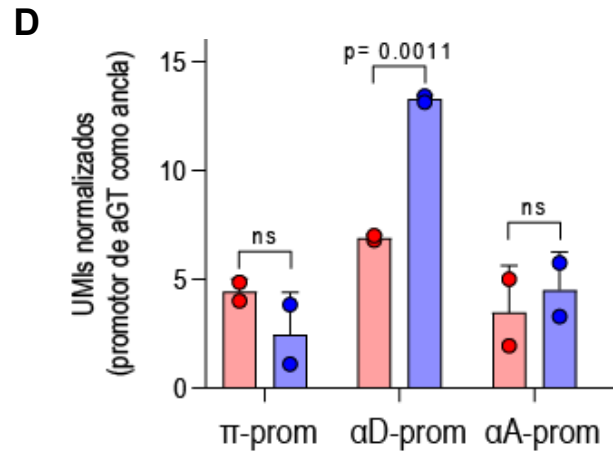
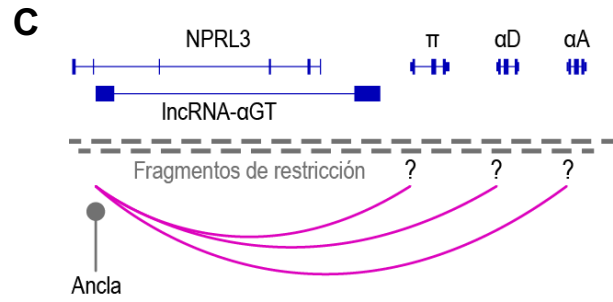
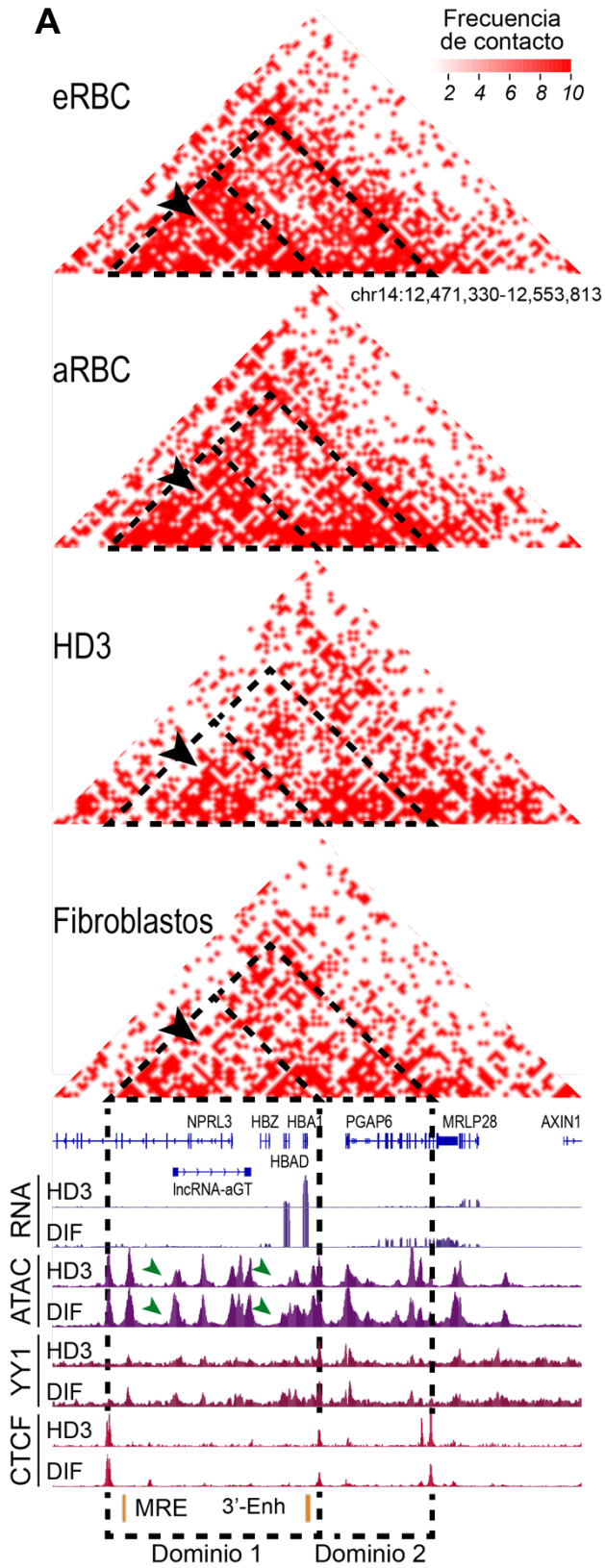


Figura 12. El elemento regulador del *lncRNA- α GT* interactúa con el promotor de α^D .

A. Matrices de contacto en el dominio α -globina de pollo generadas a partir de análisis de datos de Hi-C. Cada pixel representa ventanas de 1Kb coloreadas por gradiente de color (rojo) que refleja la frecuencia de interacción. Los triángulos punteados indican los dominios de interacción y las flechas las interacciones entre el *lncRNA- α GT* y los genes globina.

B. Señales de expresión, de accesibilidad y ocupación de YY1 y CTCF a lo largo del locus α -globina en células HD3 y HD3-DIFF. Las líneas punteadas demarcan los dominios de interacción y las flechas verdes los cambios más evidentes en la accesibilidad.

C. Esquema del diseño del UMI-4C en el que se identificaron y cuantificaron las interacciones entre la región ancla y los promotores de los genes globina.

D. Gráfica de barra representando los conteos normalizados de UMIs entre el elemento regulador de *lncRNA- α GT* y los promotores seleccionados. La significancia se obtuvo mediante la prueba t de student. ns, no significativo.

están representados por sitios de restricción que se pueden ligar, secuenciar e identificar en el experimento de UMI-4C. Utilizando el elemento regulador del *lncRNA- α GT* como ancla, recuperamos los fragmentos de restricción que sobrelapan con las regiones promotoras de los genes globina y determinamos los conteos (UMIs) que reflejan las frecuencias de interacción entre el ancla y los fragmentos de restricción. Al analizar los conteos de UMIs, se observó que en células HD3 existe una mayor frecuencia de interacción entre el elemento regulador del *lncRNA- α GT* y el promotor de α^D y en menor medida con los otros promotores (π y α^A) (figura 12D). Al inducir la diferenciación de las HD3, las interacciones entre el elemento regulador del *lncRNA- α GT* y el promotor de α^D aumentaron de forma significativa a diferencia de π y α^A . Estos análisis demuestran que el elemento regulador del *lncRNA- α GT* se encuentra espacialmente contactando al promotor de α^D y dicha interacción incrementa tras la diferenciación eritroide.

Por ello decidimos continuar caracterizando no solo la función del transcrito si no también la posible función de un elemento regulador que afecta la transcripción del gen α^D al activarse.

3. *Trans*-activación del *lncRNA- α GT* mediante CRISPRa

Los estudios para entender la función de cualquier gen se basan en la pérdida/ganancia de función. Arriaga-Canon y colaboradores hicieron un ensayo de pérdida de función mediante RNA de interferencia para abolir los niveles del transcrito *lncRNA- α GT*. Existen múltiples ejemplos en los que se utiliza shRNAs para caracterizar la función de los lncRNAs (Guttman et al., 2011; Paralkar et al., 2014; Ren et al., 2021; K. C. Wang et al., 2011; Yang et al., 2022). No obstante, hay evidencia de que es necesario utilizar más de una aproximación para confirmar su función o bien, para contemplar la posibilidad de que la transcripción y/o un elemento regulador dentro del cuerpo de gen del lncRNA que estén llevando a cabo una función (Yin et al., 2015; Ivaldi et al., 2018; Gil & Ulitsky, 2020; Núñez-Martínez & Recillas-Targa, 2022).

Para corroborar las observaciones hechas en el ensayo de pérdida de función teníamos la posibilidad de hacer un KO mediante la tecnología de CRISPR-Cas9, para abolir la expresión del *lncRNA- α GT*. La desventaja de eliminar alguna región es la alteración de la secuencia del gen del *lncRNA- α GT* y por lo tanto de un posible elemento regulador. Además, el gen del *lncRNA- α GT* se encuentra sobrelapado el gen antisentido *Npr13*. Por esto, decidimos corroborar la función del *lncRNA- α GT* utilizando una aproximación opuesta: sobre-expresar el transcrito de manera local. Una de las aproximaciones más utilizadas en el estudio de los loci de lncRNAs, que tiene la ventaja de que toma en cuenta todos los mecanismos por los que puede afectar sobre su(s) un gen(es) blanco(s) en *cis*, es la que da la *trans*-activación mediante el sistema CRISPRa (activación por CRISPR). Decidimos implementar éste sistema en células HD3 no diferenciadas, en la que no se expresan los genes globina. Se decidió utilizar esta línea celular debido a que los genes globina no se expresan, y a que el promotor del gen adulto α^D se encuentra hipermetilado. Por lo tanto, una *trans*-activación del *lncRNA- α GT* exitosa, que pudiera causar la activación del gen adulto α^D podría ser causada por un remodelamiento cromatínico de toda la región.

3.1 Implementación del sistema de *trans*-activación dCas9-VP64 en células HD3.

El sistema CRISPR-Cas9 se ha modificado para guiar proteínas regulatorias a sitios específicos en el genoma (Konermann et al. 2015; Gil & Ulitsky, 2020; S. Zibitt et al., 2021). Para esto, se inactivaron los sitios catalíticos de la proteína Cas9 (dCas9 por dead Cas9) y ésta se fusionó con dominios de activación (CRISPRa) como es el caso de VP64 (Mali et al., 2013; Hilton et al., 2015; Simeonov et al., 2017). VP64 posee un dominio tetramérico que proviene de una proteína viral *trans*-activadora (VP16) (Beerli et al., 1998) y actúa reclutando factores de inicio de la transcripción, así como a la RNA PolIII, remodeladores de la cromatina y acetilasas de histonas lo cual favorece la activación transcripcional (Hagmann et al., 1997).

Para implementar el sistema CRISPR-dCas9-VP64 en la línea celular las primeras pruebas de *trans*-activación se realizaron en la región promotora del gen de la globina adulta α^D en células HD3. Los sgRNAs que utilizamos en este caso fueron diseñados para cortar en esta región previamente (datos no publicados), por lo tanto, sabíamos de la accesibilidad en la cromatina para esos sitios.

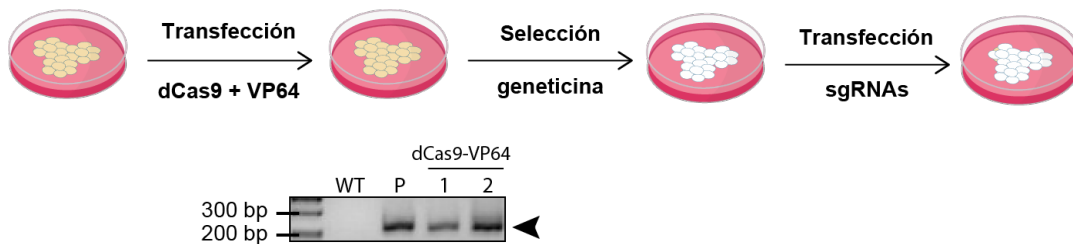
En primer lugar, se generaron líneas de HD3 que expresaran establemente la proteína dCas9-VP64. Lo anterior fue realizado mediante un plásmido Cas9m4-VP64 que contiene un gen de resistencia a geneticina. Las células transfectadas con el plásmido Cas9m4-VP64 se mantuvieron 10 días bajo selección con geneticina. Después de este periodo, la expresión de la dCas9-VP64 se verificó mediante una RT-PCR con oligonucleótidos que amplifican un fragmento de ~250 pb del transcrito quimérico de dCas9-VP64. Esto se muestra en la figura 13, en donde se observa el gel con el producto de la PCR de punto final el que control negativo de las células HD3 sin transfectar (WT), el control positivo del plásmido, y dos transfecciones independientes, en la cual el carril número dos se observa una banda de mayor intensidad que corresponde a un mayor nivel de expresión (figura 13A). A estas células se les denominó HD3-VP64.

Posteriormente, generamos un plásmido para clonar los sgRNAs a partir del plásmido pX330. Este plásmido contiene un sitio de clonación para los sgRNAs. No obstante,

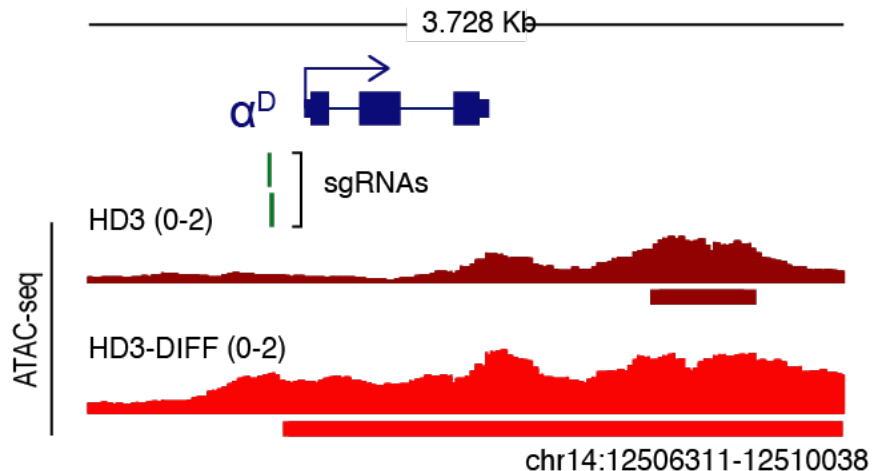
también contiene el gen de la proteína Cas9-wt. Por ello fue necesario cortar el plásmido con las enzimas XbaI y NotI para eliminar el gen de la Cas9 del plásmido pX330. Finalmente, utilizamos la enzima Klenow para rellenar los extremos cohesivos generados por estas digestiones y volvimos a ligar el plásmido ya sin el gen de la proteína Cas9 (plásmido pX330_cas9(-)). El resultado fue verificado mediante restricción y secuenciación.

Se utilizaron dos sgRNAs cuya secuencia blanco se localiza a una distancia de ~200 pb río arriba del gen α^D (sg1 y sg2, Figura 13B). Los sgRNA se alinearon y se clonaron en pX330_Cas9(-) (cada uno en un plásmido). Finalmente, estos plásmidos se transfectaron mediante liposomas utilizando diferentes proporciones de plásmido: lipofectamina y se cuantificó la expresión del gen adulto α^D mediante RT-qPCR (Figura 13C).

A



B



C

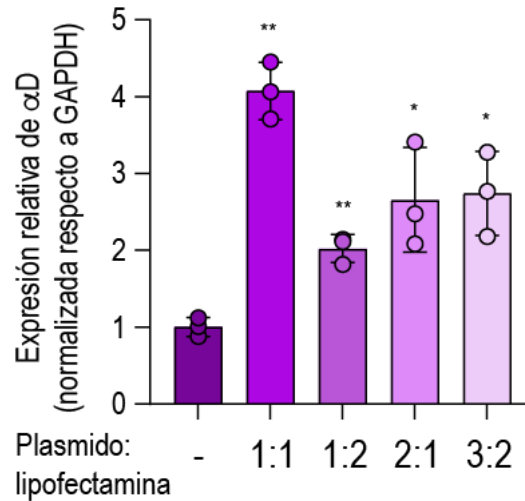


Figura 13: Implementación del sistema CRISPR-dCas9-VP64 en células HD3.

A. Estrategia experimental usada para expresar a la proteína quimérica dCas9-VP64 de manera estable en células HD3 y posteriormente transfectar los plásmidos con los gRNA. También se muestra la RT-qPCR para ver la expresión de VP64 en dos líneas estables independientes. WT: células no transfectadas. P: plásmido como control positivo 1 y 2: HD3 después de ser transfectadas y seleccionadas.

B. Localización de las secuencias blanco de los sgRNAs río arriba del gen α^D , y los picos de ATAC-seq que cambian en HD3 y HD3-DIF.

C. RT-qPCR del gen adulto α^D en células con expresión estable de dCas9-VP64 y expresión transitoria de sgRNAs. Se muestran los resultados utilizando diferentes relaciones plasmido:lipofectamina. La gráfica representa los datos de n=3 réplicas biológicas y las barras de error corresponden a SE (error estándar). *p<0.05; **p<0.01.

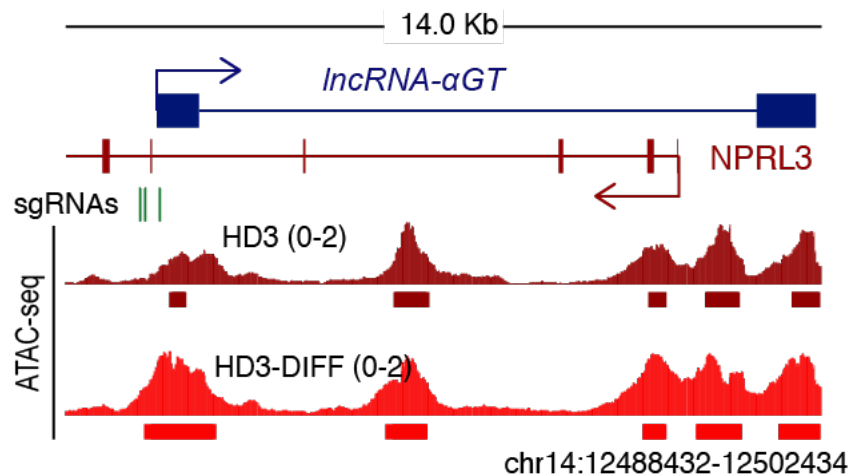
Estos resultados nos muestran que el sistema CRISPR-dCas9-VP64 es capaz de *trans*-activar el gen adulto α^D en células HD3, en donde los genes están silenciados. Además encontramos que la activación es consistente en las diferentes pruebas relación plásmido:lipofectamina. Una vez probado este sistema, nos preguntamos si este efecto lo observábamos en el promotor del lncRNA- α GT.

3.2 *Trans*-activación del *lncRNA-αGT* y su efecto en los genes globina π , α^D y α^A .

A continuación evaluamos el efecto de la *trans*-activación del *lncRNA-αGT* sobre la expresión de los genes de α -globina de pollo.

Se diseñaron sgRNAs utilizando una secuencia de 1 kb alrededor del sitio de inicio de la transcripción (TSS) del *lncRNA-αGT* (400 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción predicho para este transcrito, y 600 nucleotidos río abajo) para encontrar los mejores sgRNA, utilizando la herramienta *online* <http://crispor.tefor.net/>. Los sgRNAs se eligieron según un “score” de penalización que se obtiene del mismo software. Se eligieron 3 sgRNAs distintos para realizar el ensayo de *trans*-activación. Como se observa, los gRNA se localizan en la región del promotor del *lncRNA-αGT* donde hay un aumento en la accesibilidad cromatínica en la diferenciación (Figura 14A). Los tres sgRNAs se clonaron en el plásmido pX330_Cas9(-) y se transfectaron en la línea celular HD3-VP64 (Figura 14B). Finalmente, a estas células se les extrajo el RNA y se realizaron los ensayos de RT-qPCR.

A



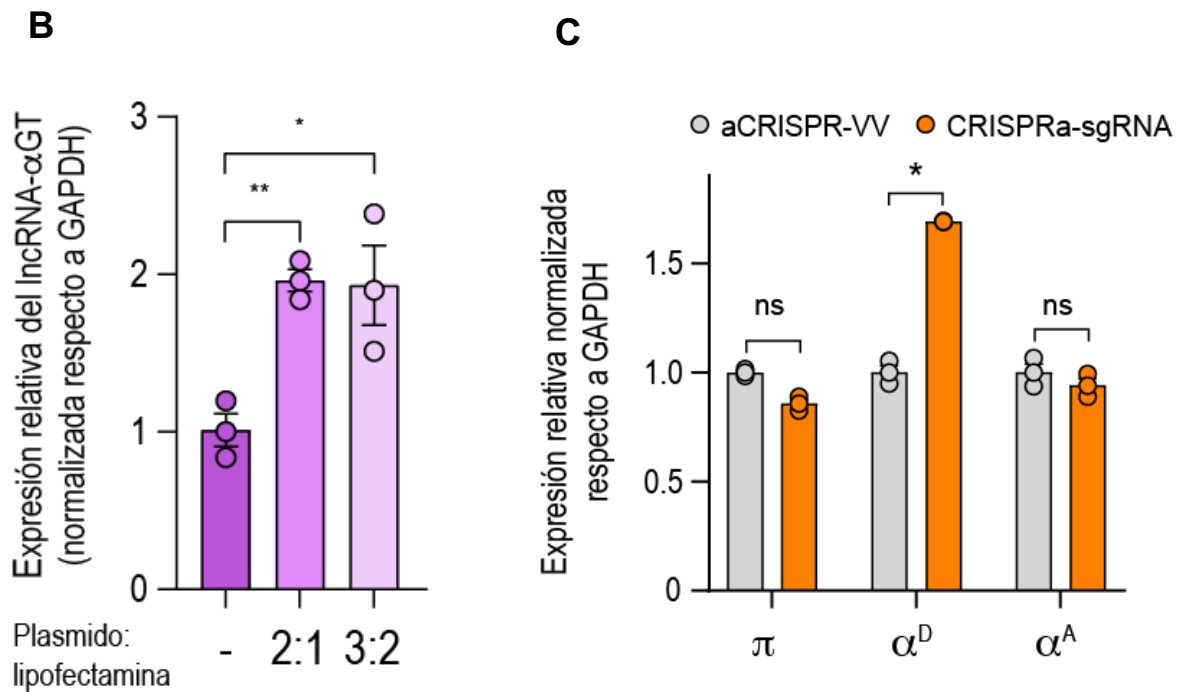


Figura 14: La *trans*-activación del lncRNA- α GT en células HD3-VP64 incrementa la expresión del gen adulto α^D .

A. Región de unión de los 3 sgRNAs alrededor del TSS del gen blanco así como la señal de ATAC-seq en HD3 y HD3-DIF. “Tracks” visualizados en el Genome browser de UCSC.

B. Grafico de barras donde se muestra la expresión del lncRNA- α GT en dos condiciones de transfección plasmido:lipofectamina con respecto al control negativo (plasmido sin sgRNA clonado).

C. Grafico de barras donde se muestra la expresión de los genes globina π , α^D y α^A en las células donde se *trans*-activó el lncRNA- α GT con la condición 2:1 (CRISPRa-sgRNA, color naranja) vs control negativo (CRISPRa-VV: se transfectaron plásmidos sin guías clonados, gris).

Las gráficas muestran datos obtenidos n=3. Las barras de error corresponden a SE. *p<0.05; **p<0.01; ns: no significativo.

Comparando la expresión con las células que no contienen los sgRNAs, ambas condiciones permitieron *trans*-activar el *lncRNA- α GT*, aunque el cambio es más significativo con la relación 2:1 (Figura 14B). Por ello, se utilizó esta condición para

evaluar la expresión de los demás genes de globina π , α^D y α^A . Los resultados mostraron un aumento de la expresión de uno de los genes adultos α^D y no del otro gen adulto α^A , ni del gen embrionario π (Figura 14C). Este resultado es consistente con los estudios hechos previamente por Arriaga-Canon *et al.*, en donde se sugiere que el efecto del transcrito es específico para el gen adulto α^D . En resumen, este resultado indica que la *trans*-activación del *lncRNA- α GT* mediante CRISPR-dCas9-VP64 induce un aumento en la expresión del gen α^D pero no del gen embrionario π ni del gen adulto α^A en un contexto donde normalmente están silenciados

De manera importante este ensayo sugiere varios mecanismos de acción del locus del *lncRNA- α GT*. El efecto de la *trans*-activación podría estar activando un elemento regulador enhancer y su efecto sobre su gen blanco posiblemente mediante la interacción directa con su promotor. La otra posibilidad es que el transcrito maduro lleve a cabo la activación mediante el reclutamiento de proteínas y remodeladores de la cromatina. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La eritropoyesis es un proceso fundamental en los vertebrados, altamente coordinado a lo largo del desarrollo y regulado a múltiples niveles. Además de su importancia biológica, este sistema ha sido modelo para el estudio de la regulación transcripcional durante la diferenciación celular y el desarrollo. Actualmente estos análisis incluyen experimentos que generan datos epigenómicos y transcriptómicos. En este trabajo utilizamos los datos generados hasta la fecha en el modelo de diferenciación eritroide terminal (eritroblastos HD3 a eritrocitos HD3-DIF) y en el dominio α -globina de pollo para entender la dinámica de uno de los reguladores fundamentales durante la diferenciación: los lncRNAs.

Los resultados de nuestros análisis mostraron que la expresión diferencial de lncRNAs en este modelo de diferenciación eritroide terminal es específico y coincide con la expresión de genes codificantes a proteínas característicos como los genes α -globina adultos y el TF maestro de eritropoyesis, Klf1. Aunque examinamos la expresión en otros TFs que han sido descritos en humano y en ratón, no encontramos un aumento de expresión al diferenciar HD3. Es probable que esto suceda porque son TFs que se expresan y son fundamentales desde el compromiso hacia el linaje eritroide (CFU-E) en la eritropoyesis temprana (GATA-1, SCL/Tal, etc). Además, la activación de los lncRNAs en la diferenciación terminal concuerda con un aumento en la accesibilidad a la cromatina en sus regiones promotoras. De hecho, el aumento en la señal de accesibilidad en los promotores de estos lncRNA, coincide con secuencias que están enriquecidas en el motivo de unión a Klf1 (que segundo motivo con mayor significancia encontrado) y con el aumento en la expresión de este TF. Este resultado es consistente con reportes previos en los que se muestra un aumento en la expresión de Klf1 (desde proeritroblastos hasta eritroblastos policromáticos) así como un aumento en la accesibilidad en sitios enriquecidos con motivos de unión a este TF (Ludwig et al., 2019; Schulz et al., 2019). El conjunto de resultados descritos nos indica que Klf1 es un candidato interesante que podría estar jugando un papel importante en la activación de estos lncRNAs, por lo que sería interesante hacer un ensayo de ChIP-seq en este modelo de diferenciación. Nuestras observaciones sugieren un potencial regulatorio tanto

de los lncRNAs como de las secuencias regulatorias a partir de las que se transcriben durante las redes regulatorias en la eritropoyesis. No obstante, es muy probable que se esté subestimando ya que la anotación utilizada para el análisis fue obtenida de ENSEMBL, y no de una anotación *de novo* para identificar nuevos lncRNAs específicos de estas líneas celulares.

Los resultados anteriormente expuestos (expresión diferencial, aumento en la accesibilidad) son recapitulados en los análisis hechos específicamente con el único lncRNA descrito en el dominio α -globina y en el modelo de diferenciación eritroide terminal de pollo: el *lncRNA- α GT*. No sólo su expresión aumenta en la etapa terminal de la diferenciación, sino que es específica de eritrocitos (HD3-DIF) consistente con lo reportado por nuestro grupo y no se expresa en células no diferenciadas ni en líneas celulares no eritroides (Arriaga-Canon et al., 2014). Así mismo, observamos un aumento en la accesibilidad de la cromatina en la región promotora del *lncRNA- α GT* al diferenciar HD3, así como en la región de los genes de globina adultos α^D y α^A , lo cual esperábamos debido al aumento en la expresión de estos genes. Es importante enfatizar que el incremento de la expresión del *lncRNA- α GT* no solo se observa en las líneas celulares utilizadas, sino que también es característico de la diferenciación terminal eritroide *in vivo*. Arriaga-Canon et. al. también demostraron el aumento de su expresión en eritrocitos de embriones con 10 días de desarrollo (RBC 10d). Debido a esto, hicimos un análisis de accesibilidad utilizando datos obtenidos en células HD3, RBC 10 días y RBC de pollos con 30 semanas (adultos). De manera importante estos análisis concuerdan con el aumento de accesibilidad en la región promotora del *lncRNA- α GT*, α^D y α^A en la diferenciación terminal (eritroblasto a RBC 10 días), lo cual confirma que las observaciones hechas en HD3-DIF también recapitulan lo que sucede en RBC. Interesantemente, los análisis de ChIP-seq también mostraron un enriquecimiento en la señal de unión de YY1, pero no en la señal de CTCF, tanto en el promotor del *lncRNA- α GT* como en la región de los genes adultos α^D y α^A . Estos resultados en conjunto con el análisis de UMI-4C muestran un aumento en la interacción de la región promotora del *lncRNA- α GT* con el gen adulto α^D , pero no con los promotores de π , α^A ni TMEM8, además de la evidencia mostrada por Arriaga-Canon et. al., nos

indica que durante la diferenciación el *lncRNA- α GT* regula de forma específica al gen adulto α^D y que esto podría estar sucediendo mediante el incremento de interacciones entre los promotores de ambos genes. Este contacto podría estar mediado por la proteína YY1. El aumento en la accesibilidad, el enriquecimiento en la unión de proteínas regulatorias y estructurales como YY1, la interacción con genes blanco y la transcripción de lncRNAs en elementos regulatorios en *cis* pueden indicar la presencia de un enhancer (Dao et al., 2017; Engreitz, Haines, et al., 2016; Paralkar et al., 2016; Weintraub et al., 2017; Yin et al., 2015). Estas características las observamos en el promotor del *lncRNA- α GT*, por lo que sugerimos que podría estar actuando como un elemento enhancer incrementando la expresión del gen α^D , lo cual aún debe de ser demostrado experimentalmente. Interesantemente, el análisis de hiC muestra la formación de dos dominios definidos por sitios de unión a CTCF. El dominio I contiene los elementos enhancer descritos hasta el momento, los genes de globina y el *lncRNA- α GT*. Estos dominios están estructurados diferencialmente en fibroblastos y en células eritroides. En las células HD3 se observa una mayor interacción en una región dentro del dominio I. En eritrocitos circulantes, aumenta la interacción dentro de ambos dominios. Esto nos indica que en la etapa terminal de la diferenciación eritropoyética, la expresión génica coincide con el aumento de interacciones dentro de estos dominios demarcados por CTCF. Esto coincide con los resultados en UMI-4C donde se observa en las células HD3-DIF hay una mayor interacción entre los promotores del *lncRNA- α GT*.

La evidencia mostrada por Arriaga-Canon y colaboradores indica que el transcrito *lncRNA- α GT* es necesario para la activación del gen α^D por ensayos de pérdida de función (Arriaga-Canon et al., 2014). No obstante, no se habían hecho aproximaciones que consideraran el elemento regulador y no sabíamos si la activación de la transcripción del *lncRNA- α GT* era suficiente para activar la expresión de su gen blanco, y si esto podría tener algún efecto también en los genes adyacentes. Para corroborar esta observación, tomamos ventaja del sistema CRISPRa (CRISPR-dCas9-VP64) para guiar un complejo activador de la transcripción (VP64) sobre el elemento regulatorio del *lncRNA- α GT* de forma endógena. De esta forma implementamos el sistema dirigiendo el complejo dCas9-

VP64 al promotor del gen α^D para demostrar si funcionaba. Posteriormente, utilizando sgRNAs sobre el elemento regulatorio del *lncRNA- α GT*, se logró aumentar su transcripción. Con estos resultados logramos implementar por primera vez el sistema CRISPRa en células eritroides de

Los resultados de dos condiciones diferentes nos mostraron que este sistema fue suficiente para inducir la expresión del *lncRNA- α GT* en un contexto celular en el que no se expresa éste lncRNA. Una vez comprobado esto se evaluó la expresión de los genes de globina adyacentes. Los resultados nos mostraron que la inducción de la actividad transcripcional en el promotor del *lncRNA- α GT* es suficiente para inducir la expresión del gen adulto α^D pero no del gen embrionario π que es el gen más cercano al locus del *lncRNA- α GT* ni al gen de globina adulta α^A . Esto confirma que la activación de *lncRNA- α GT* tiene un efecto específico sobre el gen α^D . Esto además demuestra la importancia de la formación de las interacciones entre los promotores de *lncRNA- α GT* y el gen α^D en la diferenciación celular. Los resultados sugieren que la activación del *lncRNA- α GT* podría ser suficiente para formar esta interacción específica incrementando la transcripción del gen adulto α^D pero no para los otros dos genes globina. De hecho, en el contexto celular de HD3, los promotores de π y α^D se encuentran hipermetilados en su DNA por lo que la activación de la transcripción del gen α^D implica no sólo el incremento de los contactos sino de un cambio en la estructura de la cromatina localizado y posiblemente una acción de desmetilación del DNA activa, en particular en el promotor del gen adulto facilitando su activación transcripcional. Por otro lado, los resultados de ChIP-seq de YY1 sugieren que la unión de este factor se enriquece en la diferenciación eritroide terminal. La transcripción de lncRNAs a partir de elementos enhancer, así como su enriquecimiento en YY1 puede estar mediando interacciones con los promotores de sus genes blanco y/o activando la función enhancer (Hou et al., 2019). Por otro lado, no podemos descartar la posibilidad de que este efecto se deba al aumento del transcrito maduro del lncRNA. Según lo reportado previamente, la expresión del *lncRNA- α GT* coincide con el incremento en el enriquecimiento de la histona H3K4me3 en su promotor y en el promotor del gen adulto α^D . Además, el KD del transcrito disminuyó el enriquecimiento de esta marca

en el promotor del gen α^D , por lo que resulta evidente que el transcrito está jugando un papel en la deposición de esta marca cromatina (Arriaga-Canon et al., 2014). Hay reportes que demuestran que el transcrito de un lncRNA puede unirse a la proteína WDR5 reclutándola a sus genes blanco por medio de la formación de asas de cromatina y activándolos mediante la deposición de la marca en la histona H3K4me3 (K. C. Wang et al., 2011; Luo et al., 2019). Finalmente, es posible que el *lncRNA- α GT* esté llevando a cabo su función por más de un mecanismo, ya sea mediante un elemento regulatorio (su promotor), su actividad transcripcional y el transcrito. Hay evidencia de que esto es posible, incluso está caracterizado un lncRNA (BGLT3) dentro del locus de β -globina de humano que activa en la expresión de los genes fetales γ por dos mecanismos: su transcripción promueve la formación de interacciones con sus genes blanco, y su transcrito recluta el complejo mediador (Ivaldi et al., 2018). El hecho de que el *lncRNA- α GT* afecta específicamente al gen adulto α^D también confirma que participa en la regulación durante el *switch* de hemoglobina. No obstante, sería importante hacer los análisis de accesibilidad, ChIP-seq y de interacción en RBC de embriones de 5 días de desarrollo para observar los cambios entre la diferenciación eritroide primitiva y definitiva. También resulta interesante adentrarnos en el estudio del otro gen adulto α^A , cuya regulación parece ser diferente a la del gen adulto α^D (datos del grupo no publicados).

Para confirmar los mecanismos de acción aquí descritos aun sería necesario que se generara un sistema de trans-activación estable clonando los sgRNA en plásmidos lentivirales y se analizara nuevamente los efectos en la estructura cromatínica y no sólo en la expresión de los genes de α -globina. Además, hacen falta más experimentos para discernir entre las actividades del transcrito, la transcripción y/o el elemento regulador.

El gen *Nprl3* se encuentra conservado dentro del dominio α -globina en mamíferos y aves. Interesantemente, en modelos humanos y murinos se ha descrito un super-enhancer en la región 5' de los genes globina. De hecho, este super-enhancer contiene 5 enhancers, de los cuales 4 están dentro del gen *Nprl3* (M. Kassouf et al. 2023). Aunque no ha sido reportado que en esta región se transcriba un lncRNA

en ningún otro modelo, es probable que el elemento aquí descrito pueda ser uno de esos enhancers conservados, aunque sería necesario un estudio mas detallado. Según lo reportado, estos elementos son eritroide específicos y en la diferenciación eritroide se activan (hay unión de TFs como GATA1, y enriquecimiento de marcas de histonas como H3K4me1 y me3) e incrementan los transcritos eRNA previamente al inicio de la expresión de los genes de α -globina. Posteriormente, en la diferenciación terminal hay un incremento en la accesibilidad en estas regiones y un enriquecimiento de la RNAPII, y del complejo de preinicio de la transcripción (PIC por sus siglas en inglés) (M. Kassouf et al. 2023). Debido a que nuestro modelo de estudio comprende la diferenciación terminal de eritroblastos a eritrocitos no pudimos observar la actividad transcripcional en estadíos intermedios o previos. No obstante, la activación por CRISPRa en este elemento, y su transcripción podría indicarnos que la activación de estos elementos antecede y es suficiente para activar sus genes blanco.

X. CONCLUSIONES

- La diferenciación eritroide en pollo puede adoptarse para estudiar los mecanismos de regulación, a nivel transcripcional como cromatínico en vertebrados.
- Durante la diferenciación terminal eritroide existen locus de lncRNAs que se transcriben y remodelan de forma dinámica. Estos pueden ser regulados en parte por TFs eritroides.
- La expresión del *lncRNA- α GT* y la accesibilidad de su elemento regulatorio aumentan en la diferenciación eritroide terminal, así como los genes de globina adultos α^D y α^A .
- El aumento de accesibilidad del elemento regulatorio del *lncRNA- α GT* coincide con el enriquecimiento del TF YY1 en esta región durante la diferenciación eritroide terminal.
- El *lncRNA- α GT* y los genes de α -globina se organizan en un dominio estructural en el que el promotor del *lncRNA- α GT* interactúa específicamente con el promotor de globina adulta α^D en células eritroides. Este conjunto de características sugiere una posible función enhancer.
- La activación endógena, tanto de la transcripción como del elemento regulatorio del *lncRNA- α GT* es suficiente para inducir la expresión de específica y exclusivamente al gen adulto α^D .
- El locus del *lncRNA- α GT* funciona como un elemento regulatorio distal que influencia la actividad transcripcional del gen adulto α^D durante la eritropoyesis terminal.

XI. PERSPECTIVAS

- Hacer una nueva anotación de lncRNAs para encontrar aquellos que sean específicos de las células eritroides en este modelo, y realizar nuevamente los análisis de expresión, accesibilidad y motivos de unión de TFs.
- Evaluar la accesibilidad, las interacciones (entre el promotor del *lncRNA- α GT* y el promotor del gen α^D), la unión de YY1 y el enriquecimiento de la histona H3K4me3 después de la *trans*-activación del *lncRNA- α GT* en células HD3.
- Evaluar el efecto de la *trans*-activación al diferenciar las células HD3.
- Hacer ensayos para diferenciar los mecanismos de acción por el que el *lncRNA- α GT* (locus, transcripción, transcrito) podría estar actuando.
- Demostrar si el *lncRNA- α GT* contribuye a la formación de asas de cromatina asociadas al promotor del del gen adulto α^D .
- Determinar si el *lncRNA- α GT* induce la desmetilación activa del DNA en el promotor del del gen adulto α^D .
- Determinar los TFs, co-factores y remodeladores de la cromatina que pueden ser reclutados al promotor del gen α^D causando su activación.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Dominguez, J. R., Hu, W., Yuan, B., Shi, J., Park, S. S., Gromatzky, A. A., Van Oudenaarden, A., & Lodish, H. F. (2014). *Global discovery of erythroid long noncoding RNAs reveals novel regulators of red cell maturation*. *Blood*, *123*(4), 570–581. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10>
- An, X., Schulz, V. P., Li, J., Wu, K., Liu, J., Xue, F., Hu, J., Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2014). Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. *Blood*, *123*(22), 3466–3477. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01>
- Andergassen, D., & Rinn, J. L. (2022). From genotype to phenotype: genetics of mammalian long non-coding RNAs in vivo. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 23, Número 4, pp. 229–243). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00427-8>
- Antoniani, C., Romano, O., & Miccio, A. (2017). Concise Review: Epigenetic Regulation of Hematopoiesis: Biological Insights and Therapeutic Applications. En *Stem Cells Translational Medicine* (Vol. 6, Número 12, pp. 2106–2114). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0192>
- Arriaga-Canon, C., Fonseca-Guzmán, Y., Valdes-Quezada, C., Arzate-Mejía, R., Guerrero, G., & Recillas-Targa, F. (2014). A long non-coding RNA promotes full activation of adult gene expression in the chicken α -globin domain. *Epigenetics*, *9*(1), 173–181. <https://doi.org/10.4161/epi.27030>
- Aryal, S., Zhang, Y., Wren, S., Li, C., & Lu, R. (2023). Molecular regulators of HOXA9 in acute myeloid leukemia. En *FEBS Journal* (Vol. 290, Número 2, pp. 321–339). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/febs.16268>
- Barminko, J., Reinholt, B., & Baron, M. H. (2016). Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. En *Developmental and Comparative Immunology* (Vol. 58, pp. 18–29). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.012>
- Beacon, T. H., & Davie, J. R. (2021). The chicken model organism for epigenomic research1. En *Genome* (Vol. 64, Número 4, pp. 476–489). Canadian Science Publishing. <https://doi.org/10.1139/gen-2020-0129>
- Berli, R. R., Segal, D. J., Dreier, B., & Iii, C. F. B. (1998). *The Scripps Research Institute* (Vol. 95). www.pnas.org.
- Beug, H., Doederlein, G., Freudenstein, C., & Graf, T. (1982). Erythroblast Cell lines Transformed by a Tem perat u re-Sen sit ive M u tan t of Avian Erythroblastosis Virus: A Model System To Study Erythroid Differentiation In Vitro. En *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY SUPPLEMENT* (Vol. 1).
- Bonev, B., & Cavalli, G. (2016). Organization and function of the 3D genome. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 17, Número 11, pp. 661–678). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.112>
- Buenrostro, J. D., Corces, M. R., Lareau, C. A., Wu, B., Schep, A. N., Aryee, M. J., Majeti, R., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2018). Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. *Cell*, *173*(6), 1535-1548.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.074>
- Bulger, M., & Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. En *Cell* (Vol. 144, Número 3, pp. 327–339). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.024>

- Burton, A., & Torres-Padilla, M. E. (2014). Chromatin dynamics in the regulation of cell fate allocation during early embryogenesis. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Número 11, pp. 722–734). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3885>
- Cantor, A. B., & Orkin, S. H. (2002). *Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners*. <https://doi.org/10.1038/sj/onc/1205326>
- Chan, J. Y., Kwong, M., Lu, R., Chang, J., Wang, B., Yen, T. S. B., & Kan, Y. W. (1998). Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO Journal*, 17(6), 1779–1787. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.6.1779>
- Cheng, H., Zheng, Z., & Cheng, T. (2020). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. En *Protein and Cell* (Vol. 11, Número 1, pp. 34–44). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0633-0>
- Chervenak, A. P., Basu, P., Shin, M., Redmond, L. C., Sheng, G., & Lloyd, J. A. (2006). Identification, characterization, and expression pattern of the chicken EKLf gene. *Developmental Dynamics*, 235(7), 1933–1940. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20829>
- Cognoni, D., Sunwoo, H., Kriz, A. J., Wang, C. Y., & Lee, J. T. (2019). Xist Deletional Analysis Reveals an Interdependency between Xist RNA and Polycomb Complexes for Spreading along the Inactive X. *Molecular Cell*, 74(1), 101–117.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.015>
- Dao, L. T. M., Galindo-Albarrán, A. O., Castro-Mondragon, J. A., Andrieu-Soler, C., Medina-Rivera, A., Souaid, C., Charbonnier, G., Griffon, A., Vanhille, L., Stephen, T., Alomairi, J., Martin, D., Torres, M., Fernandez, N., Soler, E., Van Helden, J., Puthier, D., & Spicuglia, S. (2017). Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions. *Nature Genetics*, 49(7), 1073–1081. <https://doi.org/10.1038/ng.3884>
- de Lara, J. C. F., Arzate-Mejía, R. G., & Recillas-Targa, F. (2019). Enhancer RNAs: Insights Into Their Biological Role. En *Epigenetics Insights* (Vol. 12). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/2516865719846093>
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., ... Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, 22(9), 1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G. K., Khatun, J., Williams, B. A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R. F., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>
- Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>
- Edginton-White, B., Maytum, A., Kellaway, S. G., Goode, D. K., Keane, P., Pagnuco, I., Assi, S. A., Ames, L., Clarke, M., Cockerill, P. N., Göttgens, B., Cazier, J. B., & Bonifer, C. (2023). A genome-wide relay of signalling-responsive enhancers drives

- hematopoietic specification. *Nature Communications*, 14(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-35910-9>
- Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., McDonel, P. E., Guttman, M., & Lander, E. S. (2016). Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature*, 539(7629), 452–455.
<https://doi.org/10.1038/nature20149>
- Engreitz, J. M., Ollikainen, N., & Guttman, M. (2016). Long non-coding RNAs: Spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 17, Número 12, pp. 756–770). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2016.126>
- Escamilla-Del-Arenal, M., & Recillas-Targa, F. (2008). GATA-1 Modulates the Chromatin Structure and Activity of the Chicken α -Globin 3' Enhancer. *Molecular and Cellular Biology*, 28(2), 575–586. <https://doi.org/10.1128/mcb.00943-07>
- Fatica, A., & Bozzoni, I. (2014). Long non-coding RNAs: New players in cell differentiation and development. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Número 1, pp. 7–21).
<https://doi.org/10.1038/nrg3606>
- Field, A., & Adelman, K. (2020). *Evaluating Enhancer Function and Transcription*.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011420>
- Funnell, A. P. W., Norton, L. J., Mak, K. S., Burdach, J., Artuz, C. M., Twine, N. A., Wilkins, M. R., Power, C. A., Hung, T.-T., Perdomo, J., Koh, P., Bell-Anderson, K. S., Orkin, S. H., Fraser, S. T., Perkins, A. C., Pearson, R. C. M., & Crossley, M. (2012). The CACCC-Binding Protein KLF3/BKLF Represses a Subset of KLF1/EKLF Target Genes and Is Required for Proper Erythroid Maturation In Vivo . *Molecular and Cellular Biology*, 32(16), 3281–3292. <https://doi.org/10.1128/mcb.00173-12>
- Furlan-Magaril, M., Rebollar, E., Guerrero, G., Fernández, A., Moltó, E., González-Buendía, E., Cantero, M., Montoliu, L., & Recillas-Targa, F. (2011). An insulator embedded in the chicken α -globin locus regulates chromatin domain configuration and differential gene expression. *Nucleic Acids Research*, 39(1), 89–103.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq740>
- Georgolopoulos, G., Psatha, N., Iwata, M., Nishida, A., Som, T., Yiangou, M., Stamatoyannopoulos, J. A., & Vierstra, J. (2021). Discrete regulatory modules instruct hematopoietic lineage commitment and differentiation. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27159-x>
- Gil, N., & Ulitsky, I. (2020). Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 21, Número 2, pp. 102–117). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0184-5>
- Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B. W., Garber, M., Grenier, J. K., Munson, G., Young, G., Lucas, A. B., Ach, R., Bruhn, L., Yang, X., Amit, I., Meissner, A., Regev, A., Rinn, J. L., Root, D. E., & Lander, E. S. (2011). LincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*, 477(7364), 295–300.
<https://doi.org/10.1038/nature10398>
- Guttman, M., & Rinn, J. L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. En *Nature* (Vol. 482, Número 7385, pp. 339–346).
<https://doi.org/10.1038/nature10887>
- Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Número

- 10, pp. 621–637). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>
- Hagmann, M., Georgiev, O., & Schaffner, W. (1997). The VP16 Paradox: Herpes Simplex Virus VP16 Contains a Long-Range Activation Domain but within the Natural Multiprotein Complex Activates Only from Promoter-Proximal Positions. En *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 71, Número 8). <https://journals.asm.org/journal/jvi>
- Hattangadi, S. M., Wong, P., Zhang, L., Flygare, J., & Lodish, H. F. (2011). From stem cell to red cell: Regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. En *Blood* (Vol. 118, Número 24, pp. 6258–6268). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-356006>
- Hemberger, M., Dean, W., & Reik, W. (2009). Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: Digging Waddington's canal. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Número 8, pp. 526–537). <https://doi.org/10.1038/nrm2727>
- Hilton, I. B., D'Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., & Gersbach, C. A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*, 33(5), 510–517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>
- Hon, C. C., Ramilowski, J. A., Harshbarger, J., Bertin, N., Rackham, O. J. L., Gough, J., Denisenko, E., Schmeier, S., Poulsen, T. M., Severin, J., Lizio, M., Kawaji, H., Kasukawa, T., Itoh, M., Burroughs, A. M., Noma, S., Djebali, S., Alam, T., Medvedeva, Y. A., ... Forrest, A. R. R. (2017). An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature*, 543(7644), 199–204. <https://doi.org/10.1038/nature21374>
- Hou, Y., Zhang, R., & Sun, X. (2019). Enhancer lncRNAs influence chromatin interactions in different ways. *Frontiers in Genetics*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00936>
- Hu, W., Yuan, B., Flygare, J., & Lodish, H. F. (2011). Long noncoding RNA-mediated anti-apoptotic activity in murine erythroid terminal differentiation. *Genes and Development*, 25(24), 2573–2578. <https://doi.org/10.1101/gad.178780.111>
- Huang, J., Liu, X., Li, D., Shao, Z., Cao, H., Zhang, Y., Trompouki, E., Bowman, T. V., Zon, L. I., Yuan, G. C., Orkin, S. H., & Xu, J. (2016). Dynamic Control of Enhancer Repertoires Drives Lineage and Stage-Specific Transcription during Hematopoiesis. *Developmental Cell*, 36(1), 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.12.014>
- Ilsley, M. D., Gillinder, K. R., Magor, G. W., Huang, S., Bailey, T. L., Crossley, M., & Perkins, A. C. (2017). Krüppel-like factors compete for promoters and enhancers to fine-tune transcription. *Nucleic Acids Research*, 45(11), 6572–6588. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx441>
- Ivaldi, M. S., Diaz, L. F., Chakalova, L., Lee, J., Krivega, I., & Dean, A. (2018). Fetal globin genes are regulated by the BGLT3 long noncoding RNA locus. En *Blood* (Vol. 132, Número 18). <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/132/18/1963/1469486/blood862003.pdf>
- Jehl, F., Muret, K., Bernard, M., Boutin, M., Lagoutte, L., Désert, C., Dehais, P., Esquerré, D., Acloque, H., Giuffra, E., Djebali, S., Foissac, S., Derrien, T., Pitel, F., Zerjal, T., Klopp, C., & Lagarrigue, S. (2020). An integrative atlas of chicken long non-coding genes and their annotations across 25 tissues. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77586-x>

- Kasaouf M., Ford S., Blayney J., & Higgs, D. (2023) Understanding fundamental principles of enhancer biology at a model locus. *BioEssays*. (Vol. 45, Número 10). <https://doi.org/10.1002/bies.202300047>
- Kerenyi, M. A., & Orkin, S. H. (2010). Networking erythropoiesis. En *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 207, Número 12, pp. 2537–2541). <https://doi.org/10.1084/jem.20102260>
- Kim, T. K., & Shiekhatar, R. (2015). Architectural and Functional Commonalities between Enhancers and Promoters. En *Cell* (Vol. 162, Número 5, pp. 948–959). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.008>
- Knezetic, J. A., & Felsenfeld, G. (1989). Identification and Characterization of a Chicken α -Globin Enhancer. En *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 9, Número 3).
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., Barcena, C., Hsu, P. D., Habib, N., Gootenberg, J. S., Nishimasu, H., Nureki, O., & Zhang, F. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), 583–588. <https://doi.org/10.1038/nature14136>
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. En *Cell* (Vol. 172, Número 3, pp. 393–407). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
- Koyano-Nakagawa, N., Kweon, J., Iacovino, M., Shi, X., Rasmussen, T. L., Borges, L., Zirbes, K. M., Li, T., Perlingeiro, R. C. R., Kyba, M., & Garry, D. J. (2012). Etv2 is expressed in the yolk sac hematopoietic and endothelial progenitors and regulates Lmo2 gene expression. *Stem Cells*, 30(8), 1611–1623. <https://doi.org/10.1002/stem.1131>
- Kulczyńska, K., & Siatecka, M. (2016). A regulatory function of long non-coding RNAs in red blood cell development. En *Acta Biochimica Polonica* (Vol. 63, Número 4, pp. 675–680). Polskie Towarzystwo Biochemiczne. https://doi.org/10.18388/abp.2016_1351
- Kung, J. T., Kesner, B., An, J. Y., Ahn, J. Y., Cifuentes-Rojas, C., Colognori, D., Jeon, Y., Szanto, A., delRosario, B. C., Pinter, S. F., Erwin, J. A., & Lee, J. T. (2015). Locus-specific targeting to the X chromosome revealed by the RNA interactome of CTCF. *Molecular Cell*, 57(2), 361–375. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.006>
- Lenhard, B., Sandelin, A., & Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: Emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Número 4, pp. 233–245). <https://doi.org/10.1038/nrg3163>
- Ludwig, L. S., Lareau, C. A., Bao, E. L., Nandakumar, S. K., Muus, C., Ulirsch, J. C., Chowdhary, K., Buenrostro, J. D., Mohandas, N., An, X., Aryee, M. J., Regev, A., & Sankaran, V. G. (2019). Transcriptional States and Chromatin Accessibility Underlying Human Erythropoiesis. *Cell Reports*, 27(11), 3228–3240.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.046>
- Luo, H., Zhu, G., Xu, J., Lai, Q., Yan, B., Guo, Y., Fung, T. K., Zeisig, B. B., Cui, Y., Zha, J., Cogle, C., Wang, F., Xu, B., Yang, F. C., Li, W., So, C. W. E., Qiu, Y., Xu, M., & Huang, S. (2019). HOTTIP lncRNA Promotes Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal Leading to AML-like Disease in Mice. *Cancer Cell*, 36(6), 645–659.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.10.011>

- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Margueron, R., & Reinberg, D. (2010). Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 11, Número 4, pp. 285–296). <https://doi.org/10.1038/nrg2752>
- Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L. L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M. E., Fitzgerald, K. A., Gingeras, T. R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J. B., Lee, J. T., ... Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(6), 430–447. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>
- Merry, C. R., Forrest, M. E., Sabers, J. N., Beard, L., Gao, X. H., Hatzoglou, M., Jackson, M. W., Wang, Z., Markowitz, S. D., & Khalil, A. M. (2015). DNMT1-associated long non-coding RNAs regulate global gene expression and DNA methylation in colon cancer. *Human Molecular Genetics*, 24(21), 6240–6253. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv343>
- Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C., & Sankaran, V. G. (2016). Advances in understanding erythropoiesis: Evolving perspectives. En *British Journal of Haematology* (Vol. 173, Número 2, pp. 206–218). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/bjh.13938>
- Ng, S. Y., Johnson, R., & Stanton, L. W. (2012). Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *EMBO Journal*, 31(3), 522–533. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.459>
- Núñez-Martínez, H. N., & Recillas-Targa, F. (2022). Emerging Functions of lncRNA Loci beyond the Transcript Itself. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Número 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23116258>
- Paralkar, V. R., Mishra, T., Luan, J., Yao, Y., Kossenkov, A. V., Anderson, S. M., Dunagin, M., Pimkin, M., Gore, M., Sun, D., Konuthula, N., Raj, A., An, X., Mohandas, N., Bodine, D. M., Hardison, R. C., & Weiss, M. J. (2014). Lineage and species-specific long noncoding RNAs during erythro-megakaryocytic development. *Blood*, 123(12), 1927–1937. <https://doi.org/10.1182/blood>
- Paralkar, V. R., Taborda, C. C., Huang, P., Yao, Y., Kossenkov, A. V., Prasad, R., Luan, J., Davies, J. O. J., Hughes, J. R., Hardison, R. C., Blobel, G. A., & Weiss, M. J. (2016). Unlinking an lncRNA from Its Associated cis Element. *Molecular Cell*, 62(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.029>
- Penagos-Puig, A., Claudio-Galeana, S., Stephenson-Gussinye, A., Jácome-López, K., Aguilar-Lomas, A., Pérez-Molina, R., & Furlan-Magaril, M. (2023). RNA polymerase II pausing regulates chromatin organization in erythrocytes. *Nature Structural & Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01037-0>
- Phillips, J. E., & Corces, V. G. (2009). CTCF: Master Weaver of the Genome. En *Cell* (Vol. 137, Número 7, pp. 1194–1211). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.001>
- Reik, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. En *Nature* (Vol. 447, Número 7143, pp. 425–432). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature05918>

- Ren, Y., Zhu, J., Han, Y., Li, P., Wu, J., Qu, H., Zhang, Z., & Fang, X. (2021). Regulatory association of long noncoding RNAs and chromatin accessibility facilitates erythroid differentiation. *Blood Advances*, 5(23), 5396–5409. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2021005167>
- Rincón-Arano, H., Guerrero, G., Valdes-Quezada, C., & Recillas-Targa, F. (2009). Chicken α -globin switching depends on autonomous silencing of the embryonic π globin gene by epigenetics mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(3), 675–687. <https://doi.org/10.1002/jcb.22304>
- Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 145–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>
- Rowley, M. J., & Corces, V. G. (2018). Organizational principles of 3D genome architecture. *Nature Reviews Genetics*, 19(12), 789–800. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0060-8>
- S. Zibitt, M., Hartford, C. C. R., & Lal, A. (2021). Interrogating lncRNA functions via CRISPR/Cas systems. *RNA Biology*, 18(12), 2097–2106. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1899500>
- Saldaña-Meyer, R., González-Buendía, E., Guerrero, G., Narendra, V., Bonasio, R., Recillas-Targa, F., & Reinberg, D. (2014). CTCF regulates the human p53 gene through direct interaction with its natural antisense transcript, Wrap53. *Genes and Development*, 28(7), 723–734. <https://doi.org/10.1101/gad.236869.113>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schoenfelder, S., & Fraser, P. (2019). Long-range enhancer–promoter contacts in gene expression control. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 20, Número 8, pp. 437–455). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0128-0>
- Schulz, V. P., Yan, H., Lezon-Geyda, K., An, X., Hale, J., Hillyer, C. D., Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2019). A Unique Epigenomic Landscape Defines Human Erythropoiesis. *Cell Reports*, 28(11), 2996–3009.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.020>
- Schwarzer, A., Emmrich, S., Schmidt, F., Beck, D., Ng, M., Reimer, C., Adams, F. F., Grasedieck, S., Witte, D., Käbler, S., Wong, J. W. H., Shah, A., Huang, Y., Jammal, R., Maroz, A., Jongen-Lavrencic, M., Schambach, A., Kuchenbauer, F., Pimanda, J. E., ... Klusmann, J. H. (2017). The non-coding RNA landscape of human hematopoiesis and leukemia. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00212-4>
- Setten, R. L., Chomchan, P., Epps, E. W., Burnett, J. C., & Rossi, J. J. (2021). *CRED9: a differentially expressed lncRNA regulates expression of transcription factor CEBPA*. <https://doi.org/10.1261/rna>
- Shlyueva, D., Stampfel, G., & Stark, A. (2014). Transcriptional enhancers: From properties to genome-wide predictions. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Número 4, pp. 272–286). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3682>
- Simeonov, D. R., Gowen, B. G., Boontanart, M., Roth, T. L., Gagnon, J. D., Mumbach, M. R., Satpathy, A. T., Lee, Y., Bray, N. L., Chan, A. Y., Lituiev, D. S., Nguyen, M. L., Gate, R. E., Subramaniam, M., Li, Z., Woo, J. M., Mitros, T., Ray, G. J., Curie, G. L., ... Marson, A. (2017). Discovery of stimulation-responsive immune enhancers

- with CRISPR activation. *Nature*, 549(7670), 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature23875>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Número 2, pp. 96–118). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Tsiftoglou, A. S., Vizirianakis, I. S., & Strouboulis, J. (2009). Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. En *IUBMB Life* (Vol. 61, Número 8, pp. 800–830). <https://doi.org/10.1002/iub.226>
- Ulianov, S. V., Galitsyna, A. A., Flyamer, I. M., Golov, A. K., Khrameeva, E. E., Imakaev, M. V., Abdennur, N. A., Gelfand, M. S., Gavrillov, A. A., & Razin, S. V. (2017a). Activation of the alpha-globin gene expression correlates with dramatic upregulation of nearby non-globin genes and changes in local and large-scale chromatin spatial structure. *Epigenetics and Chromatin*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0142-4>
- Ulianov, S. V., Galitsyna, A. A., Flyamer, I. M., Golov, A. K., Khrameeva, E. E., Imakaev, M. V., Abdennur, N. A., Gelfand, M. S., Gavrillov, A. A., & Razin, S. V. (2017b). Activation of the alpha-globin gene expression correlates with dramatic upregulation of nearby non-globin genes and changes in local and large-scale chromatin spatial structure. *Epigenetics and Chromatin*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0142-4>
- Ulyanov, S. V., & Gavrillov, A. A. (2012). Chicken β -globin genes: A model system to study the transcriptional regulation at the level of genome domains. En *Molecular Biology* (Vol. 46, Número 5, pp. 613–626). Maik Nauka Publishing / Springer SBM. <https://doi.org/10.1134/S0026893312040127>
- Valadez-Graham, V., Razin, S. V., & Recillas-Targa, F. (2004). CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken α -globin gene domain. *Nucleic Acids Research*, 32(4), 1354–1362. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh301>
- Valdes-Quezada, C., Arriaga-Canon, C., Fonseca-Guzmán, Y., Guerrero, G., & Recillas-Targa, F. (2013). CTCF demarcates chicken embryonic α -globin gene autonomous silencing and contributes to adult stage-specific gene expression. *Epigenetics*, 8(8), 827–838. <https://doi.org/10.4161/epi.25472>
- Wang, C., Wu, X., Shen, F., Li, Y., Zhang, Y., & Yu, D. (2015). Shlnc-EC6 regulates murine erythroid enucleation by Rac1-PIP5K pathway. *Development Growth and Differentiation*, 57(6), 466–473. <https://doi.org/10.1111/dgd.12225>
- Wang, K. C., Yang, Y. W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B. R., Protacio, A., Flynn, R. A., Gupta, R. A., Wysocka, J., Lei, M., Dekker, J., Helms, J. A., & Alvarez-Dominguez, J. R., Hu, W., Yuan, B., Shi, J., Park, S. S., Gromatzky, A. A., Van Oudenaarden, A., & Lodish, H. F. (2014). *Global discovery of erythroid long noncoding RNAs reveals novel regulators of red cell maturation*. 123(4), 570–581. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10>
- Weintraub, A. S., Li, C. H., Zamudio, A. V., Sigova, A. A., Hannett, N. M., Day, D. S., Abraham, B. J., Cohen, M. A., Nabet, B., Buckley, D. L., Guo, Y. E., Hnisz, D., Jaenisch, R., Bradner, J. E., Gray, N. S., & Young, R. A. (2017). YY1 Is a Structural Regulator of Enhancer-Promoter Loops. *Cell*, 171(7), 1573-1588.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.008>

- Xiang, J. F., Yin, Q. F., Chen, T., Zhang, Y., Zhang, X. O., Wu, Z., Zhang, S., Wang, H. Bin, Ge, J., Lu, X., Yang, L., & Chen, L. L. (2014). Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus. *Cell Research*, 24(5), 513–531. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.35>
- Xie, W., Schultz, M. D., Lister, R., Hou, Z., Rajagopal, N., Ray, P., Whitaker, J. W., Tian, S., Hawkins, R. D., Leung, D., Yang, H., Wang, T., Lee, A. Y., Swanson, S. A., Zhang, J., Zhu, Y., Kim, A., Nery, J. R., Urich, M. A., ... Ren, B. (2013). Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell*, 153(5), 1134–1148. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.022>
- Xu, C., & Shi, L. (2019). Long non-coding RNAs during normal erythropoiesis. En *Blood Science* (Vol. 1, Número 2, pp. 137–140). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/BS9.0000000000000027>
- Yang, S., Sun, G., Wu, P., Chen, C., Kuang, Y., Liu, L., Zheng, Z., He, Y., Gu, Q., Lu, T., Zhu, C., Wang, F., Gou, F., Yang, Z., Zhao, X., Yuan, S., Yang, L., Lu, S., Li, Y., ... Cheng, H. (2022). WDR82-binding long noncoding RNA lncEry controls mouse erythroid differentiation and maturation. *Journal of Experimental Medicine*, 219(4). <https://doi.org/10.1084/jem.20211688>
- Yin, Y., Yan, P., Lu, J., Song, G., Zhu, Y., Li, Z., Zhao, Y., Shen, B., Huang, X., Zhu, H., Orkin, S. H., & Shen, X. (2015). Opposing roles for the lncRNA haunt and its genomic locus in regulating HOXA gene activation during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 16(5), 504–516. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.03.007>
- Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K. A., Mueller, B. U., Narravula, S., Torbett, B. E., Orkin, S. H., & Tenen, D. G. (2000). *PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding*.
- Zheng, H., & Xie, W. (2019). The role of 3D genome organization in development and cell differentiation. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Número 9, pp. 535–550). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0132-4>

XIII. ANEXO

I. Tablas de oligonucleótidos y plásmidos

| Tabla 1: CRISPR sgRNA oligonucleótidos. | | |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Nombre | Secuencia Forward | Secuencia Reverse |
| Dirigidos al promotor del gen α^D | | |
| sgRNA1 | AGGGCAGCAGTGCCCCCTCA | TGAGGGGGCACTGCTGCCCT |
| sgRNA2 | CCCCTCAGGGCCCCCTCTGT | ACAGAGGGGGCCCTGAGGGG |
| Dirigidos al promotor del lncRNA- α GT | | |
| sgRNA1 | CACCGCTCTCAGAAGGGTGCCACT | AAACAGTGGCACCCCTTCTGAGAGC |
| sgRNA2 | CACCGACTGCGCTGCTCCGGAAGT | AAACCAGTTCCGGAGCAGCGCAGTC |
| sgRNA3 | CACCGCTGCAACTATGAGCTTCCCC | AAACGGGAAGCTCATAGTTGCAGC |

| Tabla 2: Oligonucleótidos para PCR | | |
|---|--------------------------|--------------------------|
| Nombre | Secuencia Forward | Secuencia Reverse |
| aDqPCR | ACTGCCGAGGACAAGAAGCTA | GGTCGAAGTGGGGGAAGTAGGT |
| aAqPCR | CCCTGGAAAGGATGTTCCACC | GGCCCAGGAGTTTGAAGTTG |
| phiqPCR | TCACTGGAGAGGCTTTTTGCC | GTGGGAAAGCAGCTGAAGTT |
| qP9 | GCGAGACACGGCAGGACAGG | GCACCTCAGTGCAGGCTGTGT |
| InSp | TAGCAGAGAGGAGGGGAGAGTG | AGATACACAGCCTGCACTGAGG |

| Tabla 3: Plásmidos |
|-------------------------------|
| PX330 (Addgene: #42239) |
| Cas9m4-VP64 (Addgene: #47319) |