



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LA
ARQUITECTURA NUCLEAR Y SU RELACIÓN CON
LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *BCR* Y *ABL1* EN
CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Erandhi Claudel Ornelas Guzmán

DIRECTORA DE TESIS:

Biól. Eunice Fabián Morales



Ciudad Universitaria, CD.MX., 2022



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 mi familia, especialmente a mis abuelos Rita Vivanco y Francisco Guzmán que fueron fuente de soporte y cariño en mi crianza.

A mi madre, por siempre apoyar mis sueños y pasión por la ciencia.

A mis amigos, quienes me han apoyado y motivado durante este camino. Gracias por ser parte de mis éxitos. Cindy, Pepe, Karen, Ray, Dulce, Guadalupe, Leonardo, Enya, Denisse, Raul, Luis, Daniela, Collin, Alejandra, Alfredo, César y Omar.

Agradecimientos

A mi asesora de tesis, Eunice Fabián Morales, por permitirme permanecer y trabajar bajo su tutela. Le agradezco su gran paciencia y asesoría.

A Diego Oliva Rico, clave para la realización de mi proyecto. Le estoy muy agradecida por su compromiso para enseñar, ser un guía y brindarme de su tiempo y paciencia para que pudiera concluir mi trabajo.

Al Dr. Alejandro López Saavedra, la Dra. Clementina Castro Hernández y Adriana Gudiño por sus consejos y observaciones técnicas.

A Víctor Falconi, quién además de ser un colega, es un amigo. Gracias por aconsejarme, enseñarme y hacer amena mi estancia en el Laboratorio.

A Rodrigo González Barrios de la Parra, por adentrarme al mundo de la epigenética, por sus consejos y guía.

A mis colegas dentro del Laboratorio, tanto estudiantes como doctores, por las risas, charlas y consejos.

Y finalmente, al Dr. Luis Herrera Montalvo, por permitirme trabajar en su Laboratorio dentro del Instituto Nacional de Cancerología.

Reconocimientos académicos

El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y en la Unidad de Aplicaciones Avanzadas en Microscopia (ADMIRA) - Red de Apoyo a la Investigación (RAI) - Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, ambos localizados en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), bajo la tutela de la Dra. Eunice Fabian-Morales y asesoramiento conjunto del LIBB. Diego Adrián Oliva Rico y apoyo técnico de la QFB. Adriana Gudiño.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Beca Número IN208815, con apoyo adicional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Fondos sectoriales del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM, México.

Resumen

La RNA polimerasa es clave para entender la organización del genoma dentro del núcleo en interfase. La transcripción de RNA nacientes tiene lugar en los focos nucleares enriquecidos en RNA polimerasa II (RNAPII), conocidos como fábricas transcripcionales. Investigaciones previas han sugerido que los genes activos en *cis* y en *trans* pueden compartir las mismas fábricas de transcripción en el contexto nuclear. Mientras que la proximidad espacial de algunos genes es un factor que influye en la incidencia con la que se producen translocaciones específicas. Por ejemplo, la leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa definida por la presencia de la translocación t(9;22) cuyo origen se ha asociado a la proximidad espacial de los genes *BCR* y *ABL1* en células hematopoyéticas. Sin embargo, el papel que puede desempeñar la presencia de fábricas transcripcionales como factor estructural y condicionante de la t(9;22) en células hematopoyéticas no ha sido esclarecido. El objetivo general de este trabajo fue determinar si los alelos de los genes *BCR* y *ABL1* pueden compartir una fábrica transcripcional en células troncales hematopoyéticas sanas. Para ello fue utilizada la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia tridimensional acoplada a inmunofluorescencia (Immuno 3D-FISH) en células CD34+ provenientes de 4 donadores de médula ósea movilizada sana del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Las imágenes del proyecto fueron capturadas en Z-stack por Microscopía de Iluminación Estructurada tridimensional (3D-SIM) y analizadas con el software imaris para su reconstrucción tridimensional. Además, se evaluó la expresión génica de los genes *BCR* y *ABL1* mediante PCR tiempo real, comparando la estirpe hematopoyética CD34+ con células primarias epiteliales de próstata (PrEC) en donde no se presenta la translocación. Las imágenes analizadas mostraron que el 8% de los núcleos analizados en la estirpe CD34+ muestran a un par génico *BCR* y *ABL1* compartiendo una fábrica transcripcional sugiriendo que la cercanía espacial de los genes *ABL1* y *BCR* no representa una condición exclusiva de la estirpe hematopoyética CD34+ para la génesis de la t(9;22). Mientras que los datos en PCR tiempo real plantean que no hay una relación entre una mayor expresión o transcripción con una distancia más cercana entre los alelos de los genes *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional en la estir-

pe CD34+. En conclusión, nuestros hallazgos describen un panorama general de la disposición espacial de los genes *BCR* y *ABL1* respecto a las fábricas transcripcionales en células troncales hematopoyéticas, y nos invitan a continuar estudiando la dinámica de estos genes en el espacio tridimensional del núcleo y la relación de esta con la génesis de la translocación t(9;22).

Índice general

Reconocimientos académicos	IV
Índice de figuras	XI
Índice de tablas	XIV
1. Introducción	1
1.1. Arquitectura nuclear	1
1.1.1. Organización del genoma en el núcleo	1
1.2. Fábricas transcripcionales	3
1.2.1. Origen del concepto	3
1.2.2. Concepto de fábricas transcripcionales	4
1.2.3. Componentes	4
1.2.3.1. RNA Polimerasa	4
1.2.3.2. Biosíntesis de RNA naciente	7
1.2.4. Estudio de las fábricas transcripcionales	8
1.2.5. Tamaño y número de las fábricas transcripcionales	8
1.2.6. Implicación de las fábricas en la regulación transcripcional	9
1.3. Relación de las fábricas transcripcionales y las translocaciones cromosómicas	14
1.3.1. Translocaciones cromosómicas en cáncer	14
1.3.2. Tipos de translocaciones	16
1.3.3. Formación de proteínas de fusión	17
1.4. Relevancia del estudio de las fábricas transcripcionales y los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> en la leucemia mieloide crónica	18
1.4.1. Leucemia mieloide crónica (LMC)	18
1.4.2. Implicación de los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> en la etiología de la leucemia mieloide crónica (LMC)	20

2. Justificación	21
3. Hipótesis	22
4. Objetivos	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos particulares	23
5. Metodología	24
5.1. Obtención de muestras	24
5.2. Preparación de muestras	24
5.2.1. Resumen de la estrategia experimental	24
5.2.1.1. Aislamiento de la fracción leucocitaria por gradiente de Ficoll	25
5.2.1.2. Obtención de células troncales hematopoyéticas por columna	25
5.2.1.3. Cultivo celular	26
5.2.1.4. Inmuno 3D-FISH	26
5.3. Análisis de imágenes	26
5.3.1. Adquisición de imágenes	26
5.3.2. Reconstrucción tridimensional	29
5.3.3. Cuantificación de las distancias intergénicas y determinación de las distancias entre los alelos de los genes a fábricas transcripcionales	30
5.4. Análisis de expresión	32
5.4.1. Resumen de la estrategia experimental	32
5.4.1.1. Extracción de RNA	33
5.4.1.2. Cuantificación de RNA	33
5.4.1.3. Síntesis de cDNA	33
5.4.1.4. Diseño de oligonucleótidos	34
5.4.1.5. PCR punto final	35
5.4.1.6. PCR en tiempo real	36
5.4.1.7. Evaluación de la eficiencia de la amplificación de oligonucleótidos	37
5.4.1.8. Análisis de expresión relativa por doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$)	38
5.5. Análisis estadísticos	38
6. Resultados	39
6.1. Validación del modelo	39
6.1.1. Expresión activa de los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i>	39

6.1.2. Proximidad génica entre el par alélico <i>BCR</i> y <i>ABL1</i>	44
6.2. Presencia y cercanía de las fábricas transcripcionales	48
6.2.1. Cuantificación de distancias entre cada gen <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> a su fábrica transcripcional más cercana	49
6.2.2. Comparación de distancias entre los alelos de los genes <i>BCR</i> / <i>ABL1</i> y su fábrica transcripcional más cercana, respecto a las distancias DIm y DIMA	53
6.2.3. Comparación de distancias entre los alelos de los genes <i>BCR</i> / <i>ABL1</i> y su fábrica transcripcional más cercana, respecto a las distancias mínimas y máximas	55
6.3. Relación entre la expresión de los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> con la distancia espacial entre los alelos y las fábricas transcripcionales	60
7. Discusión	61
8. Conclusiones	65
9. Perspectivas	66
10. Referencias	67
11. Anexos	78
11.1. Protocolos extendidos	78
11.1.1. Aislamiento de la fracción leucocitaria por gradiente de Ficoll	78
11.1.2. Extracción de RNA	79
11.1.3. Inmuno 3D-FISH	80
11.2. Tablas de resultados suplementarias	83

Índice de figuras

1.1. Organización del genoma en el núcleo celular.	2
1.2. La transcripción de genes se produce en lugares discretos del núcleo	4
1.3. Regulación de la transcripción a través de la fosforilación del dominio carboxilo terminal de la RNAPII	6
1.4. Inicio de la síntesis de RNA	7
1.5. Regulación génica desde la arquitectura lineal a la tridimensional.	10
1.6. Los genes activos transcripcionalmente colocalizan en fábricas transcripcionales compartidas	12
1.7. Reubicación de los alelos <i>Myc</i> en los focos de RNAPII tras la activación de células β	13
1.8. Consecuencias de las reordenaciones cromosómicas	15
1.9. Tipos de translocaciones cromosómicas	17
1.10. Proceso de formación de proteínas de fusión en varios pasos	18
1.11. Formación del cromosoma Filadelfia	19
1.12. Secuencias de fusión en la LMC	20
5.1. Imágenes representativas comparando imágenes en Wide Field y SIM en núcleos celulares en interfase de la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC	28
5.2. Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes SIM del núcleo celular en interfase de la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC	29
5.3. Representación de la distancia entre los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> a su fábrica transcripcional más cercana	31
5.4. Representación de la distancia entre los genes <i>DIm</i> y <i>DIMA</i>	32
5.5. Gráfica representativa de la eficiencia de amplificación	37
6.1. Expresión génica de <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> entre muestras de las estirpe hematopoyética CD34+ contra el control PrEC	41

6.2. Expresión génica de <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> entre muestras de las estirpe hematopoyética CD34+ contra el control PrEC	42
6.3. Expresión génica de <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> entre muestras de las estirpe hematopoyética CD34- contra el control PrEC	43
6.4. Expresión génica de <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> entre estirpes celulares hematopoyéticas CD34+, CD34- y PrEC	44
6.5. La distancia intergénica menor no varía entre estirpes	46
6.6. Diagrama de caja y bigotes con las mediciones de distancias intergénicas menores y mayores entre los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> en la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC	47
6.7. Diagrama de caja y bigotes con las mediciones de distancias intergénicas menores y mayores entre los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> entre muestras de la estirpe hematopoyética CD34+ y PrEC	48
6.8. Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> a su fábrica transcripcional más cercana entre la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC	51
6.9. Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> a su fábrica transcripcional más cercana entre muestras de la estirpe hematopoyética CD34+ y PrEC	52
6.10. Los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> comparten una fábrica transcripcional en común en la estirpe hematopoyética CD34+	53
6.11. Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> a su fábrica transcripcional más cercana entre la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC agrupados de acuerdo a si dichas distancias corresponden a genes DIm (fondo de caja gris) y DIMA (fondo de caja negro)	54
6.12. Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> a su fábrica transcripcional más cercana entre la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC agrupados de acuerdo a si dichas distancias corresponden a genes DIm (fondo de caja gris) y DIMA (fondo de caja negro)	55
6.13. Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> a su fábrica transcripcional más cercana entre la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC agrupados de acuerdo a la distancia mínima (fondo de caja gris) y máxima (fondo de caja negro) de cada alelo a su fábrica transcripcional	57

6.14. Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana entre muestras de la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC agrupados de acuerdo a la distancia mínima (fondo de caja gris) y máxima (fondo de caja negro) de cada alelo a su fábrica transcripcional 58

6.15. Comparación de los coeficientes de variación de las distancias mínimas y máximas de los alelos a su fábrica transcripcional agrupados por gen en las estirpes CD34+ y PrEC 59

Índice de tablas

5.1. Reactivos y volúmenes para una reacción de síntesis de cDNA	34
5.2. Programación del termociclador para la reacción de síntesis de cDNA	34
5.3. Información de los oligonucleótidos diseñados para los experimentos de expresión	35
5.4. Reactivos y volúmenes para una reacción de PCR punto final	35
5.5. Programación del termociclador para PCR punto final	36
5.6. Reactivos y volúmenes para una reacción de PCR tiempo real	36
5.7. Programación del termociclador para PCR en tiempo real	37
6.1. Promedio de las distancias DIm y DIMA por muestra	45
6.2. Promedio de las distancias DIm y DIMA por estirpe	45
6.3. Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana calculadas por muestra	49
6.4. Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana calculadas por estirpe	49
11.1. Reactivos para la extracción de RNA	79
11.2. Soluciones a preparar para la extracción de RNA	79
11.3. Anticuerpos para la Inmuno 3D FISH	80
11.4. Reactivos para la Inmuno 3D FISH	81
11.5. Soluciones a preparar para la Inmuno 3D FISH	81
11.6. Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a las distancias DIm y DIMA por muestra	83
11.7. Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a las distancias DIm y DIMA por muestra	84
11.8. Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a las distancias DIm y DIMA por estirpe	85

11.9. Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana
de acuerdo a las distancias DIm y DIMA por estirpe 85

Introducción

1.1. Arquitectura nuclear

1.1.1. Organización del genoma en el núcleo

Actualmente, el estudio de la regulación genómica se ha enfocado a entender los mecanismos globales en el contexto del núcleo celular. Cada vez es más evidente que la regulación de la expresión genética no puede explicarse únicamente por la información codificada en los elementos reguladores contenidos en la secuencia lineal de DNA [1]. La estructura de la cromatina de orden superior, la regulación epigenética mediante modificaciones de la cromatina y los componentes nucleares desempeñan funciones cruciales en la expresión de los genes. La acumulación de pruebas moleculares y de microscopía [2–4] apunta a que la arquitectura nuclear y la organización espacial del genoma son factores importantes en la regulación de los genes individuales y los programas de expresión de los genes [1,5].

La organización espacial del genoma se compone a través de elementos estructurales en múltiples niveles y escalas de longitud (Figura 1.1) como son las fibras, bucles, dominios y compartimentos que conforman a la cromatina [1,5]. La fibra de cromatina está formada por unidades de 146 pares de bases (pb) de DNA que envuelven a los nucleosomas, los cuales están constituidos por octámeros de proteínas llamadas histonas [1]. Aunque la naturaleza precisa de la fibra de cromatina ha sido ampliamente debatida, las observaciones recientes de varios métodos apoyan la opinión de que la fibra de cromatina suele tener un diámetro de 5 a 24 nm en todo el núcleo y está segregada físicamente como eucromatina transcripcionalmente activa y heterocromatina reprimida transcripcionalmente en regiones distintas en el núcleo celular de la mayoría de las células eucariotas [6]. Esta organización del genoma abarca también el establecimiento de territorios cromosómicos [7], la formación de dominios de cromatina (TADs) y el posicionamiento de genes en localizaciones preferenciales dentro del espacio nuclear [8,9].

1. INTRODUCCIÓN

Además del material genético, en el espacio libre de DNA se distribuyen de forma no aleatoria en el núcleo cuerpos de Cajal, grupos de gránulos de intercromatina “splicing speckles” y focos de RNA conocidos como fábricas transcripcionales, [10,11]. En conjunto, estas observaciones ponen de manifiesto un grado considerable de orden y no aleatoriedad en la organización del genoma y los componentes estructurales dentro del núcleo [12,13]. Revisado en Misteli (2020) [5].

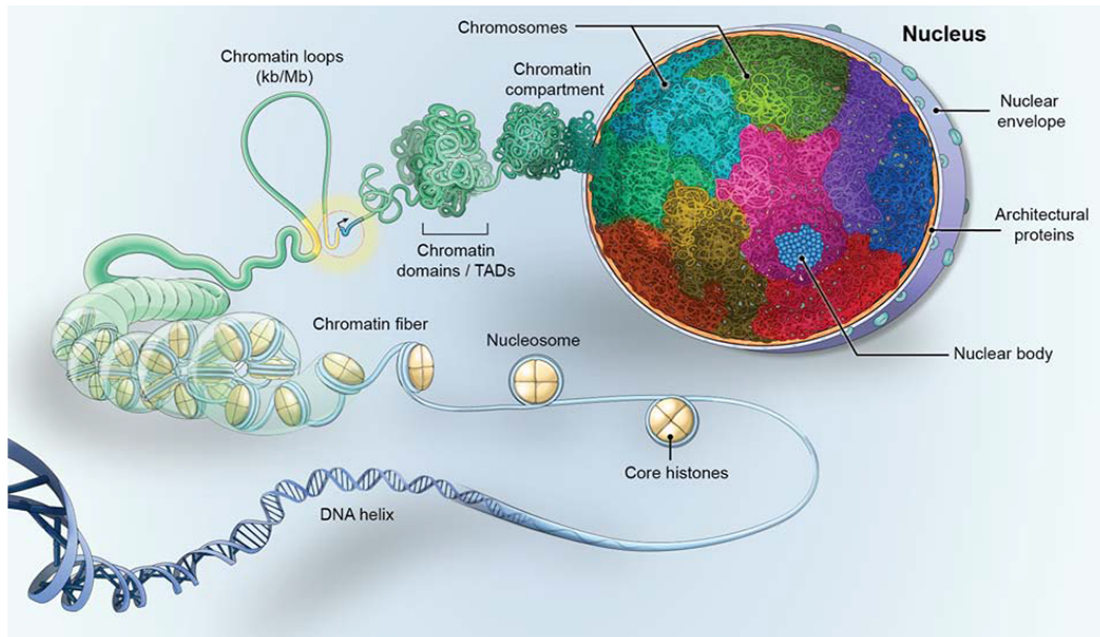


Figura 1.1: Organización del genoma en el núcleo celular Los genomas están organizados en múltiples niveles. El DNA se envuelve alrededor del nucleosoma, que está formado por un octámero de histonas centrales, formando la fibra de cromatina que se pliega en bucles, llevando a menudo los elementos reguladores de los genes (amarillo), como los potenciadores, a la proximidad de los promotores de los genes (oro/azul) para controlar su transcripción (flecha negra). A continuación, la fibra se pliega en dominios de cromatina, denominados TADs, que se asocian entre sí para crear compartimentos de cromatina. El DNA de cada cromosoma ocupa un volumen distinto, o territorio cromosómico (varios colores), dentro del núcleo celular, generando patrones no aleatorios de cromosomas y genes. En el espacio libre de DNA, el núcleo también contiene agregados de RNA y proteínas que forman cuerpos nucleares (azul). Imagen obtenida de Misteli (2020) [5].

1.2. Fábricas transcripcionales

1.2.1. Origen del concepto

El término de “fábricas transcripcionales” fue utilizado por primera vez en 1993 por Jackson y colegas [14]. Ellos utilizaron el Br-UTP como marcaje para visualizar la síntesis de RNAm en células HeLa permeabilizadas y encapsuladas en microperlas de agarosa. Utilizando la microscopía confocal para visualizar los transcritos, descubrieron que la transcripción se producía en 300-500 sitios heterogéneos y discretos en el núcleo, en lugar de estar distribuidos homogéneamente por todo el núcleo [14]. Wansick y colaboradores (1993)[15] obtuvieron el mismo año resultados similares utilizando los mismos métodos a través de la microscopía de inmunofluorescencia. Estos estudios iniciales fueron respaldados por Iborra et al. (1996) [16], que utilizaron Br-UTP o biotina-14 CTP para marcar los transcritos nacientes, además de visualizar los transcritos no sólo por microscopía de luz sino también por microscopía electrónica utilizando partículas de inmuno-oro. Igualmente, Iborra et al. (1996) [16] descubrieron que los grupos de transcritos marcaban sitios de transcripción activa, por lo que sugirieron una transcripción producida en agrupaciones (Figura 1.2), lo que ahora se denominan comúnmente como fábricas transcripcionales.

Para investigar más a fondo las fábricas de transcripción, Iborra y colaboradores (1996) [16] compararon la distribución de los transcritos con la distribución de la RNA polimerasa II (RNAPII). Utilizando microscopía electrónica de transmisión, etiquetaron tanto los transcritos nacientes como las polimerasas con partículas de oro de diferentes tamaños (9 y 15 nm, respectivamente) e identificaron dos poblaciones de polimerasas etiquetadas: un fondo de partículas solitarias dispersas y una segunda población organizada en racimos. Las moléculas de polimerasa solitarias dispersas no se localizaron con los transcritos, mientras que las moléculas de polimerasa agrupadas mostraron una colocalización parcial, con una distancia de 24 nm en sus centros de masa, lo que sugirió la existencia de grupos de transcritos con polimerasas comprometidas con la transcripción. Esta colocalización de los sitios de RNAPII y de transcritos nacientes fueron confirmados por microscopía de luz en estudios posteriores [17,18]. Revisado en Rieder et. al (2012) [19].

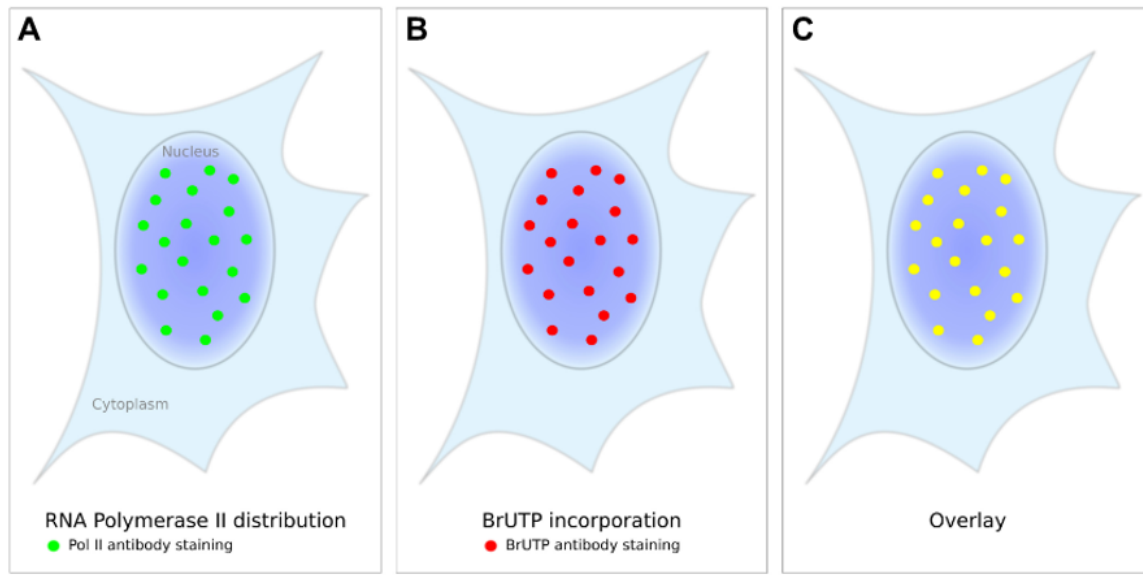


Figura 1.2: La transcripción de genes se produce en lugares discretos del núcleo(A) Cuando se detecta la RNA polimerasa II mediante inmunofluorescencia, puede observarse un patrón de tinción no uniforme (puntos verdes). (B) El etiquetado del RNA naciente mediante la incorporación de Br-UTP y la posterior inmunotinción (puntos rojos) revela un patrón de tinción que coincide con la tinción de la polimerasa, como muestra una superposición (C) (puntos amarillos). El número de fábricas por núcleo varía de 100 a 8,000, dependiendo del tipo de célula, el estado de diferenciación y el método de detección. Imagen tomada de Rieder et. al (2012) [19]

1.2.2. Concepto de fábricas transcripcionales

Las fábricas transcripcionales son sitios de RNA mensajeros nacientes enriquecidos de RNA polimerasa y factores involucrados en la transcripción y regulación de RNA mensajeros localizadas en loci específicos del núcleo en interfase [14,15]. Por tanto, el entendimiento de la estructura y funcionamiento de la RNA polimerasa es clave para comprender su naturaleza.

1.2.3. Componentes

Dentro de los componentes de las fábricas transcripciones, podemos mencionar dos principales: la RNA polimerasa y los RNA nacientes. Debido que ambos conceptos están intrínsecamente relacionados, comenzaré explicando el concepto de la RNA polimerasa y finalizaré con la biosíntesis de RNA nacientes.

1.2.3.1. RNA Polimerasa

La maquinaria molecular responsable de la transcripción de secuencias de DNA en RNA es la enzima RNA polimerasa. En el núcleo de la célula eucarionte existen tres enzimas que trans-

criben el RNA [20]. Estas enzimas son denominadas RNA polimerasa I (RNAPI), que transcribe RNA ribosomales (rRNA); la RNA polimerasa II (RNAPII) que transcribe principalmente RNA mensajeros (RNAm) que codifican para proteínas y la RNA polimerasa III (RNAPIII) que transcribe los RNA de transferencia (tRNA). Además se ha observado que tanto la RNAPII como la RNAPIII transcriben también variantes de RNA no codificantes como son los RNA largos no codificantes (lncRNA), microRNAs (miRNAs), RNA asociados a Piwi (piRNAs), RNA pequeños nucleares (snRNAs) y RNA pequeños nucleolares (snoRNAs) [21]. Es importante mencionar que aunque la mayoría de los trabajos sobre fábricas de transcripción se han basado en el estudio de la RNAPII, las otras dos RNA polimerasas del núcleo, la RNAPI y la RNAPIII, también se han asociado a fábricas transcripcionales [19]. Por lo que, para este trabajo me centraré en la RNA polimerasa II (RNAPII), donde se ha realizado la mayor parte de las investigaciones sobre este tema.

La enzima RNAPII, está constituida por un conjunto de entre 8 a 14 polipéptidos. Donde la subunidad de mayor tamaño molecular (Rpb1) que contiene en el extremo carboxilo terminal repeticiones de siete residuos de aminoácidos (YSPTSPS), que varían en número siendo de 27 en levaduras y llegando a 53 en mamíferos [22]. Cada uno de estos segmentos contiene residuos de aminoácidos que son factibles de ser fosforilados. Este dominio de Rpb1 es denominado CTD (dominio carboxilo terminal) posee, en general, la capacidad de asociarse a una diversidad de polipéptidos, entre los cuales encontramos proteínas que procesarán posteriormente el transcrito, proteínas reguladoras del proceso de biosíntesis de RNAm (co-activadores, co-represores) y proteínas que modifican la cromatina, entre otras [22]. La unión o no unión entre ellos es regulada fundamentalmente por el grado de fosforilación de algunos residuos de aminoácidos presentes en cada heptámero de repetición contenida en el CTD. Por ejemplo, la Ser5 del CTD es fosforilada por la actividad cinasa del factor de transcripción general TFIIH durante el proceso de iniciación de la RNA polimerasa y desciende sus niveles durante el proceso de elongación en donde los niveles de fosforilación en la Ser2 se elevan [23] (Figura 1.3). Este tipo de modificación es reversible, de modo que la extensión de la fosforilación del CTD es un punto de regulación crucial para el proceso global de transcripción y es clave para su identificación mediante anticuerpos fluorescentes [24]. Entre las otras subunidades encontramos algunas que se asocian a Rpb1, especialmente Rpb2, para conformar el sitio activo del complejo RNAPII, mientras que el resto de las subunidades dan fundamentalmente soporte estructural a la enzima [25].

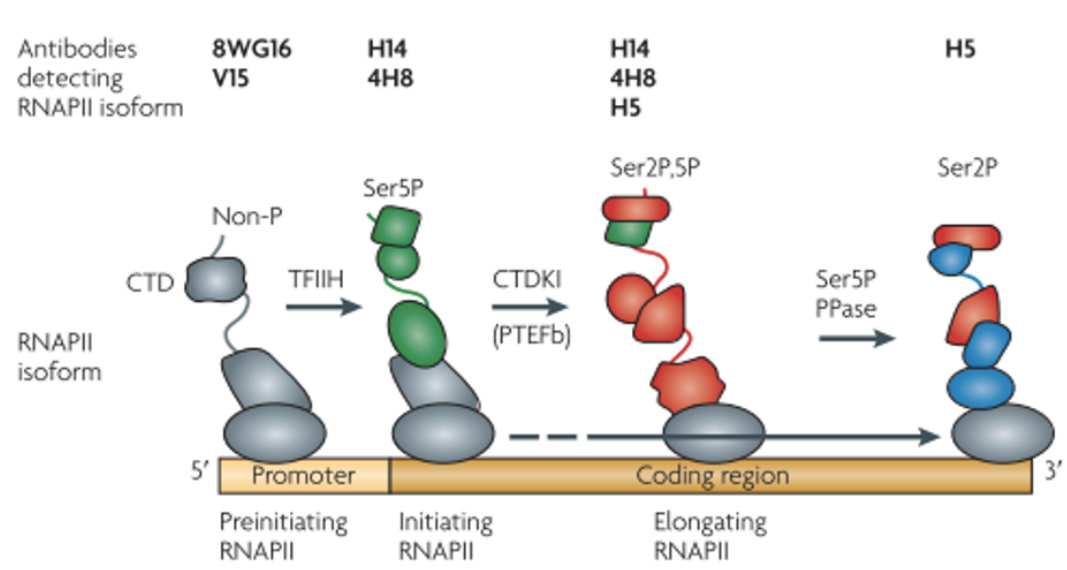


Figura 1.3: Regulación de la transcripción a través de la fosforilación del dominio carboxilo terminal de la RNAPII. La RNAPII (óvalo gris) se representa en cuatro posiciones a lo largo de un gen, y en cada posición su dominio carboxilo terminal (CTD: línea ondulada) es de un color diferente para indicar diferentes estados de fosforilación: El gris indica repeticiones no fosforiladas; el verde indica repeticiones Ser5P; el rojo indica repeticiones Ser2,5P (doblemente fosforiladas); y el azul indica repeticiones Ser2P. La forma de preiniciación de la RNAPII está hipofosforilada (no-P), luego la Ser5 del CTD es fosforilada por la actividad cinasa del factor de transcripción general TFIIH durante la transición a la forma de iniciación de la enzima. La fosforilación adicional de Ser2 por la CTD cinasa I (CTDKI), parte del factor de elongación positiva de la transcripción b (P-TEFb), genera entonces la forma de elongación activa de la polimerasa. Cerca del extremo 3' de los genes se cree que la fosforilación en Ser5 (Ser5P) es eliminada por una proteína fosfatasa (PPasa) y domina la fosforilación del CTD en Ser2. Imagen obtenida de Phatnani y Greenleaf (2006) [29] y modificada por Sutherland y Bickmore (2009) [24].

1.2.3.2. Biosíntesis de RNA naciente

La RNAPII desencadena la biosíntesis de RNA's nacentes cumpliendo con tres etapas fundamentales [26]. La primera etapa del proceso es la iniciación, que se caracteriza por el reconocimiento de una región específica del gen, la cual se denomina promotor. La segunda etapa, denominada elongación, conlleva la biosíntesis de la molécula de RNA naciente, la cual finaliza en la etapa de terminación que coincide con la liberación de la RNAPII del DNA molde (Ver Figura 1.4). En el caso de transcritos de RNA que codifican proteínas, este transcrito primario es procesado al interior del núcleo y, una vez maduro, es exportado al citoplasma donde será "leído" y traducido en una proteína (proceso de traducción) [27].

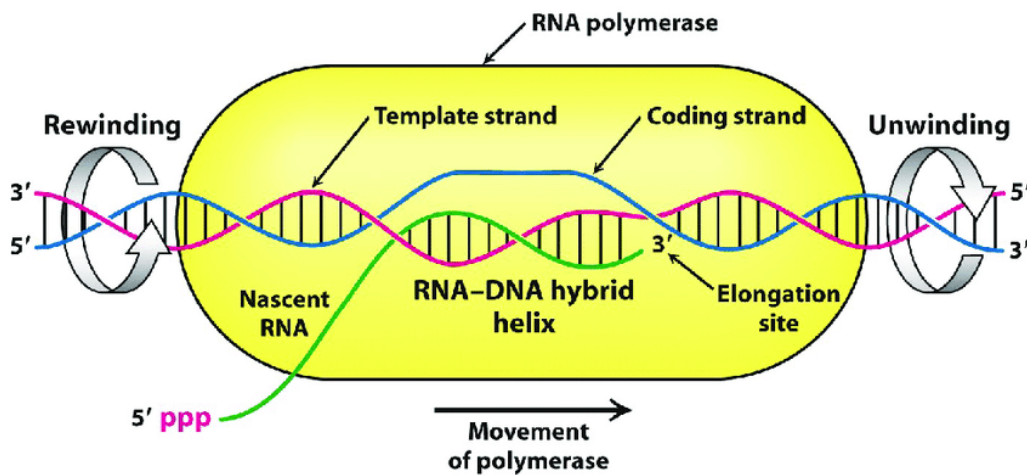


Figura 1.4: Inicio de la síntesis de RNA. La síntesis del RNA se produce a partir de una molécula de DNA molde (template strand). La transcripción comienza con el reconocimiento por parte de la enzima RNA polimerasa de un promotor, una secuencia característica de nucleótidos en el DNA situada antes del segmento que va a transcribirse; la doble hélice del DNA es abierta por la actividad helicasa de la propia enzima. A continuación, la RNA polimerasa progresa a lo largo de la hebra de DNA en sentido 3' a 5', sintetizando una molécula complementaria de RNA. Imagen obtenida de Hubatsch (2013) [28].

1.2.4. Estudio de las fábricas transcripcionales

Aunque las fábricas de transcripción se visualizan fácilmente en las células fijadas mediante inmunofluorescencia, ya sea por microscopía electrónica o por microscopía de luz confocal [16,29], estudios recientes se han enfocado en visualizar fábricas individuales en células eucariotas vivas. Este comportamiento dinámico de la RNAPII en células vivas se ha analizado mediante diferentes aproximaciones: utilizando moléculas de RNAPII marcadas con proteína verde fluorescente [30], con recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP) [31], por análisis de alta resolución de una sola molécula utilizando fotoconvertibles o fotoactivables [32], mediante la valoración preferencia de fosforilación del CTD [33], por visualización del receptor de glucocorticoides etiquetado con proteína verde fluorescente [34], mediante la síntesis de RNAm [32] y recientemente, a través de una sonda codificada específicamente para RNAPII [36]. Revisado en Uchino et al. (2022) [36].

1.2.5. Tamaño y número de las fábricas transcripcionales

Una variedad de estudios de inmunofluorescencia y microscopía electrónica, realizados en distintos tipos de células humanas y de ratón, han encontrado un estimado de 500 a 8,000 de fábricas aproximadamente en el núcleo celular, en donde cada una de las cuales se propone que consta de 4 a 30 moléculas RNAPII con un diámetro medio que varía de 198 ± 7.9 nm si se asume una forma circular al tomar las medidas [16, 37-41]. En conjunto, estos datos sugieren que el tamaño de la fábrica de transcripción puede depender de la actividad transcripcional de los genes involucrados dentro de la misma fábrica, ya que los *loci* más activos desde el punto de vista de la transcripción reclutan más polimerasa, lo que conduce a focos de transcripción más grandes. Además, la evidencia propone que puede haber diferencias en el tamaño de la fábrica entre células transformadas y no transformadas reflejadas en parte por diferencias en la actividad transcripcional [19].

1.2.6. Implicación de las fábricas en la regulación transcripcional

La evidencia señala que los mecanismos de regulación genética y epigenética que operan en las células deben entenderse dentro del contexto tridimensional de la organización nuclear, debido a que el control transcripcional se produce en asociación con los componentes estructurales del núcleo [42–45] (Revisado en Zaidi et al. 2018 [46]). Entre los parámetros de la arquitectura nuclear que integran la información reguladora de manera que permiten una expresión selectiva y característica del estado funcional de las células podemos enlistar:

- La metilación CpG de promotores específicos, los cuales silencian selectivamente la expresión de genes específicos de tejido [53,54](Figura 1.5: A).
- El plegado de la cromatina, lo cual reduce las distancias entre las secuencias reguladoras, facilitando la comunicación cruzada entre las secuencias promotoras y potenciadores [47,48] (Figura 1.5: B y C).
- El “código de histonas”, el cual define el control epigenético mediado por la cromatina a través de las modificaciones postraduccionales de las colas N-terminales altamente conservadas de las histonas [49,52].
- Y la agrupación heterogénea de sub-estructuras nucleares como son las fábricas transcripcionales [24](Figura 1.5: D)

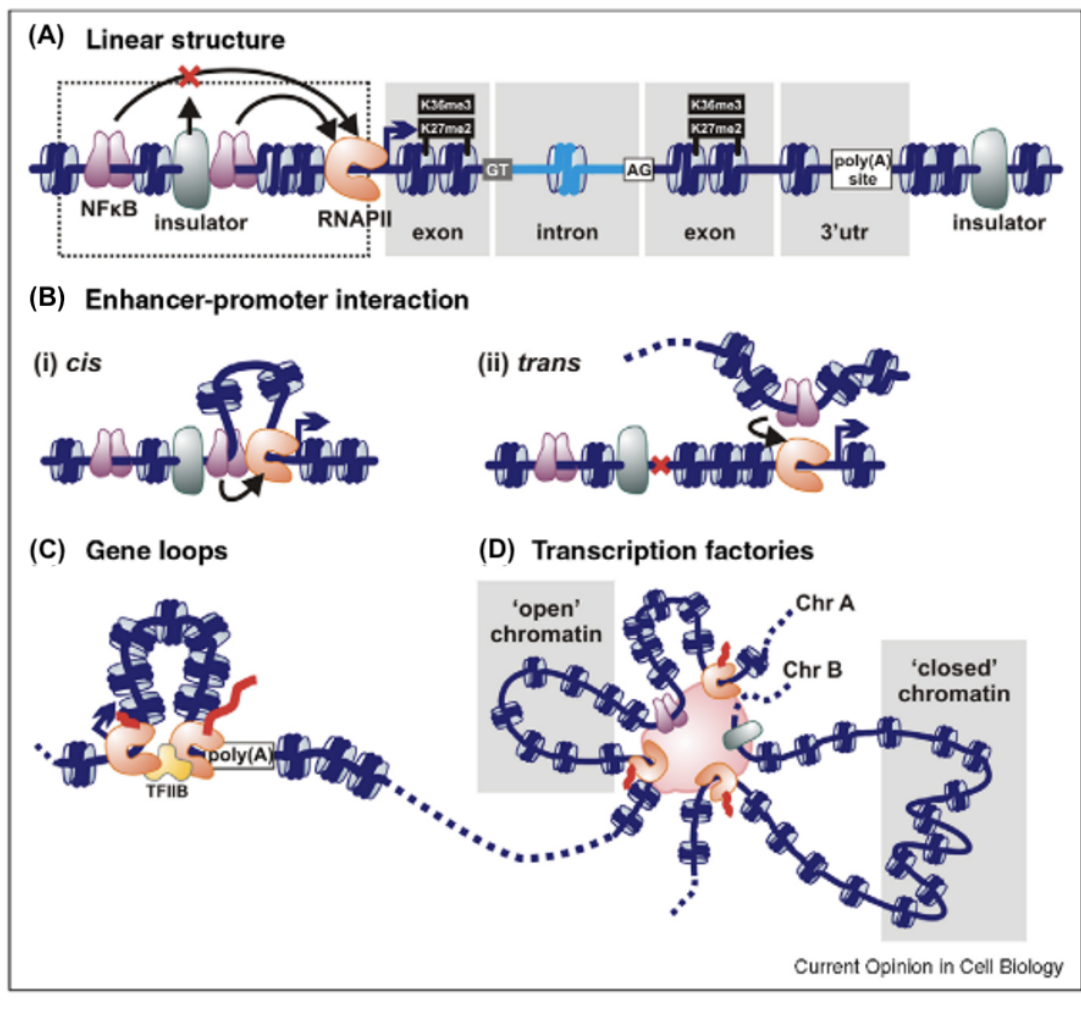


Figura 1.5: Regulación génica desde la arquitectura lineal a la tridimensional. (A) Estructura lineal. Los genes suelen codificar un módulo potenciador/promotor (contorno punteado) donde se acoplan las RNA polimerasas (RNAPII) y los factores de transcripción (aquí NFkB), exones, intrones y una región 3' no traducida (utr); a menudo están flanqueados por aislantes (insulator). Los exones son ricos en nucleosomas y están marcados por H3K27-dimetil y/o H3K36-trimetil; los sitios de empalme (GT/AG) son pobres en nucleosomas; después del sitio poli(A) la densidad de nucleosomas vuelve a aumentar. (B) Las interacciones potenciador-promotor desplegadas en *cis* (para generar un bucle local) o en *trans* pueden estimular la transcripción. (C) Bucle génico. Los extremos 5' y 3' de un gen activo están yuxtapuestos y unidos por la ARN polimerasa y/o factores de transcripción (aquí TFIIB). (D) Las fábricas transcripcionales (rosa) son estructuras polimórficas a las que se unen unidades de transcripción del mismo o de diferentes cromosomas (Chr) a través de ARN polimerasas o factores de transcripción. La cromatina "abierta" se transcribe cuando los promotores en ella se unen a la fábrica transcripcional; la cromatina "cerrada" está alejada de la fábrica y es inerte. Imagen obtenida de Papantonis y Cook (2010) [28]

En el caso de las fábricas transcripcionales, una implicación directa respecto a la regulación de la transcripción, es la propuesta de que existen grupos de genes transcripcionalmente activos compartiendo fábricas transcripcionales en el espacio nuclear para co-transcribirse [56]. Por ejemplo, Osborne y colaboradores en 2004 [18] observaron *in vivo* que genes distales de globina (*beta globina Hbb* y *Eraf*) activos en células eritroides de ratón colocan en la misma fábrica transcripcional a una proporción aproximada de 50 % de la señal de colocación (Ver Figura 1.6:A). Del mismo modo, a través de una inmunofijación, encontraron una asociación espacial más estrecha entre los alelos que se colocaban con focos de RNAPII que entre los alelos que no lo hacían (Ver Figura 1.6:B). Posteriormente, estas observaciones fueron corroboradas por la metodología 3C, en donde se detectaron mayores frecuencias de interacción entre el locus de la *beta globina Hbb* y *Eraf* (proteína estabilizadora de la hemoglobina alfa) situado a 25 Mb en *cis* en células eritroides a comparación de células provenientes de tejido cerebral [57]. Por otro lado, también es posible que la agrupación de genes en las fábricas tenga consecuencias funcionales. De acuerdo a Papantonis y Cook (2011) [58] una de las consecuencias funciones podría ser una mayor eficiencia en la transcripción, la idea de que en las fábricas transcripcionales existen moléculas co-reguladoras, normalmente asociadas a factores de transcripción específicos concentradas en fábrica transcripcionales, puede conducir a una transcripción más eficiente de los genes asociados que se co-transcriben en esa fábrica.

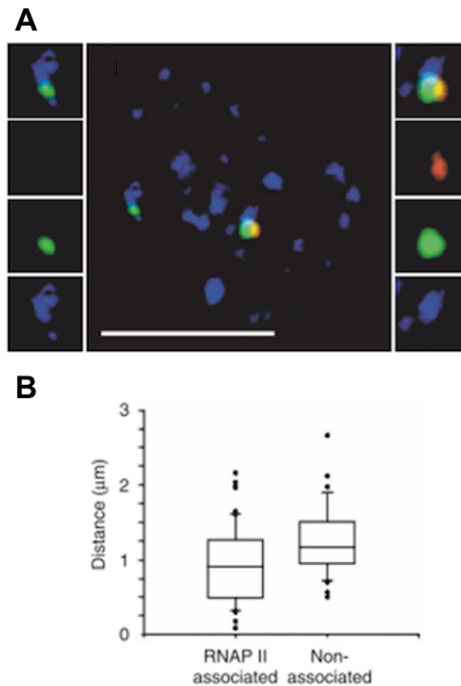


Figura 1.6: Los genes activos transcripcionalmente colocan en fábricas transcripcionales compartidas. A) Sección óptica única de DNA inmuno-FISH de DNA con tres sondas en una célula eritroide, mostrando las señales de *beta globina Hbb* (verde), *Eraf* (rojo) y RNAPII (azul). En los paneles laterales se muestran los canales fusionados y separados de las señales. A la izquierda del panel principal, una señal *beta globina Hbb* sola se asocia con la señal de RNAPII. A la derecha, dos señales colocalizantes se asocian con RNAPII. Barra de escala, 5 µm. (B) Diagrama de cajas y bigotes de las distribuciones de las mediciones 3D de la distancia de separación entre los loci *Hbb* y *Eraf* (n=84), divididos en asociados a RNAPII y no asociados. Imagen obtenida de Osborne et. al (2004) [18].

Con respecto a la dinámica de asociación entre genes y las fábricas transcripcionales. Osborne y colaboradores en 2007 [59] investigaron la relación entre los genes *Myc* e *IgH*, y las fábricas transcripcionales durante una inducción génica temprana en linfocitos beta de ratón. (Ver Figura 1.7). En donde, el protooncogén *Myc* en el cromosoma 15 fue preferentemente reclutado a la misma fábrica de transcripción que el gen *IgH* altamente transcrito localizado en el cromosoma 12. Demostrando así que la inducción implica una rápida reubicación de los genes en las fábricas de transcripción. Además, debido a que *Myc* e *IgH* son los compañeros de translocación más frecuentes en el plasmocitoma y en el linfoma de Burkitt, los autores del estudio pudieron concluir que existe una relación directa entre la organización inter cromosómica no aleatoria de los genes transcritos en las fábricas de transcripción y la incidencia de translocaciones cromosómicas específicas (Osborne et al. 2007) [59].

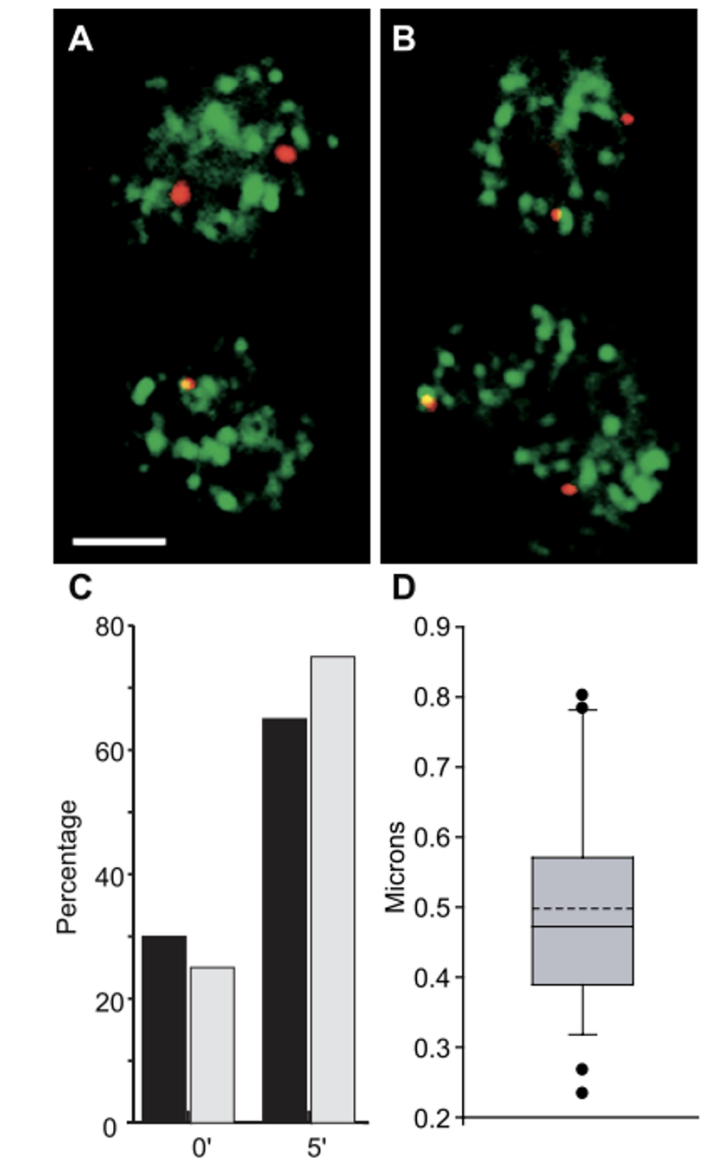


Figura 1.7: Reubicación de los alelos *Myc* en los focos RNAPII tras la activación de células β . a) Sección óptica única de DNA immuno-FISH de DNA con tres sondas en una célula eritroide, mostrando las señales de *beta globina Hbb* (verde), *Eraf* (rojo) y RNAPII (azul). En los paneles laterales se muestran los canales fusionados y separados de las señales. A la izquierda del panel principal, una señal *beta globina Hbb* sola se asocia con la señal de RNAPII. A la derecha, dos señales colocalizantes se asocian con RNAPII. Barra de escala, 5 mm. (b) Diagrama de cajas y bigotes de las distribuciones de las mediciones 3D de la distancia de separación entre los loci *Hbb* y *Eraf* (n=84), divididos en asociados a RNAPII y no asociados. (c) El porcentaje de alelos colocalizando con una señal de transcripción por RNA FISH para *Hbb-b1*, *Hba*, *Eraf*, *Uros*, *Igf2* y *Kcnq1ot1* en células eritroides. Imagen obtenida de Osborne et. al (2004) [59].

1.3. Relación de las fábricas transcripcionales y las translocaciones cromosómicas

Como se mencionó en el apartado anterior, se ha sugerido que la actividad génica que converge en una misma fábrica transcripcional, aumenta la proximidad de las regiones cromosómicas y por lo tanto la posibilidad de intercambio genético entre ellas, lo que daría lugar a las translocaciones cromosómicas [59,60]. Lo anterior es relevante en la investigación en cáncer debido a que las translocaciones cromosómicas son comúnmente observadas y asociadas a las neoplasias hematológicas y a los sarcomas en humanos [61].

1.3.1. Translocaciones cromosómicas en cáncer

La mayoría de las translocaciones cromosómicas en el cáncer implican el intercambio recíproco de DNA entre dos cromosomas, lo que da lugar a una desregulación general del material genético, puede haber deleciones, inversiones o translocaciones que deriven en una proteína de fusión quimérica con potencial oncogénico [62] (Figura 1.8).

Esta relación entre los cromosomas y el cáncer se observó por primera vez en 1902, cuando el citólogo alemán Theodor Boveri observó el crecimiento anormal de huevos de erizo de mar huevos con un número anormal de cromosomas [64,65]. Sin embargo, no fue hasta principios de los 80's cuando Janet Rowley demostró, mediante la tinción con Giemsa y quinacrina, que algunos cromosomas de células cancerosas humanas pueden intercambiar sus partes entre sí, un fenómeno que se designó como translocación cromosómica [66-68]. En 1973, Rowley dio a conocer los primeros informes de translocaciones cromosómicas relacionadas con el cáncer humano que implicaban a los cromosomas 8 y 21 en la leucemia mieloide aguda (LMA) [69] y a los cromosomas 9 y 21 en la leucemia mieloide crónica (LMC) [70]. Tres años después del informe de Rowley, la translocación entre los cromosomas 8 y 14 en el linfoma de Burkitt fue descubierta [71]. Con el avance de las técnicas de clonación molecular, los genes específicos implicados en las translocaciones se identificaron unos años después del primer informe de Rowley. Revisado en Canoy (2021) [62].

Mientras que en la LMC, el gen *ABL1* del cromosoma 9 [72] se identificó que se transloca a la región del grupo de puntos de ruptura (*BCR*) en el cromosoma 22 [73,74] produciendo el producto del gen de fusión *BCR-ABL1* [75]. En el linfoma de Burkitt, el gen *Myc* del cromosoma 8 [76] se encuentra yuxtapuesto al extremo 5' de la cadena pesada de la cadena pesada de la

inmunoglobulina (*IgH*) [77], dando lugar a la sobreexpresión de *Myc* [78].

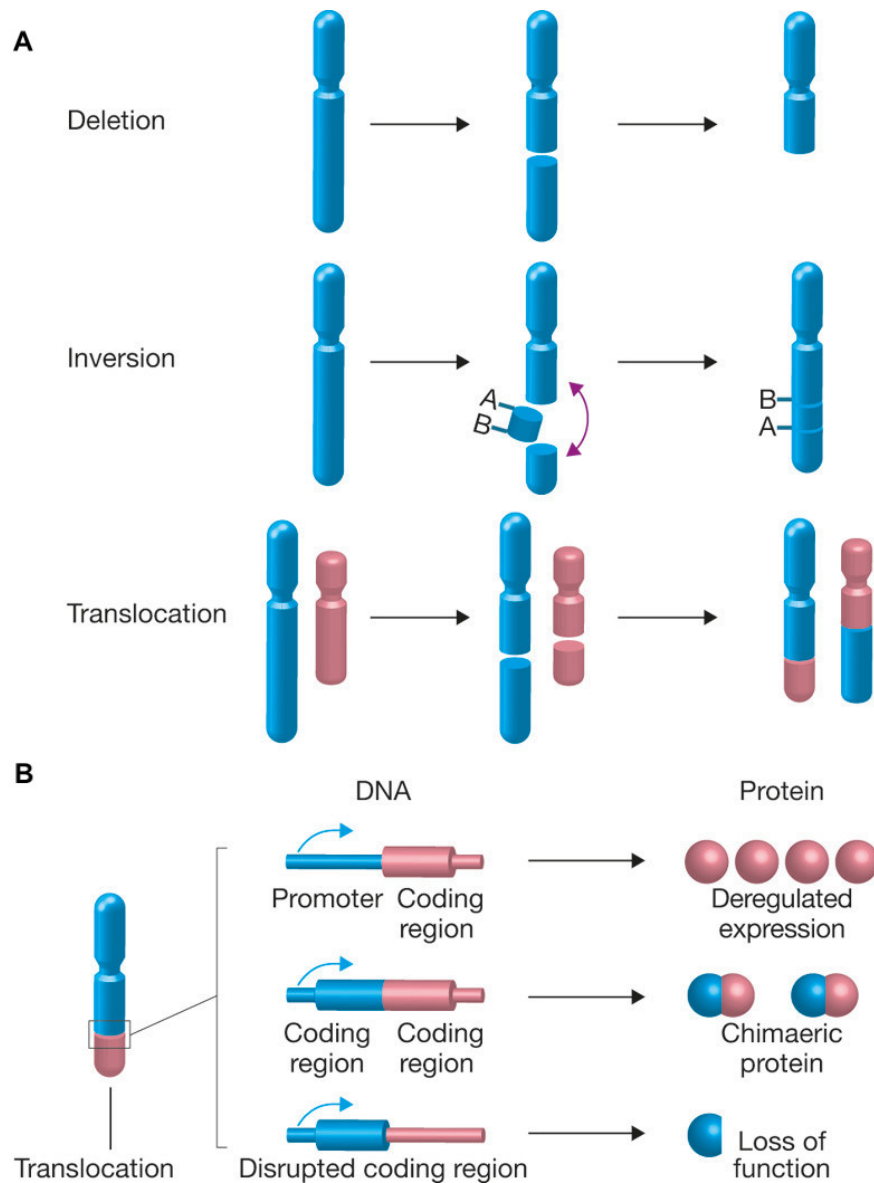


Figura 1.8: Consecuencias de las reordenaciones cromosómicas (A) La ruptura de un cromosoma puede provocar la pérdida de material genético (delección). Cuando se producen dos rupturas en el mismo cromosoma, el trozo de DNA resultante puede invertirse y reinsertarse en el cromosoma, dando lugar a la formación de una inversión. El material genómico también puede transferirse y unirse a un cromosoma diferente, dando lugar a la formación de una translocación cromosómica. (B) Una translocación puede proporcionar una ventaja proliferativa o de supervivencia a la célula generando una proteína de fusión quimérica con potencial oncogénico, a través de la interrupción de un gen supresor de tumores o por la fusión de un gen promotor de tumores a un promotor transcripcional fuerte. Imagen obtenida de Roukos y Misteli (2014) [63].

1.3.2. Tipos de translocaciones

En general, debido a los distintos tipos de translocaciones descritas en la literatura [62], las translocaciones cromosómicas se consideran recíprocas (Figura 1.9:A) si el intercambio entre cromosomas es bidireccional. Por otro lado, las translocaciones cromosómicas no recíprocas se producen si el intercambio es unidireccional (Figura 1.9:B). Las translocaciones cromosómicas también pueden ser equilibradas o desequilibradas, dependiendo de si no hay ganancia o pérdida neta de material genómico tras el intercambio de segmentos cromosómicos. En las translocaciones recíprocas, se puede producir uno de los tres conjuntos de cromosomas derivados: (1) los dos cromosomas intercambian segmentos rotos pequeños produciendo cromosomas derivados con un solo centrómero (monocéntrico) (Figura 1.9:A). (2) las partes más grandes de los extremos rotos de los cromosomas se unen, produciendo un cromosoma derivativo con dos centrómeros (dicéntrico), y las partes más pequeñas de los cromosomas rotos se unen produciendo un cromosoma derivativo sin un centrómero (acéntrico) (Figura 1.9:A). (3) Una variante del segundo conjunto en la que intervienen dos cromosomas acrocéntricos y se fusionan en el centrómero (Figura 1.9:C). Este tipo de translocación se conoce comúnmente como translocación Robertsoniana descrita por primera vez en 1916 [79]. Los otros brazos rotos p también se fusionan y se convierten en un cromosoma acéntrico.

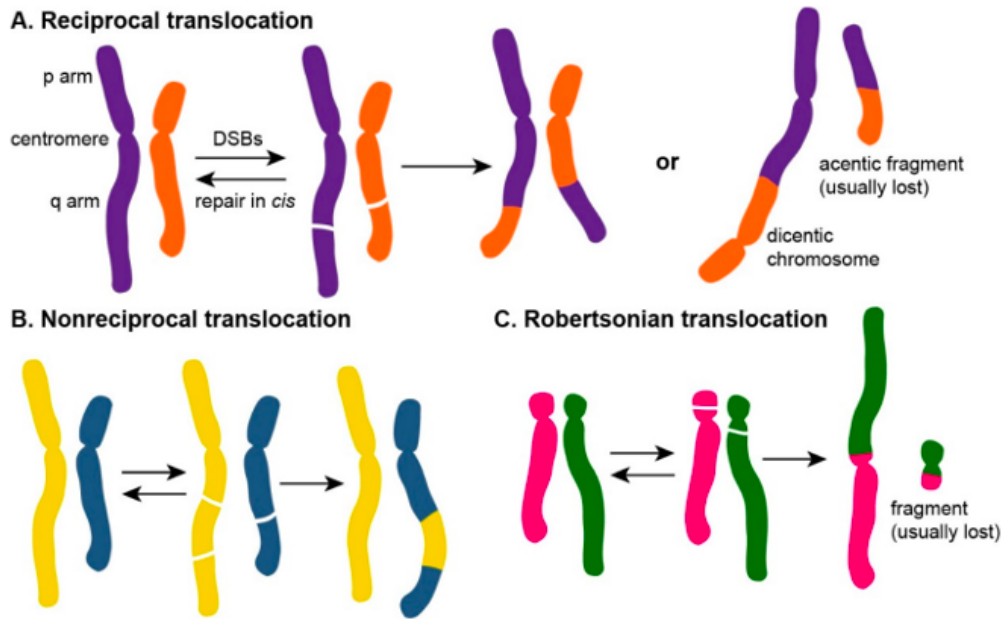


Figura 1.9: Tipos de translocaciones cromosómicas. La reparación de las rupturas de doble hebra (Double Strad Breaks; DSB) en dos cromosomas no homólogos puede producir (A) translocaciones recíprocas si el intercambio entre dos cromosomas translocantes es bidireccional o (B) translocaciones no recíprocas si el intercambio es unidireccional. (C) Las translocaciones Robertsonianas se producen entre dos cromosomas acrocéntricos que se fusionan en el centrómero. Imagen obtenida de Canoy (2021) [62].

1.3.3. Formación de proteínas de fusión

Como se mencionó anteriormente, las translocaciones producen un intercambio de material genético, en consecuencia, secuencias génicas provenientes de distintas cromosomas se fusionan y en el caso de que el sitio de fusión corresponda a una secuencia codificante, al momento de transcribirse se pueden producir proteínas quiméricas o de fusión [62]. La formación de una proteína de fusión es un proceso de varios pasos para su síntesis (Figura 1.10) y consiste en lo siguiente: Dos genes asociados a la fusión (A y B) se rompen en sus puntos de ruptura; tras una serie de reacciones, dos segmentos de los dos genes separados se unen generando un nuevo gen: el gen de fusión. Los genes de fusión pueden entonces traducirse en proteínas de fusión (Figura 1.10). Estas proteínas de fusión contienen dominios funcionales que pueden activar o inhibir la transcripción, la unión del DNA o las interacciones proteína-proteína [80]. El ejemplo más representativo es la formación de la proteína quimérica *BCR-ABL1* en la LMC, la cual eleva la actividad tirosina quinasa en el dominio del protooncogen ABL, activando así las vías de señalización implicadas en el crecimiento y la proliferación celular [81].

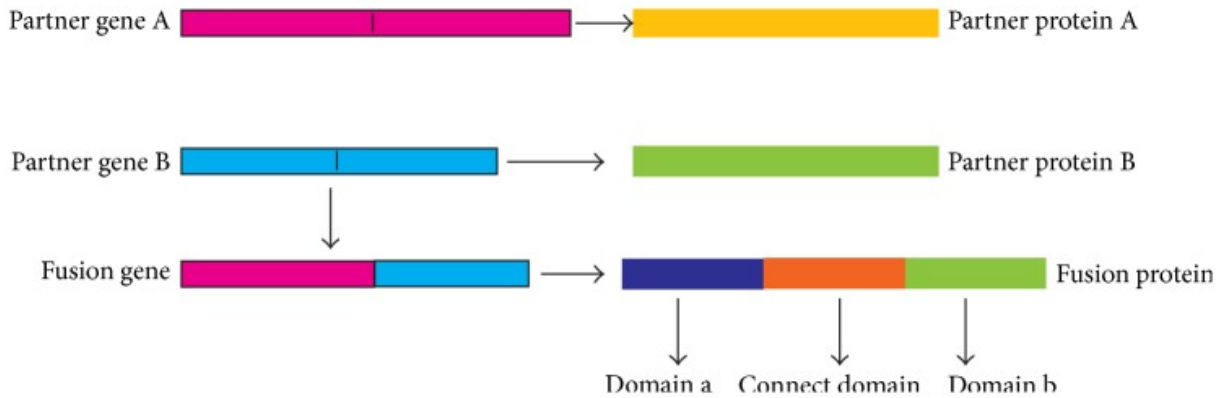


Figura 1.10: Proceso de formación de proteínas de fusión en varios pasos. (Un nuevo gen de fusión se forma después de que dos genes de fusión asociados A (rosa) y B (azul) se rompan en sus puntos de ruptura. Las líneas negras en los genes asociados a la fusión y el nuevo gen de fusión representan el punto de ruptura. El gen de fusión se traduce en una proteína de fusión, que tiene tres dominios, el dominio a (azul oscuro) de la proteína asociada de fusión a, el dominio b (cian) de la proteína asociada de fusión b, y un dominio de conexión (naranja). Imagen obtenida de Wang et al. (2015) [80].

1.4. Relevancia del estudio de las fábricas transcripcionales y los genes *BCR* y *ABL1* en la leucemia mieloide crónica

1.4.1. Leucemia mieloide crónica (LMC)

La leucemia mieloide crónica es un trastorno mieloproliferativo clonal de una célula madre pluripotente con una incidencia en 1-2 casos entre 100,000 al año [82], descrito por primera vez por John Hughes Bennett en 1845 en The Royal Infirmary of Edinburgh (Revisado en: Quintás-Cardama y Cortes, 2006 83). La LMC fue la primera enfermedad maligna con una anomalía cromosómica específica vinculada a ella tras el descubrimiento de un cromosoma diminuto, ahora conocido como cromosoma Filadelfia (Ph) (Ver Figura 1.11) [84], que posteriormente se definió como resultado de una translocación cromosómica recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 t(9;22). Como resultado de la translocación, el cromosoma 22 acortado tiene como resultado la fusión de la región 3' del protooncogen c-ABL1 (9q34) con la región 5' del gen *BCR* (punto de ruptura de la región del clúster) en el cromosoma 22q11.1. Por consiguiente, se generan diferentes proteínas de fusión codificadas por *BCR-ABL1* que varían en tamaño dependiendo del punto de ruptura en el gen *BCR* [85] (Figura 13), siendo así la oncoproteína p210 más común en más del 90% de los pacientes con LMC [86].

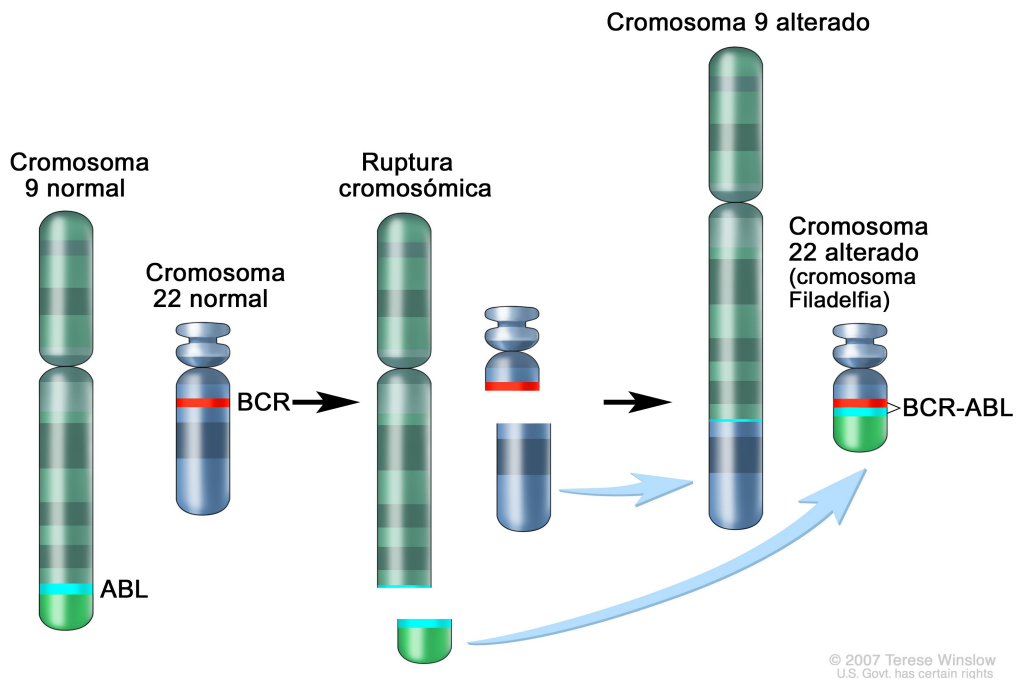


Figura 1.11: Formación del cromosoma Filadelfia. Tras una ruptura en el cromosoma 9 y el cromosoma 22 se origina un cromosoma 9 alterado y un cromosoma 22 diminuto nombrado cromosoma Filadelfia. Imagen obtenida de Terese Winslow (2007) [87].

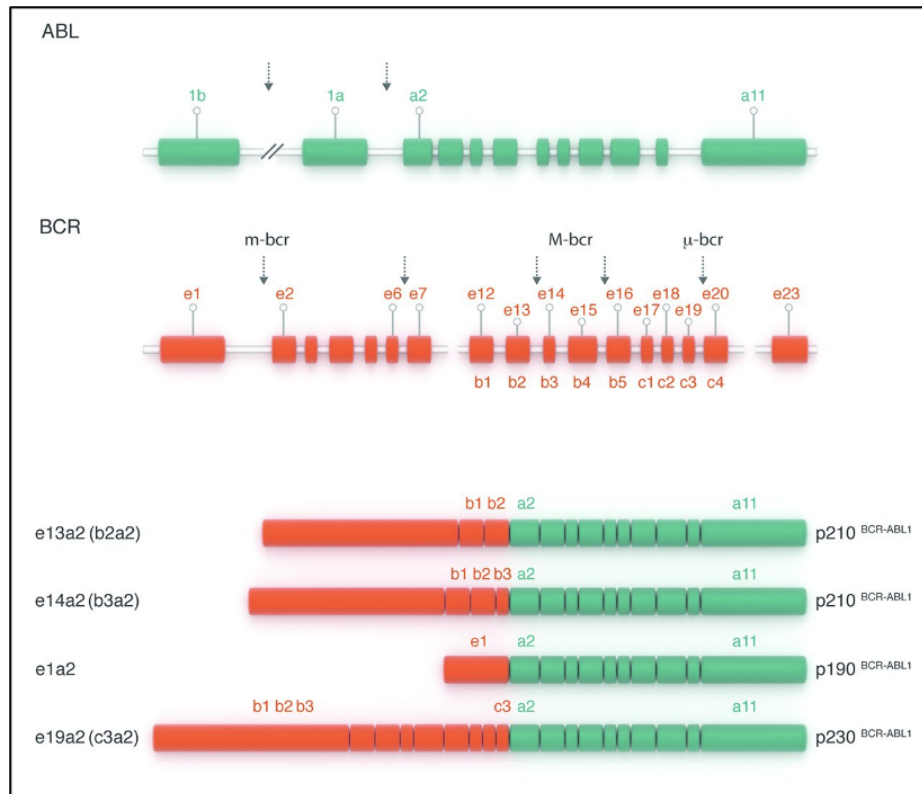


Figura 1.12: Representación de la estructura de los genes *BCR* y *ABL1* normales y de los diferentes puntos de ruptura y secuencias de fusión que pueden generarse en la Leucemia mieloide crónica. Imagen obtenida de Jabbour y Kantarjian (2018) [88].

1.4.2. Implicación de los genes *BCR* y *ABL1* en la etiología de la leucemia mieloide crónica (LMC)

De acuerdo a la etiología de la LMC en relación con la organización del genoma, se ha observado que proximidad espacial de los cromosomas 9 y 22 en interfase afecta la probabilidad de translocación entre ellos [89–91]. Además, los genes *BCR* y *ABL1* en los cromosomas 9 y 22 se han reportado con una distancia espacial de 1-2 μm en promedio el uno del otro en el espacio nuclear de células hematopoyéticas [92–94]. Por lo que se ha propuesto que la proximidad espacial es un factor crucial en la génesis de la t(9;22) [92,95]. La evidencia anterior sugiere que la LMC sigue el modelo de "primero contacto", donde se explica que las translocaciones se forman a partir de *loci* de genes que ya están próximos entre sí antes de la aparición de las rupturas de doble cadena (DSBs) asociadas al daño al DNA [62]. Evidencia que apoya lo anterior se ha demostrado en células vivas a través de un mapa de organización espacial Hi-C de alta resolución, donde se observó que la mayoría de las translocaciones se forman a partir de loci que son inicialmente proximales entre sí ($<2 \mu\text{m}$) antes de la inducción de DSBs o que contienen altas frecuencias de contacto [96,97].

Justificación

La organización espacial del genoma en conjunto con los parámetros de la arquitectura nuclear desempeñan un papel en la regulación transcripcional [46]. Estudios de la organización genómica en el núcleo interfásico han propuesto que las fábricas transcripcionales pueden contribuir a la formación de translocaciones cromosómicas al reclutar genes transcripcionalmente activos en proximidad espacial [98–104]. En el caso de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), se ha sugerido que la proximidad espacial de los genes *BCR* y *ABL1* en los cromosomas 9 y 22 puede explicar la alta incidencia del cromosoma Filadelfia t(9;22), los cuales se ha reportado que se localizan a 1-2 μm en promedio el uno del otro en el espacio nuclear [92–94]. Esto se ha demostrado además en células vivas y a través de un mapa de organización espacial Hi-C de alta resolución, donde se observó que la mayoría de las translocaciones se forman a partir de loci que son inicialmente proximales entre sí ($<2 \mu\text{m}$) antes de la inducción de DSB o que contienen altas frecuencias de contacto [96,97]. Dado que la LMC es un modelo de referencia en el que la cercanía espacial de los genes *BCR* y *ABL1* asume un factor importante en la etiología de esta translocación, nos pareció relevante estudiar si fábricas transcripcionales compartidas se encuentran presentes como un factor común que pudiese explicar la cercanía de estos genes en células troncales hematopoyéticas sanas previo a la generación de la t(9;22).

Hipótesis

Los alelos de los genes *BCR* y *ABL1* comparten una fábrica transcripcional en células troncales hematopoyéticas sanas.

Objetivos

4.1. Objetivo general

Determinar si los alelos de los genes *BCR* y *ABL1* pueden compartir una fábrica transcripcional en células troncales hematopoyéticas sanas.

4.2. Objetivos particulares

- Obtener muestras de sangre periférica movilizada (SPM) de donadores sanos y aislar la población de células troncales hematopoyéticas por columna
- Procesar las muestras a través de la técnica inmuno 3D-FISH de las muestras de células troncales hematopoyéticas
- Obtener imágenes tridimensionales de las muestras mediante Microscopía de Iluminación Estructurada (3D-SIM)
- Determinar las distancias de los alelos de los genes *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana mediante reconstrucción tridimensional de las imágenes obtenidas
- Determinar las distancias intergénicas entre los alelos de los genes *BCR* y *ABL1* mediante reconstrucción tridimensional
- Analizar la expresión de los genes *BCR* y *ABL1* de las muestras a través de la reacción de PCR en tiempo real

Metodología

5.1. Obtención de muestras

En el presente estudio se incluyeron muestras de sangre periférica movilizada (SPM) correspondientes a 6 donadores masculinos sanos de 20 a 40 años, sin tratamiento oncológico previo y con cariotipo 46 XY analizados en 25 metafases. La obtención de muestras se realizó por aféresis, un procedimiento en el cual se extrae sangre y se separa parte de la misma, mientras que el resto de la sangre es regresada al donante. Con la finalidad de movilizar las células madre de la médula ósea hacia el torrente sanguíneo y evitar la punción ilíaca, se les administró a los donadores de 3 a 24 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de Filgrastim (factor estimulante de colonias de granulocitos [G-CSF]) para estimular la producción de los glóbulos blancos [105]. La obtención de muestras se siguió de acuerdo al protocolo de investigación registrado ante los comités de ética y de investigación del INCan con el número (013/030/ICI) (CEI/856/13).

5.2. Preparación de muestras

5.2.1. Resumen de la estrategia experimental

Para preparar las laminillas a analizar, las muestras SPM fueron trabajadas inmediatamente después de su recolección para el aislamiento de la fracción leucocitaria por gradiente de Ficoll [5.2.1.1](#). Posteriormente, se llevó a cabo una separación de la fracción leucocitaria por columna [5.2.1.2](#) usando el kit CD34 MicroBead Kit UltraPure (Núm. de Catálogo 130-100-453) para obtener células troncales hematopoyéticas. Las poblaciones celulares fueron marcadas con sondas fluorescentes para la visualización de los genes *BCR* y *ABL1*, además de tratarlas con un anticuerpo secundario contra la RNAPII para la identificación de las fábricas transcripciones (Inmuno DNA-FISH [5.2.1.4](#)). Una vez montadas las laminillas, se obtuvieron imágenes tridimensionales mediante Microscopía de Iluminación Estructurada (3D-SIM) y se analizaron con

el software Imaris <https://imaris.oxinst.com/> (V.9.5.0, Bitplane) (Análisis de imágenes 5.3)

5.2.1.1. Aislamiento de la fracción leucocitaria por gradiente de Ficoll

Las muestras SPM fueron procesadas individualmente con Ficoll (Núm de catálogo 10771) para separar las poblaciones celulares en fases de acuerdo a su densidad. Se agregó Ficoll en proporción 1:1 con respecto al volumen de la muestra y posteriormente se centrifugaron a 400 rpm por 30 min a temperatura ambiente (TA) para formar las fases. Se removió la fase superior que contiene plasma y se trasvasó la fase intermedia, de color blanco, que contiene leucocitos a un tubo nuevo donde se agregó PBS en proporción 1:3 con respecto al volumen de la fase intermedia obtenida. Posteriormente los leucocitos se centrifugaron una vez más a 400 rpm por 10 min a TA, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 3 mL de PBS nuevo; este paso se repitió hasta dos veces para remover los restos de Ficoll y un obtener un pellet de color blanco. (Ver Protocolos extendidos para más detalles 11.1.2).

5.2.1.2. Obtención de células troncales hematopoyéticas por columna

En la LMC, las células troncales hematopoyéticas (HSC) se han establecido como las células de origen de la t(9;22) mediante estudios de clonalidad *in vivo* en humanos [106,107]. El clúster de diferenciación 34 (CD34) es un marcador reconocido para las HSC humanas y se utilizó en este trabajo para su aislamiento. Para obtener la población de células que expresan el marcador CD34 se realizó una selección positiva siguiendo el protocolo descrito por el proveedor Miltenyi Biotec usando el kit CD34 MicroBead Kit UltraPure (Núm. Cat. 130-100-453) para procesar la fracción leucocitaria de médula ósea movilizada obtenidas por gradiente de Ficoll. Las células CD34+ se marcaron magnéticamente con micro perlas CD34 MicroBeads UltraPure. A continuación, las células se suspendieron en una columna LS MACS (Núm. Cat. 130-042-401) que se coloca en el campo magnético de un separador MidiMACS Separator (Núm. Cat. 130-042-302). Las células CD34+ marcadas magnéticamente fueron retenidas dentro de la columna. Las células no marcadas fueron eliminadas de la columna a través de lavados secuenciales. Después de retirar la columna del campo magnético, las células retenidas magnéticamente fueron eluidas obteniendo únicamente la fracción celular CD34+. Estas células fueron procesadas tanto para Inmuno 3D-FISH 5.2.1.4 como para Análisis de expresión de RNA .

5.2.1.3. Cultivo celular

La línea celular PrEC fue elegida como un modelo comparativo dado que se trata de un cultivo primarios de células normales epiteliales de próstata donde no se ha observado la presencia de la $t(9;22)$, por lo que dado nuestros antecedentes, hipotetizamos que la disposición de las fábricas transcripcionales y su relación con la expresión de los genes *BCR* y *ABL1* sea diferente de la que podamos encontrar en las células hematopoyéticas.

Las células epiteliales de próstata PrEC conforman una línea adherente, obtenida de la compañía ATCC (ATCC, Núm Cat. PCS-440-010) la cual fue cultivada en el medio basal de células epiteliales de próstata (ATCC, Núm Cat. PCS-440-030) y complementada con el kit de crecimiento de células epiteliales de próstata (ATCC, Núm Cat. PCS-440-040) que contiene los siguientes suplementos de crecimiento: L-glutamina, extracto P, epinefrina, rh TGF- α , hidrocortisona, insulina rh y apotransferrina. Las células se crecieron durante dos semanas y después fueron sincronizadas mediante privación de suero fetal bovino por 48 hrs, con la finalidad de que las células se mantuvieran en fase G0, es decir en interfase y poder hacer los análisis comparativos entre la línea celular PrEC y las muestras SPM.

5.2.1.4. Inmuno 3D-FISH

La población de células CD34+ aisladas y las células PrEC fueron cuantificadas y resuspendidas en PBS a una concentración mínima de 10⁵ células/mL. La suspensión celular se colocó sobre un portaobjetos tratado con Poli-L-Lisina (Núm de catálogo 25988-63-0) dentro de una caja petri p60 y se mantuvieron a TA por 15 min máximo para permitir que las células se adhirieran a la superficie del portaobjetos. Posteriormente las muestras fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4%, permeabilizadas con Tritón e hibridadas usando una sonda dual (Núm de catálogo 30-191032) para la detección de los genes *BCR* y *ABL1*. Finalmente se realizó una inmunofluorescencia contra RNAPII (Núm de catálogo ab5408) para visualizar las fábricas transcripcionales (Ver protocolo extendido [11.1.3](#)).

5.3. Análisis de imágenes

5.3.1. Adquisición de imágenes

De las laminillas obtenidas por inmuno 3D-FISH se observaron previas tomas de imágenes mediante microscopía de epifluorescencia en formato de campo abierto o “Wide Field” (WF) para evaluar la efectividad de la hibridación de las sondas. Una vez corroborada la eficiencia de hibridación se adquirieron imágenes Z-Stack mediante Microscopía de Iluminación Estructurada

(SIM), considerada de súper resolución, la cual permite superar el límite de difracción clásico y disminuir el ruido de las señales aumentando hasta 8 veces la resolución volumétrica que se obtiene utilizando técnicas convencionales, lo que significaría $\sim 100\text{--}130$ nm de dimensión lateral y $\sim 280\text{--}350$ nm de dimensión axial [108]. En la Figura 5.1 se muestra una comparación entre los resultados obtenidos por WF y SIM del núcleo celular de una célula troncal hematopoyética CD34+ y una célula epitelial de próstata PrEC.

Las imágenes SIM se tomaron en un sistema Zeiss Elyra PS1 equipado con un objetivo de inmersión en aceite Zeiss Plan Apochromat Inverted 100x/1.46, una cámara Andor EM-CCD iXo 885 y un lente de 1.63 mm a temperatura ambiente. Se obtuvo la señal de DAPI, el anticuerpo secundario contra RNAPII (Alexa Fluor 642, Núm de catálogo A-21235) y las sondas de *BCR* (SpectrumGreen Probe) y *ABL1* (SpectrumOrange Probe) (Núm de catálogo 30-191032) usando láseres de excitación de 405nm, 488nm, 561nm y 642nm. Los Z-Stack se capturaron con un intervalo de 84 nm entre cada plano, lo que consiste entre 100-145 planos secuenciales. Además, se definieron manualmente los límites de cada Z-Stack, para asegurar la captura del núcleo completo.

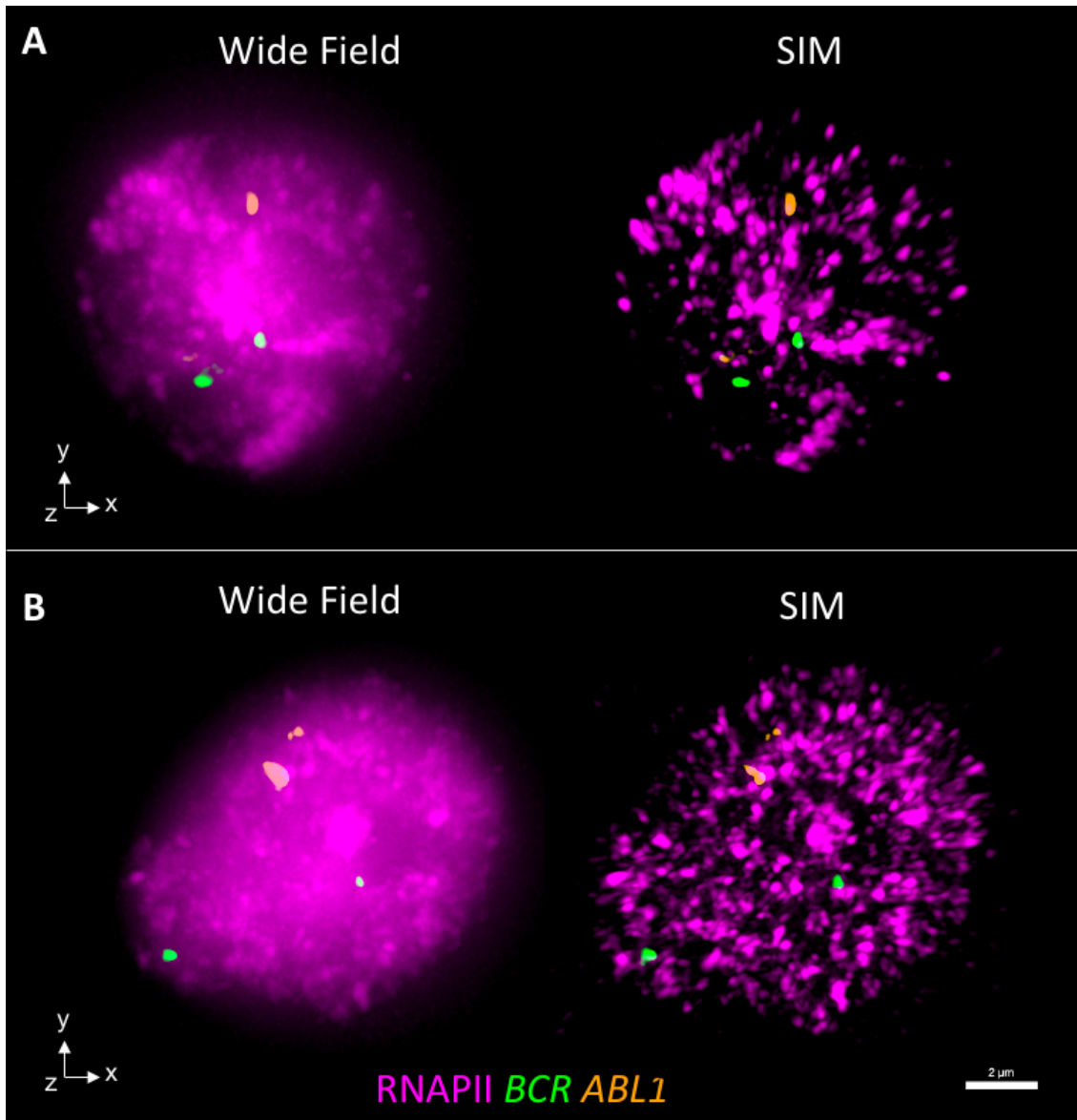


Figura 5.1: Imágenes representativas comparando imágenes en Wide Field y SIM en núcleos celulares en interfase de la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC. (A) Imagen en Z- stack del núcleo celular de una célula hematopoyética CD34+ obtenida por campo abierto (Wide Field) a la izquierda, mientras que a la derecha la imagen es transformada por el algoritmo de Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM). (B) Imagen en Z- stack del núcleo celular de la estirpe PrEC obtenida por campo abierto (Wide Field) a la izquierda, mientras que a la derecha la imagen es obtenida por Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM). En ambas imágenes (A-B) se observan la presencia de las señales de la RNA polimerasa II (RNAPII) y los genes *BCR* y *ABL1* en la estirpe PrEC. En magenta; RNAPII, verde; *BCR* y anaranjado; *ABL1*.

5.3.2. Reconstrucción tridimensional

A partir de las imágenes obtenidas en SIM, se realizó una reconstrucción tridimensional (3D-SIM) de cada una de las señales utilizando el programa para análisis de imagen Imaris (<https://imaris.oxinst.com/>) (V.9.5.0, Bitplane). Este software permitió reconstruir cada una de las señales de forma independiente y superponerlas para formar una sola reconstrucción tridimensional de cada núcleo. En la Figura 5.2 se ejemplifica la reconstrucción tridimensional a partir de imágenes SIM del núcleo celular en interfase de las estirpes utilizadas en este estudio, la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC.

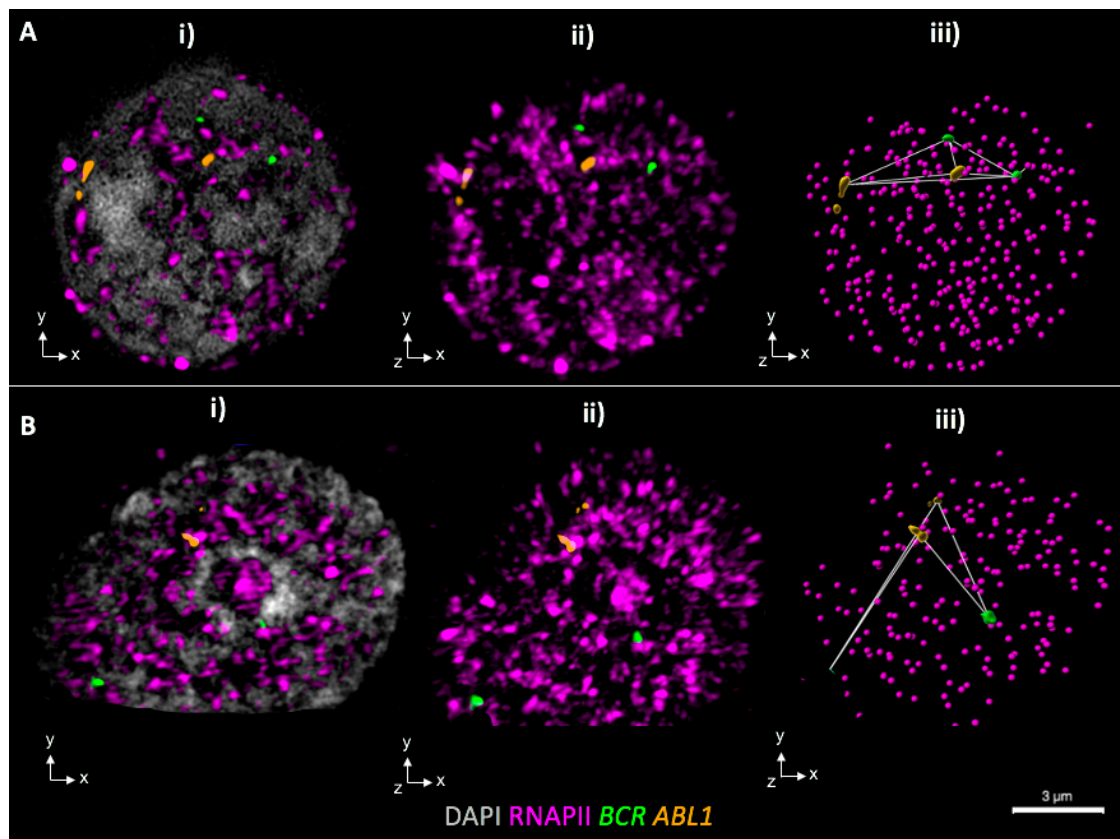


Figura 5.2: Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes SIM del núcleo celular en interfase de la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC. De izquierda a derecha: Imagen en un plano bidimensional (x,y) del núcleo celular de la estirpe CD34+ (A. i) y la estirpe PrEC (B. i) donde se observa la cromatina con presencia de las señales de la RNA polimerasa II (RNAPII) y los genes *BCR* y *ABL1*. Luego, las señales de los genes *BCR* y *ABL1* y la RNAPII sin presencia de cromatina (A. ii - B. ii) y por último, la representación de la construcción tridimensional de los genes *BCR* y *ABL1* y la RNAPII. Las líneas blancas indican las mediciones de distancia del centro de masa de cada gen hacia los demás loci en ambas estirpes (A. iii - B. iii). En magenta; RNAPII, verde; *BCR*, anaranjado; *ABL1*, blanco; DAPI.

5.3.3. Cuantificación de las distancias intergénicas y determinación de las distancias entre los alelos de los genes a fábricas transcripcionales

La reconstrucción tridimensional de las imágenes permitió su modelado 3D para calcular las distancias intergénicas entre cada par de alelos así como las distancias de cada alelo a su fábrica transcripcional más cercana. Para éstos cálculos de distancia se usó entonces el centro de masa (c.m) de cada señal como punto de medición y referencia. Por definición, el c.m representa el promedio de las posiciones de todas las partes del objeto, el cual depende de la forma del cuerpo y distribución de su masa. El uso del software Imaris permitió la determinación automática de el c.m. y extender una línea entre cada c.m indicado y el cálculo de la distancia en micrómetros (μm) (Véase Figura 5.2 : A. iii - B. iii). Por lo que se realizaron las siguientes mediciones:

- Distancia entre los alelos de cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana (Véase Figura 5.3). Al realizar las reconstrucciones 3D-SIM el software nos permite identificar visualmente el foco correspondiente a la señal de RNAPII más cercana a alguna de las señales correspondientes a los genes de interés.
- Distancia intergénica menor (DIm) : Distancia mínima entre el par de genes *BCR* y *ABL1* (Véase Figura 5.4). Al realizar las mediciones entre los genes *BCR* y *ABL1* obtenemos 4 mediciones distintas para cada par génico, de estas mediciones la distancia DIm corresponde entonces a la distancia más corta entre el par *BCR* y *ABL1*.
- Distancia intergénica mayor (DIMA) : Distancia mayor entre el par de genes *BCR* y *ABL1* que no corresponden al par DIm (Véase Figura 5.4).

Es importante mencionar que en los datos de distancia entre los alelos de cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana presentados en las Tablas 6.3 y 6.4 fueron descartados los valores atípicos, por lo que las observaciones numéricas n varían entre muestras. Por “valor atípico” (outlier), hago referencia a una observación que no proviene de la misma distribución que el resto de la muestra. Este análisis fue realizado por el programa GraphPad Prism <https://www.graphpad.com> (versión 8) a través del método de Desviación Estudentizada Extrema (ESD), el cual puede ser consultado a través de la página web del programa.

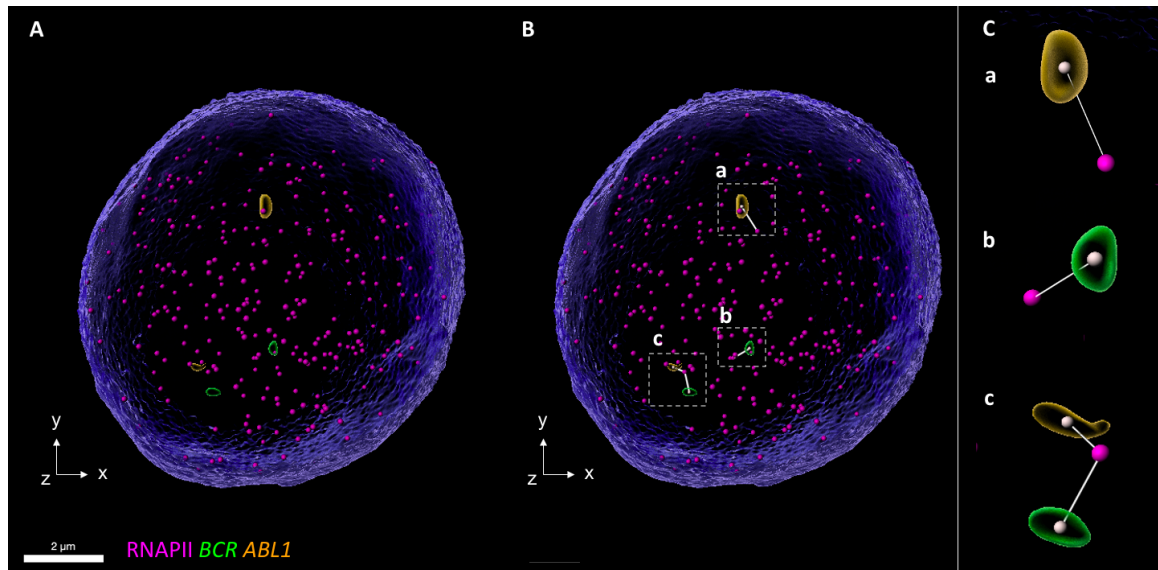


Figura 5.3: Representación de la distancia entre los genes *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana. (A) Reconstrucción tridimensional 3D-SIM de un núcleo de una célula CD34+ en interfase mostrando las señales de los genes *BCR* (verde) y *ABL1* (anaranjado). (B) Ejemplificación de la toma de distancias entre los genes *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana. (C) Imágenes aumentadas representativas de las distancias entre los diferentes loci y su fábrica más cercana tomadas de la imagen (B). En (C.a) y (C.b) se observa una representación de la distancia del gen *ABL1* a su fábrica (A) así como de *BCR* a su fábrica. Mientras que en (C.c) se ejemplifica a ambos genes compartiendo una fábrica transcripcional. Las esferas magenta representan; RNAPII. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

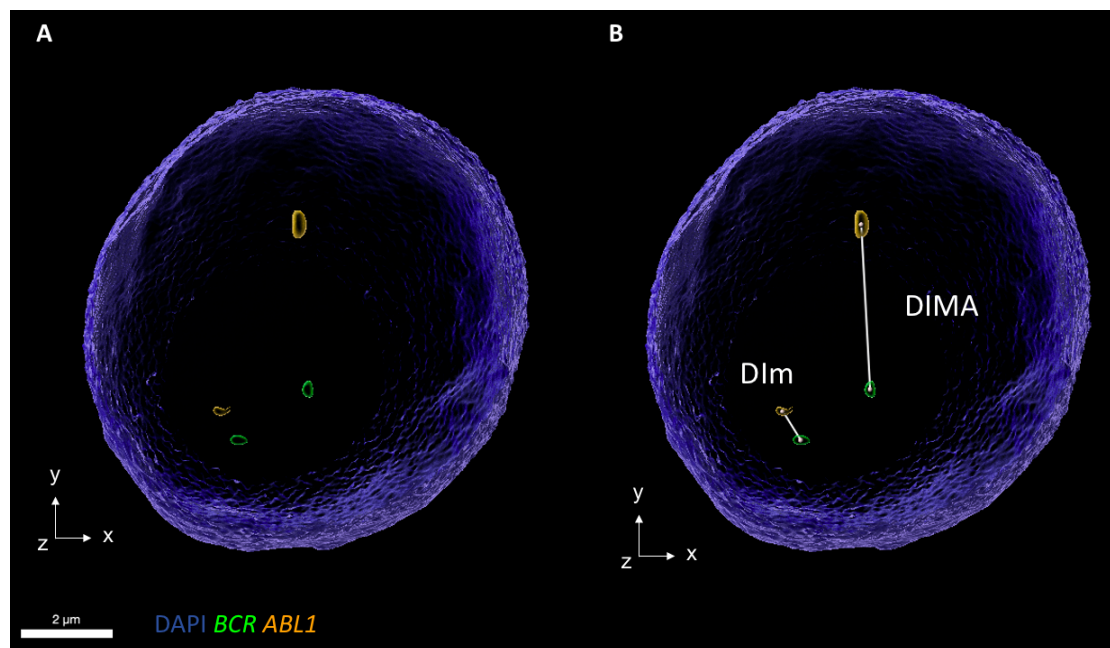


Figura 5.4: Representación de la distancia entre los genes DIm y DIMA. (A) Reconstrucción tridimensional 3D-SIM de un núcleo de una célula CD34+ en interfase mostrando las señales de los genes *BCR* (verde) y *ABL1* (anaranjado) . (B) Ejemplificación de la toma de distancia entre genes y la definición de la distancia intergenica mínima (DIm) y distancia intergenica máxima (DIMA) entre el par génico *BCR-ABL1*. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

5.4. Análisis de expresión

5.4.1. Resumen de la estrategia experimental

Para cuantificar los niveles de expresión de RNA, primero se obtuvo RNA total de las muestras siguiendo el protocolo de Extracción de RNA (Ver protocolo extendido 11.1.2) en TRIzol (Invitrogen Núm. Cat. 1559602), se cuantificó el RNA (Cuantificación de RNA) y se sintetizó cDNA a partir de 100 ng de RNA con el kit de High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de Applied Biosystems (Núm. Cat. 2022-08-31); siguiendo las instrucciones descritas en Síntesis de cDNA 5.4.1.3.

Posteriormente se realizó el ensayo de PCR en tiempo real, utilizando el reactivo Master Mix SYBR Green (Núm. Cat. QR0100) para determinar la expresión relativa de los genes *BCR* y *ABL1* (Diseño de oligonucleótidos) en células hematopoyéticas: sangre periférica (SP), sangre periférica movilizada (SPM) CD34+/CD34- ; y células epiteliales de próstata primarias (PrEC). Se calibró con la expresión de dichos genes en SP y se normalizó contra la expresión de *GAPDH*. El análisis se hizo por triplicado experimental. Se evaluó la expresión relativa calculando la doble delta Ct($\Delta\Delta Ct$).

5.4.1.1. Extracción de RNA

Las muestras CD34+ obtenidas por columna fueron previamente suspendidas en 0.5 mL TRIzol por cada pellet de muestra, mientras que las muestras de SP y PrEC fueron suspendidas en 1 mL de TRIzol debido a que había un mayor número de células.

Las muestras suspendidas en TRIzol se dejaron descongelar en hielo hasta verse homogéneas. En caso de que las muestras tuvieran tejido residual, se centrifugaron a 5 min por 500 rpm y el sobrenadante se vació en un tubo eppendorf de 2 mL etiquetado. A continuación se agregaron 0.2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C, conservando la fase acuosa y se adicionó 1 mL de isopropanol, que posteriormente se incubó por 20 min y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C conservando el pellet.

Este pellet corresponde al RNA extraído, se lavó con etanol al 70 % y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet a TA por 5 min. Finalmente el pellet se resuspendió en 10-20 μ L de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) libre de RNAsas, se dejó resuspender 15 min y se conservó el RNA extraído a -80°C. Se tomó una alícuota de 5 μ L del RNA extraído y este volumen fue usado para su cuantificación (Ver Cuantificación de RNA [5.4.1.2](#)). Para más detalles de la extracción, véase [Protocolos extendidos 11.1.2](#)

5.4.1.2. Cuantificación de RNA

La cuantificación del RNA extraído con anterioridad se llevó a cabo por medio del espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) en la función de lectura de absorbancia para RNA y utilizando como blanco agua libre de RNAsas. Se colocó en el pedestal 1 μ L de RNA. Una vez obtenidos los resultados de la cuantificación, se comprobó que los ratios de absorbancia 260/280 fueran cercanos a 2.0 (para determinar que no existe contaminación de DNA y proteínas) y 260/230 (presencia de fenoles) entre 2.0 a 2.2.

5.4.1.3. Síntesis de cDNA

Una vez obtenido el RNA total de las muestras a analizar, fue sintetizado a cDNA usando el RNA como templado a través del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de Applied Biosystems (Núm. Cat. 2022-08-31); utilizando 100 ng de RNA. Para cada reacción de 20 μ L se mezclaron los reactivos descritos en la [Tabla 5.1](#) bajo las condiciones descritas en la [Tabla 5.2](#).

Añadir por cada reacción:	
Reactivos	Volumen
Buffer 10X	2 μ L
dNTPs	0.8 μ L
Enzima de transcripción reversa	1 μ L
Inhibidor de RNAsas	1 μ L
Oligos de secuencia aleatoria	1 μ L
H ₂ O	X μ L
RNA	Y μ L
Volumen final	20 μ L

Tabla 5.1: Reactivos y volúmenes para una reacción de síntesis de cDNA

Ciclos	Duración (min)	Temperatura
1	10:00	25°C
2	60:00	37°C
1	00:50	80°C
	∞	4°C

Tabla 5.2: Programación del termociclador para la reacción de síntesis de cDNA

5.4.1.4. Diseño de oligonucleótidos

Se usaron oligos para el reconocimiento y amplificación de la región codificante de los genes *BCR* y *ABL1*. Para el diseño de cada oligo se siguieron las condiciones estándar del diseño de oligonucleótidos reportadas para optimizar el diseño de oligos como el mantener una temperatura de alineación y fusión (T_m) entre 55-65°C y óptima de 60°C, una concentración de citosinas y guaninas G+C del 45-55 %, ausencia de estructuras secundarias y baja capacidad de complementaridad en el extremo 3' y formación de homodímeros entre el mismo oligo.

Para encontrar las secuencias y localización de los genes de interés en el genoma humano se consultó el Genome Browser <https://genome.ucsc.edu/>. Mientras que para el análisis de los oligos se usaron los programas de OligoCal <http://biotools.nubic.northwestern.edu/> y Primer3 <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> a través de Primer-BLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Una vez corroborado los oligos in silico, los oligos utilizados fueron solicitados a la compañía IDT. La información de los oligos está resumida en la Tabla 5.3

Nombre del gen	Sentido del oligo	Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Longitud del amplicón generado (pb)
<i>BCR</i>	<i>fw</i>	GTCATGTCCCAGGTCCAG	18	105
	<i>rv</i>	CCTTTAGACTTCGGTGGAGA	20	
<i>ABL1</i>	<i>fw</i>	AAAAGGAGCTGGGGAAAC	18	171
	<i>rv</i>	TCATGGTCCAGAGGATCG	18	
<i>GAPDH</i>	<i>fw</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	20	87
	<i>rv</i>	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	21	

Tabla 5.3: Información de los oligonucleótidos diseñados para los experimentos de expresión

Posteriormente los oligos fueron estandarizados y las muestras amplificadas por PCR punto final 5.4.1.5.

5.4.1.5. PCR punto final

Para validar el producto de amplificación de los oligos diseñados, se llevó a cabo un ensayo de PCR punto final. Para cada reacción de 10 μL se mezclaron los reactivos descritos en la Tabla 5.4 bajo las condiciones descritas en la Tabla 5.7. Los oligos fueron diseñados para amplificar fragmentos de los genes *ABL1* y *BCR*. En el caso del control negativo, se sustituyó el volumen del templado por agua libre de RNAsas.

Reactivos	Volumen	Concentración
Agua libre de RNAsas	6.25 μL	
Buffer 10X	1 μL	1X
Cloruro de magnesio (MgCl_2) 50 mM	0.4 μL	2 mM
dNTPs 10 mM	0.25 μL	10 mM
Oligo FW 10 mM	0.5 μL	10 μM
Oligo RW 10 mM	0.5 μL	10 μM
DNA	1 μL	
Taq DNA polimerasa	0.1	1 U
Volumen final	10 μL	

Tabla 5.4: Reactivos y volúmenes para una reacción de PCR punto final

Ciclos	Duración (min)	Temperatura	Proceso
1	5:00	95°C	Desnaturalización
35	00:30	94°C	Fusión
	00:30	60°C	Alineamiento
	00:30	72°C	Elongación
1	00:10	72°C	Elongación final

Tabla 5.5: Programación del termociclador para PCR punto final

Los resultados se observaron en geles de agarosa al 2%, junto con un marcador de 100pb. Las bandas de DNA debían ser visibles y observarse íntegras a través del transiluminador (UVP-BioImaging controller, Hamamatsu camera), y visualizados con el programa *Labworks 4.5*.

5.4.1.6. PCR en tiempo real

Una vez sintetizado el cDNA, se continuó con el ensayo de PCR en tiempo real para los análisis de expresión génica y la evaluación de la eficiencia de la amplificación de oligonucleótidos. Para ello se añadió por cada reacción de PCR, los siguientes reactivos de la Tabla 5.6:

Reactivos	Volumen
Master Mix SYBR Green	5 μ L
H ₂ O	3.8 μ L
cDNA	1 μ L
Oligo FW	0.1 μ L
Oligo RW	0.1 μ L
Volumen final	10 μ L

Tabla 5.6: Reactivos y volúmenes para una reacción de PCR tiempo real

Posteriormente se agregaron los 10 μ L de cada reacción en tiras de 8 tubos y se colocaron en el termociclador programado con las condiciones descritas en la Tabla 5.7. Además, se incluyó una curva de disociación para comprobar que los oligos sólo detentaban un locus en la secuencia amplificada.

Ciclos	Duración (min)	Temperatura
1	10:00	95°C
40	00:15	95°C
	01:00	60°C
1 (Curva de disociación)	00:15	95°C
	01:00	60°C
	00:15	95°C

Tabla 5.7: Programación del termociclador para PCR en tiempo real

5.4.1.7. Evaluación de la eficiencia de la amplificación de oligonucleótidos

La eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos se llevó a cabo realizando una PCR en tiempo real. Para ello se realizó una curva estándar con diluciones sucesivas de 0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 % de cDNA proveniente de una concentración original de 100 ng de RNA, diluyendo con agua libre de RNAsas. Para cada dilución se preparó un triplicado experimental. Posteriormente se grafica el log del porcentaje de cDNA contra el Ct obtenido por PCR en tiempo real. Se utiliza la pendiente del gráfico para obtener la ecuación de eficiencia de amplificación (EA), la cual debe ser cercana a 2.

$$EA = 10^{(-1/m)} \quad (5.1)$$

Donde:

EA: Eficiencia de amplificación m: pendiente la recta calculada en la curva estándar de las diferentes concentraciones de cDNA

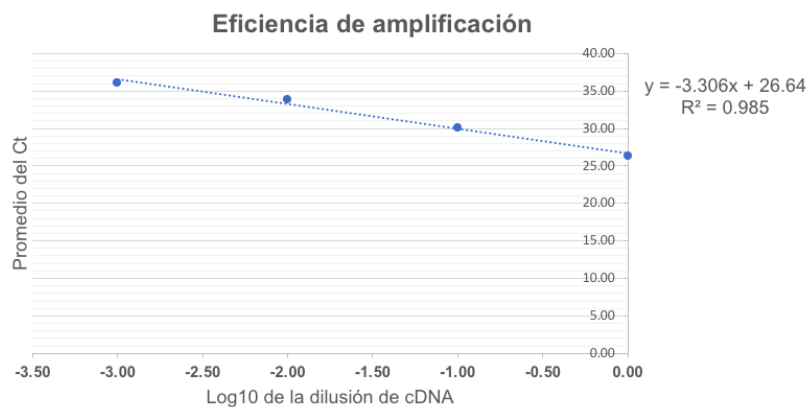


Figura 5.5: Gráfica representativa de la eficiencia de amplificación. Ejemplo de la eficiencia de amplificación de *ABL1* usando las concentraciones de cDNA al 1 %, 0.1 %, 0.01 % y 0.001 %.

5.4.1.8. Análisis de expresión relativa por doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$)

El doble delta CT ($\Delta\Delta Ct$) indica la expresión génica relativa entre diferentes muestras, ya que utiliza directamente los valores del ciclo umbral (Ct) calculados por el sistema de qPCR. Para ello es necesario calcular primero el ΔCt como sigue:

$$\Delta Ct = (Ct_{del\ Gen\ de\ interés} - Promedio\ Ct_{del\ gen\ calibrador})$$

Donde ocupamos el Ct de *GAPDH* como gen calibrador. Mientras que la fórmula para obtener el $\Delta\Delta Ct$ es la siguiente:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct - Promedio\ \Delta Ct_{de\ la\ condición})$$

Donde ocupamos el ΔCt de sangre periférica sana como condición.

El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ asume una eficiencia de amplificación de PCR uniforme del 100% en todas las muestras. El valor 2 representa una eficiencia de amplificación de PCR de 100%. Esta suposición hace que el método sea fácil de realizar, y puede ser válido en condiciones óptimas. Este valor se reporta en veces de cambio (fold change) en la expresión génica. En este caso, los valores fueron también normalizados a través de una división de cada valor fold change entre el promedio fold change de sangre periférica.

5.5. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó con el software libre R <https://www.r-project.org/> y GraphPad Prism <https://www.graphpad.com/> (versión 8). Se realizaron pruebas de Mann-Whitney-Wilcoxon para muestras no paramétricas con el objetivo de conocer las diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión génica de los genes *BCR* y *ABL1* en la estirpe hematopoyética y la línea celular PrEC.

Se realizaron las mismas pruebas estadísticas para la significancia estadística de las distancias de cada alelo a su fábrica transcripcional más cercana y las distancias intergénicas entre *BCR* y *ABL1* para cada muestra y estirpe celular.

6.1. Validación del modelo

Estudios de la organización genómica en el núcleo interfásico han propuesto que las fábricas transcripcionales pueden contribuir a la formación de translocaciones cromosómicas al reclutar genes transcripcionalmente activos que se encuentran espacialmente cercanos entre sí [98–104]. Por lo tanto, con la finalidad de validar nuestro modelo, comprobamos si había una expresión activa de los genes *BCR* y *ABL1* en la estirpe de células troncales hematopoyéticas (SPM CD34+) y evaluamos que la proximidad de los genes *BCR* y *ABL1* en esta estirpe sea menor a $2 \mu\text{m}$ tal cómo se ha reportado en la literatura.

6.1.1. Expresión activa de los genes *BCR* y *ABL1*

A través de la metodología de PCR en tiempo real, evaluamos la expresión activa de los genes *BCR* y *ABL1* en las muestras individuales de la estirpe SPM CD34+ y en la población de nuestro modelo comparativo, la línea celular PrEC. Lo primero que observamos, tal como esperábamos, es que en las muestras SPM CD34+ existe una transcripción activa de los genes involucrados en la t(9;22) (Figura 6.1). Asimismo, hay transcripción activa en PrEC, pero la expresión de ambos genes es considerablemente baja en comparación con las muestras SPM CD34+. Además, notamos que existe un grado de heterogeneidad entre individuos en la expresión de ambos genes, especialmente en el gen *ABL1*.

Posteriormente, analizamos la expresión de los genes *BCR* y *ABL1* agrupada por estirpe para observar patrones de expresión en la estirpe SPM CD34+ que podrían pasar desapercibidos a nivel individual. Lo que obtuvimos fue que tanto en la estirpe SPM CD34+ como en PrEC no hay diferencia de expresión entre los genes *BCR* y *ABL1* con significancia estadística ($p < 0.05$) entre ellos. Sin embargo, la Figura 6.2 muestra que *ABL1* tiende a expresarse en mayor medida

y con datos más variables, lo que se observa en las barras de error de mayor longitud en los datos de expresión de *ABL* que en las barras de error para los datos del gen *BCR* en ambas estirpes.

A continuación, nos pareció interesante evaluar la expresión de estos mismos genes en una población hematopoyética con un mayor grado de diferenciación. Se comparó entonces la expresión de los genes en una población CD34- y en la población CD34+. Lo que se observó a partir de las muestras individuales fue que la expresión de *BCR* tiende a ser homogénea entre las muestras de ambas estirpes SPM CD34+ y SPM CD34- (Veásen las Figuras 6.1 y 6.3). La expresión de *BCR* es estadísticamente similar entre las muestras CD34+, mientras que en la estirpe CD34- sólo las muestras MOS60 y MOS63 mostraron una diferencia estadística ($p < 0.05$) entre ellas. Por el contrario, la expresión de *ABL1* resultó heterogénea entre las muestras de ambas estirpes. La expresión de *ABL1* en las muestras en general mostraron tanto una mayor variabilidad, como una expresión diferencial entre las muestras, registrando una significancia estadística $p < 0.05$.

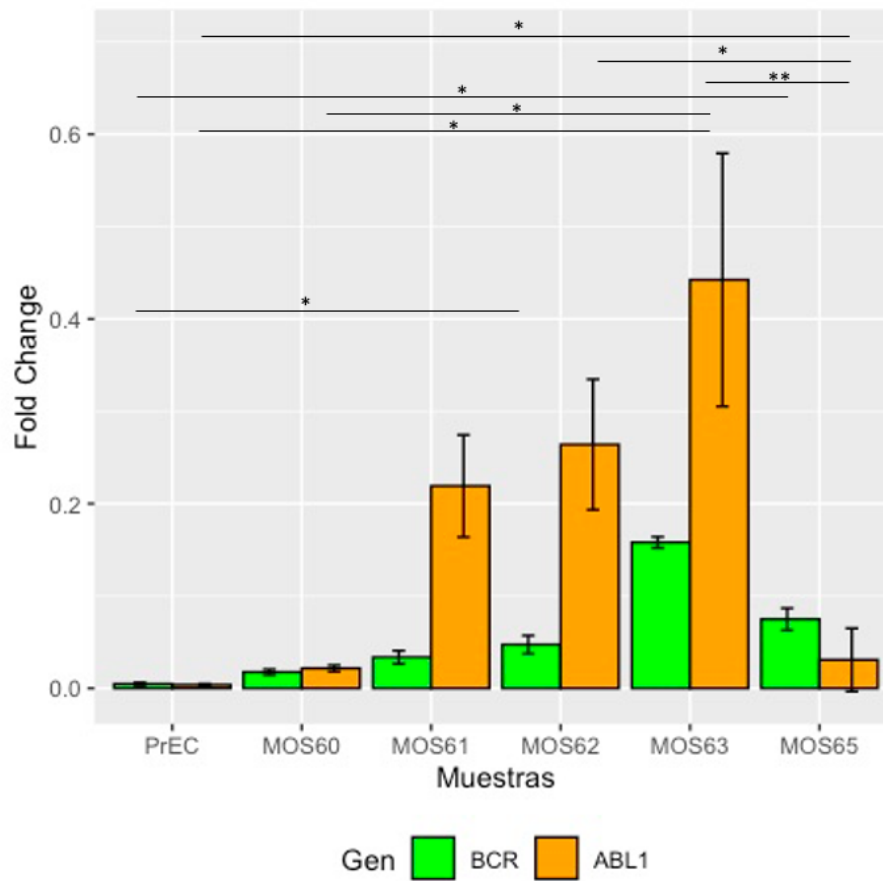


Figura 6.1: Expresión génica de *BCR* y *ABL1* entre muestras de las estirpe hematopoyética CD34+ contra el control PrEC. En el eje "y", el promedio de las veces de cambio de expresión (Fold Change) normalizadas con sangre periférica y en "x", las muestras MOS son muestras de las estirpe hematopoyética CD34+ (n=5). PrEC= células epiteliales de próstata primaria. En verde el gen *BCR* y en anaranjado *ABL1*. Test no paramétrico Krustal-Wallis $p < 0.0001$, test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

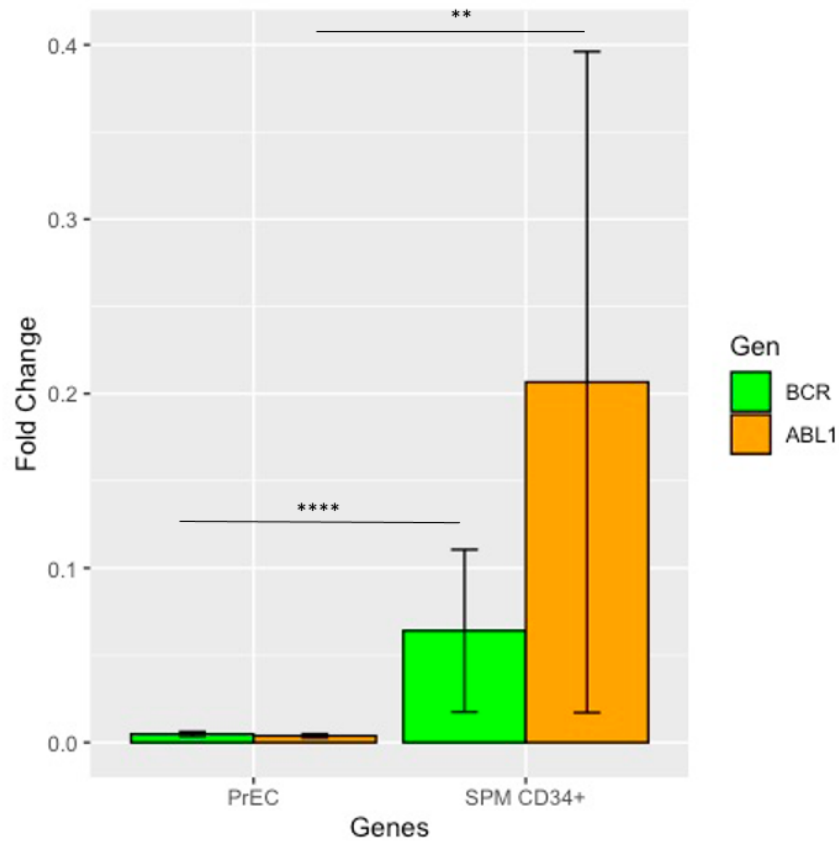


Figura 6.2: Expresión génica de *BCR* y *ABL1* entre la estirpe celular hematopoyética CD34+ y la estirpe epitelial de próstata PrEC. En el eje "y", el promedio de las veces de cambio de expresión (Fold Change) normalizadas con sangre periférica y en "x", las estirpes celulares SPM CD34+ (n=5) y la estirpe PrEC. SPM= Sangre periférica movilizada; PrEC= células epiteliales de próstata primaria. En verde el gen *BCR* y en anaranjado *ABL1*. Test no paramétrico Kruskal-Wallis $p < 0.0001$, test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

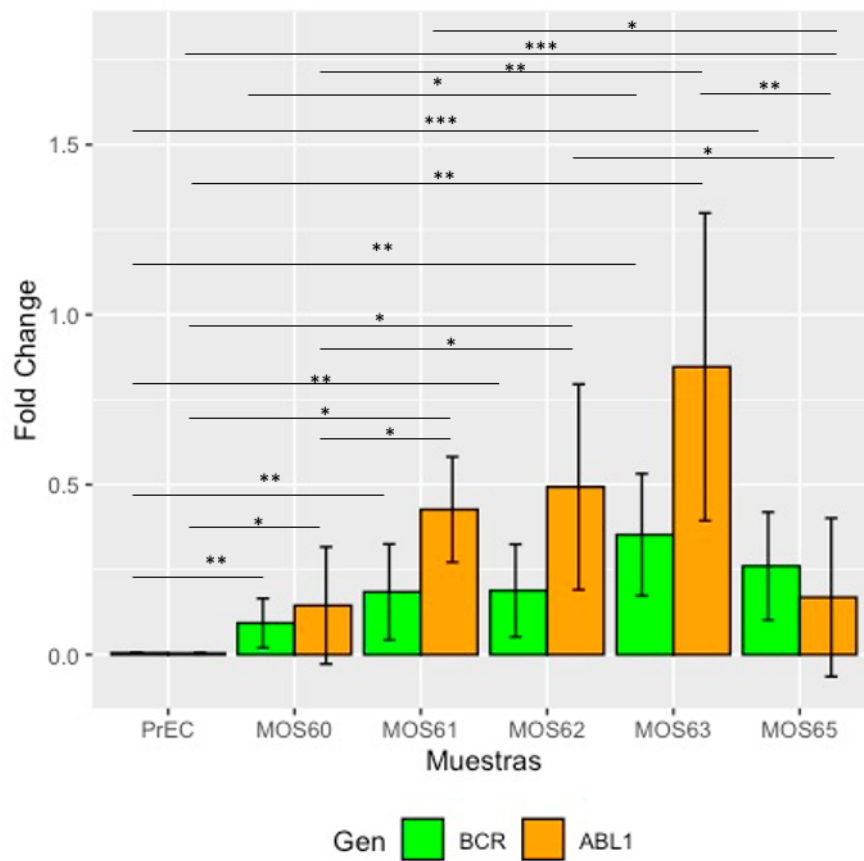


Figura 6.3: Expresión génica de *BCR* y *ABL1* entre muestras de las estirpe hematopoyética CD34- contra el control PrEC. En el eje "y", el promedio de las veces de cambio de expresión (Fold Change) normalizadas con sangre periférica y en "x", las muestras MOS son muestras de las estirpe hematopoyética CD34-(n=5). PrEC= células epiteliales de próstata primaria. En verde el gen *BCR* y en anaranjado *ABL1*. Test no paramétrico Kruskal-Wallis $p < 0.0001$, test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

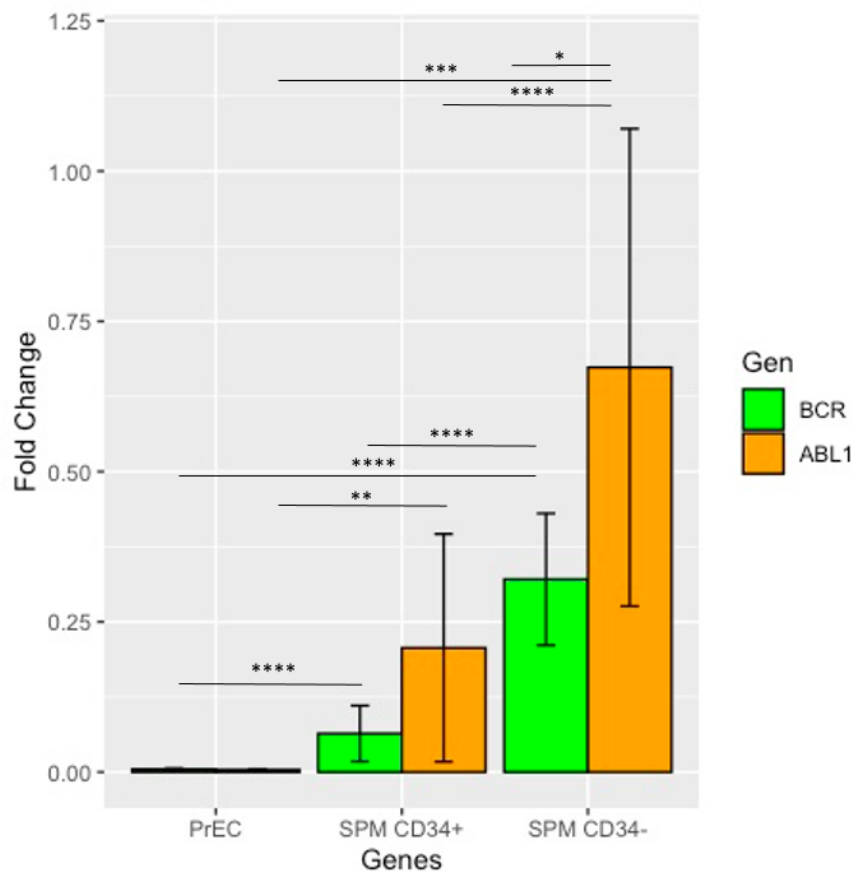


Figura 6.4: Expresión génica de *BCR* y *ABL1* entre estirpes celulares hematopoyéticas CD34+, CD34- y PrEC. En el eje "y", el promedio de las veces de cambio de expresión (Fold Change) normalizadas con sangre periférica y en "x", las estirpes celulares de las estirpes hematopoyéticas SPM CD34+ (n=5), SPM CD34- (n=5) y la estirpe control. SPM= Sangre periférica movilizada; PrEC= células epiteliales de próstata primaria. En verde el gen *BCR* y en anaranjado *ABL1*. Test no paramétrico Krustal-Wallis $p < 0.0001$, test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

6.1.2. Proximidad génica entre el par alélico *BCR* y *ABL1*

Continuando con la validación de nuestro modelo, evaluamos la proximidad génica entre el par alélico *BCR* y *ABL1*. Conforme a lo reportado en la literatura, la proximidad entre el par alélico *BCR* y *ABL1* en células hematopoyéticas sanas es menor a $2 \mu\text{m}$ de acuerdo a la distancia intergénica mínima promedio entre sus células. Este valor de proximidad génica ha sido justificado de acuerdo a modelos matemáticos y observaciones *in vivo* que pueden ser revisados en la literatura [97,109]. Por lo tanto, para determinar la proximidad de los genes usando este criterio, obtuvimos las distancias intergénicas de las muestras de células troncales en SPM CD34+ y de las células PrEC. A partir de los valores obtenidos clasificamos las distancias como: distancia

intergénica menor (DIm) o distancia intergénica mayor (DIMA) como se puede consultar en las Tablas 6.1 y 6.2.

Distancia intergénica menor (DIm)			
Muestra	Promedio (μm)	Desv. Est.	n
PrEC	2.10	1.28	25
MOS60	1.90	1.02	25
MOS61	2.02	0.99	25
MOS63	1.98	1.10	25
Distancia intergénica mayor (DIMA)			
Muestra	Promedio (μm)	Desv. Est.	n
PrEC	4.27	1.85	25
MOS60	4.00	1.41	25
MOS61	4.06	1.78	25
MOS63	3.56	1.61	25

Tabla 6.1: Promedio de las distancias DIm y DIMA por muestra.

Distancia intergénica menor (DIm)			
Estirpe	Promedio (μm)	Desv. Est.	n
PrEC	2.10	1.28	25
SPM CD34+	1.96	1.02	75
Distancia intergénica mayor (DIMA)			
Estirpe	Promedio (μm)	Desv. Est.	n
PrEC	4.2	1.84	25
SPM CD34+	3.87	1.60	75

Tabla 6.2: Promedio de las distancias DIm y DIMA por estirpe.

Lo primero que observamos es que nuestro modelo confirma que la proximidad entre los genes *BCR* y *ABL1* en SPM CD34+ es menor a $2 \mu\text{m}$, con una distancia DIm promedio en nuestros resultados de $1.98 \mu\text{m}$ (Figura 6.5). Mientras que en la línea celular PrEC, el promedio de la distancia DIm fue de $2.1 \mu\text{m}$ con una distribución semejante a la SPM CD34+ sin diferencia estadística entre ambas estirpes.

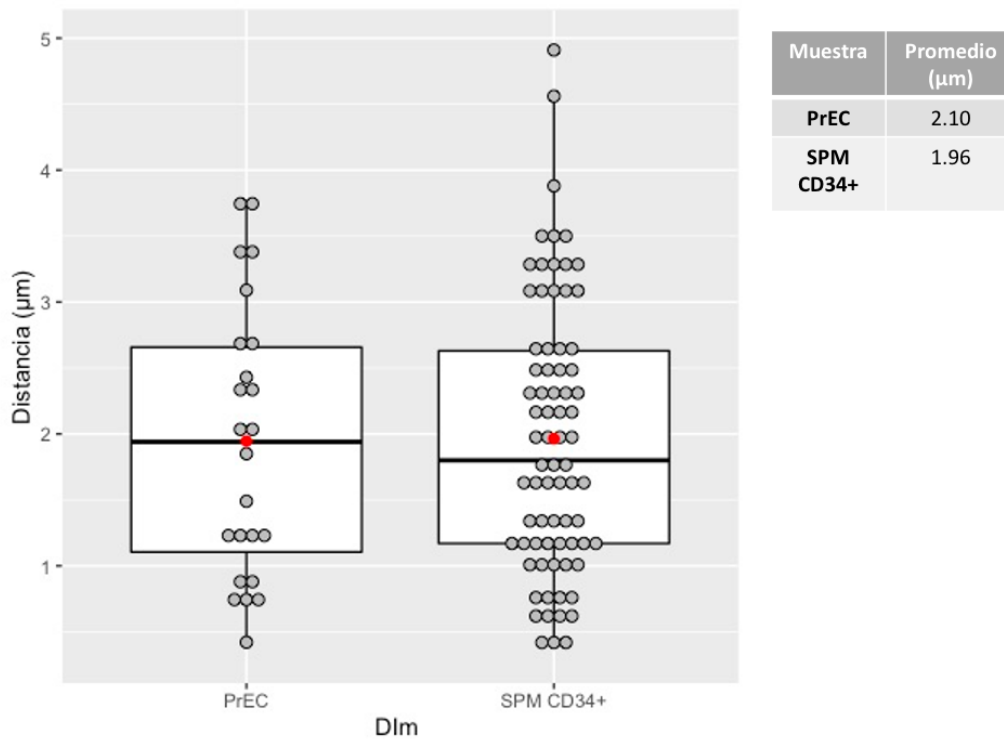


Figura 6.5: La distancia intergénica menor no varía entre estirpes. Diagrama de caja y bigotes con las mediciones de distancias intergénicas menores entre los genes *BCR* y *ABL1* en la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC. Distancia intergénica menor (DIm): puntos en gris. En el eje "y", la distancia en micrómetros (μm); en "x", las estirpes SPM CD34+ y PrEC. La línea gruesa dentro de las cajas representa la mediana y el punto rojo representa el valor promedio. A la derecha, tabla con los promedios de las distancias intergénicas menores de la estirpe hematopoyética CD34+ ($n=75$) y la estirpe PrEC ($n=25$). SPM= Sangre periférica movilizada y PrEC= células epiteliales de próstata primaria. Sin diferencias estadísticas de acuerdo al Test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos.

En consecuencia a los resultados obtenidos de las distancias DIm en las estirpes evaluadas, observamos la distribución de distancias DIMA en comparación con las distancias DIm de las muestras SPM CD34+ y PrEC para obtener una visión general de la distribución de las distancias intergénicas. Lo que notamos fue que tanto en la estirpe SPM CD34+ como en la línea celular PrEC existe un par alélico heterólogo que está más próximo entre sí (DIm) y un par alélico más lejano (DIMA) donde el valor DIMA promedio para SPM CD34+ es de 3.37 y para la línea celular PrEC es de 4.27 (Figura 6.6). Definimos como alelos heterólogos a aquellos que provienen de genes distintos, en este caso el par alélico heterólogo sería el par *BCR- ABL1*. Asimismo, observamos esta misma distribución en las muestras individuales de SPM CD34+ para ver si existía homogeneidad entre ellas. Y en efecto, no encontramos diferencias entre las muestras al considerar el valor de $p < 0.05$ (Figura 6.7). Sin embargo, resulta interesante que

tanto la muestra MOS61 y PrEC tiene el mismo valor promedio en la distancia DIm siendo así de distintas estirpes.

En conjunto, los datos anteriores nos llevaron a pensar que la cercanía entre los alelos podría no ser el único factor determinante para que se lleve a cabo la $t(9;22)$ ya que, como lo demostramos, la distancia DIm promedio en PrEC también fue cercana a $2 \mu\text{m}$ y sabemos que en esta línea celular no se presenta esta translocación.

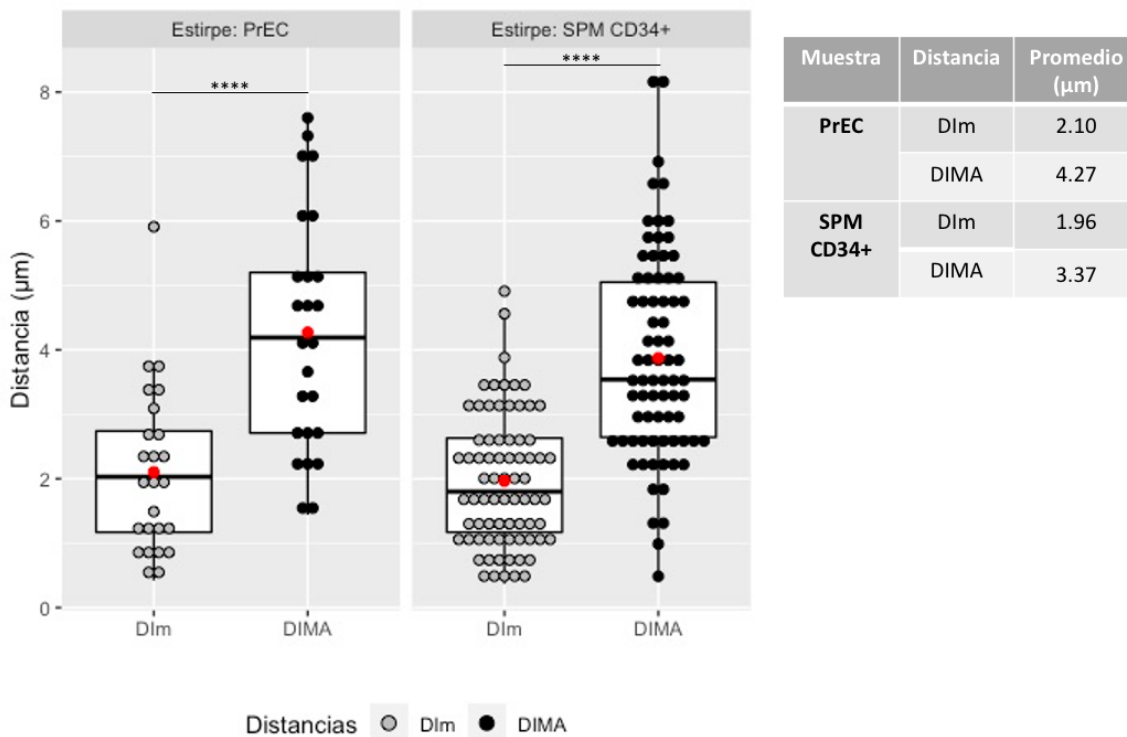


Figura 6.6: Diagrama de caja y bigotes con las mediciones de distancias intergénicas menores y mayores entre los genes *BCR* y *ABL1* en la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC. A la izquierda. En el eje "y", la distancia en micrómetros (μm); en "x", las distancias DIm (puntos en gris) y DIMA (puntos en negro). La línea gruesa dentro de las cajas representa la mediana y el punto rojo representa el valor promedio. A la derecha, tabla con los promedios de las distancias de la estirpe hematopoyética CD34+ ($n=75$) y la estirpe PrEC ($n=25$). Distancia intergénica menor=DIm; Distancia intergénica mayor=DIMA; SPM= Sangre periférica movilizada y PrEC= células epiteliales de próstata primaria. Test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos * $p < 0.05$, ** $p < 0.1$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

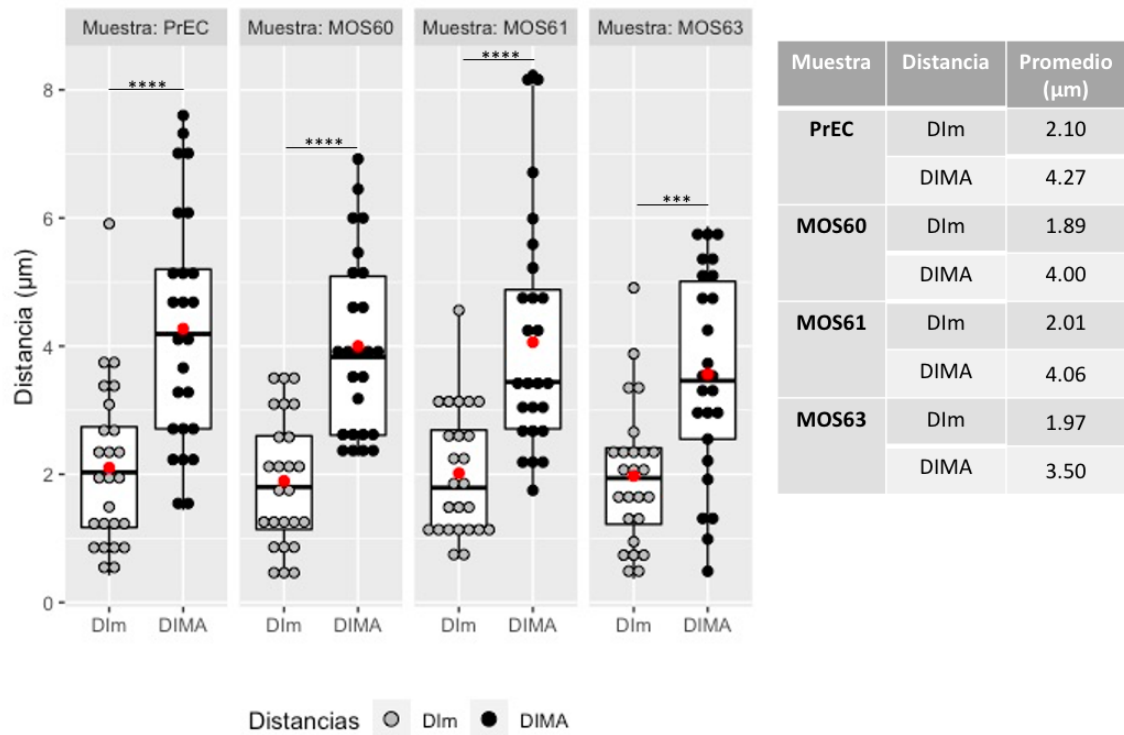


Figura 6.7: Diagrama de caja y bigotes con las mediciones de distancias intergénicas menores y mayores entre los genes *BCR* y *ABL1* entre muestras de la estirpe hematopoyética CD34+ y PrEC. A la izquierda. En el eje "y", la distancia en micrómetros (μm); en "x", las distancias DIm (puntos en gris, $n=25$) y DIMA (puntos en negro, $n=25$) por cada muestra. La línea gruesa dentro de las cajas representa la mediana y el punto rojo representa el valor promedio. A la derecha. Tabla con los promedios de las distancias de las muestras. Distancia intergénica menor=DIm; Distancia intergénica mayor=DIMA; SPM= Sangre periférica movilizada y PrEC= células epiteliales de próstata primaria. Test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos * $p < 0.05$, ** $p < 0.1$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

6.2. Presencia y cercanía de las fábricas transcripcionales

Con la finalidad de encontrar un factor adicional a la distancia entre los *loci* que pudiera favorecer un evento de recombinación entre los genes con distancias próximas, decidimos evaluar la existencia de fábricas transcripcionales compartidas entre los alelos de los *loci* analizados. La razón de esto, es que las fábricas transcripcionales son focos discretos de RNA polimerasa en el núcleo interfásico, donde convergen genes y enzimas de reparación, los cuales bajo ciertas condiciones de estrés celular que dañan al DNA y se generen DSBs, podría llevarse un evento de recombinación, como se mencionó en la introducción 1.3.

6.2.1. Cuantificación de distancias entre cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana

Para comprobar la existencia de fábricas transcripcionales compartidas en las células hematopoyéticas, lo primero que realizamos fue medir las distancias entre los alelos de cada gen, *ABL1* y *BCR*, tanto en la estirpe CD34+ como en PrEC. Estos valores se puede consultar en las Tablas 6.3 y 6.4 en donde los valores atípicos fueron descartados a través del método de ESD descrito en la metodología 5.3.2.

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana				
Muestra	Gen	Promedio (μm)	Desv. Est.	n
PrEC	<i>BCR</i>	0.54	0.20	50
	<i>ABL1</i>	0.49	0.21	49
MOS60	<i>BCR</i>	0.65	0.30	49
	<i>ABL1</i>	0.70	0.33	50
MOS61	<i>BCR</i>	0.92	0.40	47
	<i>ABL1</i>	0.95	0.47	48
MOS63	<i>BCR</i>	0.71	0.35	50
	<i>ABL1</i>	0.82	0.37	50

Tabla 6.3: Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana calculadas por muestra

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana				
Estirpe	Gen	Promedio (μm)	Desv. Est.	n
PrEC	<i>BCR</i>	0.54	0.20	50
	<i>ABL1</i>	0.49	0.21	49
SPM CD34+	<i>BCR</i>	0.76	0.37	146
	<i>ABL1</i>	0.83	0.41	148

Tabla 6.4: Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana calculadas por estirpe

Lo que descubrimos al graficar los datos, es que tanto la estirpe de interés SPM CD34+ como el control PrEC mantienen la misma distancia entre cada uno de los genes y la fábrica transcripcional más cercana (Figura 6.8). En la estirpe SPM CD34+ las células evaluadas en

BCR presentan una distancia promedio a su fábrica transcripcional más cercana de $0.75 \mu\text{m}$ y en *ABL1* de $0.82 \mu\text{m}$. Mientras que en la estirpe control PrEC, las células evaluadas en *BCR* presentan una distancia promedio de $0.53 \mu\text{m}$ y en *ABL1* de $0.49 \mu\text{m}$ (Figura 6.8). Este resultado es replicable en las mediciones de las muestras individuales como puede observarse en la (Figura 6.9) en donde la muestras no difieren más de $0.12 \mu\text{m}$ de distancia entre sus genes. De la misma manera, los promedios de distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana son menores a $1 \mu\text{m}$ en cada muestra de cada estirpe.

Por otro lado, los alelos de los genes de la estirpe SPM CD34+ están más alejados de su fábrica transcripcional. Con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), el gen *BCR* de la estirpe SPM CD34+ está en promedio $0.22 \mu\text{m}$ más alejado de su fábrica transcripcional inmediata en comparación con la estirpe celular PrEC. De la misma manera, el gen *ABL1* de la estirpe SPM CD34+ está en promedio $0.33 \mu\text{m}$ más alejado de su fábrica transcripcional inmediata en comparación con PrEC (Figura 6.8).

Sin embargo, a pesar de que los alelos de los genes SPM CD34+ están más alejados de su fábrica transcripcional, el 8% de los núcleos analizados de la estirpe CD34+ muestran a un par alélico *BCR* y *ABL1* compartiendo una fábrica transcripcional. A través de las reconstrucciones 3D-SIM de los núcleos celulares, se llevó a cabo un conteo de los casos donde los genes de interés comparten una fábrica transcripcional en común. Estos casos sólo se presentaron en la estirpe hematopoyética CD34+ y no así en el control PrEC. En la Figura 6.10 se observan ejemplos de las reconstrucciones tridimensionales de este caso en cada una de las muestras SPM CD34+ analizadas.

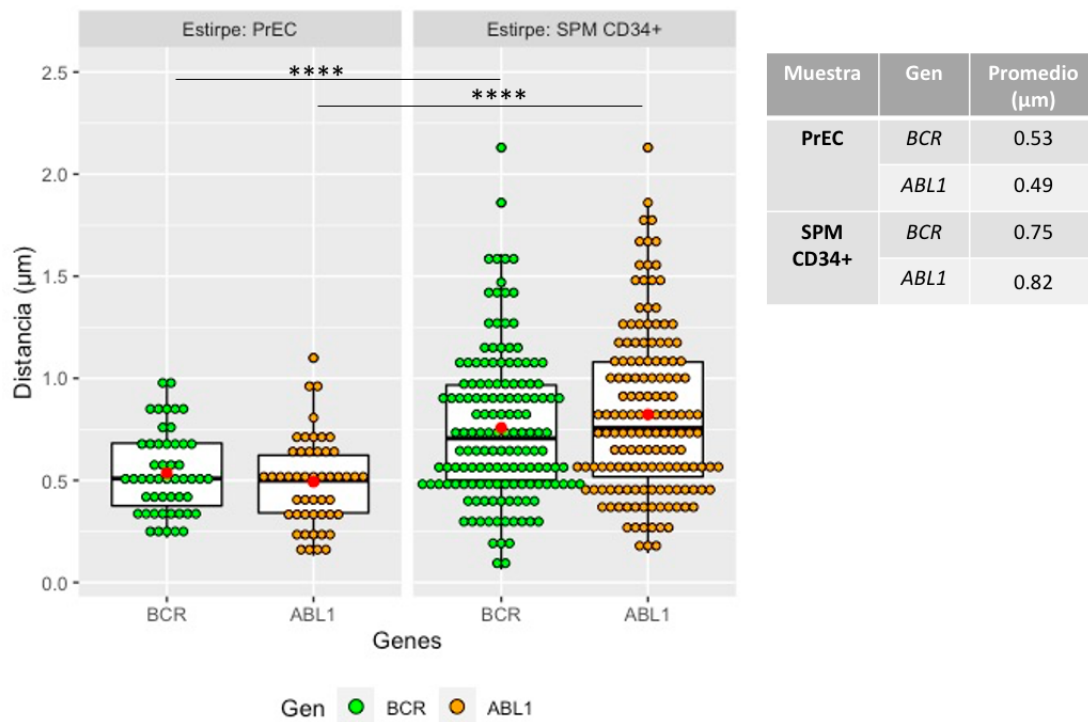


Figura 6.8: Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana entre la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC. En el eje "y", la distancia en micrómetros (μm); en "x", los genes por estirpe. La línea gruesa dentro de las cajas representa la mediana y el punto rojo representa el valor promedio. A la derecha, tabla con los promedios de las distancias intergénicas menores de la estirpe hematopoyética CD34+ (*BCR*, $n=146$; *ABL1*, $n=148$) y la estirpe PrEC (*BCR*, $n=50$; *ABL1*, $n=49$). SPM= Sangre periférica movilizada y PrEC= células epiteliales de próstata primaria. En verde, se representan los valores del gen *BCR* y en anaranjado de *ABL1*. Test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

6. RESULTADOS

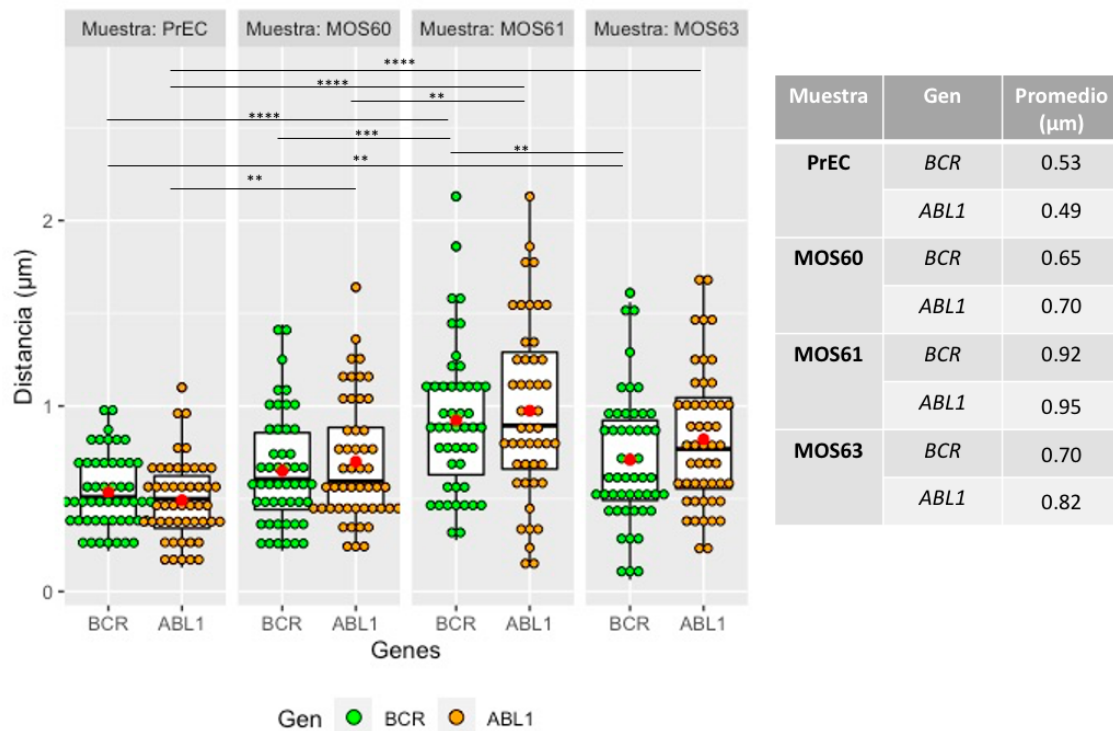


Figura 6.9: Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana entre muestras de la estirpe hematopoyética CD34+ y PrEC. En el eje "y", la distancia en micrómetros (μm); en "x", las muestras MOS ($n=3$) de la estirpe hematopoyética CD34+ y PrEC (células epiteliales de próstata primaria). La línea gruesa dentro de las cajas representa la mediana y el punto rojo representa el valor promedio. En verde, se representan los valores del gen *BCR* y en anaranjado de *ABL1* por muestra: MOS60 (*BCR*, $n=49$; *ABL1*, $n=50$), MOS61 (*BCR*, $n=47$; *ABL1*, $n=48$), MOS63 (*BCR*, $n=50$; *ABL1*, $n=50$) y PrEC (*BCR*, $n=50$; *ABL1*, $n=49$). Test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

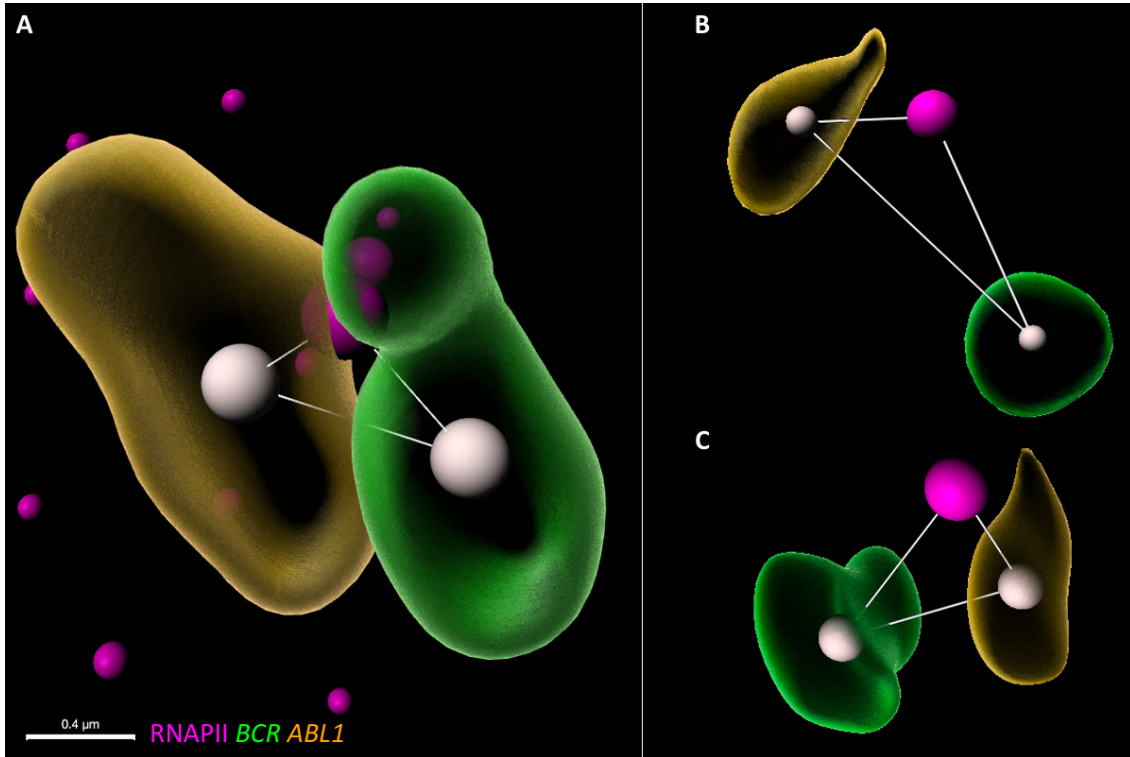


Figura 6.10: Los genes *BCR* y *ABL1* comparten una fábrica transcripcional en común en la estirpe hematopoyética CD34+. Representación de los genes *BCR* y *ABL1* compartiendo fábricas transcripcionales encontradas en la estirpe CD34+ provenientes de las muestras MOS60 (A), MOS61 (B) y MOS63 (C). Reconstrucción de las señales de los genes *BCR* (verde) y *ABL1* (anaranjado) y la RNA polimerasa II (RNAPII) en esferas magenta.

6.2.2. Comparación de distancias entre los alelos de los genes *BCR* / *ABL1* y su fábrica transcripcional más cercana, respecto a las distancias DIm y DIMA

Con la intención de encontrar si las distancias de cada alelo a su fábrica transcripcional cercana son menores cuando el alelo es espacialmente cercano o próximo a su alelo heterólogo en las estirpes SPM CD34+ y PrEC, se procedió a analizar la distribución de estas distancias agrupándolas de acuerdo a la distancia intergénica DIm o DIMA del alelo a partir del cual se calculó la distancia de la fábrica transcripcional más cercana. Por consiguiente, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

La cercanía de una fábrica transcripcional hacia uno de los alelos del par *BCR* y *ABL1* con menor distancia intergénica entre ellos (DIm) no es menor que la de un gen con distancia intergénica mayor (DIMA). Es decir, la distancia de una fábrica transcripcional hacia uno de los alelos no es distinta por la cercanía o lejanía de este alelo hacia su pareja alélica heteróloga (*BCR*-

6. RESULTADOS

ABL1) en las muestras y en cada estirpe evaluada ($p > 0.05$) (Figura 6.11: Tabla suplementaria 11.6 y Figura 6.12: Tabla suplementaria 11.8). La única excepción se presentó en los alelos del gen *ABL1* de la muestra MOS63 (Figura 6.11).

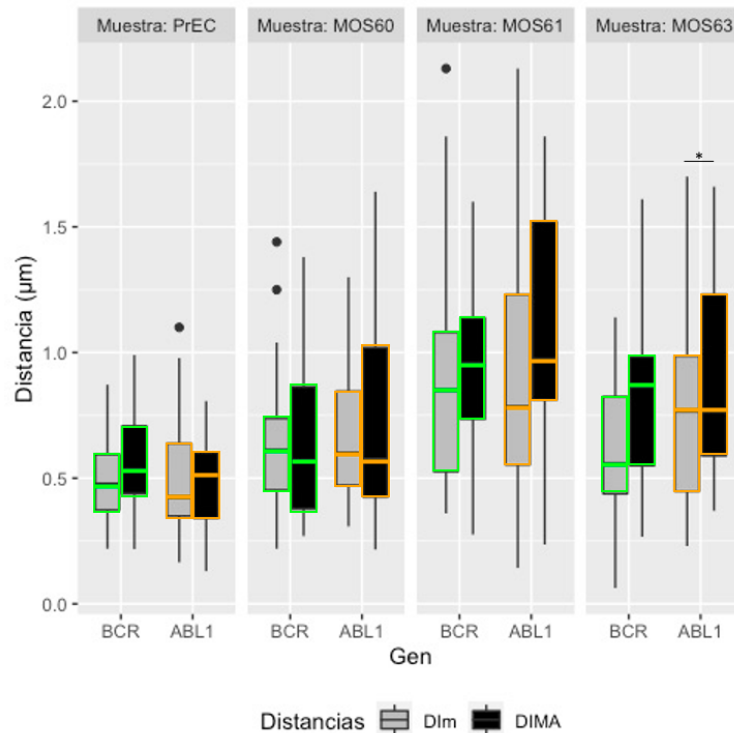


Figura 6.11: Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana entre la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC agrupados de acuerdo a si dichas distancias corresponden a genes DIm (fondo de caja gris) y DIMA (fondo de caja negro). En el eje "y", la distancia en micrometros (μm); en "x", las muestras MOS de la estirpe hematopoyética CD34+ y PrEC (células epiteliales de próstata primaria). La línea gruesa dentro de las cajas representa la mediana. En verde, el contorno de la caja representa los valores del gen *BCR* y en anaranjado *ABL1* por muestra: MOS60 (*BCR* DIm, $n=24$; DIMA, $n=25$ / *ABL1* DIm, $n=25$; DIMA, $n=25$), MOS61 (*BCR* DIm, $n=25$; DIMA, $n=22$ / *ABL1* DIm, $n=23$; DIMA, $n=25$), MOS63 (*BCR* DIm, $n=25$; DIMA, $n=25$ / *ABL1* DIm, $n=25$; DIMA, $n=25$), PrEC (*BCR* DIm, $n=25$; DIMA, $n=25$ / *ABL1* DIm, $n=25$; DIMA, $n=24$). Test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos * $p < 0.05$.

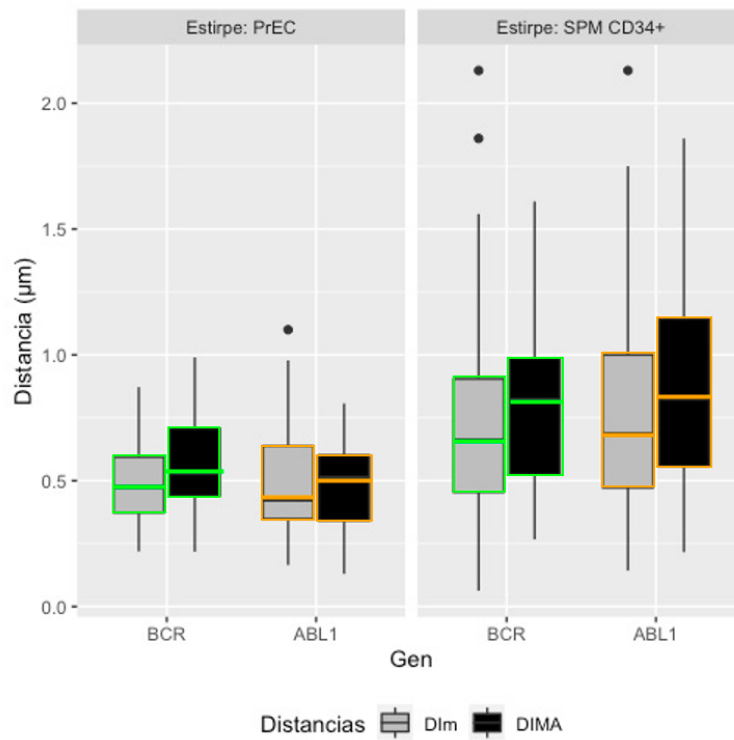


Figura 6.12: Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana entre la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC agrupados de acuerdo a si dichas distancias corresponden a genes DIM (fondo de caja gris) y DIMA (fondo de caja negro). En el eje "y", la distancia en micrometros (μm); en "x", los genes por estirpe; SPM= Sangre periférica movilizada; PrEC= células epiteliales de próstata primaria. La línea gruesa dentro de las cajas representa la mediana. En verde, el contorno de la caja representa los valores del gen *BCR* y en anaranjado *ABL1* por estirpe: SPM CD34+ (*BCR* DIM, n=74; DIMA, n=72/ *ABL1* DIM, n=73; DIMA, n=75), PrEC (*BCR* DIM, n=25; DIMA, n=25/ *ABL1* DIM, n=25; DIMA, n=24). Sin diferencias estadísticas de acuerdo al Test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos.

6.2.3. Comparación de distancias entre los alelos de los genes *BCR* / *ABL1* y su fábrica transcripcional más cercana, respecto a las distancias mínimas y máximas

Con la finalidad de observar qué tan diferentes son las distancias de una fábrica transcripcional en los alelos de un mismo gen, cuantificamos el grado de variabilidad entre las distancias mínimas y máximas de los genes *BCR* y *ABL1* en cada estirpe evaluada. Para ello, primero observamos si había una diferencia en estas distancias al comparar la distribución de estas distancias de acuerdo a la distancia (mínima o máxima) del alelo a partir del cual se calculará la distancia de la fábrica transcripcional más cercana. Es decir que, de los dos alelos de un mismo

gen (llamados par homólogo), uno tendrá una distancia menor hacia la fábrica transcripcional más cercana (min), mientras que el otro alelo tendrá una distancia mayor hacia su respectiva fábrica transcripcional (max); en nuestro caso los pares alélicos homólogos corresponden al par *BCR- BCR'* o *ABL1- ABL1'*. Por lo tanto, sugerimos que por cada par de genes homólogos uno de los alelos estará más cerca de una fábrica transcripcional.

Lo que observamos fue que en las mediciones de cada muestra (Figura 6.14: Tabla suplementaria 11.7) como en las mediciones que se agruparon por estirpe (Figura 6.13: Tabla suplementaria 11.9), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distancias mínimas y máximas de cada alelo a su fábrica transcripcional más cercana. La única excepción fue la muestra MOS61 en *ABL1* ($p > 0.05$) (Figura 6.14). Lo que significa que en general existe una fábrica transcripcional más cercana a uno de los alelos de cada gen evaluado.

Una vez identificada la diferencia entre distancias mínimas y máximas, obtuvimos el grado de variabilidad entre las distancias mínimas y máximas de los genes *BCR* y *ABL1* calculando los coeficientes de variación en cada estirpe evaluada. Lo que encontramos fue que existe mayor variación entre las distancias mínimas y máximas en la estirpe SPM CD34+. De acuerdo con los coeficientes de variación calculados de las distancias mínimas y máximas en cada estirpe evaluadas, hay un porcentaje mayor de variación entre las distancias mínimas y máximas de la estirpe CD34+ en comparación con PrEC (Ver Figura 6.15). En donde, la estirpe CD34+ presenta un coeficiente de variación (CV) de 48.34% en *BCR* y un 48.93% en *ABL1*. Mientras que el control PrEC presenta un CV de 37.25% en *BCR* y un 43.6% en *ABL1*. El coeficiente de variación se calculó como el porcentaje de la desviación estándar de los datos entre el promedio.

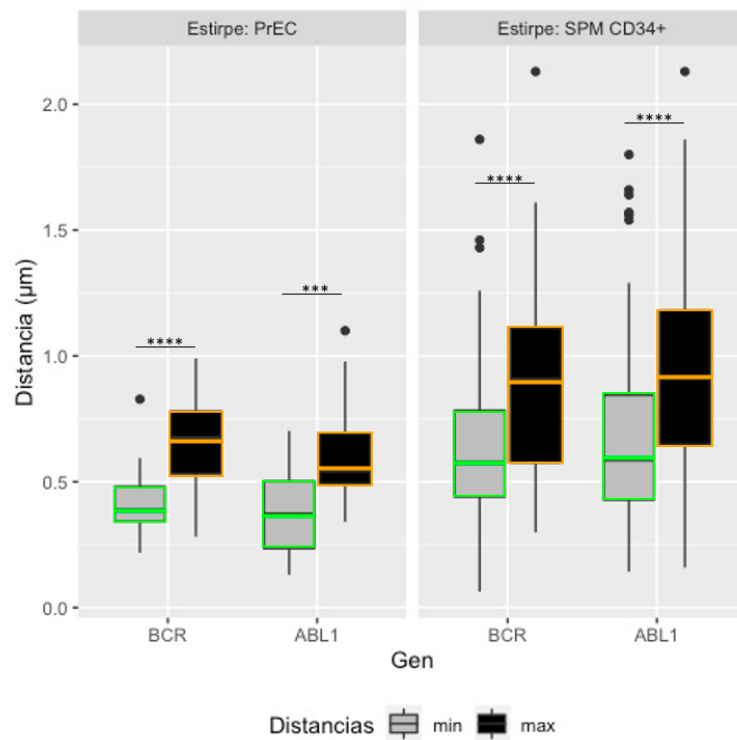


Figura 6.13: Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana entre la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC agrupados de acuerdo a la distancia mínima (fondo de caja gris) y máxima (fondo de caja negro) de cada alelo a su fábrica transcripcional. En el eje "y", la distancia en micrometros (μm); en "x", los genes por estirpe; SPM= Sangre periférica movilizadada; PrEC= células epiteliales de próstata primaria. La línea gruesa dentro de las cajas representa la mediana. En verde, el contorno de la caja representa los valores del gen *BCR* y en anaranjado *ABL1* por estirpe: SPM CD34+ (*BCR* min, n=75; max, n=71/ *ABL1* min, n=75; max, n=73), PrEC (*BCR* min, n=25; max, n=25/ *ABL1* min, n=25; max, n=24). Test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

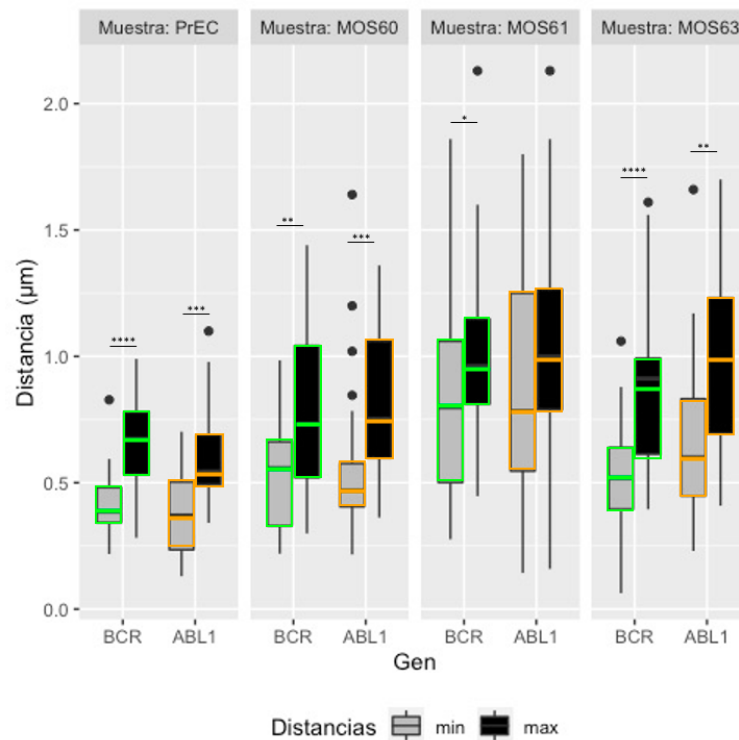


Figura 6.14: Diagrama de caja y bigotes de las mediciones de distancia entre cada gen *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional más cercana entre muestras de la estirpe hematopoyética CD34+ y la estirpe PrEC agrupados de acuerdo a la distancia mínima (fondo de caja gris) y máxima (fondo de caja negro) de cada alelo a su fábrica transcripcional. En el eje "y", la distancia en micrometros (μm); en "x", las muestras MOS de la estirpe hematopoyética CD34+ y PrEC (células epiteliales de próstata primaria). La línea gruesa dentro de las cajas representa la mediana. En verde, el contorno de la caja representa los valores del gen *BCR* y en anaranjado *ABL1* por muestra: MOS60 (*BCR* min, n=25; max, n=24/ *ABL1* min, n=25; max, n=24), MOS61 (*BCR* min, n=25; max, n=22/ *ABL1* min, n=25; max, n=23), MOS63 (*BCR* min, n=25; max, n=25/ *ABL1* min, n=25; max, n=25), PrEC (*BCR* min, n=25; max, n=25/ *ABL1* min, n=25; max, n=24). Test de MannWhitney–Wilcoxon para diferencias entre grupos *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

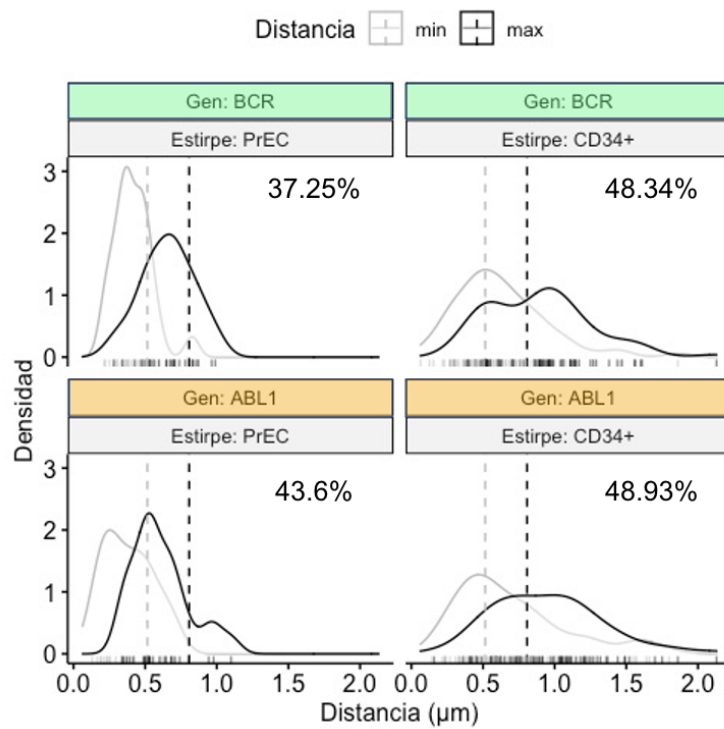


Figura 6.15: Comparación de los coeficientes de variación de las distancias mínimas y máximas de los alelos a su fábrica transcripcional agrupados por gen en las estirpes **CD34+** y **PrEC**. El coeficiente de variación se calculó como el porcentaje de la desviación estándar de los datos entre el promedio ($CV = sd / \mu (100)$). La estirpe **CD34+** presenta un CV de 48.34% en *BCR* y un 48.93% en *ABL1*. Mientras que el control **PrEC** presenta un CV de 37.25% en *BCR* y un 43.6% en *ABL1*.

6.3. Relación entre la expresión de los genes *BCR* y *ABL1* con la distancia espacial entre los alelos y las fábricas transcripcionales

Finalmente, a partir de los análisis con los datos presentados en este trabajo buscamos una relación entre los valores de distancias de cada alelo de cada gen a su fábrica transcripcional cercana y los valores de expresión génica que pudiera asociar ambas variables en la población CD34+. Lo que observamos fue que la estirpe hematopoyética CD34+ presenta una mayor expresión de *BCR* y *ABL1* así como una distancia promedio más lejana entre las mediciones de cada gen a una fábrica transcripcional cercana. Tal como se observa en la Figura 6.2, la expresión de los genes *BCR* y *ABL1* fue mayor en la estirpe SPM CD34+ que en el control PrEC. De la misma manera, los genes de la estirpe SPM CD34+ están más alejados de su fábrica transcripcional en el control PrEC (Ver Figura 6.8). Sin embargo, esta relación no se observa si se toman los datos de expresión y distancia por cada gen individual, ya que si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre la expresión de *BCR* y *ABL1* por muestra (Figura 6.1), existe una mayor expresión de *ABL1* que no se vió reflejada con mediciones de distancia mayores a una fábrica transcripcional en comparación con las distancias de *BCR* (Figura 6.9). Lo anterior sugiere que, en las muestras troncales hematopoyéticas analizadas en este estudio, las fábricas transcripcionales cercanas no alteran la eficiencia en la transcripción en los genes *BCR* y *ABL1*.

Discusión

Las fábricas transcripciones desempeñan un papel fundamental en la arquitectura nuclear al ser sitios enriquecidos en RNA mensajeros nacientes, RNA polimerasa y factores involucrados en la transcripción, reparación y regulación del DNA localizadas en sitios específicos del núcleo en interfase [10,11,14,15,56]. El estudio de las fábricas además ha tomado relevancia debido a que se sugiere que las fábricas transcripcionales participan en procesos de cambio en la estabilidad cromosómica como son las translocaciones cromosómicas [59]. De la misma manera, en el presente trabajo sugerimos que las fábricas transcripcionales podrían desempeñar un papel importante como factor estructural en la organización cromosómica que condicione la generación de la translocación cromosómica t(9;22) en el desarrollo de la LMC. Un ejemplo de la posible participación de las fábricas transcripcionales en la generación de translocaciones se ha observado en los genes *Myc* e *Igh*; los cuales son compañeros de translocación más frecuentes en el plasmocitoma y en el linfoma de Burkitt [59]. En el trabajo mencionado, los alelos *Myc* e *Igh* fueron reclutados a focos de RNAPII tras la activación de células B mientras que las distancias de los alelos *Myc* que no colocalizaban se ubicaban en un rango de 0.2 a 0.8 μm .

En cambio, en nuestro estudio, decidimos medir las distancias de los alelos del par génico *BCR* y *ABL1*, par que se fusiona en la t(9;22), a su fábrica transcripcional más cercana en células troncales hematopoyéticas sanas. Antes de las mediciones, previamente observamos que las señales de nuestros genes no colocalizaban, por lo que no sería posible cuantificar el porcentaje de colocalización de los alelos a los focos de RNAPII. Sin embargo, sí podíamos cuantificar casos donde los alelos compartieran fábricas transcripcionales bajo la premisa de la proximidad génica que establece que dos o más secuencias de DNA cercanas a una distancia de 2 μm pueden desplazarse a través de movimientos brownianos dentro del nucleoplasma e interactuar entre sí [97]. Lo que sugiere que bajo un proceso de daño y reparación del DNA, los extremos libres de la cromatina formados por rupturas de doble cadena podrían interactuar entre sí en una distancia promedio de 2 μm , favoreciendo un evento de recombinación entre las secuencias de *BCR* y

ABL1. De esta manera, a través de nuestros experimentos encontramos que las distancias entre los alelos de los genes *BCR* y *ABL1* en células troncales hematopoyéticas identificadas con el marcador CD34+ a sus fábricas transcripcionales cercanas son en promedio menores a 1 μm , por lo que fácilmente la cromatina podría desplazarse hacia los límites de una fábrica transcripcional, las cuales han reportado un diámetro estimado $198 \pm 7.9 \text{ nm}$ [16,37–40,56]. Además, confirmando nuestra hipótesis, encontramos que existe un porcentaje de núcleos celulares (8%) en esta estirpe donde los genes *BCR* y *ABL1* comparten fábricas transcripcionales. No obstante, aunque este 8% de núcleos evaluados comparten una fábrica transcripcional en común, no significa que los genes de interés interactúen en ella. Para evaluar la interacción entre los alelos y las fábricas transcripcionales, sería necesario realizar un RNA-FISH el cual nos permitiría observar la interacción de RNA nacientes en *ABL1* y *BCR* en una fábrica transcripcional. Desde una perspectiva genómica se podría implementar también un 3C o 4C en donde identifiquemos las regiones del DNA interactuando con la RNA polimerasa y proteínas involucradas en el proceso de daño, reparación y recombinación del DNA.

Por otro lado, de acuerdo a la comparación de distancias alelo-fábrica respecto a las distancias DIM y DIMA, esperábamos una mayor cercanía de las fábricas transcripcionales hacia el par génico *BCR* y *ABL1* con menor distancia intergénica, es decir, el par génico Dim; ya que podría estar favoreciendo una transcripción más eficiente en este par o más susceptible a eventos de reparación por parte de la RNAPII que a futuro faciliten procesos de recombinación. Sin embargo, los resultados mostraron que la cercanía de una fábrica transcripcional hacia uno de los genes de interés no se ve aparentemente influenciada por la cercanía de este gen hacia su pareja génica heteróloga. Un posible argumento para explicar esta situación, es que mientras no exista algún factor externo como el daño al DNA, factores estructurales del núcleo o factores reguladores que promuevan una alta transcripción en estos genes y que sabemos modifican la distribución de las secuencias involucradas [110–113], las distancias de las fábricas al par génico *BCR* y *ABL1* más cercano no se verán afectadas.

En cambio, en los resultados de comparación de distancias alelo-fábrica transcripcional respecto a las distancias mínimas y máximas la existencia de una fábrica transcripcional más cercana a uno de los alelos de cada gen evaluado podría ser explicada por un proceso de transcripción alelo específica en ambos genes, especialmente en la estirpe CD34+. La hipótesis anterior se basa en que, considerando que uno de los alelos en cada gen es más cercano a una de las fábricas transcripcionales, sugerimos que el alelo más cercano está transcribiéndose activamente. Existe

evidencia de esta posibilidad en donde se ha observado que la expresión y transcripción de alelos autosómicos es monoalélica y aleatoria. En mamíferos se ha reportado que este proceso ocurre en un 12 a 24 % en genes autosómicos y que procesos epigenéticos podrían estar implicados su regulación [114,115]. Consideramos que esta propuesta podría ser evaluada por cuantificación de las hebras de RNA nacientes sintetizadas en un sólo sitio por RNA FISH o a través de un análisis de expresión génica alelo específico mediante el uso de ASOs (Allele Specific Oligonucleotides, por sus siglas en inglés) en donde se usan oligos específicos para cada uno de los alelos que reconocen variaciones en las secuencias de las regiones 5'UTR que varían entre cada alelo [116]. Sin embargo, es un campo de estudio que requiere más investigación al respecto.

Mientras que, respecto al alto grado de variabilidad entre las distancias mínimas y máximas de los genes *BCR* y *ABL1* que obtuvimos en la población CD34+ a través de los coeficientes de variación, es posible que la variación tenga que ver con la diversidad de células progenitoras que se obtienen por medio de la selección positiva del marcador CD34+ junto con las células troncales [117]. Este hecho podría estar contribuyendo a la heterogeneidad de los datos e influyendo en la variabilidad obtenida en las mediciones entre las distancias mínimas y máximas en fábricas transcripcionales de los genes *BCR* y *ABL1* en la estirpe hematopoyética, en comparación con la línea celular PrEC. No obstante, se requerirían más pruebas para descartar el origen de esta variabilidad.

Por el contrario, en la relación de la expresión de los genes *BCR* y *ABL1* con la distancia espacial entre los alelos y las fábricas transcripcionales cercanas, no se encontró una relación entre una mayor expresión/transcripción, con una distancia más cercana entre los genes *BCR* y *ABL1* en la estirpe CD34+ como sugerían Papantonis y Cook (2011) [55]. Quienes postulan que la cercanía entre un gen y su fábrica transcripcional puede asociarse con una mayor tasa de transcripción [55].

Además, mientras que la literatura sugiere que la cercanía espacial de los genes *ABL1* y *BCR* en los cromosomas 9 y 22 puede explicar la etiología de la t(9;22), nuestros resultados denotan que, a pesar de mantener una distancia intergénica menor (DI_m) de 1.96 m y encontrarse dentro de los límites marcados por la literatura (1 - 2 μ m) [92-94], la proximidad de los genes *ABL1* y *BCR* no representa una condición exclusiva para explicar la alta incidencia del cromosoma Filadelfia t(9;22) en la LMC, ya que la línea control PrEC, de estirpe epitelial de próstata, tiene una distancia DI_m similar al rango sugerido. Sin embargo, existe evidencia en donde se propo-

nen alternativas para comprender la cercanía o agrupación de genes en el núcleo en interfase. Por ejemplo, se ha sugerido que los centros de empalme “splicing speckles”, también conocidas como grupos de gránulos de intercromatina e identificados con la proteína SC35, pueden ser responsables del agrupamiento de genes cercanos por el requerimiento común que tiene por el uso de componentes de empalme o “splicing” [118–122]. Dado que el tamaño de estos gránulos de intercromatina se ha caracterizado con una medida promedio de 0.5–2 μm [123], es posible que los genes *BCR* y *ABL1* colocalizan con estas estructuras.

Por otra parte, mientras que genes cercanos entre sí pueden compartir ya sea fábricas transcripcionales o splicing speckles también es posible que los genes se agrupen en ausencia de transcripción o empalme, organizados en una arquitectura preestablecida que no se encuentre influenciada por la activación o represión transcripcional. De acuerdo a Rieder, Trajanoski y McNally (2012) [19], los principios organizadores para este tercer tipo de agrupamientos aún están por esclarecerse, pero “el posicionamiento preferencial de los cromosomas, el intercambio de factores nucleares distintos de las fábricas transcripcionales o la asociación con nucleolos o componentes del entorno nuclear son factores que podrían influir” [19].

Una de las limitaciones del proyecto respecto a las técnicas utilizadas es que no se evaluaron estrictamente las señales de los genes transcripcionalmente activos, ya que, si bien asumimos una transcripción activa de los genes *BCR* y *ABL1* por los resultados de expresión, la técnica de DNA FISH no muestra los RNA nacientes que resultan del proceso de biosíntesis de RNA [59]. Asimismo, un seguimiento in vivo de los RNA nacientes de *BCR* y *ABL1* antes y después de inducir daño al DNA por la formación de rupturas de cadena doble (DSBs), acoplado a una inmunofluorescencia contra RNAPII comprobaría si después del daño al DNA, la frecuencia de los genes a compartir focos de RNAPII aumenta.

Por último, es relevante mencionar que durante la realización de este proyecto nos vimos limitados por la disponibilidad de muestras. No sólo por un número reducido de donantes de sangre periférica movilizada (SPM), sino también el conteo celular de la estirpe de interés CD34+ que corresponde a una muestra primaria limitada. Sin embargo, nuestros hallazgos muestran un panorama general de la disposición espacial de los genes *BCR* y *ABL1* respecto a las fábricas transcripcionales en células troncales hematopoyéticas, y nos invitan a continuar estudiando la dinámica de estos genes en el espacio tridimensional del núcleo y su relación con la génesis de la translocación t(9;22).

Conclusiones

Aunque los experimentos realizados en el presente estudio estuvieron limitados por el número de células y muestras hematopoyéticas, nuestros resultados brindan un panorama general de la dinámica estructural de los genes *BCR* y *ABL1* respecto a fábricas transcripcionales, lo cual nos permite concluir lo siguiente:

1. El 8% de los núcleos analizados en la estirpe CD34+ muestran a un par génico *BCR* y *ABL1* compartiendo una fábrica transcripcional.
2. La cercanía espacial de los genes *ABL1* y *BCR* no representa una condición exclusiva de la estirpe hematopoyética CD34+.
3. Los alelos de los genes *BCR* y *ABL1* de la estirpe SPM CD34+ están más alejados de su fábrica transcripcional comparados con una línea celular primaria de próstata (PrEC).
4. La cercanía de una fábrica transcripcional hacia uno de los genes interés no se ve aparentemente influenciada por la cercanía de este gen hacia su pareja génica heteróloga.
5. Existe un alelo por cada par de genes homólogos más cercano a una fábrica transcripcional que su contraparte alélica.
6. Hay mayor variación entre las distancias mínimas y máximas en la estirpe SPM CD34+ comparados con una línea celular primaria de próstata PrEC.
7. No se encontró una relación entre una mayor expresión o transcripción con una distancia más cercana entre los alelos de los genes *BCR* y *ABL1* a su fábrica transcripcional en la estirpe CD34+.
8. Existe un grado de heterogeneidad entre la expresión de los genes *BCR* y *ABL1* entre individuos

Perspectivas

Algunas de las perspectivas experimentales que proponemos para la continuación del presente estudio se enlistan a continuación:

- Ampliar el número de muestras de donadores de sangre periférica movilizada.
- Evaluar la transcripción alelo específica de cada uno de los genes y asociarla directamente con la posición espacial de este alelo dentro del núcleo celular.
- Evaluar la colocalización de los genes *BCR* y *ABL1* con respecto a splicing speckles los cuales pueden ser identificados con la proteína SC35.
- Rastrear *in vivo* el RNA nascente de los genes *ABL1* y *BCR* a través de un live-cell imaging, usando un marcador metabólico de RNA o bien a través de RNA-seq de fragmentos de RNA nascente e inducir daño al DNA generando DSBs para evaluar la dinámica *in vivo* tanto de las secuencias génicas como del transcrito nascente.
- Identificar las regiones del DNA interactuando con la RNA polimerasa y proteínas involucradas en el proceso de daño, reparación y recombinación del DNA a través de un 3C o 4C.
- Caracterizar el posicionamiento de las fábricas transcripcionales dentro de los territorios cromosómicos 9 y 22.

Referencias

1. Parada LA, Misteli T. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends in Cell Biology*. 2002;12(9):425-432. doi:10.1016/S0962-8924(02)02351-6
2. Francastel C, Schübeler D, Martin DIK, Groudine M. Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(2):137-143. doi:10.1038/35040083
3. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-45. doi:10.1038/47412
4. Dundr M, Misteli T. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Journal*. 2001;356(Pt 2):297. doi:10.1042/0264-6021:3560297
5. Misteli T. *The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function*. *Cell*. 2020;183(1). doi:10.1016/j.cell.2020.09.014
6. Fawcett DW. On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *American Journal of Anatomy*. 1966;119(1):129-145. doi:10.1002/AJA.1001190108
7. Cremer T, Cremer C, Baumann H, et al. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Human Genetics*. 1982;60(1):46-56. doi:10.1007/BF00281263
8. Fraser P, Bickmore W. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 2007 447:7143. 2007;447(7143):413-417. doi:10.1038/nature05916
9. Rowley MJ, Corces VG. Organizational principles of 3D genome architecture. *Nature Reviews Genetics* 2018 19:12. 2018;19(12):789-800. doi:10.1038/s41576-018-0060-8
10. Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(2):1-12. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A000646

11. Staněk D, Fox A. Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*. 2017;46:94-101. doi:10.1016/J.CEB.2017.05.001
12. Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*. 2007;128(4):787-800. doi:10.1016/J.CELL.2007.01.028
13. Rowley MJ, Corces VG. Organizational principles of 3D genome architecture. *Nature Reviews Genetics* 2018 19:12. 2018;19(12):789-800. doi:10.1038/s41576-018-0060-8
14. Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ, Cook PR. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *The EMBO Journal*. 1993;12(3):1059. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05747.x
15. Wansink DG, Schul W, van der Kraan I, van Steensel B, van Driel R, de Jong L. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *The Journal of Cell Biology*. 1993;122(2):283. doi:10.1083/JCB.122.2.283
16. Iborra FJ, Pombo A, Jackson DA, Cook PR. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription “factories” in human nuclei. *Journal of Cell Science*. 1996;109(6):1427-1436. doi:10.1242/JCS.109.6.1427
17. Grande, M. A., van der Kraan, I., de Jong, L., van Driel R. Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *Journal of Cell Science*. 1997;110((Pt 15)):1781–1791.
18. Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, et al. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. Published online 2004. doi:10.1038/ng1423
19. Rieder D, Trajanoski Z, McNally JG. Transcription factories. *Frontiers in Genetics*. 2012;3(OCT). doi:10.3389/FGENE.2012.00221
20. Woychik NA, Hampsey M. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*. 2002;108(4):453-463. doi:10.1016/S0092-8674(02)00646-3
21. Wang D, Farhana A. Biochemistry, RNA Structure. *StatPearls*. Published online May 8, 2022. Accessed July 10, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/>
22. Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*. 2001;292(5523):1863-1876. doi:10.1126/SCIENCE.1059493
23. Phatnani HP, Greenleaf AL. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev*. 2006;20(21):2922-2936. doi:10.1101/GAD.1477006

-
24. Sutherland H, Bickmore WA. Transcription factories: gene expression in unions? *Nature Reviews Genetics* 2009 10:7. 2009;10(7):457-466. doi:10.1038/nrg2592
 25. Triezenberg SJ. Structure and function of transcriptional activation domains. *Current Opinion in Genetics Development*. 1995;5(2):190-196. doi:10.1016/0959-437X(95)80007-7
 26. Hampsey M. Molecular Genetics of the RNA Polymerase II General Transcriptional Machinery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(2):465. doi:10.1128/MMBR.62.2.465-503.1998
 27. Maldonado E, Reinberg D. News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995;7(3):352-361. doi:10.1016/0955-0674(95)80090-5
 28. Hubatsch L. Fast kinetics of DNA repair. Published online 2013. doi:10.13140/RG.2.2.35148.10888
 29. Pombo A, Jackson DA, Hollinshead M, Wang Z, Roeder RG, Cook PR. Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. *The EMBO Journal*. 1999;18(8):2241. doi:10.1093/EMBOJ/18.8.2241
 30. Janicki SM, Tsukamoto T, Salghetti SE, et al. From silencing to gene expression: Real-time analysis in single cells. *Cell*. 2004;116(5):683-698. doi:10.1016/S0092-8674(04)00171-0/ATTACHMENT/1BC43BFA-B7FE-4EAE-9223-C30A159CD493/MMC5.AVI
 31. Steurer B, Janssens RC, Geverts B, et al. Live-cell analysis of endogenous GFP-RPB1 uncovers rapid turnover of initiating and promoter-paused RNA Polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(19):E4368-E4376. doi:10.1073/PNAS.1717920115/SUPPL_F I LE/PNAS.1717920115.SD02.XLSX
 32. Cho WK, Spille JH, Hecht M, et al. Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science (1979)*. 2018;361(6400):412-415. doi:10.1126/SCIENCE.AAR4199/SUPPL_F I LE/AAR4199_S3.MOV
 33. Guo YE, Manteiga JC, Henninger JE, et al. Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature* 2019 572:7770. 2019;572(7770):543-548. doi:10.1038/s41586-019-1464-0
 34. Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, et al. Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Nature* 2014 516:7530. 2014;516(7530):272-275. doi:10.1038/nature13714
-

35. Forero-Quintero LS, Raymond W, Handa T, et al. Live-cell imaging reveals the spatiotemporal organization of endogenous RNA polymerase II phosphorylation at a single gene. *Nature Communications* 2021 12:1. 2021;12(1):1-16. doi:10.1038/s41467-021-23417-0
36. Uchino S, Ito Y, Sato Y, et al. Live imaging of transcription sites using an elongating RNA polymerase II-specific probe. *Journal of Cell Biology*. 2022;221(2). doi:10.1083/JCB.202104134/212888
37. Eskiw CH, Fraser P. Ultrastructural study of transcription factories in mouse erythroblasts. *Journal of Cell Science*. 2011;124(21):3676-3683. doi:10.1242/JCS.087981
38. Chen X, Wei M, Zheng MM, et al. Study of RNA Polymerase II Clustering inside Live-Cell Nuclei Using Bayesian Nanoscopy. *ACS Nano*. 2016;10(2):2447-2454. doi:10.1021/ACS.NANO.5B07257
39. Martin S, Pombo A. Transcription factories: quantitative studies of nanostructures in the mammalian nucleus. *Chromosome Res*. 2003;11(5):461-470. doi:10.1023/A:1024926710797
40. Eskiw CH, Rapp A, Carter DRF, Cook PR. RNA polymerase II activity is located on the surface of protein-rich transcription factories. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 12):1999-2007. doi:10.1242/JCS.027250
41. Jackson DA, Iborra FJ, Manders EMM, Cook PR. Numbers and Organization of RNA Polymerases, Nascent Transcripts, and Transcription Units in HeLa Nuclei. *Molecular Biology of the Cell*. 1998;9(6):1523. doi:10.1091/MBC.9.6.1523
42. Deng B, Melnik S, Cook PR. Transcription factories, chromatin loops, and the dysregulation of gene expression in malignancy. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(2):65-71. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2012.01.003
43. Malyavantham KS, Bhattacharya S, Berezney R. The architecture of functional neighborhoods within the mammalian cell nucleus. *Adv Enzyme Regul*. 2010;50(1):126. doi:10.1016/J.ADVENZREG.2009.10.003
44. Meldi L, Brickner JH. Compartmentalization of the nucleus. *Trends Cell Biol*. 2011;21(12):701-708. doi:10.1016/J.TCB.2011.08.001
45. Zaidi SK, Young DW, Choi JY, et al. The dynamic organization of gene-regulatory machinery in nuclear microenvironments. *EMBO Reports*. 2005;6(2):128. doi:10.1038/SJ.EMBOR.7400337
46. Zaidi SK, Fritz AJ, Tracy KM, et al. Nuclear organization mediates cancer-compromised genetic and epigenetic control. *Advances in Biological Regulation*. 2018;69:1-10. doi:10.1016/j.jbior.2018.05.001
47. Peterson CL, Workman JL. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10(2):187-192. doi:10.1016/S0959-437X(00)00068-X

-
48. Spencer VA, Davie JR. Dynamically acetylated histone association with transcriptionally active and competent genes in the avian adult beta-globin gene domain. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34810-34815. doi:10.1074/JBC.M104886200
 49. Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications—miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(7):457-469. doi:10.1038/NRC2876
 50. Huang H, Sabari BR, Garcia BA, David Allis C, Zhao Y. SnapShot: histone modifications. *Cell.* 2014;159(2). doi:10.1016/J.CELL.2014.09.037
 51. Peppenella S, Murphy KJ, Hayes JJ. Intra- and inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure. *Chromosoma.* 2014;123(1-2):3-13. doi:10.1007/S00412-013-0435-8
 52. Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell.* 2007;25(1):15-30. doi:10.1016/J.MOLCEL.2006.12.014
 53. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(2):172-183. doi:10.1016/S0955-0674(03)00013-9
 54. He S, Dunn KL, Espino PS, et al. Chromatin organization and nuclear microenvironments in cancer cells. *J Cell Biochem.* 2008;104(6):2004-2015. doi:10.1002/JCB.21485
 55. Papantonis A, Cook PR. Genome architecture and the role of transcription. *Current Opinion in Cell Biology.* 2010;22(3):271. doi:10.1016/J.CEB.2010.03.004
 56. Jackson DA, Iborra FJ, Manders EMM, Cook PR. Numbers and Organization of RNA Polymerases, Nascent Transcripts, and Transcription Units in HeLa Nuclei. *Molecular Biology of the Cell.* 1998;9(6):1523. doi:10.1091/MBC.9.6.1523
 57. Mitchell JA, Fraser P. Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription. *Genes & Development.* 2008;22(1):20-25. doi:10.1101/GAD.454008
 58. Papantonis A, Cook PR. Fixing the model for transcription: The DNA moves, not the polymerase. *Transcription.* 2011;2(1):41. doi:10.4161/TRNS.2.1.14275
 59. Osborne C, Chakalova L, Mitchell J, et al. Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol.* 2007;5(8):1763-1772. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0050192
 60. Brickner J. Genetic and epigenetic control of the spatial organization of the genome. *Molecular Biology of the Cell.* 2017;28(3):364. doi:10.1091/MBC.E16-03-0149

61. Mertens F, Antonescu CR, Hohenberger P, et al. Translocation-related sarcomas. *Semin Oncol.* 2009;36(4):312-323. doi:10.1053/J.SEMINONCOL.2009.06.004
62. Canoy RJ. Factors That Affect Chromosomal Translocations in Cells. Université Paris-Saclay; 2021. Accessed January 27, 2022. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03505918>
63. Roukos V, Misteli T. The biogenesis of chromosome translocations. *Nat Cell Biol.* 2014;16(4):293-300. doi:10.1038/NCB2941
64. Balmain A. Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nature Reviews Cancer* 2001 1:1. 2001;1(1):77-82. doi:10.1038/35094086
65. Boveri T. Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of Cell Science.* 2008;121(Supplement₁) : 1 – 84. doi : 10.1242/JCS.025742
66. Druker BJ. Janet Rowley (1925–2013). *Nature* 2014 505:7484. 2014;505(7484):484-484. doi:10.1038/505484a
67. Rowley JD. Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nature Reviews Cancer* 2001 1:3. 2001;1(3):245-250. doi:10.1038/35106108
68. Rowley JD. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood.* 2008;112(6):2183-2189. doi:10.1182/BLOOD-2008-04-097931
69. Rowley JD. Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Annales de genetique.* 1973;16(2):109–112.
70. Rowley JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* 1973 243:5405. 1973;243(5405):290-293. doi:10.1038/243290a0
71. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with burkitt and non-burkitt lymphomas. *International Journal of Cancer.* 1976;17(1):47-56. doi:10.1002/IJC.2910170108
72. Klein A de, Kessel AG van, Grosveld G, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1982 300:5894. 1982;300(5894):765-767. doi:10.1038/300765a0

-
73. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36(1):93-99. doi:10.1016/0092-8674(84)90077-1
74. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, et al. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983 306:5940. 1983;306(5940):239-242. doi:10.1038/306239a0
75. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985 315:6020. 1985;315(6020):550-554. doi:10.1038/315550a0
76. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982;79(24):7824-7827. doi:10.1073/PNAS.79.24.7824
77. Taub R, Kirsch I, Morton C, et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982;79(24):7837-7841. doi:10.1073/PNAS.79.24.7837
78. Ar-Rushdi A, Nishikura K, Erikson J, Watt R, Rovera G, Croce CM. Differential Expression of the Translocated and the Untranslocated c-myc Oncogene in Burkitt Lymphoma. *Science* (1979). 1983;222(4622):390-393. doi:10.1126/SCIENCE.6414084
79. Robertson WRB. Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of tettigidae and acrididae: V-shaped chromosomes and their significance in acrididae, locustidae, and gryllidae: Chromosomes and variation. *Journal of Morphology*. 1916;27(2):179-331. doi:10.1002/JMOR.1050270202
80. Wang D, Li D, Qin G, et al. The Structural Characterization of Tumor Fusion Genes and Proteins. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/912742
81. Sharda S, Sarmandal P, Cherukommu S, et al. A Virtual Screening Approach for the Identification of High Affinity Small Molecules Targeting BCR-ABL1 Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017;17(26). doi:10.2174/1568026617666170821124512
82. Hehlmann R. Chronic Myeloid Leukemia in 2020. *Hemasphere*. 2020;4(5):e468. doi:10.1097/HS9.0000000000000468
83. Quintás-Cardama A, Cortes JE. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2006;81(7):973-988. doi:10.4065/81.7.973
-

84. Nowell C. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut.* 1962;8(2):65-66. doi:10.1007/BF01630378
85. Chasseriau J, Rivet J, Bilan F, et al. Characterization of the Different BCR-ABL Transcripts with a Single Multiplex RT-PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2004;6(4):343-347. doi:10.1016/S1525-1578(10)60530-2
86. Foroni L, Wilson G, Gerrard G, et al. Guidelines for the measurement of BCR-ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology.* 2011;153(2):179-190. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08603.x
87. Terense WL. Philadelphia Chromosome. *Medical and Scientific Illustration.* Published 2007. <https://www.teresewinslow.com/cellular-scientific/9vavdk7xuvvhib624d8sjknlrdk9in>
88. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. *American Journal of Hematology.* 2012;87(11):1037-1045. doi:10.1002/AJH.23282
89. Bickmore WA, Teague P. Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. *Chromosome Res.* 2002;10(8):707-715. doi:10.1023/A:1021589031769
90. Roukos V, Voss TC, Schmidt CK, Lee S, Wangsa D, Misteli T. Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science.* 2013;341(6146):660-664. doi:10.1126/SCIENCE.1237150
91. Sathitruangsak C, Righolt CH, Klewes L, Tung Chang D, Kotb R, Mai S. Distinct and shared three-dimensional chromosome organization patterns in lymphocytes, monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Int J Cancer.* 2017;140(2):400-410. doi:10.1002/IJC.30461
92. Kozubek S, Lukášová E, Marečková A, et al. The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias. 1999;108(7).
93. Neves H, Ramos C, Gomes Da Silva M, Parreira A, Parreira L. The Nuclear Topography of ABL, BCR, PML, and RAR Genes: Evidence for Gene Proximity in Specific Phases of the Cell Cycle and Stages of Hematopoietic Differentiation. *Blood.* 1999;93(4):1197-1207. doi:10.1182/BLOOD.V93.4.1197
94. Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, Misteli T. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nature Genetics.* 2003;34(3):287-291. doi:10.1038/ng1177

-
95. Lukášová, E., Kozubek, S., Kozubek, M., Kjeronská, J., Rýznar, L., Horáková, J., Krahulcová, E., Horneck G. Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia. *Hum Genet.* 1997;100(5-6):525-535. doi:10.1007/S004390050547
 96. Zhang Y, McCord RP, Ho YJ, et al. Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell.* 2012;148(5):908-921. doi:10.1016/J.CELL.2012.02.002
 97. Sachs RK, Chen AM, Brenner DJ. Review: Proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology.* 1997;71(1):1-19. doi:10.1080/095530097144364
 98. Bickmore WA, Teague P. Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. *Chromosome Research.* 2002;10(8):707-715. doi:10.1023/A:1021589031769
 99. Meaburn KJ, Misteli T, Soutoglou E. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(1):80-90. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2006.10.008
 100. Parada LA, McQueen PG, Munson PJ, Misteli T. Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. *Current Biology.* 2002;12(19):1692-1697. doi:10.1016/S0960-9822(02)01166-1
 101. Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, Misteli T. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nature Genetics.* 2003;34(3):287-291. doi:10.1038/ng1177
 102. Branco MR, Pombo A. Intermingling of Chromosome Territories in Interphase Suggests Role in Translocations and Transcription-Dependent Associations. *PLOS Biology.* 2006;4(5):e138. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0040138
 103. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE. Proximity of Chromosomal Loci That Participate in Radiation-Induced Rearrangements in Human Cells. *Science (1979).* 2000;290(5489):138-141. doi:10.1126/SCIENCE.290.5489.138
 104. Roukos V, Voss TC, Schmidt CK, Lee S, Wangsa D, Misteli T. Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science.* 2013;341(6146):660-664. doi:10.1126/SCIENCE.1237150
 105. Ltd A. Neupogen (filgrastim). Published online 2009.
 106. Fialkow PJ, Denman AM, Jacobson RJ, Lowenthal MN. Chronic myelocytic leukemia. Origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. *J Clin Invest.* 1978;62(4):815-823. doi:10.1172/JCI109193

107. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008;112(13):4793-4807.
doi:10.1182/BLOOD-2008-08-077941
108. Kraus F, Miron E, Demmerle J, et al. Quantitative 3D structured illumination microscopy of nuclear structures. *Nature Protocols* 2017 12:5. 2017;12(5):1011-1028. doi:10.1038/nprot.2017.020
109. Marshall WF, Straight A, Marko JF, et al. Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Curr Biol*. 1997;7(12):930-939. doi:10.1016/S0960-9822(06)00412-X
110. Hediger F, Neumann FR, van Houwe G, Dubrana K, Gasser SM. Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. *Curr Biol*. 2002;12(24):2076-2089. doi:10.1016/S0960-9822(02)01338-6
111. Zimmer C, Fabre E. Principles of chromosomal organization: lessons from yeast. *J Cell Biol*. 2011;192(5):723-733. doi:10.1083/JCB.201010058
112. Lin C, Yang L, Tanasa B, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. 2009;139(6):1069-1083.
doi:10.1016/J.CELL.2009.11.030
113. Mathas S, Kreher S, Meaburn KJ, et al. Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(14):5831-5836. doi:10.1073/PNAS.0900912106
114. Deng Q, Ramsköld D, Reinius B, Sandberg R. Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* (1979). 2014;343(6167):193-196.
doi:10.1126/SCIENCE.1245316/SUPPL_FILE/DENG - SM.PDF
115. Eckersley-Maslin MA, Spector DL. Random monoallelic expression: regulating gene expression one allele at a time. *Trends in Genetics*. 2014;30(6):237-244. doi:10.1016/J.TIG.2014.03.003
116. Sgourou A, Papachatzopoulou A, Katsila T, Patrinos GP. Low- and Medium-Throughput Variant Detection Methods: A Historical Perspective. *Molecular Diagnostics: Third Edition*. Published online January 1, 2017:23-39. doi:10.1016/B978-0-12-802971-8.00003-1
117. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):640-653. doi:10.1002/WSBM.86
118. Shopland LS, Johnson C v., Lawrence JB. Evidence that all SC-35 domains contain mRNAs and that transcripts can be structurally constrained within these domains. *Journal of Structural Biology*. 2002;140(1-3):131-139. doi:10.1016/S1047-8477(02)00507-5

-
119. Brown JM, Leach J, Reittie JE, et al. Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *Journal of Cell Biology*. 2006;172(2):177-187. doi:10.1083/JCB.200507073
 120. Brown JM, Green J, Neves RP das, et al. Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *Journal of Cell Biology*. 2008;182(6):1083-1097. doi:10.1083/JCB.200803174
 121. Takizawa T, Meaburn KJ, Misteli T. The Meaning of Gene Positioning. *Cell*. 2008;135(1):9-13. doi:10.1016/J.CELL.2008.09.026
 122. Szczerbal I, Bridger JM. Association of adipogenic genes with SC-35 domains during porcine adipogenesis. *Chromosome Res*. 2010;18(8):887-895. doi:10.1007/S10577-010-9176-1
 123. Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S, Fu XD. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(8):819-826. doi:10.1038/NSMB.1461

11.1. Protocolos extendidos

11.1.1. Aislamiento de la fracción leucocitaria por gradiente de Ficoll

Materiales:

Reactivo	Marca	Núm. de catálogo
Ficoll-Paque	Sigma-Aldrich	10771

Procedimiento:

1. Tras obtener una muestra proveniente de sangre periférica, invertir el tubo 8 veces consecutivas para mezclar la heparina con la sangre y evitar la coagulación de la misma
2. En tubos Falcon de 15 mL, agregar lentamente un volumen de Ficoll idéntico al de la sangre (6mL), para una proporción 1:1
3. Agregar cuidadosa y lentamente, 6 mL de sangre sobre el volumen de Ficoll. Para evitar mezclar la sangre con el Ficoll, dejamos resbalar la sangre por la pared del tubo, en lugar de agregarla directamente sobre el Ficoll
4. Centrifugar a 400 rpm por 30 min a temperatura ambiente (TA). Es muy importante que el freno de la centrífuga esté desactivado
5. Al retirar el tubo, es importante no agitar el tubo, pues esto rompería las fases de separación
6. Con la pipeta, retirar cuidadosamente la fase superior que contiene plasma y plaquetas.

7. Recuperar la fase intermedia, color blanco, que se encuentra debajo y poner en un tubo nuevo.
8. Agregar el triple de volumen de PBS con respecto a la fase intermedia o blanca obtenida. Es decir, si se obtuvieron 3 mL de células, agregar 9 mL de PBS. Este proceso se lleva a cabo con la finalidad de limpiar las células de Ficoll.
9. Centrifugar las células a 400 rpm por 10 min a TA
10. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 3 mL de PBS limpio
11. Repetir 3 veces los pasos 9 a 12 para cada muestra hasta obtener un pellet color blanco.

11.1.2. Extracción de RNA

Materiales:

Reactivo	Marca	Núm. de catálogo
TRIzol ® Reagent	Invitrogen	1559602
Isopropanol	IBI Scientific	IB15735
Etanol	Meyer	64175
Cloroformo	JT Baker	67663
DEPC	Sigma-Aldrich	D5758

Tabla 11.1: Reactivos para la extracción de RNA

Soluciones	Composición
Agua libre de RNAsas	Añadir 1 mL de DEPC por cada litro de agua destilada y esterilizar en autoclave
Etanol 75 (%)	Añadir 15 mL de agua libre de RNAsas por cada 75 mL de Etanol al 100 (%)

Tabla 11.2: Soluciones a preparar para la extracción de RNA

Procedimiento:

Para la realización de este protocolo se requieren muestras previamente suspendidas en un tubo con TRIzol Reagent.

1. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada mL del volumen del tubo
2. Agitar el tubo vigorosamente por 15 segundos hasta observar un color rosado opaco e incubar de 2-3 min en TA
3. Centrifugar las muestras a 14,000 rpm por 15 min a 4°C
Importante: la mezcla se separa en tres fases; una inferior color rosa (solvente), una fase intermedia blanca (fase orgánica) y una fase superior transparente (fase acuosa). El RNA se encuentra exclusivamente en la fase superior (acuosa)
4. Transferir la fase acuosa cuidadosamente a un tubo nuevo, sin contaminarla tomando parte de la fase orgánica al succionar con la micropipeta.
5. Adicionar 0.5 mL de isopropanol 100 % por cada mL de la fase superior recolectada para favorecer la precipitación del RNA
Punto pausa: Se puede almacenar a -20°C toda la noche o bien, continuar con el paso siguiente.
6. Incubar a -20°C en el congelador de 40 min a 1 hr
7. Centrifugar las muestras a 14,000 rpm por 15 min a 4°C
8. Quitar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 mL de etanol al 70 % y agitar el tubo brevemente con el vortex
9. Repetir los dos pasos anteriores y lavar el pellet con etanol al 70 %
10. Quitar el sobrenadante y dejar secar los tubos de cabeza a TA durante 10 min.
11. Resuspender el pellet con DEPC

11.1.3. Inmuno 3D-FISH

Materiales:

Anticuerpos	Marca	Núm de catálogo
RNA Pol II (S5) [4H8]	Abcam	ab5408
Anti-goat IgG Alexa Fluor 647	Invitrogen	A-21235
BCR/ABL1 dual color	Abbott Molecular, Vysis	30-191032

Tabla 11.3: Anticuerpos para la Inmuno 3D FISH

Reactivos	Marca	Núm de catálogo
PFA (Paraformaldehído al 37(%))	JT Baker	2106-03
Tritón X-100	Sigma-Aldrich	9036-19-5
RNAasa	Thermo Scientific	EN0531
Inhibidor de RNA	Promega	N211B
Tween	Sigma	P9416
BSA (Suero bovino de albúmina)	Thermo Fisher	26140087
Poli-L-Lisina	Sigma-Aldrich	25988-63-0
FAM (Formamida)	Promega	H5051
PBS (Buffer fosfato alcalino) 1X	Gibco	10010-023

Tabla 11.4: Reactivos para la Inmuno 3D FISH

Soluciones	Composición
PFA 2(%)	Pesar 2 g/100 mL de paraformaldehído en PBS1X y calentar a 62°C. Ajustar pH a 7.0 y disolver
20xSSC	Pesar 175.3g de NaCl y 88.2g de Citrato de Sodio. Adicionar 80mL de agua estéril y esterilizar en el autoclave
BS (Solución bloqueadora)	Pesar 125 mg BSA (albúmina de suero bovino). Adicionar 500 μ L suero de cabra, 5 μ L Tween 20 y 4.47 mL PBS 1X estéril
Buffer de sondas	Añadir 3.15 μ L PBS, 0.1 μ L de agua estéril y 0.45 μ L de cada sonda

Tabla 11.5: Soluciones a preparar para la Inmuno 3D FISH

Procedimiento:

Para la realización de este protocolo se requiere una muestra celular fijada con paraformaldehído (PFA) que previamente haya sido resuspendida en PBS a una concentración mínima de 105 células/mL y colocada sobre un portaobjetos tratado con Poli-L-Lisina dentro de una caja petri p60.

1. Remover el PFA de la laminilla con 3 lavados PBS 1X

11. ANEXOS

2. Permeabilizar con Tritón frío al 0.4% y dejar 30 min en el agitador (Orbi-Shaker MP, Benchmark)
3. Incubar a TA por 90 min con 75 μ l de BS en cámara húmeda
4. Incubar a 4°C el anticuerpo primario RNA Pol II (ab5408) toda la noche (40 μ l BS + 0.5 μ L Pol II)
5. Realizar 3 lavados con BSA 0.2% por 3 min a TA en el agitador
6. Incubar a TA por 90 min con el anticuerpo secundario en oscuridad 40 μ l BS+0.4 μ l Alexa 647
7. Enjuagar 3 veces con Tween 0.1X por 5 min a TA en el agitador
8. Fijar con PFA 2% a TA por 2 min
9. Tratar con RNAsa por 1 hr a 37°C
10. Realizar 3 lavados con PBS 1X por 2 min
11. Permeabilizar con tritón frío 0.7% HCL 0.1 M por 20 min en el agitador
12. Realizar 3 lavados con PBS 1X por 2 min
13. Realizar lavados con FAM 50% pH. 7.2 TA por 24 hrs
14. Desnaturalizar a 80°C por 5 min en el horno (Hybrite, Vysis)
15. Preparar las sondas BCR/ABL1 dual color con 5 μ L del buffer de sondas
16. Hibridar las sondas a 37°C por 24 hrs en cámara húmeda
17. Realizar 3 lavados con FAM 37°C por 2 min
18. Realizar 3 lavados con SSC 2X a 37°C por 2 min
19. Realizar 3 lavados con PBS 1X por 2 min
20. Montar laminillas

11.2. Tablas de resultados suplementarias

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a su distancia intergénica menor (DIm)

Muestra	Gen	Distancia	Promedio	Desv. Est.	n
PrEC	BCR	DIm	0.50	0.17	25
	ABL1	DIm	0.51	0.25	25
MOS60	BCR	DIm	0.65	0.30	24
	ABL1	DIm	0.69	0.29	25
MOS61	BCR	DIm	0.93	0.46	25
	ABL1	DIm	0.88	0.50	23
MOS63	BCR	DIm	0.59	0.29	25
	ABL1	DIm	0.75	0.34	25

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a su distancia intergénica mayor (DIMA)

Muestra	Gen	Distancia	Promedio	Desv. Est.	n
PrEC	BCR	DIMA	0.58	0.22	25
	ABL1	DIMA	0.48	0.18	24
MOS60	BCR	DIMA	0.65	0.31	25
	ABL1	DIMA	0.71	0.37	25
MOS61	BCR	DIMA	0.92	0.32	22
	ABL1	DIMA	1.06	0.43	25
MOS63	BCR	DIMA	0.83	0.36	25
	ABL1	DIMA	0.89	0.38	25

Tabla 11.6: Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a las distancias DIm y DIMA por muestra

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a su distancia mínima (min)

Muestra	Gen	Distancia	Promedio	Desv. Est.	n
PrEC	BCR	min	0.41512	0.1338037	25
	ABL1	min	0.38384	0.1699354	25
MOS60	BCR	min	0.52308	0.2068476	25
	ABL1	min	0.5682	0.3232096	25
MOS61	BCR	min	0.834	0.3885423	25
	ABL1	min	0.85792	0.4623285	25
MOS63	BCR	min	0.52248	0.2443478	25
	ABL1	min	0.67704	0.322907	25

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a su distancia máxima (max)

Muestra	Gen	Distancia	Promedio	Desv. Est.	n
PrEC	BCR	max	0.65692	0.1818371	25
	ABL1	max	0.6063333	0.1996734	24
MOS60	BCR	max	0.7829167	0.3264009	24
	ABL1	max	0.83408	0.2874201	25
MOS61	BCR	max	1.0181364	0.3946544	22
	ABL1	max	1.0526522	0.4645507	23
MOS63	BCR	max	0.89684	0.3385647	25
	ABL1	max	0.96572	0.3566964	25

Tabla 11.7: Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a las distancias DIm y DIMA por muestra

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a su distancia intergénica menor (DIm)

Estirpe	Gen	Distancia	Promedio	Desv. Est.	n
PrEC	BCR	DIm	0.50	0.17	25
	ABL1	DIm	0.51	0.25	25
SPM CD34+	BCR	DIm	0.73	0.38	74
	ABL1	DIm	0.77	0.39	73

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a su distancia intergénica mayor (DIMA)

Estirpe	Gen	Distancia	Promedio	Desv. Est.	n
PrEC	BCR	DIMA	0.58	0.22	25
	ABL1	DIMA	0.48	0.18	24
SPM CD34+	BCR	DIMA	0.79	0.35	72
	ABL1	DIMA	0.89	0.42	75

Tabla 11.8: Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a las distancias DIm y DIMA por estirpe

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a su distancia mínima (min)

Estirpe	Gen	Distancia	Promedio	Desv. Est.	n
PrEC	BCR	min	0.42	0.13	25
	ABL1	min	0.38	0.17	25
SPM CD34+	BCR	min	0.63	0.32	75
	ABL1	min	0.70	0.39	75

Distancia de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a su distancia máxima (max)

Estirpe	Gen	Distancia	Promedio	Desv. Est.	n
PrEC	BCR	max	0.66	0.18	25
	ABL1	max	0.61	0.20	24
SPM CD34+	BCR	max	0.90	0.36	71
	ABL1	max	0.95	0.38	73

Tabla 11.9: Promedio de las distancias de cada gen a su fábrica transcripcional más cercana de acuerdo a las distancias DIm y DIMA por estirpe