



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN POR EL lncRNA TERRA
EN LA RECUPERACIÓN TELOMÉRICA
DE UN MODELO DE CÉLULAS CANCEROSAS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
DIEGO ADRIAN OLIVA RICO

DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, 29 AGOSTO DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN	6
1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL TELÓMERO.....	6
1.1 EL LOOP TELOMÉRICO Y EL COMPLEJO SHELTERINA	8
1.2 SECUENCIA Y CROMATINA SUBTELOMÉRICAS.....	10
2. RNA TELOMÉRICO: TERRA	12
2.1 TRANSCRIPCIÓN DEL RNA TELOMÉRICO	16
2.2 RECLUTAMIENTO Y DEGRADACIÓN DE TERRA.....	18
3. PAPEL DE TERRA EN CÁNCER.....	19
PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	20
● PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
● HIPÓTESIS.....	20
● OBJETIVO	20
● DISEÑO EXPERIMENTAL	20
METODOLOGÍA	22
● CULTIVO CELULAR.....	22
● PREPARACIÓN DE METAFASES	22
● ANÁLISIS DE CARIOTIPO.....	23
● NORTHERN BLOT	23
● DISEÑO DE PRIMERS SUBTELOMÉRICOS	24
● ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TELOMERASA Y TERRA POR QPCR	25
● ANÁLISIS DE LONGITUD TELOMÉRICA POR Q-FISH.....	25
● PROCESAMIENTO DE IMÁGENES	26
● INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA	27

RESULTADOS	29
1. ANÁLISIS DE CARIOTIPO.....	29
2. EXPRESIÓN DE TELOMERASA.....	32
3. NIVELES GLOBALES DE TERRA.....	33
4. EXPRESIÓN LOCUS-ESPECÍFICA DE TERRA.....	34
5. LONGITUD TELOMÉRICA GLOBAL	37
6. ANÁLISIS DE LA LONGITUD TELOMÉRICA POR CROMOSOMA.....	39
7. LONGITUD TELOMÉRICA ESPECÍFICA EN LOS LOCI 5P Y 10Q	41
8. ANÁLISIS DE LA CROMATINA SUBTELOMÉRICA.....	44
8.1. HETEROCROMATINA EN LAS CÉLULAS SC.....	44
8.2. HETEROCROMATINA EN LAS CÉLULAS K562.....	46
8.3. Eucromatina en las células SC	46
8.4. Eucromatina en las células K562.....	49
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	62
ANEXOS	65
● ÍNDICE DE FIGURAS	65
● LISTA DE ABREVIATURAS.....	66
● LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS Y SUS SECUENCIA	69
● PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL DOCTORADO	70
REFERENCIAS.....	72

RESUMEN

El RNA largo no codificante con repetidos teloméricos (TERRA, por sus siglas en inglés) ha sido asociado con la homeostasis telomérica, el reclutamiento de Telomerasa y el proceso de recuperación cromosómica; sin embargo, el impacto de esta asociación no ha sido estudiado por completo durante el proceso carcinogénico. Es complicado determinar si los cambios en la expresión de TERRA son una causa o una consecuencia de la transformación celular, debido a que los estudios se realizan usualmente en células cancerosas o en muestras de tumores. Para evaluar el papel que este RNA largo no codificante (lncRNA) desempeña en el envejecimiento celular y la recuperación cromosómica estudiamos la integridad telomérica y la expresión de TERRA durante el establecimiento de una clona de células mieloides no transformadas. Encontramos que la expresión reducida de TERRA puede alterar la homeostasis telomérica de algunos loci pero la expresión de este lncRNA solo se alteró cuando la metilación de dominios subteloméricos con cromatina bivalente se vió comprometida

ABSTRACT

The long non-coding RNA Telomeric Repeat-containing RNA (TERRA) has been associated with telomeric homeostasis, Telomerase recruitment, and the process of $\uparrow\uparrow\beta\uparrow$ chromosome healing; nevertheless, the impact of this association is yet to be reviewed during the carcinogenic process. Determining whether changes in TERRA expression are a cause or a consequence of cell transformation is a complex task because studies are usually carried out using either cancerous cells or tumor samples. In order to determine the role of this lncRNA in cellular aging and chromosome healing, we evaluated telomeric integrity and TERRA expression during the establishment of a clone of untransformed myeloid cells. We found that a reduced expression of TERRA disturbed the telomeric homeostasis of certain loci, but the expression of the lncRNA was only affected when the methylation of subtelomeric bivalent chromatin domains was compromised.

INTRODUCCIÓN

1. Estructura y función del telómero

Los extremos de los cromosomas lineales están sujetos a un proceso inevitable de erosión (1,2). Esta erosión es el resultado de la replicación ineficiente de los cromosomas lineales, ya que la DNA Polimerasa II (DNA Pol II) es incapaz de completar la cadena rezagada de DNA una vez que se termina la síntesis de la cadena líder (3,4). Por lo tanto, se pierden entre 50 y 200 pares de bases (pb) después de cada ronda de replicación celular (5,6), lo cual deja expuesta una porción excedente de DNA monocatenario en el extremo de la molécula (7). Este desgaste es la razón del número limitado de divisiones que una célula puede tener (límite de Hayflick) y contribuye al proceso normal de envejecimiento (1,8–12). (Figura 1).

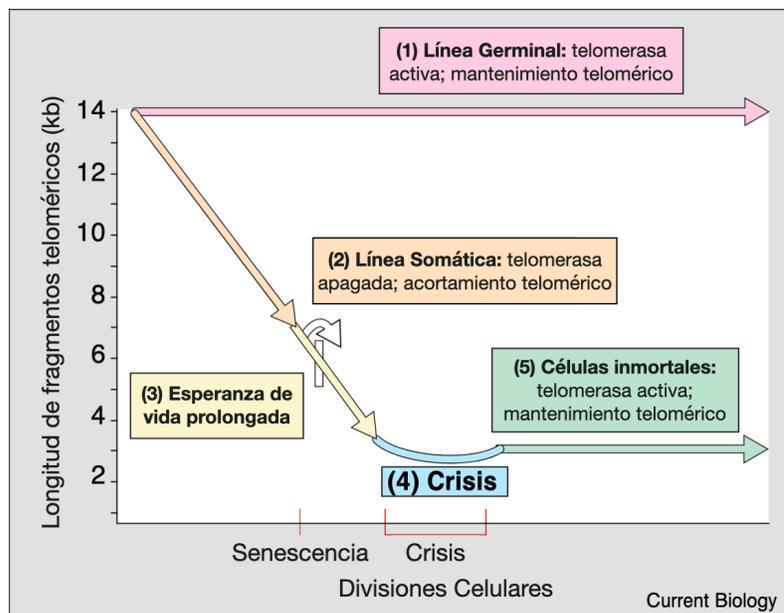


Figura 1. Envejecimiento celular y límite de Hayflick.

La teoría del origen telomérico del envejecimiento celular y la immortalización propone que: (1) Los telómeros son mantenidos en una línea germinal debido a la presencia de la telomerasa. (2) Los telómeros se acortan debido al problema de la replicación terminal en células somáticas que no expresan la telomerasa. (3) Existen factores, como algunos oncogenes, que pueden extender la esperanza de vida celular ignorando las señales

de senescencia. (4) En los cultivos celulares en donde hay células con telómeros cortos se lleva a cabo un periodo de crisis en donde muere gran parte de la población. (5) Las clonas celulares inmortales que resultan de esta crisis han reactivado la expresión de la telomerasa y así mantienen, e incluso alargan, sus telómeros. Modificado de Greider, 1998 (13).

Los extremos de los cromosomas lineales deben protegerse de factores endógenos que pueden conducir a su acortamiento prematuro; esto se logra gracias a los telómeros,

complejos nucleoprotéicos que se forman en los extremos de los cromosomas lineales (14–17). Los telómeros son segmentos de DNA repetitivo que facilitan la protección de los extremos cromosómicos y aseguran su estabilidad a través de interacciones con proteínas de unión a DNA de doble cadena (dsDNA) y cadena sencilla (ssDNA) que modifican la arquitectura de los extremos cromosómicos para evitar que éstos sean procesados como una ruptura de doble cadena de DNA (DSB) (16,2,18). (Figura 2) Por esta razón se considera que los telómeros promueven la estabilidad genómica (15) principalmente a través de la acción directa de recubrir los extremos de los cromosomas (19,20).

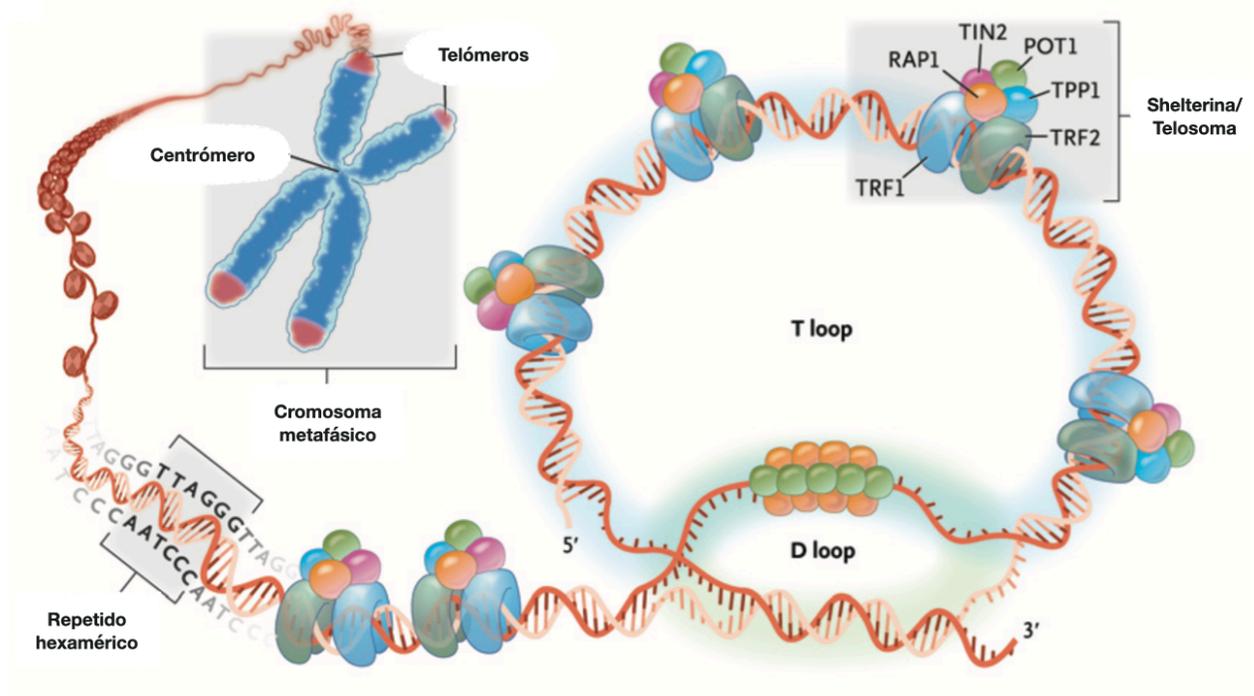


Figura 2. Estructura del telómero. Los telómeros se localizan en los extremos de los cromosomas lineales; en células humanas se componen de cientos de repetidos hexaméricos en tandem con la secuencia TTAGGG en la hebra líder y CCCTAA en la rezagada. Estas secuencias están protegidas por un complejo proteico llamado shelterina o telosoma, compuesto por las proteínas TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 y RAP1. El extremo 3' de la hebra líder termina en un excedente de DNA de cadena sencilla que se dobla sobre sí mismo para invadir la porción de doble cadena del telómero, dando lugar a las asas teloméricas. Modificado de Calado & Young, 2009 (21).

Debido a que los telómeros contienen secuencias repetitivas en tándem, la porción excedente de ssDNA de un cromosoma puede recombinar con las secuencias teloméricas de dsDNA de

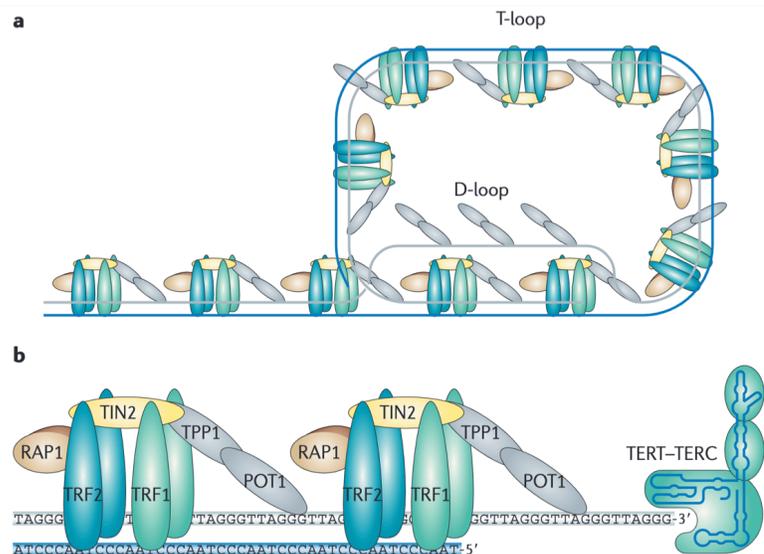
otro cromosoma; esta recombinación puede conducir al alargamiento anormal de algunos telómeros a expensas del desgaste acelerado de otros (22,23). Otro fenómeno que puede resultar de la ineficiente protección de los cromosomas es la fusión de secuencias teloméricas a través del mecanismo de reparación del DNA por unión de extremos no homólogos (NHEJ); en presencia de DSBs, la vía de NHEJ se encarga de capturar los extremos que se originaron por la ruptura de la molécula de DNA y fusionarlos por medio de una polimerización aleatoria, que ignora la secuencia original que unía los extremos (24). En este contexto pueden ocurrir eventos intra-cromosómicos o inter-cromosómicos de fusiones teloméricas, generando puentes anafásicos y ciclos de ruptura y fusión que incrementan la erosión telomérica que ocurre con cada división celular (17). Debido al impacto que la inestabilidad telomérica puede tener a nivel genómico el telómero emplea varios mecanismos para lograr garantizar la integridad del material genético.

1.1 El loop telomérico y el complejo Shelterina

Dado el riesgo que representa para el telómero tener una porción de ssDNA, la cadena no apareada debe protegerse de manera eficiente para evitar el desgaste prematuro. Esta protección se logra mediante la reestructuración física de la molécula, proceso que es estabilizado por el complejo de Shelterina (16,25). Este complejo, también llamado Telosoma (26), consiste en un ensamble hetero-hexamérico de proteínas que se asocian con diferentes porciones del telómero. Los Factores de unión a repetidos teloméricos 1 y 2 (TRF1 y TRF2, respectivamente) funcionan como homodímeros que reconocen la porción de dsDNA del telómero, mientras que la proteína Protección de telómeros 1 (POT1) se asocia con la porción de ssDNA (27). Las tres proteínas interactúan indirectamente entre sí a través de sus asociaciones con el Factor nuclear 2 de interacción con TRF-1 (TIN2) y el Homólogo de proteína de displasia adrenocortical (ACD, también llamado TPP1, PTP1, PIP1 o TINT1). TIN2 funciona como un puente entre los elementos del complejo Shelterin que reconocen dsDNA y ssDNA, ya que se une a TRF1/2 para luego reclutar el complejo TPP1-POT1. Además, el dominio amino-terminal de TPP1 puede interactuar con la telomerasa y reclutarla a los telómeros (27). El último componente del complejo hexamérico es la Proteína activadora/

represora 1 (RAP1, también llamada Proteína 1 de interacción con TRF2), que se une solo a TRF2. Aunque la presencia de RAP1 en el complejo shelterina impide la recombinación de los telómeros, la proteína no es esencial para el establecimiento del telosoma. Debido a la asociación simultánea de TIN2 con TRF1/2 y el complejo TPP1-POT1 el ssDNA del telómero se dobla sobre sí mismo, acercándose hacia la porción de dsDNA. Esta estructura se conoce como asa telomérica (T-loop) y es uno de los tres tipos de estructuras de asa que se encuentran en el telómero (18). Una segunda estructura de asa se forma cuando la hebra de ssDNA del T-loop desplaza a una de las cadenas de la región telomérica de dsDNA sobre la cual se pliega. Esta hebra de ssDNA se empareja con la secuencia complementaria expuesta y da lugar al asa de desplazamiento (D-loop) la cual, en conjunto con el complejo shelterin, estabilizan el T-loop. Estas conformaciones protegen al ssDNA telomérico de la acción catalítica de exonucleasas e impiden la recombinación inter-telomérica. (Figura 3).

Figura 3. El complejo shelterina y las asas teloméricas. a) Esquema del modelo de unión del complejo shelterina al telómero en la conformación T-loop. El telómero tiene una porción de cadena sencilla de 150-200pb llamada excedente de la hebra G (en color gris), que invade la región de DNA de doble cadena del telómero para formar un asa de protección llamada T-loop, así como un asa de desplazamiento en el sitio de la invasión, D-loop. b)



Representación esquemática de la telomerasa y las proteínas de shelterina unidas al telómero. El complejo está compuesto por los Factores de unión a repetidos teloméricos 1 y 2 (TRF1 y TRF2), la Proteína activadora/represora 1 (RAP1), la proteína Protección de telómeros 1 (POT1), el Factor nuclear 2 de interacción con TRF-1 (TIN2) y el Homólogo de proteína de displasia adrenocortical (ACD, también llamado TPP1, PTOP, PIP1 o TINT1). TRF1/2 se unen directamente al dsDNA telomérico, TIN2 se une simultáneamente a TRF1/2 y recluta al complejo TPP1-POT1, el cual se une al ssDNA a través de POT1. La telomerasa está compuesta por una subunidad catalítica proteica (TERT) y una secuencia modelo de RNA (TERC) a partir de la cual se sintetiza el DNA telomérico. Modificado de Martínez & Blasco, 2011 (27).

1.2. Secuencia y cromatina subteloméricas

La protección de los telómeros no está limitada a componentes proteicos sino que incluye a las secuencias de DNA adyacentes. Las secuencias subteloméricas se caracterizan por presentar una degeneración gradual de la secuencia original del repetido telomérico. Estos repetidos asociados al telómero (TAR, por sus siglas en inglés) (28) están pseudo-conservados en la mayoría de los cromosomas humanos y varían en su longitud y similitud con la secuencia canónica TTAGGG (29). Sin embargo, a medida que las secuencias TAR se alejan del telómero se vuelven específicas para cada cromosoma.

Las regiones TAR son propensas al intercambio de cromátidas hermanas y recombinan con una mayor tasa de incidencia entre más cerca estén del repetido telomérico, a diferencia de las secuencias TAR-like intra-cromosómicas, donde los eventos de recombinación son escasos (30). La diferente tasa de recombinación entre secuencias similares, localizadas en diferentes porciones cromosómicas, pone en evidencia que hay mecanismos de protección activos en los segmentos subterminales de los cromosomas que evitan la recombinación telomérica. Esta protección adicional es mediada por la cromatina telomérica y subtelomérica, responsable de la estabilidad de las secuencias adyacentes al telómero.

En los nucleosomas de la cromatina telomérica y subtelomérica hay marcas de histonas asociadas a heterocromatina, similares a las marcas presentes en la heterocromatina constitutiva de las regiones pericentroméricas (31). Estas marcas permiten la compactación de los nucleosomas en las regiones teloméricas y subteloméricas, impidiendo la recombinación por intercambio de cromátidas hermanas o la pérdida espontánea de secuencias teloméricas por DSBs. Las marcas de histonas que predominan en las regiones terminales de los cromosomas son la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3) y la trimetilación de la lisina 20 en la histona 4 (H4K20me3); las metiltransferasas de histonas Homólogo 1 y 2 del supresor de variegación 3-9 (SUV39H1/H2) y Homólogo 1 del supresor de variegación 4-20 (SUV420H1) establecen y mantienen dichas marcas en conjunto con el Homólogo alfa de la proteína de heterocromatina 1 (HP1A) (32,33,34). (Figura 4).

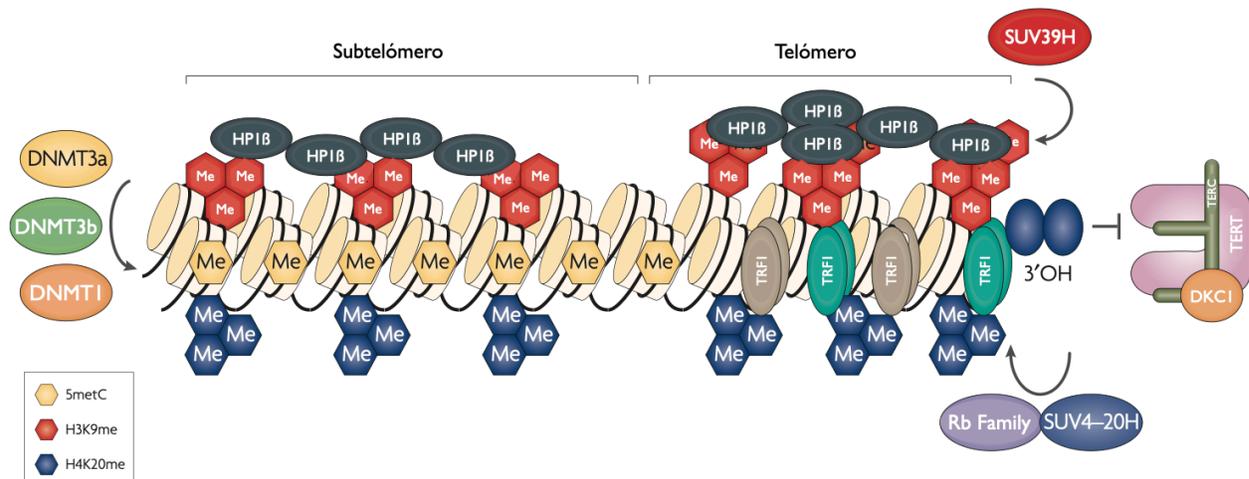


Figura 4. Mantenimiento de la cromatina subtelo mérica. Tanto la cromatina telomérica como la subtelo mérica se encuentran enriquecidas en la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3) y de la lisina 20 en la histona 4 (H4K20me3), así como en la unión de las isoformas de la proteína de heterocromatina 1 (HP1). Ambas modificaciones de histonas son llevadas a cabo por las metiltransferasas de histonas SUV39H y SUV4-20H respectivamente. La asociación de proteínas de la familia Retinoblastoma (RB) con SUV4-20H favorece la eficiente trimetilación de H4K20. Adicionalmente, el DNA subtelo mérico se encuentra altamente metilado por acción de las enzimas DNMT1, DNMT3a y DNMT3b; la metilación del DNA inhibe la recombinación telomérica. Tanto la trimetilación de histonas como la metilación del DNA se han reportado como reguladores negativos del alargamiento telomérico inhibiendo la actividad de la holoenzima telomerasa compuesta por la unida catalítica (TERT), una secuencia modelo de RNA (TERC) y la proteína diskeratosis congénita 1(DKC1). Modificado de Blasco, 2007 (31).

Además de estas modificaciones post-traduccionales la estructura de la cromatina subtelo mérica también es regulada por la metilación directa del DNA, que es llevada a cabo por la DNA metil-transferasa (DNMT) 3a/3b y conservada por la DNMT1. La metilación del DNA está involucrada en la regulación negativa de la longitud telomérica y es esencial para evitar la recombinación homóloga (HR) inter-telomérica (32). Cabe mencionar que el DNA del telómero se encuentra libre de metilación, ya que esta modificación ocurre en contexto CpG y la secuencia repetida del telómero carece de dicho dímero (5'-TTAGGG-3'). En cambio, la región subtelo mérica sí es propensa a esta modificación y se encuentra hipermetilada, una condición epigenética implicada en el silenciamiento transcripcional de los genes asociados a secuencias metiladas. Sin embargo, se ha descubierto que, a pesar de la baja densidad

génica y del DNA hipermetilado que caracteriza a las secuencias sub-teloméricas, estas regiones son transcripcionalmente activas y dan origen a RNAs no codificantes largos (lncRNAs).

Los lncRNAs se definen como transcritos mayores a 200pb que carecen de un marco de lectura abierto (ORF), tienen una tasa de transcripción muy baja y presentan una expresión diferencial entre tejidos, lo que sugiere que se expresan de manera tejido-específica (35). Estas moléculas pueden sufrir splicing alternativo, generar isoformas (36) y pueden localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma por lo que presentan modificaciones en sus extremos 5' y 3' para su protección. La estructura de 7 metil-guanosina (m7G) protege al extremo 5' y la poli-adenilación protege al extremo 3', sin embargo estas modificaciones pueden no estar presentes en todos los lncRNAs.

2. RNA telomérico: TERRA

Las moléculas no codificantes que se transcriben de las regiones subteloméricas están involucradas en el mantenimiento y la regulación de la homeostasis telomérica. Estos RNAs llevan parte de la secuencia telomérica en su porción 3' (5'-UUAGGG-3') por lo que reciben el nombre TERRA, por las siglas en inglés del término: "RNA con repetidos teloméricos". Esta molécula funciona tanto en cis como en trans y puede generarse a partir de casi todos los telómeros en células eucariontes, desde levadura hasta mamíferos (37,38). Se ha propuesto que está conservada de manera evolutiva en todos los vertebrados, ya que también se ha detectado en el RNA total del pez zebra (38).

TERRA siempre se transcribe en dirección centrómero-telómero y tiene una longitud variable, dependiendo de la localización de su sitio de inicio de la transcripción (TSS) a lo largo del locus subtelomérico del cual se transcribe. Es por esta razón que las moléculas de TERRA pueden tener desde 100pb hasta 9 kilobases (kb) de longitud (37). La RNA Polimerasa II (Pol II) es la enzima responsable de la transcripción de TERRA, aunque este lncRNA también puede ser transcrito por otras polimerasas, aunque con una tasa mucho menor (38,39). Como

es característico en los productos de la RNA Pol II, TERRA es poli-adenilado en su extremo 3', sin embargo la cola de poli-A solo esta presente en una porción del TERRA transcrito. Aunque la proporción de lncRNA poli-adenilado varía dependiendo del tipo celular, se ha descrito que únicamente el 7% de este lncRNA se encuentra poli-adenilado en células HeLa (39) (Figura 5). En cualquier caso, cuando TERRA cuenta con una cola de poli-A la molécula se vuelve más dinámica; esta característica es esencial para entender cómo es que TERRA puede proteger todos los telómeros a pesar de solo ser transcrita en algunos loci teloméricos. Una vez transcritas, las moléculas poli-adeniladas de TERRA pueden disociarse de Pol II y difundir a través del nucleoplasma para asociarse a otro telómero en donde TERRA no se exprese.

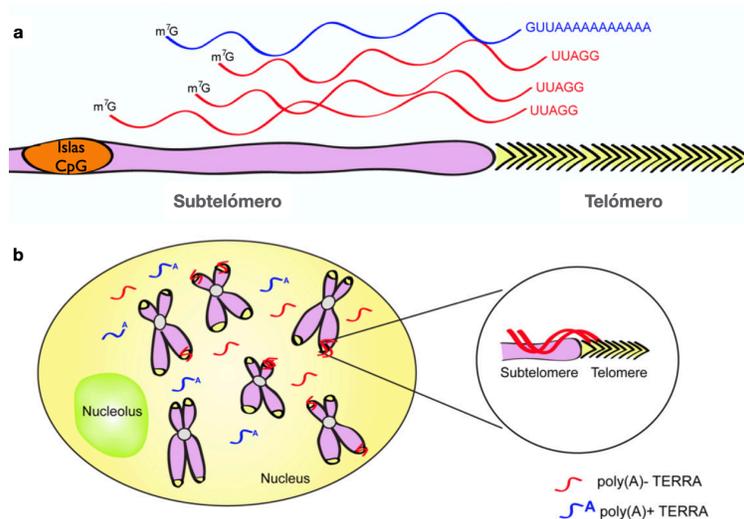


Figura 5. Transcripción de TERRA. **a)** La transcripción de TERRA inicia en varios loci dentro de la región subtelo mérica y continua hacia los extremos de los cromosomas hasta 400pb dentro del repetido telomérico. El extremo 5' de TERRA tiene estructuras de 7-metilguanosa (m7G) que protegen al lncRNA. Solo una fracción (7%) de TERRA esta poli-adenilado en el extremo 3'. **b)** TERRA Poli(A)+ se encuentra en el nucleoplasma; el 50% de TERRA Poli(A)- se encuentra asociado a cromatina y enriquecido en los telómeros. Modificado de Feuerhahn et al., 2010 (40).

El mecanismo a través del cual TERRA se une a los telómeros que no la transcriben, es crucial para la integridad telomérica de los cromosomas y por lo tanto para la integridad genómica de la célula. Esta importancia radica en la facultad que tiene TERRA por promover la compactación de la cromatina en el locus en donde se une, gracias a la asociación entre TERRA, TRF2 y el Complejo de reconocimiento del origen (ORC) que permite a este lncRNA interactuar de manera indirecta con las isoformas de HP1. La interacción con elementos

característicos de heterocromatina peri-centromérica constitutiva (41) permite a TERRA asistir en la propagación de la heterocromatina en el telómero (42), reclutando las isoformas de HP1 a las regiones marcadas con H3K9me3 y promoviendo el eventual reclutamiento de SUV39H1.

Es importante mencionar que la compactación de la cromatina no es la única manera en la que se protege la integridad del genoma; las asas teloméricas (loops) son responsables de la protección de la hebra G, nombre que recibe el extremo 3' excedente en los cromosomas lineales y TERRA también está involucrada en su formación. En interfase, cuando el ssDNA está en conformación de asa, la hebra G se encuentra protegida contra su degradación, sin embargo todos los loops son desmantelados durante la replicación de DNA con la finalidad de evitar que se detengan las horquillas de replicación. Esto deja expuestos los extremos 3' de los cromosomas al concluir la fase de síntesis (Fase S), cuando los niveles de TERRA son más bajos. En estos momentos la hebra G se puede proteger contra el efecto de exonucleasas formando cuadruplex G (G-quads), estructuras donde cuatro guanidinas forman enlaces Hoogsteen estables a lo largo de una misma cadena de DNA (16,43,44). En los telómeros, los cuadruplex G también pueden formarse de manera inter-catenaria o incluso de manera híbrida, combinando al ssDNA con las moléculas de TERRA desplazadas de las asas teloméricas (45) (Figura 6).

Los cuadruplex G también forman parte del complejo Telomero-Shelterina debido a la fuerte interacción que se presenta entre estas estructuras y la proteína POT1, así que los G-quads protegen a la hebra G manteniéndola anclada al complejo shelterina en interfase, o formando estructuras híbridas de DNA/RNA libres de proteínas, durante la fase de replicación (16,48). Es importante mencionar que, en este último caso, no está claro hasta qué punto pueden los cuadruplex G mantener la integridad del cromosoma por sí solos, ya que en ausencia de las proteínas de unión a ssDNA de shelterina la resección telomérica ocurre de manera acelerada.

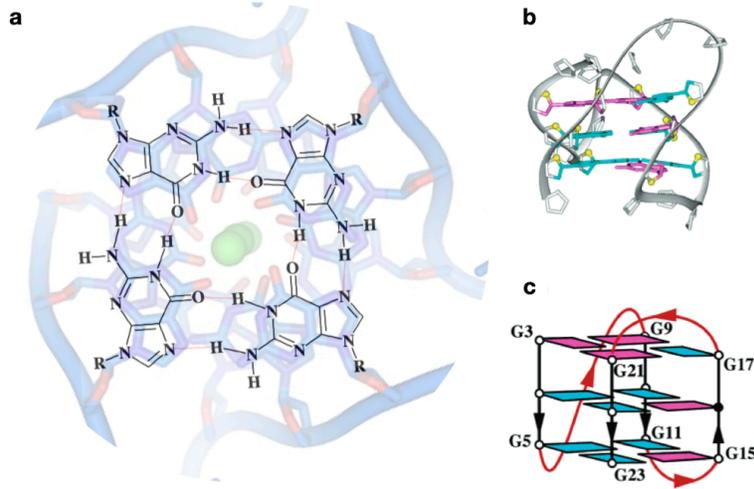


Figura 6. El cuadruplex de guanidinas.

a) Estructura de un arreglo coplanar de guaninas. Existen dos posibles conformaciones espaciales para la formación de un cuadruplex intramolecular: en presencia de Na⁺ o en presencia de K⁺. **b)** Estructura en listón de un cuadruplex de guaninas en solución de K⁺, con cuatro repetidos teloméricos d[TAGGG(TTAGGG)3]. Guaninas en conformación sin: verde, guaninas en conformación anti: rosa, backbone: gris, fosfatos: amarillo. **c)** Esquema

representativo de un grupo de tres cuadruplex de guaninas con topología (3+1) en solución de K⁺. De las cuatro hebras involucradas tres se orientan en la misma dirección y una en dirección opuesta. Los cuadruplex de guaninas coplanares en una cadena con cuatro repetidos teloméricos se integran en dos grupos anti,sin,sin,sin y un grupo sin,anti,anti,anti con el mismo código de color descrito en b). Modificados de a) Riou et al., 2006; b y c) Luu,et al., 2006 (46,47).

TERRA puede desplazar porciones del dsDNA telomérico, gracias a la complementariedad entre las secuencias y formar cuadruplex G con él, dando lugar a la estructura llamada asa de RNA (R-loop). Ya que esta asociación depende de los repetidos teloméricos presentes en TERRA (49), este lncRNA se puede unir prácticamente a cualquier telómero independientemente del cromosoma a partir del cual se haya transcrito, siempre y cuando pueda difundir desde el sitio de transcripción hasta otros loci cromosómicos. Así es como TERRA recluta de manera específica las proteínas antes descritas a la región telomérica, promoviendo la acumulación y la expansión de marcas de heterocromatina hacia la región sub-telomérica. Se han descubierto dominios protéicos que pueden reconocer y unirse específicamente a estructura del cuadruplex G y no a la secuencia del repetido telomérico (41,42,50), así que la estabilización del telómero puede dar inicio incluso en ausencia de proteínas teloméricas, ya que el ssDNA del telómero puede formar cuadruplex G híbridos con TERRA en cuanto termina el proceso de replicación, pero antes de que se haya formado el telosoma. Este proceso evita la activación de mecanismos de reparación del DNA aún en

presencia de ssDNA y simultáneamente, crea sitios de anclaje para TRF1, TRF2 y las proteínas modificadoras de cromatina que restaurarán las marcas de heterocromatina tanto en la región telomérica como en la sub-telomérica.

2.1. Transcripción del RNA telomérico

Los sitios de inicio de la transcripción (TSSs, por sus siglas en inglés) de TERRA se encuentran en la región subtelomérica de la mayoría de los cromosomas y la cromatina en estos loci debe permanecer preparada para una transcripción oportuna al inicio de G2, cuando los niveles de TERRA comienzan a incrementar. Sin embargo, la cromatina subtelomérica no debe permitir la constante síntesis de este lncRNA. Como ya se mencionó, la cromatina telomérica permanece compactada para evitar eventos de recombinación, es por esto que las marcas predominantes a lo largo de las regiones terminales de los cromosomas están asociadas con la compactación de la cromatina, la represión transcripcional (H3K9me3) y el silenciamiento de promotores asociados (H4K20me3) (51). Sin embargo las histonas en los TSSs de TERRA también están enriquecidos con una marca post-traducciona asociada a promotores activos: la trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3). Esta marca se encuentra embebida en cromatina facultativa, misma que se caracteriza por estar enriquecida con la trimetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me3). A pesar de estar relacionada con un estado represivo para la transcripción, la presencia de H3K27me3 en sitios marcados con H3K4me3 permite a la heterocromatina estar en un estado ambivalente que facilita la transcripción a partir de promotores y TSSs cercanos (52).

La conformación abierta en la cromatina subtelomérica se mantiene gracias a la presencia de secuencias aislantes que son reconocidas por el factor de unión a CCCTC (CTCF). Esta es una proteína con dedos de zinc que funciona como barrera física para impedir la propagación de las marcas de heterocromatina constitutiva más allá de los sitios delimitados por su unión (53). Para cumplir esta función CTCF se une a cohesiona, formando asas de cromatina y estabilizándolas (41,53), lo cual mantiene regiones de cromatina abierta en medio de cromatina silenciada. Sin embargo, la transcripción telomérica no se limita únicamente a la

presencia de CTCF y su interacción con RNA Pol II, sino que TRF1 también puede interactuar con el dominio carboxilo-terminal de la polimerasa. A pesar de que la localización de RNA Pol II al telómero no depende por completo de su interacción con TRF1, el número de transcritos de TERRA sí disminuye al comprometer la expresión de TRF1 (41).

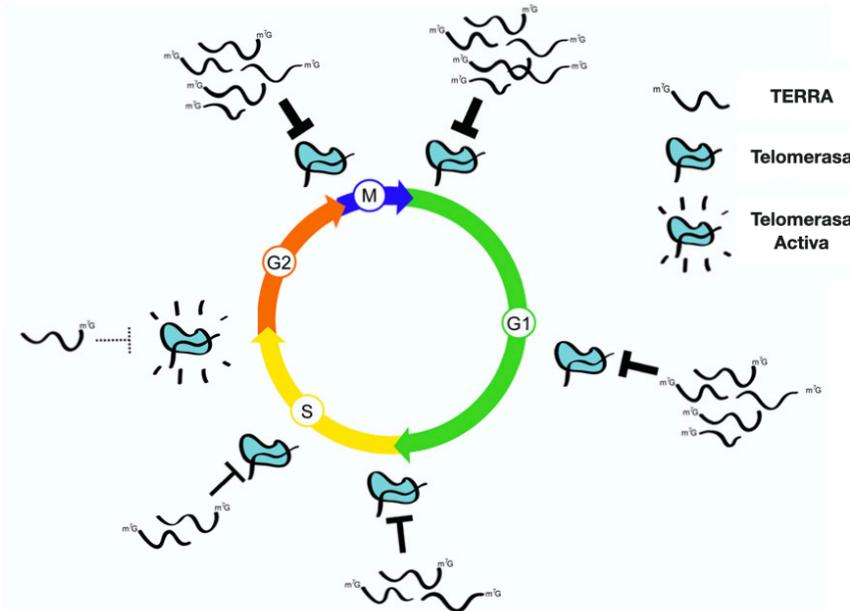


Figura 7. Acumulación de TERRA a través del ciclo celular. Los niveles de TERRA se encuentran en su punto más bajo en fase S tardía y G2 temprana, lo cual corresponde al momento de replicación telomérica y a la extensión telomérica cuando la telomerasa está activa. En este contexto TERRA mantiene inhibida a la telomerasa fuera de fase S. Modificado de Feuerhahn et al., 2010 (40).

La región subteloamérica es transcripcionalmente restrictiva y las marcas de cromatina alrededor de los TSS deben ser reguladas para evitar el silenciamiento inapropiado del locus; sin embargo la sobre-expresión de TERRA también puede ser detrimental para la célula. Un patrón aberrante en las marcas de histonas puede conducir a la sobre-expresión de TERRA (54) cuando se produce un acortamiento telomérico (55,56), ya sea por la actividad de DNAsas en los extremos desprotegidos de los cromosomas o por el colapso de horquillas de replicación en la cercanía de los repetidos teloméricos. El acortamiento telomérico acelerado de un cromosoma conlleva a la pérdida gradual de la heterocromatina constitutiva ya que, cuando no hay suficiente cromatina telomérica con las modificaciones de histonas H3K9me3 y H4K20me3, dichas marcas no pueden ser propagadas con eficiencia al término de la replicación del DNA (57). La pérdida de estas marcas ocurre de manera simultánea con la disminución en la metilación del DNA de la región subteloamérica y con un incremento en la

acetilación de las histonas 3 y 4, lo cual se asocia a cromatina abierta y permisiva a la transcripción. De este manera, un telómero acortado puede sobre-expresar TERRA y con ello comprometer la viabilidad celular ya que, al incrementar la concentración nuclear de este lncRNA se dificulta su degradación durante la transición S-G2, momento en el que TERRA debe disociarse de los telómeros, impidiendo la progresión de las horquillas de replicación (Figura 7).

2.2. Reclutamiento y degradación de TERRA

La transcripción elevada de la molécula TERRA puede dar inicio al proceso de recuperación telomérica, ya que este lncRNA puede reclutar a la transcriptasa reversa telomérica (telomerasa) de manera específica; de hecho, se ha reportado que en *Saccharomyces cerevisiae* TERRA es 10 veces más propenso a reclutar a la telomerasa al telómero del cual se transcribió (58).

Aunado a esto, en células humanas se ha descrito que la extensión telomérica conlleva al aumento en la densidad de H3K9me3 en regiones subteloómicas, lo cual conduce al silenciamiento de TERRA, mediado por HP1A y SUV39H1, una vez que la secuencia telomérica ha sido extendida (58). Tanto el restablecimiento de la heterocromatina telomérica después de la acción de la telomerasa, así como el silenciamiento parcial de TERRA son procesos cruciales para la homeostasis celular, ya que la acumulación de TERRA en los telómeros puede conducir al estancamiento de las polimerasas al término de la fase de síntesis (S) del ciclo celular y el colapso de una horquilla de replicación en las regiones terminales de los cromosomas genera una pérdida considerable de DNA, en comparación con las 200pb que se pierden normalmente después de cada ronda de replicación (59). Es por esto que la sobre-expresión de TERRA se considera perjudicial, puesto que deja a la célula con dos posibles resultados: cortar la porción no replicada del DNA y perder secuencias teloméricas para permitir que termine la fase S, o dar inicio a un proceso de muerte celular programada a causa del largo tiempo de arresto del ciclo celular en esta fase (60,61).

3. Papel de TERRA en cáncer

Considerando el papel central que TERRA tiene en el mantenimiento de la homeostasis telomérica, este lncRNA puede tener un impacto considerable en el proceso de envejecimiento celular y el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, regulando eventos decisivos a lo largo de los múltiples pasos del proceso de tumorigénesis. En esta enfermedad, las células se transforman al adquirir marcadores específicos durante la tumorigénesis, que pueden conducir a un fenotipo maligno (45,62,63); una de estas características, observada en todas las células cancerosas, es el potencial ilimitado de replicación (64).

Esta replicación exacerbada debe a la recuperación de las secuencias teloméricas que se pierden después de cada división celular y TERRA participa en la regulación de este proceso. La expresión de TERRA correlaciona con la actividad de la telomerasa en las células que transcriben la unidad catalítica de dicha enzima, hTERT, lo cual hace a los telómeros que transcriben TERRA los blancos más frecuentemente extendidos (65). En células que no expresan hTERT la expresión de TERRA está asociada con el acortamiento acelerado del telómero (66), lo que prepara al telómero para su recombinación en células que recurren al alargamiento alternativo de los telómeros (ALT). Este fenotipo regenerador de telómeros, sustentado ya sea por la expresión de la telomerasa o por la recombinación telomérica, es esencial para la continuación del linaje celular transformado (8,64,67–70), pero el establecimiento de una clona celular maligna depende de que se lleve a cabo un proceso de recuperación telomérica (20,27,71–75).

PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

Planteamiento del problema

A pesar de la evidencia acerca de la relación entre el proceso de tumorigénesis y la pérdida de la homeostasis telomérica, la consecuente adquisición del potencial ilimitado de replicación se considera únicamente un marcador facilitador para la transformación celular (76), de modo que las condiciones fundamentales que inducen la pérdida de la homeostasis telomérica siguen siendo ambiguas. Es por esta razón que resulta crucial estudiar el impacto que la transcripción alterada de TERRA tiene en la iniciación del cáncer, dado que este lncRNA es un componente decisivo para la integridad telomérica, tanto en células normales como en células transformadas.

Hipótesis

Los cambios de expresión del lncRNA TERRA se encontrarán asociados con la pérdida de heterocromatina subteloamérica en los loci a partir de los cuales se transcribe; la pérdida de heterocromatina constitutiva se reflejará en el acortamiento telomérico de los loci en donde la expresión de TERRA cambie.

Objetivo

Evaluar el efecto que los cambios en la expresión de TERRA tienen en el establecimiento y mantenimiento de la heterocromatina subteloamérica, así como su impacto en la longitud telomérica de una clona celular.

Diseño Experimental

Con la finalidad de estudiar el papel de TERRA en el proceso de transformación, decidimos analizar el perfil de expresión de este lncRNA a lo largo de la selección clonal de células no transformadas; dicho proceso sería evaluado analizando el cariotipo de la línea celular SC de la Colección de Cultivos Americanos (ATCC, por sus siglas en inglés), un modelo celular multiclonal, de origen mielóide, propenso a experimentar selección clonal in vitro (77).

Elegimos al linaje celular mieloide como nuestro modelo de estudio para aprovechar la estabilidad que distingue a los telómeros de las neoplasias derivadas de médula ósea (78). Debido a que en última instancia la expresión alterada de TERRA se vería reflejada en la estabilidad telomérica, decidimos monitorizar la longitud telomérica y la compactación de la cromatina subtelomérica, para asociar las fluctuaciones en la transcripción de TERRA con los cambios generados por el envejecimiento celular de nuestro modelo o por un proceso de selección clonal.

Debido a que nuestro propósito era evaluar la estabilidad telomérica, los resultados obtenidos del análisis de expresión, las mediciones de longitud telomérica y el enriquecimiento de marcas de cromatina fueron comparados entre SC, la línea celular no transformada y K562, una línea de origen leucémico (79).

METODOLOGÍA

Cultivo Celular

La línea celular derivada de osteosarcoma, Saos2 (ATCC HTB-85) así como las líneas de origen mieloide K562 y SC (ATCC CCL-243; ATCC CRL-9855) fueron adquiridas de la Colección de Cultivos Americanos. Las líneas K562 y SC fueron cultivadas usando Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (ATCC 30-2005) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (ATCC 30-2020). Además, el medio IMDM usado para las células SC fue suplementado con 2-mercaptoetanol para una concentración final de 0.05mM (Gibcco 31350010), hipoxantina a 0.1 mM y timidina a 0.016 mM (Hypoxanthine - Thymidine (H.T.) 500x concentrate (ATCC 71-X). Las células Saos2 fueron cultivadas usando medio McCoy's 5a (ATCC 30-2007) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (ATCC 30-2020). Todos los cultivos se mantuvieron a 37° C con 5% de CO₂. Las células fueron subcultivadas cuando el cultivo alcanzaba una confluencia del 80% y se consideró como un evento de duplicación poblacional (PD) cuando el cultivo duplicaba la confluencia inicial de siembra. Se tomaron muestras de cada cultivo celular cada 3-4 PDs.

Preparación de Metafases

Las células se incubaron 15' a 37° C en el medio de cultivo correspondiente y se suplementaron con Colcemida a una concentración final de 100ng/ml (Gibcco 15212012). Las células flotantes K562 y SC fueron lavadas con PBS y resuspendidas en solución hipotónica de cloruro de potasio al 0.55%. Las células adherentes Saos2 fueron lavadas con PBS y adicionadas con solución hipotónica de citrato de sodio al 0.8%. Las células se incubaron en sus respectivas soluciones hipotónicas por 30' a 37° C, agregando 1ml de solución fijadora 5' antes del término de esta incubación. Para las células flotantes se usó metanol y ácido acético en proporción 3:1 como solución fijadora y para las adherentes se usaron los mismos reactivos en proporción 5:2. Las células se centrifugaron y resuspendieron en las soluciones fijadoras correspondientes. Después de mantener las células 5' a temperatura ambiente, se prepararon laminillas con esta suspensión.

Análisis de cariotipo

Las metafases fueron teñidas con Giemsa para realizar el conteo de cromosomas. En las células SC se contaron 44, 43, 29 y 81 metafases para determinar la ploidía de la línea celular después de 7, 10, 15 y 27 PDs respectivamente. En la línea K562, el análisis se hizo contando 25, 106 y 43 metafases después de 8, 18 y 31 PDs. También se prepararon laminillas de ambas líneas para análisis de bandas G. Se analizaron 25 metafases por cariotipo convencional tanto para SC como para K562. Los PDs analizados fueron el 7 y 27 para la célula SC y el 8 y 31 para las K562.

Northern blot

Se usaron 20µg de RNA total para cada una de las condiciones a analizar por Northern Blot y se utilizó el kit NorthernMax® (Applied Biosystems AM1940) siguiendo las indicaciones del proveedor. Se fraccionaron las muestras por electroforesis en gel de agarosa con 1.4% de formaldehído (Figura 8A). El RNA fue transferido a una membrana Hybond-N+ nylon (Amersham Hybond, RPN3050B) (Figura 8B) e hibridado con sondas de DNA, específicas para la secuencia de TERRA, marcadas con dCTP[P32] (Figura 8C). La Figura 8 muestra cada uno de los pasos antes descritos como control de calidad previo a la hibridación de las sondas.

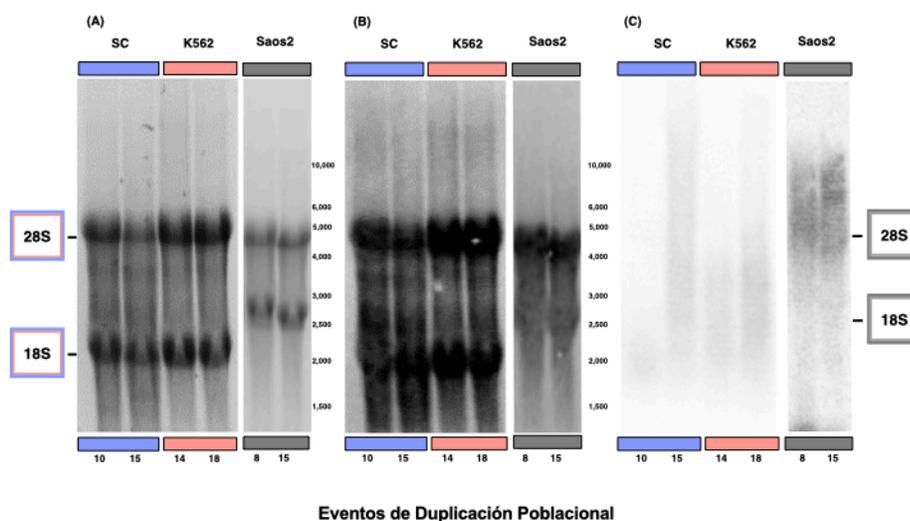


Figura 8. Preparación de muestras para Northern blot de TERRA. RNA total de diferentes pases de células SC, K562 y Saos2. (A) Gel de agarosa después de la electroforesis del RNA total. (B) Membrana de nitrocelulosa después de transferir el RNA. (C) Auto-radiografía del RNA hibridado con sondas marcadas con dCTP[P32].

Diseño de primers subtelo méricos

Los loci subtelo méricos que seleccionamos para evaluar la transcripci3n de TERRA y el enriquecimiento de marcas de cromatina han sido descritos previamente como loci que transcriben TERRA (58,80) así que los loci 15q y 10q fueron analizados usando primers reportados por Deng et al. (80).

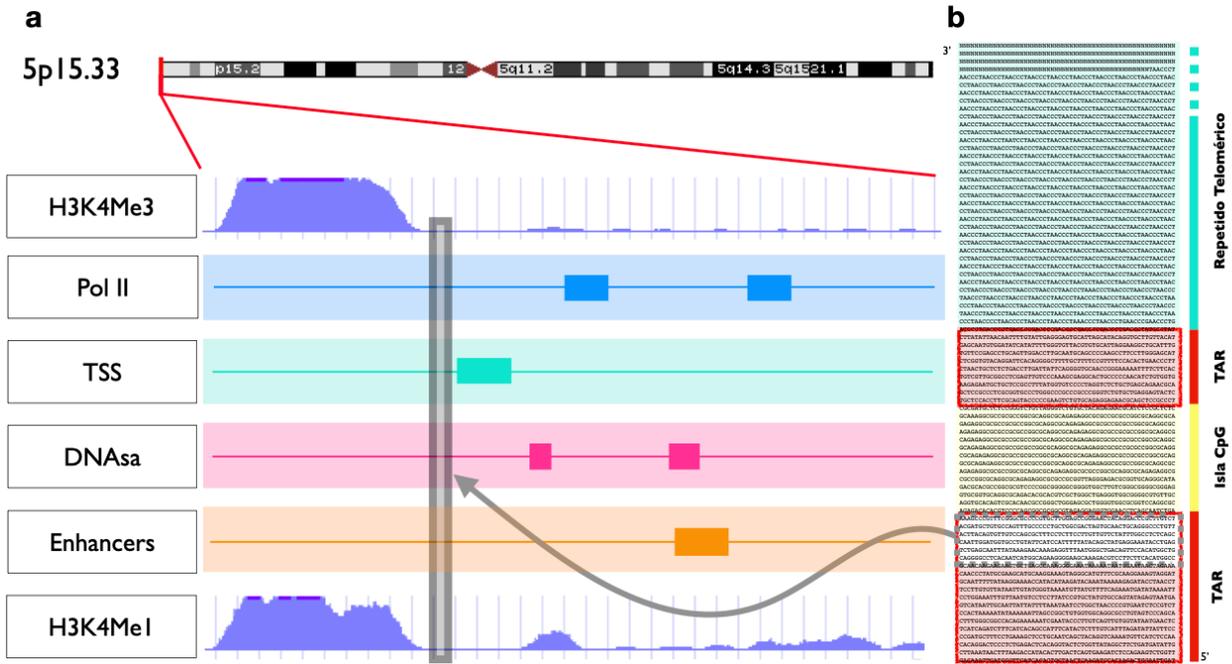


Figura 9. Topografía del locus 5p evaluado. a) Parte superior: Representación esquemática de una porción del cromosoma 5 humano. Se indica en rojo la región 5p15.33. Parte inferior: Localización de marcas de histonas, proteínas asociadas y elementos de interés en 5p15.33. Abundancia de H3K4me3: histograma superior, presencia de RNA Polimerasa II (Pol II): azul, potenciales sitios de inicio de la transcripción (TSSs): verde, sitios sensibles a DNase: rosa, secuencias reportadas con actividad de enhancer: anaranjado, abundancia de H3K4me1: histograma inferior. El recuadro gris indica el locus reconocido por los primers para el análisis de 5p. **b)** Fragmento de la secuencia de la región 5p15.33. La región TAR 5' es específica para 5p15.33, así que los primers para el análisis de este locus se diseñaron en la secuencia contenida dentro del recuadro gris. A pesar de estar más cerca de los repetidos teloméricos la región TAR 3' no fue usada debido a su alta inespecificidad ya que también se encontró en 37 loci diferentes localizados en regiones subtelo méricas y pericentroméricas de los cromosomas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, X & Y. En la secuencia se observa el repetido telomérico: verde ("N" indica bases aún no secuenciadas), dos regiones de repetidos asociados al telómero (TAR): rojo y una isla CpG subtelo mérica: amarillo.

Para el análisis de los loci 2p, 5p, 11q, y Xp se diseñaron primers siguiendo el mismo criterio: que amplificaran regiones subteloméricas sensibles a DNAsa, que estuvieran enriquecidas en las marcas H3K4me3, H3K4me1 y Pol II, dentro de las cuales estuvieran reportadas secuencias potenciadoras (enhancers) y sitios potenciales de inicio de la transcripción (Figura 9). Para conducir este análisis usamos el sitio web Genome Browser de la Universidad de Santa Cruz, California.

Análisis de la expresión de Telomerasa y TERRA por qPCR

Se aisló el RNA total de diferentes pases de cada línea celular usando el kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research, R2050). Se usaron 2µg de RNA para sintetizar cDNA usando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher, 4368814). La qPCR se llevó a cabo en un equipo StepOne Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, 4376600) usando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher, K0221). Para evaluar la expresión de Telomerasa se usaron primers para amplificar hTERT, la unidad catalítica de la enzima. Los niveles de expresión de hTERT en la línea celular leucémica K562 se usaron como control positivo a la presencia de Telomerasa. Incluimos en el análisis a la línea celular Saos 2 como control negativo a la expresión de la transcriptasa reversa. Las veces de cambio se calcularon mediante doble delta Ct; la expresión de hTERT en el evento de duplicación poblacional más temprano de la línea K562 fue usado como referencia para el análisis. Todos los valores se normalizaron contra la expresión de GAPDH. Para la expresión de TERRA se usaron primers para los loci subteloméricos 5p, 10q, 11q, 15q y Xp. Las veces de cambio en la expresión del lncRNA se calcularon mediante doble delta Ct; la expresión de TERRA en el evento de duplicación poblacional más temprano de cada línea celular fue usado como referencia para el análisis. Todos los valores se normalizaron contra la expresión de U6.

Análisis de longitud telomérica por Q-FISH

Realizamos Q-FISH en metafases de al menos tres PDs de las líneas SC y K562. Se usó una sonda pan-telomérica marcada con FITC para la cuantificación de la longitud telomérica (DAKO, K532511). Se utilizó una sonda específica para el centrómero del cromosoma 18

(chr18), marcada con Cy5, como referencia de intensidad de fluorescencia para el análisis de longitud (MetaSystems, D-0818-050-FI) (Figura 10A, B I). Las sondas se usaron de manera secuencial, hibridando las metafases primero con la sonda telomérica y después con la sonda centromérica de referencia. Las laminillas se permeabilizaron incubándolas 60 segundos a 37° C en una solución de ácido clorhídrico al 0.01M con 0.005% de pepsina. Después de dos lavados con TBS las laminillas se desnaturalizaron usando el equipo Hybrite Slide Stainer (Abbott Molecular). Las muestras se calentaron 5' a 80° C para hibridar 2.5µl de la sonda telomérica y 5' a 75° C para hibridar 2µl de la sonda la centromérica. A partir de este punto en el protocolo se siguieron las indicaciones del proveedor (DAKO, K532511).

Procesamiento de imágenes

Las imágenes de las metafases hibridadas se capturaron usando un microscopio Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss, GmbH) acoplado a un modulo Metafer para búsqueda y captura automatizadas (MetaSystems Hard und Software, GmbH). Las metafases que mostraron una hibridación de buena calidad fueron escaneadas usando un objetivo de inmersión Plan-APOCHROMAT 63x/1.4 Oil y tres filtros ópticos para la detección de DAPI, FITC y Cy5 (Carl Zeiss, GmbH). Las imágenes resultantes fueron procesada usando el software Ikaros para el análisis convencional de cariotipo. El software Isis se usó para realizar el cariotipo por DAPI y para la cuantificación de longitud telomérica (MetaSystems Hard und Software, GmbH) (Figura 10A, B II-IV).

La longitud telomérica de cada brazo cromosómico se calculó con la intensidad de fluorescencia de las sondas hibridadas en la secuencia del repetido telomérico. Usamos la fluorescencia del centrómero chr18 como valor de referencia, normalizando la intensidad de fluorescencia de los telómero en una metafase, contra la fluorescencia de la sonda centromérica hibridada en dicha metafase. Los valores de intensidad de fluorescencia >1.0 corresponden a un incremento en la cantidad de sonda telomérica hibridada y se interpretaron como telómeros alargados. Una intensidad de fluorescencia telomérica <1.0 corresponde a

una disminución en la cantidad de sonda telomérica hibridada y se interpretó como una pérdida parcial de secuencias teloméricas, es decir telómeros acortados.

Inmunoprecipitación de cromatina

La cromatina se aisló con el kit Shearing ChIP (Diagenode, C01020012) y se inmunoprecipitó con el kit OneDay ChIP (Diagenode, C01010080) siguiendo el protocolo del proveedor. Se usaron 4µg de anticuerpo para la precipitación de H3K4me3 (Abcam, ab8580), H3K9me3 (Abcam, ab8898), H3K27me3 (Millipore, 07449), H4K20me3 (Abcam, ab9053), CTCF (Millipore, 07729) y RNA Pol-II (Abcam, ab5408). Los anticuerpos se incubaron toda la noche para la precipitación y después el DNA se analizó por qPCR con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher, K0221) usando primers específicos para cada locus telomérico. Este análisis también se llevó a cabo en el equipo StepOne Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, 4376600). El input de cromatina total de cada muestra fue usada como referencia para las curvas comparativas de las marcas analizadas. Los datos se normalizaron contra la precipitación inespecífica de IgG.

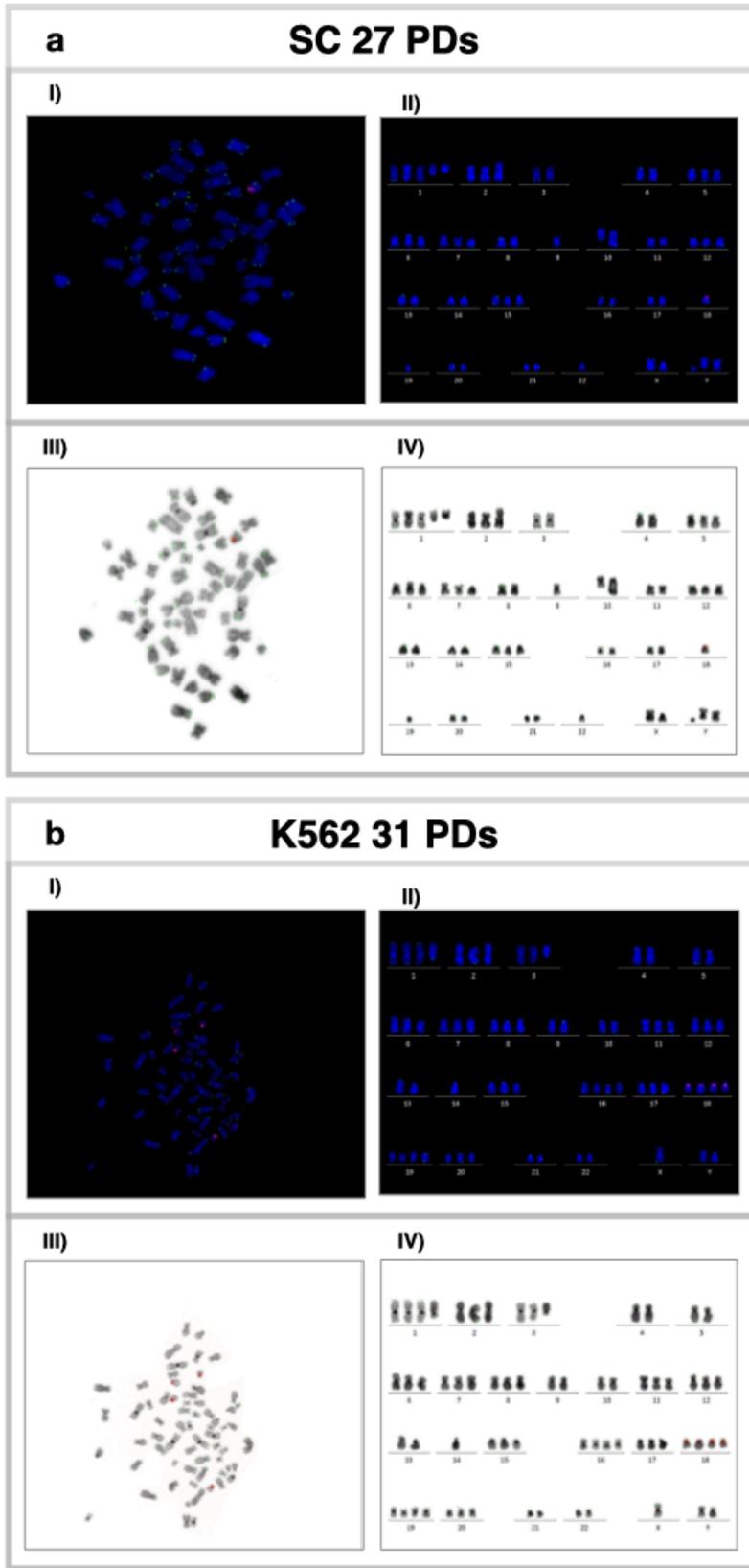


Figura 10. Metafases y cariogramas para el análisis por Q-FISH. a) Células SC después de 27 PDs. a-I) Metafase hibridada usando una sonda pan-telomérica, FitC y una sonda centromérica de referencia para el chr18, Cy5. a-II) Cariograma de la metafase mostrada en a-I). a-III) Escala de grises de la contra-tinción con DAPI hecha en la metafase mostrada en a-I). IV) Cariograma en escala de grises de la metafase mostrada en a-III). b) Células K562 después de 31 PDs. b-I) Metafase hibridada usando una sonda pan-telomérica, FitC y una sonda centromérica de referencia para el chr18, Cy5. b-II) Cariograma de la metafase mostrada en b-I). III) Escala de grises de la contra-tinción con DAPI hecha en la metafase mostrada en b-I). IV) Cariograma en escala de grises de la metafase mostrada en b-III).

RESULTADOS

1. Análisis de Cariotipo

El análisis convencional del cariotipo de la línea SC mostró que se había establecido una clona celular en los pases tempranos del cultivo, con un número modal de 59 cromosomas, después de solo 7 eventos de duplicación poblacional (PDs). El número modal de las células SC permaneció por arriba de 46 en cada uno de los pases evaluados y la ploidía de la línea fue hipertriploide en más del 50% de las metafases analizadas, en 3 de los pases celulares evaluados (Figura 11A).

El análisis por Bandas G mostró que la ploidía anormal de las células SC se debía tanto a aberraciones numéricas como estructurales en su cariotipo. Las alteraciones cromosómicas que estaban presentes en cada evento de duplicación están marcadas (*) en la Figura 11C,D. A pesar de que ya se había establecido una clona desde el inicio del ensayo, se encontraron 3 alteraciones más después de 27 PDs. Encontramos que el 60% de las metafases analizadas habían perdido $\text{dup}(10) (q26q11.2)\text{add}(10)(q11.2)$ y el 64% había perdido un +5 y había adquirido un marcador cromosómico adicional (Figura 11B,D)

Reportamos el cariotipo de la línea celular SC con la que trabajamos después de 10 y 27 PDs de la siguiente manera (81):

7 PDs: 55~61,X, $\text{del}(X)(p11.2)$, $+\text{der}(1)t(1;?) (q21;?)$, $+\text{der}(2)t(2;17)(q37;q21)$, $+\text{del}(4)(q21)$,
 $+5$, $\text{del}(6)(p21)$, $\text{del}(7)(p10)$, $+i(7)(p10)$, $+8$, $\text{dup}(10)(q26q11.2)\text{add}(10)(q11.2)$, $\text{der}(10)t(10;X)$
 $(p13;p11.4)$, $\text{del}(11)(q23)$, $+13$, $+15$, $+21$, $+2\text{mar}[cp25]$.

27 PDs: 60~61,X, $\text{del}(X)(p11.2)$, $+\text{der}(1)t(1;?) (q21;?)$, $+\text{der}(2)t(2;17)(q37;q21)$, $+\text{del}(4)(q12)$,
 $+\text{del}(6)(p21)$, $+\text{del}(7)(p10)$, $+i(7)(p10)$, $+8$, 10 , $\text{der}(10)t(10;X)(p13;p11.4)$, $\text{del}(11)(q23)$,
 $+13$, $+15$, $+21$, $+3\text{mar}[cp25]$.

Durante el análisis, encontramos que el cariotipo de la línea K562 también mostró aberraciones numéricas y estructurales que no estaban presentes al adquirir la línea celular de

la Colección de Cultivos Americanos (ATCC, por sus siglas en inglés) (Figura 12A). Dado que esta línea celular está reportada como triploide, esperábamos encontrar aberraciones numéricas estables, mismas que están marcadas (*) en la Figura 12C,D. Sin embargo, encontramos varias aberraciones más.

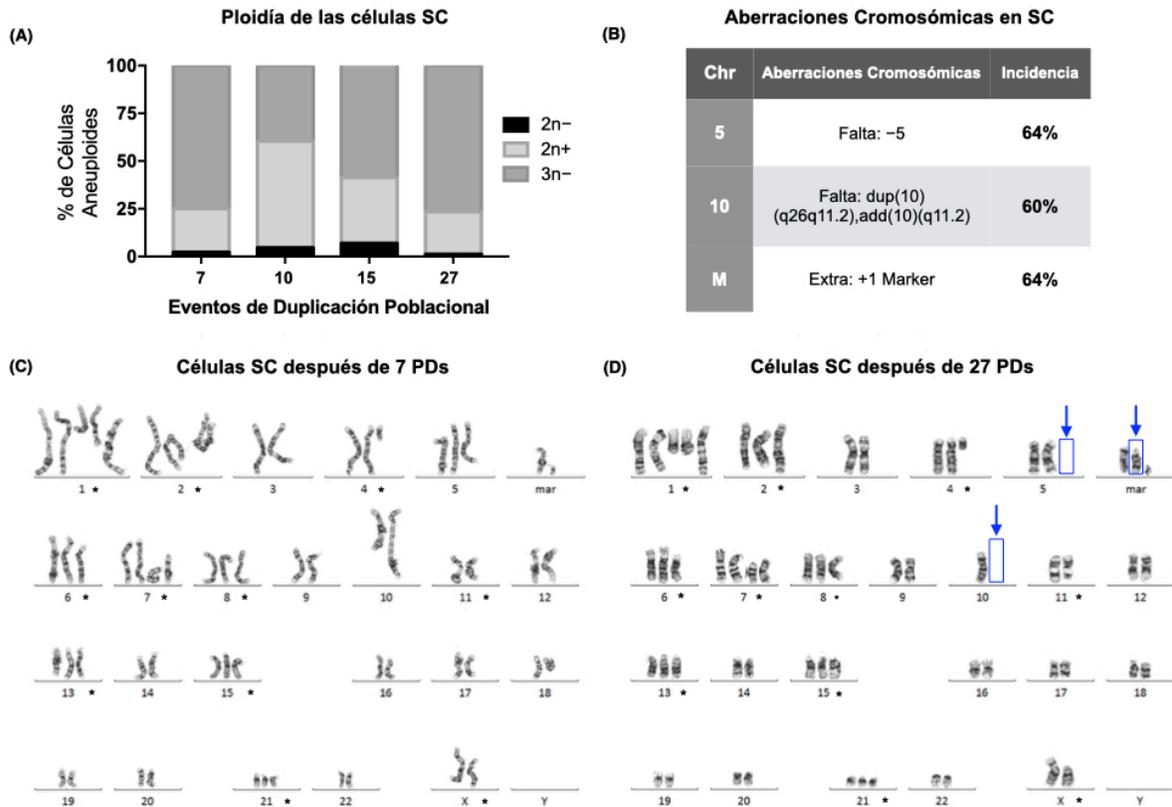


Figura 11. Se estableció una clona hipotriploide en las células SC pero aún hubo inestabilidad cromosómica numérica. (A) Porcentaje de células aneuploides después de 7, 10, 15 y 27 eventos de duplicación poblacional (PDs) en la línea celular SC. Más del 50% de las células analizadas fueron hipotriploides (3n-) en tres de los PDs analizados. (B) Aberraciones cromosómicas encontradas después de 27 PDs en la línea celular SC. Aproximadamente 60% de las células analizadas mostraron una pérdida del cromosoma 5 (chr5) y del cromosoma derivativo 10, junto con la aparición de un marcador cromosómico extra. (C) Cariograma de las células SC después de 7 PDs. Las alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales que se encontraron en cada una de las poblaciones analizadas están marcadas (*). (D) Cariograma de las células SC después de 27 PDs. Las alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales que se encontraron en cada una de las poblaciones analizadas están marcadas (*). Las aberraciones cromosómicas adicionales están señaladas con flechas azules.

Después de 31 PDs, los cromosomas 3 y 4 mostraron deleciones y se encontró un cromosoma derivativo 7 (der(7)t(7;?)(p13;?)), junto con un cromosoma 11 adicional (+11,del(11)(p12)) y la aparición de dos marcadores cromosómicos extra (81). Más aún, varios cromosomas perdieron uno o dos de sus pares homólogos en algunas de las metafases analizadas: pérdida del cromosoma 10 (chr10) (29.16%), pérdida de chr14 (91.6%), pérdida de chr17 (95.8%), o de dos chr17 (4.16%), pérdida de chr21 (12.5%), pérdida de chr22 (83.3%) y pérdida de dos chr22 (8.3%) (Figura 12B,D).

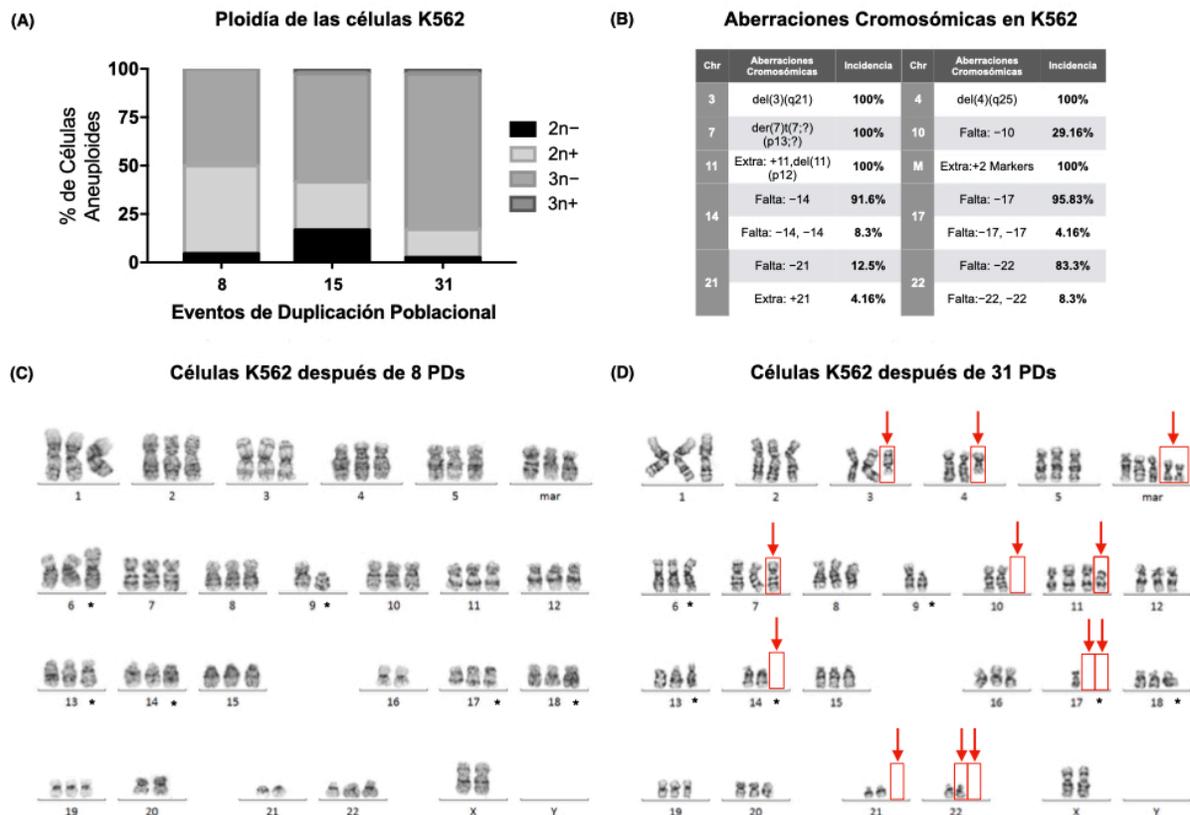


Figura 12. La línea celular hipotriploide K562 mostró inestabilidad cromosómica a medida que envejecía el cultivo. (A) Porcentaje de células aneuploides después de 8, 15 y 31 eventos de duplicación poblacional (PDs) en la línea celular K562. Más del 50% de las células analizadas fueron hipotriploides (3n-) PDs analizados. (B) Aberraciones cromosómicas encontradas después de 31 PDs en la línea celular K562. Se encontró un total de 14 aberraciones numéricas/estructurales; 8 de ellas ocurrieron en más del 80% de las células analizadas. (C) Cariograma de las células K562 después de 8 PDs. Las alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales que se encontraron en cada una de las poblaciones analizadas están marcadas (*). (D) Cariograma de las células K562 después de 31 PDs. Las alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales que se encontraron en cada una de las poblaciones analizadas están marcadas (*). Las aberraciones cromosómicas adicionales están señaladas con flechas rojas.

Reportamos el cariotipo de la línea celular K562 con la que trabajamos después de 8 y 31 PDs de la siguiente manera (81):

8 PDs: 61~74,XX,add(6)(p23),-9,del(9)(p13),der(13)t(13;?)(q14;?)-16,add(17)(p13.3),add(18)(q23),-20,-21,3mar[cp25].

31 PDs: 61~82,XX,del(3)(q21),del(4)(q25),add(6)(p23),der(7)t(7;?)(p13;?)-9,del(9)(p13),-10,+11,del(11)(p12),t(13;?)(q14;?)-14,-17,-17,add(18)(q23),-21,-22,5mar[cp25].

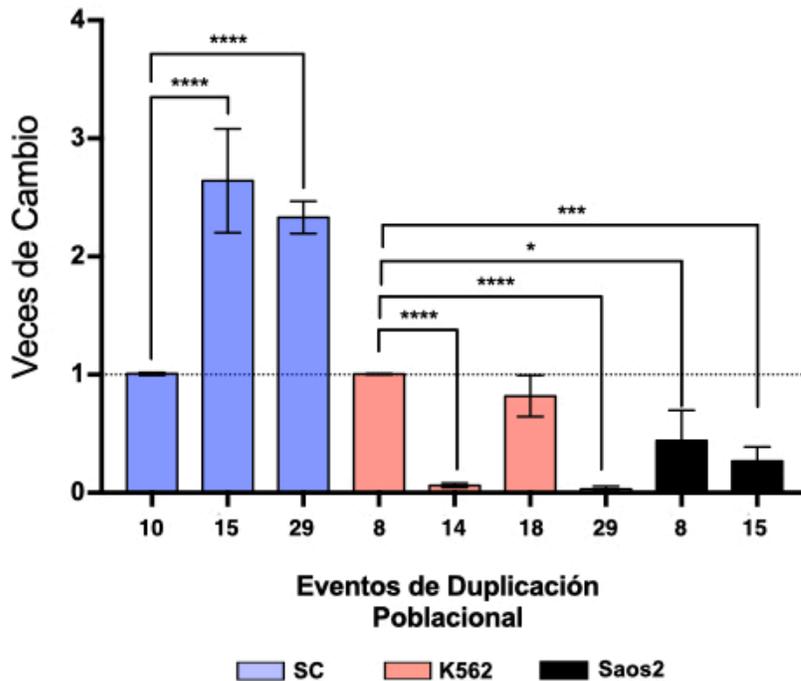
2. Expresión de Telomerasa

De acuerdo con la ATCC, la línea SC es una línea multiclonal indiferenciada al momento de su adquisición (77), así que resultó de interés para nosotros evaluar la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa, hTERT. Realizamos este análisis usando tres líneas celulares: SC, una línea mieloide no cancerosa; K562, una línea derivada de leucemia mieloide crónica; Saos2, una línea derivada de osteosarcoma que se usó como control negativo para la expresión de la transcriptasa reversa (82). Las células K562 sirvieron como nuestra referencia para la expresión de hTERT (79), por lo tanto los datos se normalizaron contra la población analizada más temprana de la línea K562.

Al realizar el análisis por qPCR encontramos que la línea SC mostraba un incremento de 1.62 veces en la expresión de hTERT después de 15 PDs. Después de 29 PDs, la expresión de hTERT aún seguía elevada. En la línea K562 encontramos que la expresión de la unidad catalítica no fue consistente. Después de 14 PDs la expresión de hTERT bajó 0.93 veces, hasta valores casi indetectables y 4 PDs después la expresión de hTERT regresó a sus niveles originales. Al final del ensayo, después de 29 PDs, la expresión de hTERT volvió a bajar 0.96 veces. En contraste con las líneas de origen mieloide, la expresión de hTERT permaneció por debajo de nuestros valores de referencia en Saos2, la línea ALT-dependiente (Figura 13A). Ya que el mantenimiento telomérico es esencial para la replicación ilimitada, no esperábamos que la expresión de hTERT disminuyera de manera significativa en una línea leucémica; sin embargo este patrón de expresión fluctuante podría ser el resultado de una

eficiente transformación maligna, algo que aún no había ocurrido en la clona recién establecida de las células SC.

(A) Expresión de hTERT



(B) Abundancia de TERRA

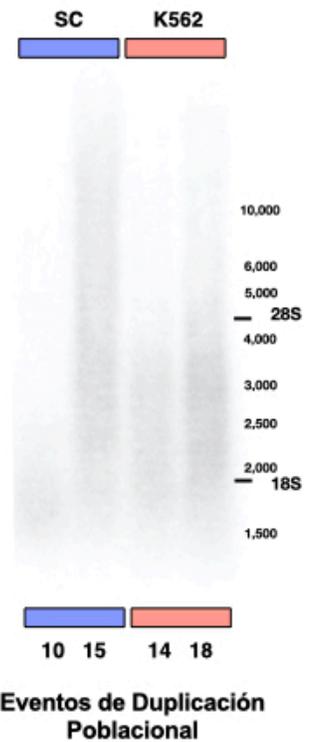


Figure 13. En las células SC se recuperó la expresión de hTERT e incrementó la longitud de TERRA. (A) Expresión de hTERT en diferentes pases de las líneas celulares SC, K562 y Saos2. hTERT mostró una expresión elevada y estable en las células SC. En las células K562 se encontró una expresión fluctuante de hTERT. En las células Saos2 la expresión de hTERT se mantuvo significativamente por debajo de los valores de expresión de las líneas celulares mieloides. Los datos se analizaron con una ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Valor ajustado de $P < 0.0001$ (****), $= 0.0006$ (***), $= 0.0234$ (*). (B) Análisis por Northern blot de la abundancia de TERRA en diferentes pases de las líneas celulares SC y K562. No parece haber un incremento en la abundancia global de TERRA en ninguno de los pases evaluados. Sin embargo, hubo un incremento en el tamaño del lncRNA cuando la expresión de hTERT estaba elevada en las células SC (15 PDs) y en las células K562 (18PDS).

3. Niveles globales de TERRA

Para evaluar los niveles globales de TERRA extrajimos RNA total de las líneas SC y K562 y lo analizamos por Northern blot para determinar si los cambios en la expresión de telomerasa

repercutían en la transcripción telomérica de manera global. Para esto, nos enfocamos en evaluar los niveles de TERRA en las poblaciones celulares en las cuales la expresión de hTERT había incrementado significativamente.

Debido a que trabajábamos con un lncRNA rico en secuencias repetidas nuestros resultados mostraron un barrido de RNA con repetidos teloméricos que abarcaba desde 1.5 kb hasta >10 kb. Sin embargo, la mayor parte del RNA mostraba una longitud de entre 2.5 a 3.5 kb. En las células SC la mayoría del lncRNA tenía el doble de longitud en las muestras de 15 PDs (4 kb) que en las de 10 PDs (2 kb) y la longitud máxima del RNA hibridado ocurrió después de 15 PDs con >10 kb, un incremento considerable en comparación con la longitud máxima reportada a los 10 PDs (2.5 kb). Se observaron resultados similares en el RNA de las células K562. La mayor parte de TERRA era más largo en las muestras de 18 PDs (3 kb) que en el RNA obtenido después de 14 PDs (2.5 kb), La longitud máxima del lncRNA también incrementó hasta 6 kb en las muestras obtenidas después de 18 PDs.

Las moléculas de TERRA más cortas en la línea SC se encontraron en las muestras de 10 PDs, con una longitud máxima de aproximadamente 3 kb. En las células K562 encontramos las moléculas más cortas de TERRA después de 14 PDs, con un máximo de 4 kb. En ambas líneas la longitud máxima del lncRNA incrementó a >10 kb después de 5 PDs de la línea SC y hasta 10 kb después de 4 PDs de la K562 (Figura 13B). Dado que la longitud de TERRA incrementó cuando la expresión de hTERT se encontraba elevada, asumimos que la longitud de las secuencias teloméricas repercutía de manera directa en el tamaño de las moléculas de TERRA transcritas a partir de las mismas. Sin embargo, la tasa de transcripción de este lncRNA debe de estar regulada de manera locus-específica, de lo contrario las moléculas de TERRA de todas las longitudes transcritas se acumularían de manera proporcional.

4. Expresión locus-específica de TERRA

En vista de que queríamos determinar si la expresión de hTERT podía afectar la expresión del lncRNA telomérico, decidimos evaluar una población puntual de este lncRNA. Analizamos de

manera específica la expresión de TERRA 5p y TERRA 10q, ya que estas moléculas se expresan a partir de los cromosomas en donde encontramos aberraciones adicionales después de 27 PDs de la línea SC.

Previo al análisis cuantitativo de la expresión de TERRA, verificamos el potencial codificante de los loci seleccionados. Para esto usamos la calculadora de potencial codificante del Centro de Bioinformática de la Universidad de Beijing (Coding Potential Calculator, disponible en línea: <http://cpc2.gao-lab.org/index.php>), para estimar la probabilidad de que las secuencias a amplificar fueran codificantes (83,84). Este análisis se llevó a cabo corriendo nuestras secuencias de interés junto con un control de secuencias previamente reportadas como loci que expresan TERRA.

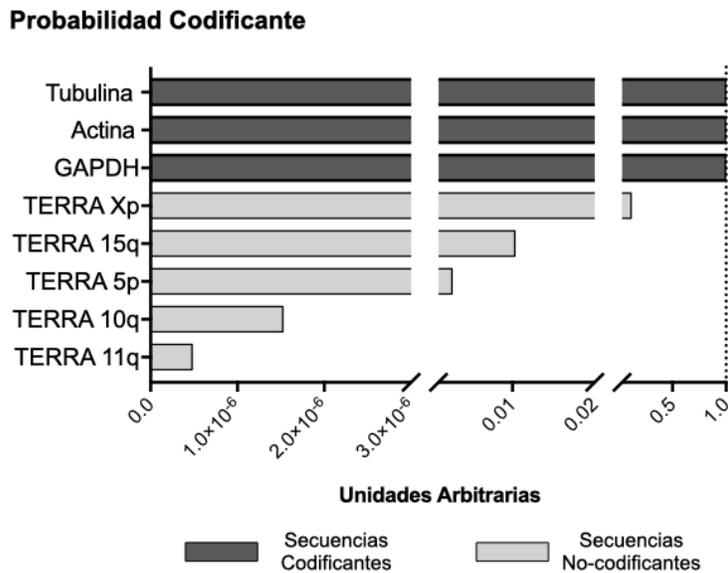


Figura 14. Los loci analizadas de TERRA no tienen potencial de codificación. Se evaluó la probabilidad de que las secuencias analizadas fueran codificantes usando la calculadora de potencial de codificación del Centro de Bioinformática de la Universidad de Pekin (<http://cpc2.gao-lab.org/index.php>). El análisis *in silico* confirmó que las secuencias amplificadas de TERRA no tenían un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) ni potencial codificante alguno.

El análisis *in silico* confirmó que las secuencias analizadas no contaban con la integridad de un marco de lectura abierto (ORF) y que cada una de las secuencias tenía una probabilidad de codificación muy bajo: 2.64×10^{-3} para TERRA 5p, 1.52×10^{-6} para TERRA 10q, 4.77×10^{-7} para TERRA 11q, 1.03×10^{-2} para TERRA 15q y 0.114 para TERRA Xp (Figura 14).

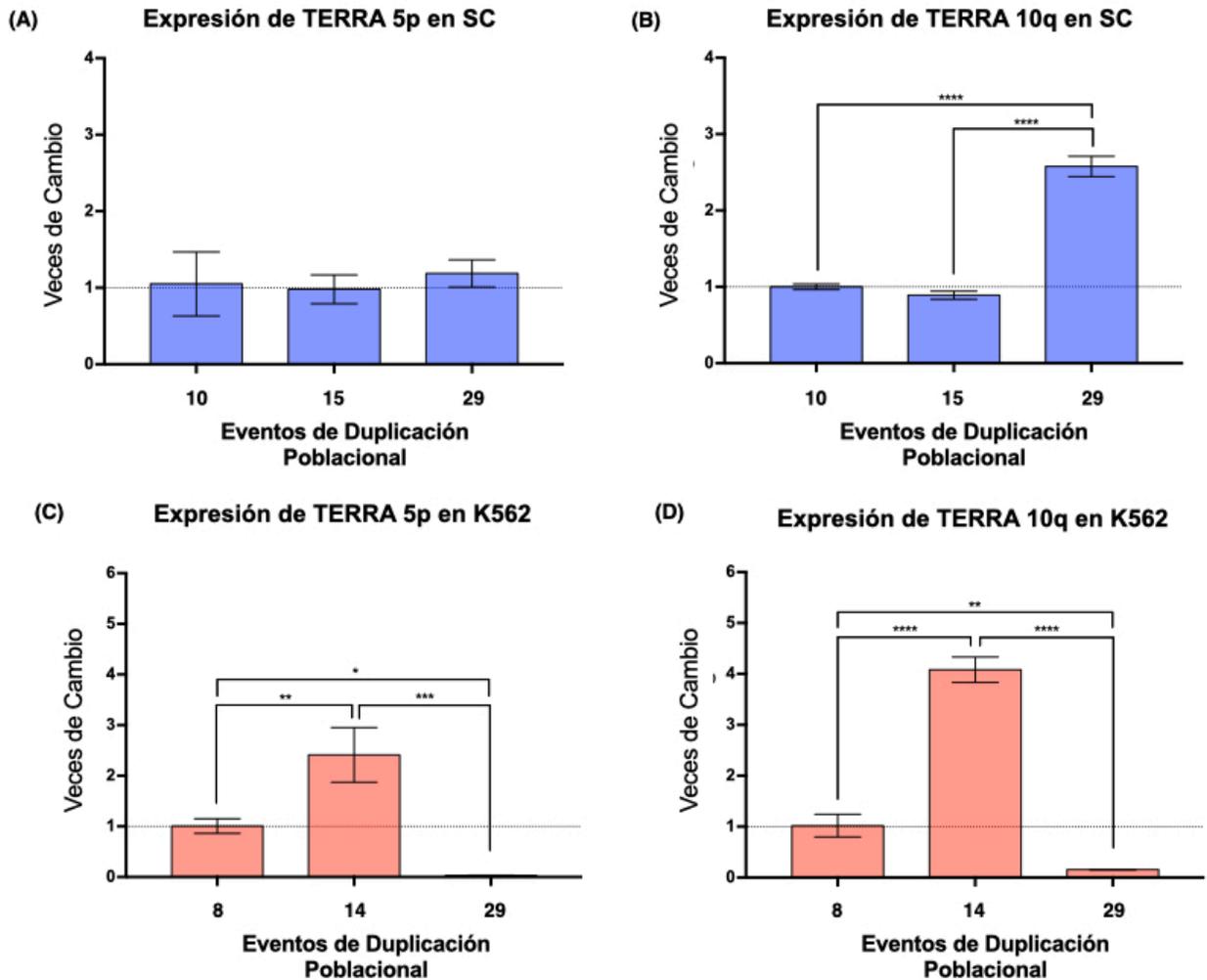


Figure 15. La expresión de TERRA cambió de manera telómero-específica. (A) La expresión de TERRA 5p no fue afectada por el envejecimiento celular de la línea SC. (B) La expresión de TERRA 10q incrementó significativamente después de 29 PDs en las células SC. (C, D) Hubo un patrón de expresión similar en ambos loci analizados en las células K562. La expresión de TERRA incrementó después de 14 PDs y después bajó significativamente después de 29 PDs. Los datos se analizaron con una ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Valor ajustado de $P < 0.0001$ (****), = 0.0003 (***), = 0.005 (**), = 0.0240 (*)

Los resultados de la PCR en tiempo real mostraron que, en las células SC, TERRA 5p tiene una expresión estable a lo largo del ensayo, es decir que no fue afectada por el envejecimiento celular, mientras que la expresión de TERRA 10q incremento >2 veces después de 29 PDs (Figura 15A,B). En las células K562 la expresión de TERRA 5p solo fue estable en los primeros pases celulares, pero después de 29PDs su expresión bajó

significativamente (Figura 15C). Esta abrupta disminución en la expresión de TERRA también se encontró al analizar el locus 10q después de 29 PDs; sin embargo, a diferencia de TERRA 5p, la expresión de TERRA 10q había incrementado 4 veces después de los 14 PDs (Figura 15D). Los resultados confirmaron que la expresión de TERRA varía no solo en función de la edad de la población celular analizada, sino también de acuerdo al cromosoma a partir del cual se transcribe el lncRNA.

5. Longitud Telomérica Global

Para determinar la relación entre la expresión de TERRA y la integridad telomérica examinamos las fluctuaciones en la longitud telomérica durante nuestro análisis. Ya que buscábamos evaluar el efecto *in cis* de TERRA, llevamos a cabo una hibridación in situ fluorescente cuantitativa (Q-FISH, por sus siglas en inglés) en metafases de ambas líneas celulares, que después fueron arregladas en sus cariogramas correspondientes para la identificación específica de las señales teloméricas de los brazos cortos (p) o largos (q) de cada cromosoma analizado. También analizamos la intensidad de fluorescencia media de cada metafase en las poblaciones observadas de ambas líneas celulares, para así identificar los cambios globales que se presentaran en la longitud telomérica de cada línea conforme envejeciera el cultivo celular.

Analizando los datos de esta manera encontramos claras diferencias entre los telómeros de las células no neoplásicas, SC, y los de las células leucémicas (K562) (Figura 16). Primero, la media de la longitud telomérica en las poblaciones tempranas fue más corta en las células SC (0.66 unidades arbitrarias, UA) que en las células K562 (1.21 UA). La segunda diferencia fue la pérdida de secuencias teloméricas después de 18 PDs de K562, cuando la intensidad de fluorescencia media bajó significativamente (0.855 UA); después de 31 PDs la intensidad de la señal telomérica recuperó sus niveles iniciales (1.5 UA). Contrario a lo observado en esta línea, en las células SC la intensidad de fluorescencia telomérica media incrementó de manera constante en cada población evaluada. Por último, encontramos que a pesar de los valores heterogéneos en la longitud telomérica de cada una de las poblaciones evaluadas, la

diferencia siempre fue mayor en los telómeros de K562, mientras que los de telómeros de SC mostraron fluctuaciones más discretas en su longitud.

TERRA no pareció influenciar esto, ya que mientras los niveles globales de TERRA estaban elevados, los telómeros de las células SC fueron extendidos (15 PDs), mientras que los telómeros de las células K562 se recortaron abruptamente (18 PDs).

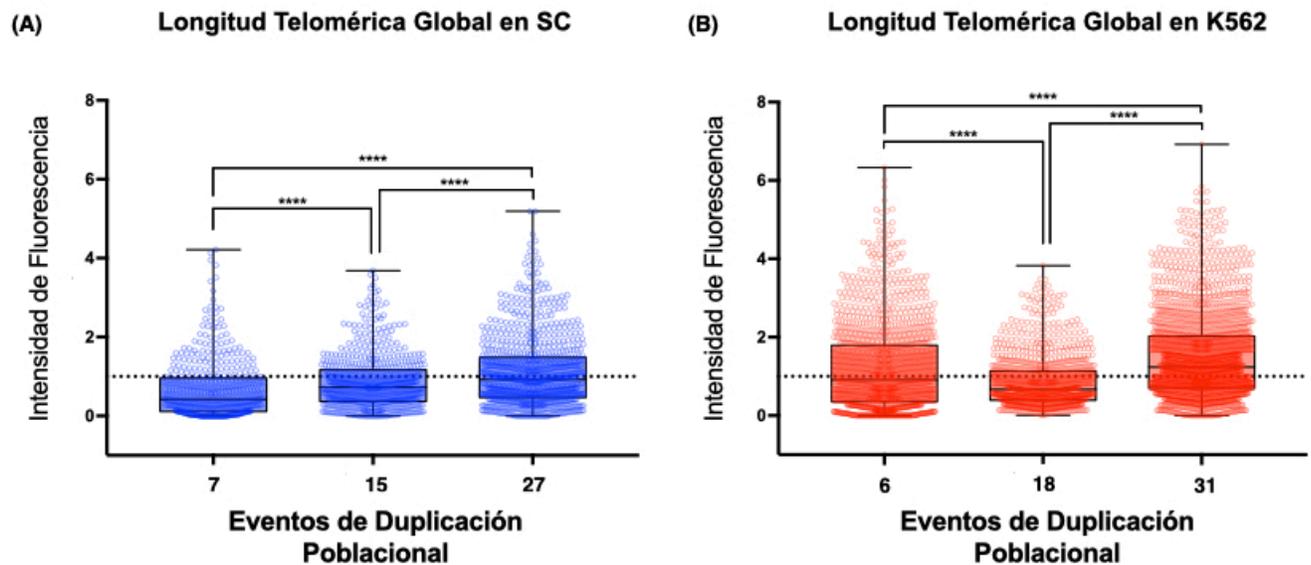


Figura 16. La longitud telomérica global incremento constantemente en las células SC. (A) Distribución de los valores de longitud telomérica en diferentes pases de la línea celular SC. Hubo un alargamiento discreto pero constante de las secuencias teloméricas durante el ensayo (B) Distribución de los valores de longitud telomérica en diferentes pases de la línea celular K562. Hubo una reducción significativa en la longitud telomérica después de 18 PDs, pero la longitud se recuperó después de 31 PDs. La línea punteada en (A) y (B) representa la fluorescencia del centrómero del chr18, el valor de referencia usado para el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia de la sonda telomérica se normalizó contra la fluorescencia centromérica y se expresó en unidades arbitrarias (UA). Los valores > 1 representan un incremento en las secuencias teloméricas hibridadas, i.e. telómeros alargados. Los valores < 1 representan una pérdida de secuencias teloméricas, i.e telómeros acortados. Los datos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. $P < 0.0001$ (****).

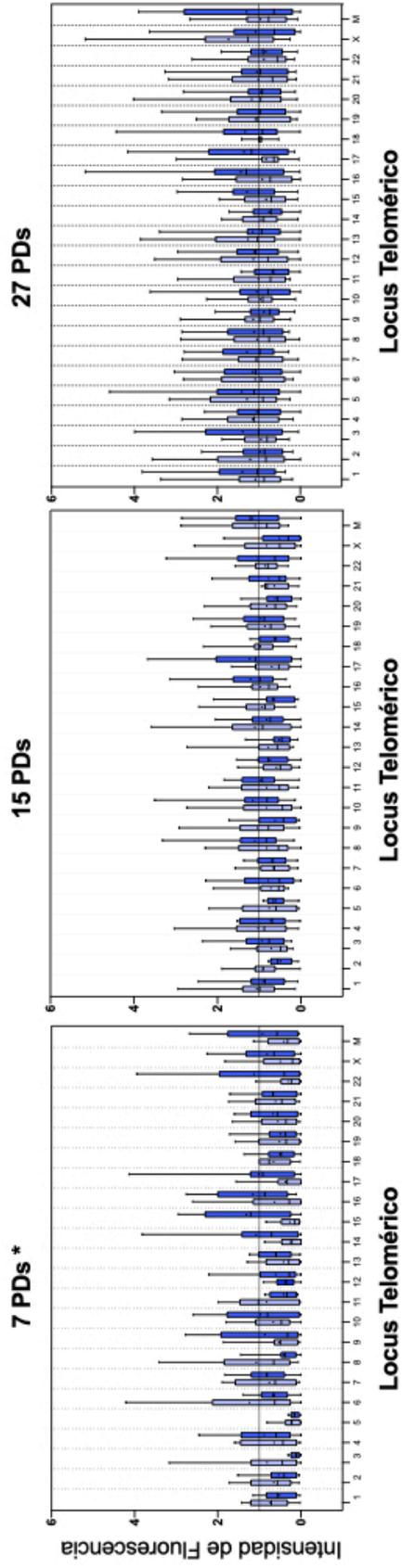
6. Análisis de la longitud telomérica por cromosoma

Para estudiar la heterogeneidad antes mencionada analizamos individualmente los telómeros de cada brazo cromosómico. Usamos DAPI para identificar los cromosomas y realizar el análisis del cariotipo y encontramos una longitud considerablemente desigual entre los cromosomas de las tres poblaciones analizadas de K562 (Figura 17B). Por el contrario, la diferencia en la longitud telomérica de los cromosomas de las células SC solo fue estadísticamente significativa en la población más temprana que se analizó de ellas (7 PDs). En las poblaciones subsiguientes de SC las fluctuaciones en la longitud telomérica ya no fueron significativas (Figura 17A).

El análisis detallado de los cromosomas de las células SC reveló que, después de 7 PDs, el 85.41% de los brazos cromosómicos tenían telómeros cortos, ya que su intensidad media de fluorescencia estaba por debajo del valor de referencia de la sonda centromérica (1.0 UA). Más aún, la mediana de la fluorescencia telomérica observada fue <1.0 UA en 95.83% de los cromosomas y más de la mitad de estos valores (52.17%) eran <0.5 UA. Después de 7 PDs encontramos telómeros constantemente cortos en los loci 3q, 5p, 5q, 12p, 14p, 15p y 22p de las células SC. Sin embargo, después de 15 PDs, la intensidad de la fluorescencia telomérica aumentó 0.183 UA en todos los brazos cromosómicos. Después de 27 PDs solo el 31.25% de los telómeros en SC tenían una intensidad de fluorescencia media <1.0 UA: 3p, 9q, 11q, 14p, 14q, 15p, 16p, 17p, 22p y 22q. Esto nos indica que las secuencias teloméricas fueron recuperadas en 54.16% de los telómeros de las células SC, con un incremento de 0.251 UA en su longitud promedio (Figura 17A).

El mismo análisis mostró que en la población más temprana de las células K562 (6 PDs), solo el 27.08% de los brazos cromosómicos tenían telómeros cortos: 4q, 9p, 10p, 12q, 14q, 22p, Xp, Mp y Mq. De manera interesante, la mayoría de los telómeros en las células de origen leucémico se acortaron después de 18 PDs, con el 79.16% de los brazos cromosómicos registrando una intensidad media de fluorescencia <1.0 UA y con la mediana de la fluorescencia observada por debajo del valor de referencia en todos los brazos cromosómicos.

(A) Longitud Telomérica por Cromosoma en SC



(B) Longitud Telomérica por Cromosoma en K562

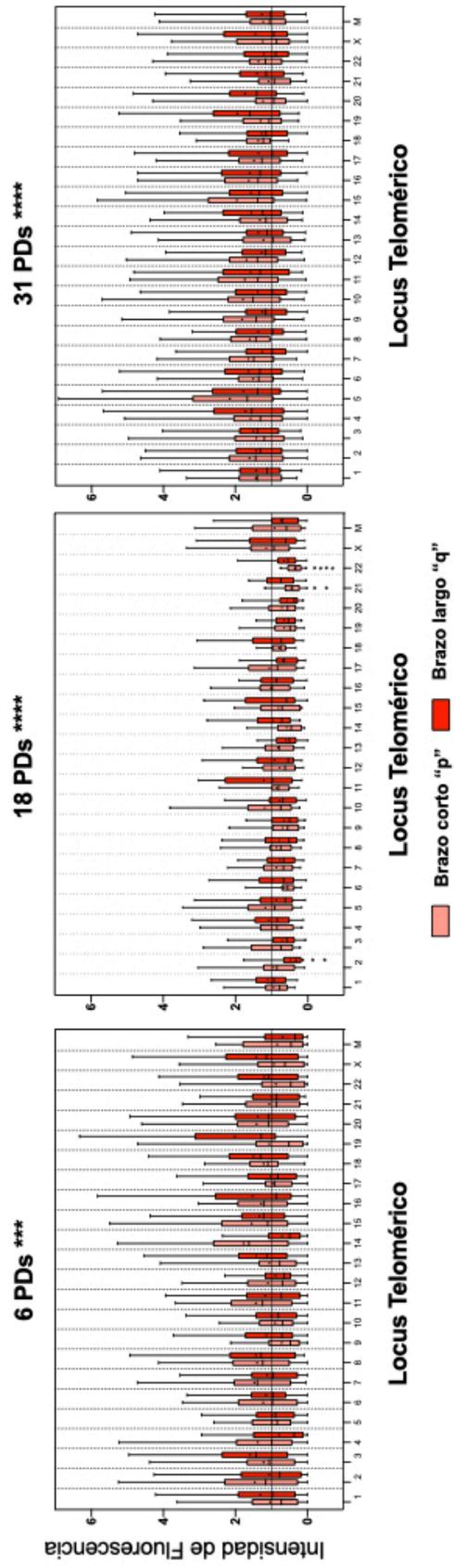


Figura 17. Longitud telomérica cromosoma-específica en las células SC y K562. (A) En los brazos cromosómicos de las células SC observamos un alargamiento telomérico constante. La longitud telomérica inicial fue significativamente heterogénea a los 7 PDs; varios brazos cromosómicos mostraron telómeros con longitud crítica. En pases tardíos, la longitud telomérica se recuperó y la distribución de los valores de longitud ya no fue significativa. Los datos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. $P = 0.043$ (*) a los 7 PDs. (B) En los brazos cromosómicos de la línea K562 observamos un abrupto acortamiento telomérico, seguido de un alargamiento heterogéneo. La longitud inicial en K562 fue significativamente mayor que la longitud inicial en SC, pero después de 18 PDs la longitud telomérica disminuyó considerablemente. Los telómeros 2q, 21p y 22p estaban significativamente acortados después de 18 PDs en cada célula analizada. Valor ajustado de P para los telómeros 2q, 21p y 22p a los 18 PDs < 0.005 (**) y < 0.0001 (****). Después de 31 PDs se recuperó la longitud telomérica pero la distribución de los valores de longitud siguió siendo significativa. Los datos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. (A) y (B) La intensidad de fluorescencia de la sonda telomérica se normalizó contra la fluorescencia centromérica y se expresó en unidades arbitrarias (UA). El valor promedio se muestra dentro de cada caja (*). Valor de P para la longitud telomérica a los 6 PDs = 0.0002 (***) y a los 18 y 31 PDs < 0.0001 (****).

Después de 31 PDs los valores de la intensidad de fluorescencia subieron de nuevo a rangos >1.0 UA en todos los brazos cromosómicos, lo que indica que la re-expresión de hTERT indujo una recuperación en las secuencias teloméricas de 0.64 UA, casi duplicando la cantidad perdida a los 18 PDs. Al final del ensayo, las secuencias teloméricas se habían recuperado en al menos 80% de los telómeros de las células K562 (Figura 17B).

No está claro si las diferentes tasas de extensión telomérica pueden estar relacionadas con el perfil de expresión de hTERT pero se debe reconocer que, una vez que las células K562 recuperaron la expresión de hTERT, tuvo lugar una extensión telomérica acelerada, mientras que en SC, en donde la expresión de hTERT se mantuvo estable, la elongación fue constante pero mucho más moderada.

7. Longitud telomérica específica en los loci 5p y 10q

Ya que nuestro propósito era estudiar la relación entre la expresión de TERRA y la longitud telomérica, analizamos de manera específica la longitud de los telómeros en los brazos 5p y 10q de cada población celular.

En el cromosoma 5 de las células SC, la longitud telomérica promedio en ambos brazos mostró un incremento significativo después de 27 PDs. Los telómeros tanto en 5p como en 5q incrementaron su longitud 3.0 y 2.615 veces respectivamente, al compararlos con su longitud inicial (Figura 18A). A pesar de que la longitud telomérica promedio aumentó en las dos poblaciones analizadas de la línea SC, el incremento solo fue significativo después de 27 PDs. En cambio, en el cromosoma 10 la longitud telomérica promedio no mostró ningún cambio significativo en las poblaciones evaluadas (Figura 18B).

Encontramos resultados similares en las células K562. En el cromosoma 5 la longitud telomérica promedio de ambos brazos mostró un incremento estadísticamente significativo. Los telómeros en el locus 5p aumentaron 1.319 y 1.137 veces después de 18 y 31 PDs respectivamente, al compararlos con su longitud inicial. Los telómeros en el locus 5q aumentaron 1.022 y 0.854 veces después de 18 y 31 PDs respectivamente (Figura 18C). En el cromosoma 10 solo hubo un cambio significativo en la longitud telomérica promedio del brazo 10p, aumentando 0.988 veces después de 31 PDs (Figura 18D).

Como ya se mencionó, observamos valores heterogéneos al medir la longitud telomérica en cada una de las poblaciones evaluadas. Al continuar con este análisis notamos que los valores globales de longitud telomérica mostraban un rango mayor en los cromosomas de la línea K562 en comparación con el rango de los datos de las células SC (Figura 17).

Encontramos valores de longitud telomérica más homogéneos en las poblaciones analizadas de la línea SC, tanto en el locus 5p como en 10q. Después de 27 PDs de las células SC el rango de los valores de longitud telomérica para 5p y 5q solo incrementó 1.81 y 2.79 UA respectivamente (Figura 18A). Mientras que en los loci 10p y 10q el cambio en la dispersión de los datos después de 27 PDs fue aún menor, aumentando apenas 0.33 UA (Figura 18B). Por otro lado, después de 31 PDs de las células K562 el rango de longitud telomérica en 5p y 5q incrementó 4.07 y 2.74 UA respectivamente (Figura 18C). Esta diferencia también fue

encontrada después de 31 PDs en el cromosoma 10, en donde el rango de longitud telomérica aumento 3.16 UA en 10p y 1.25 UA en 10q (Figura 18D).

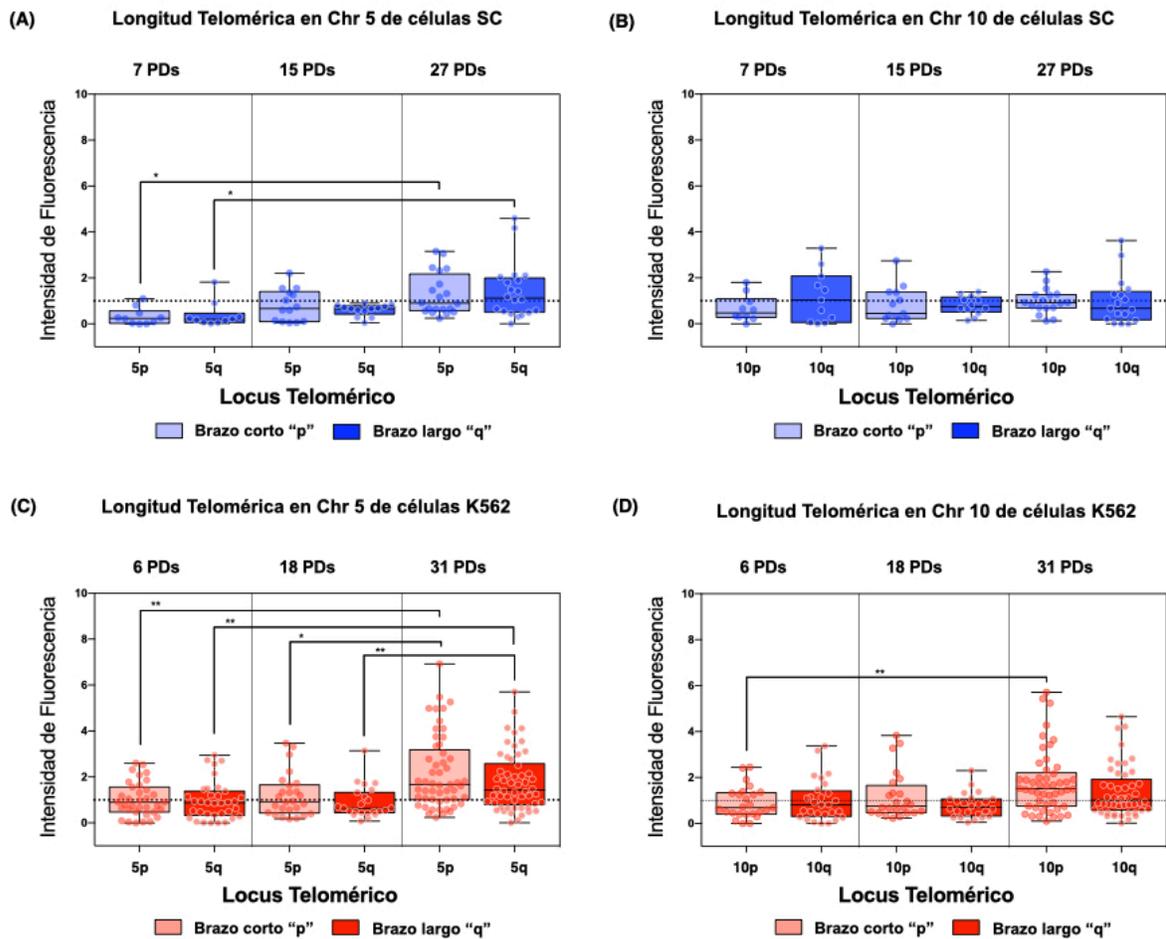


Figura 18. Cada brazo cromosómico mostró un patrón de alargamiento diferente. Se evaluó la longitud telomérica en el chr5 y chr10. (A, C) En ambas líneas celulares los telómeros del chr5 fueron extendidos significativamente después de 27 PDs en la línea celular SC y después de 31 PDs en la K562. (B) No se detectó extensión telomérica en el chr10 de las células SC. (D) Hubo un evidente patrón de alargamiento telomérico en el chr10 de las células K562, pero el cambio solo fue significativo en el locus 10p. (A-D) La intensidad de fluorescencia de la sonda telomérica se normalizó contra la fluorescencia centromérica y se expresó en unidades arbitrarias (UA). Los datos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Valor ajustado de $P < 0.05$ (*), < 0.005 (**).

8. Análisis de la Cromatina subtelomérica

Las fluctuaciones que encontramos en la longitud telomérica pueden deberse a la presencia de la telomerasa; sin embargo, las proteínas del complejo shelterina pueden obstaculizar la actividad de esta enzima en telómeros estables (85), ofreciendo una explicación al alargamiento preferencial de los telómeros cortos. De hecho, la heterocromatina puede inhibir la transcripción de TERRA en cualquier locus subtelomérico (41), así que puede existir una relación indirecta entre la longitud telomérica, el estado de la cromatina local y la transcripción de TERRA en células que expresan telomerasa. Por esta razón decidimos evaluar el enriquecimiento de algunas marcas de cromatina y proteínas asociadas en los mismos loci en donde se cuantificó la expresión de TERRA, para relacionar el estado de la cromatina subtelomérica con los cambios en la expresión de TERRA derivados del envejecimiento celular.

8.1. Heterocromatina en las células SC

Los loci 5p y 10q acumularon marcas de histonas asociadas a heterocromatina a medida que la población celular envejeció.

- En 5p, la marca H3K9me3 aumentó 4.4 veces después de 15 PDs. La marca H3K27me3 aumentó 9.73 veces después de 15 PDs y 7.29 veces después de 25 PDs (Figura 19A,C). La marca H4K20me3 fue indetectable después de 25 PDs (Figura 20A).
- En el locus 10q la marca H3K9me3 aumentó 3.32 veces hasta después de 25 PDs. H3K27me3 mostró un incremento constante aunque sutil de 1.25 veces después de 15 PDs y 3.26 veces después de 25 PDs (Figura 19B,D). La marca H4K20me3 mostró un incremento de 5 veces después de 25 PDs (Figura 20B).

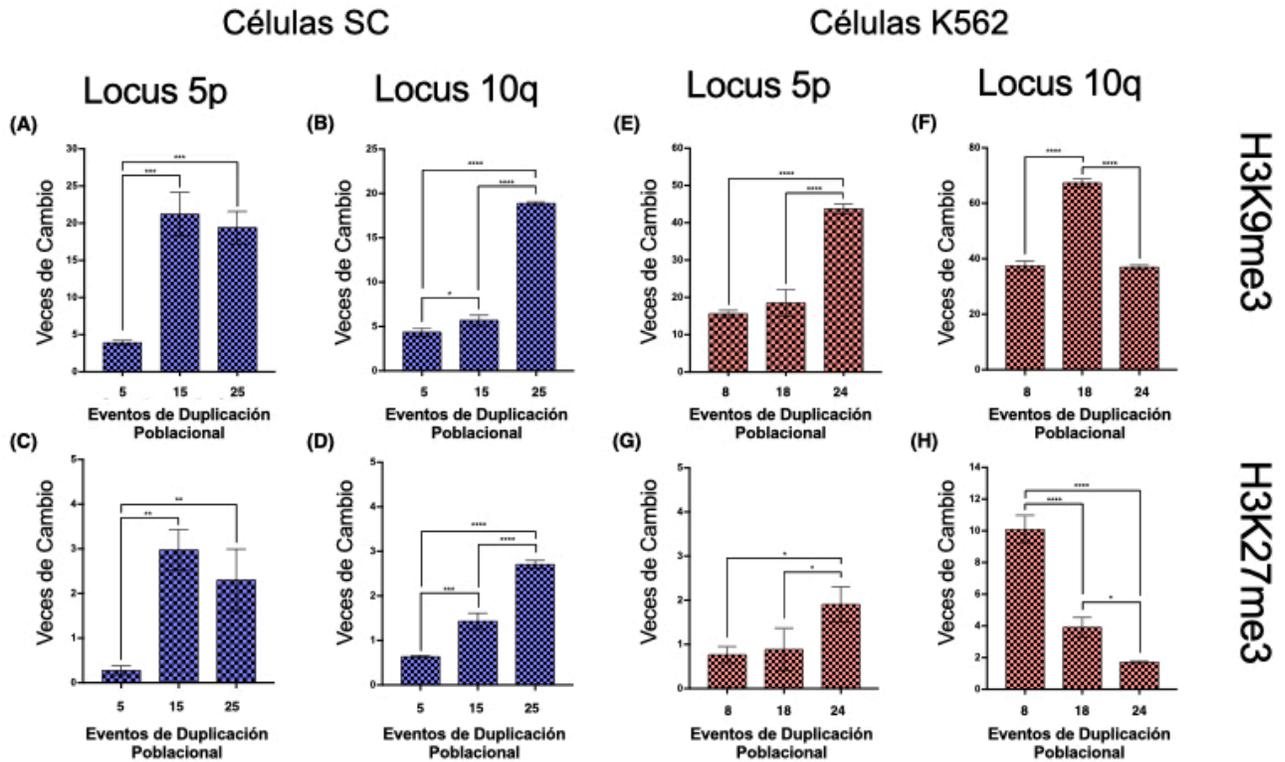


Figura 19. Las marcas de histonas asociadas a heterocromatina se acumulan en los dos loci analizados de la línea SC. Se realizó una inmuno-precipitación de cromatina para analizar la abundancia de las marcas de histonas H3K9me3 y H3K27me3, ambas asociadas a heterocromatina. (A-D) A medida que envejeció el cultivo, las dos marcas se acumularon en los loci 5p y 10q de las células SC. (E, G) En las células K562 el locus 5p también acumuló las dos marcas de histonas asociadas a heterocromatina. (F) Los niveles de H3K9me3 solo incrementaron de manera temporal en el locus 10q después de 18 PDs de la línea K562. (H) Los niveles de H3K27me3 disminuyeron en el locus 10q conforme envejecieron las células K562. Es de mencionar que los niveles de H3K9me3 siempre estuvieron considerablemente más elevados que los niveles de H3K27me3 en ambas líneas celulares. Los datos se normalizaron contra la precipitación inespecífica de IgG y se analizaron con una ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Valor ajustado de $P < 0.0001$ (****), < 0.001 (***), < 0.01 (**), < 0.05 (*)

8.2. Heterocromatina en las células K562

Al analizar las mismas marcas de cromatina en el locus 5p de las poblaciones celulares de K562 identificamos un fenómeno similar al que reportamos en SC.

- En 5p, H3K9me3 y H3K27me3 mostraron un enriquecimiento de 1.8 y 1.49 veces respectivamente, después de 24 PDs (Figura 19E,G). H4K20me3 incrementó 1.12 veces después de 14 PDs, pero después de 24 PDs los niveles de esta marca regresaron a su valor inicial (Figura 20E).
- En 10q no hubo diferencias en los niveles de H3K9me3 ni de H3K27me3. H3K9me3 incrementó 0.79 veces después de 14 PDs y volvió a sus niveles iniciales después de 20 PDs. Los niveles de H3K27me3 disminuyeron 0.61 veces después de 14 PDs y 0.83 veces después de 24 PDs (Figura 19F,H). H4K20me3 mostró un enriquecimiento de 0.79 veces después de 14 PDs pero los niveles de esta marca también bajaron hasta 0.76 veces por debajo de sus valores iniciales después de 24 PDs (Figura 20F).

8.3. Eucromatina en las células SC

En las células SC las marcas asociadas a eucromatina se acumularon.

- En el locus 5p vimos un incremento de 2.228 veces en Pol II y 4.98 veces en CTCF después de 25 PDs (Figura 21A,C). H3K4me3 también incrementó sus niveles 1.316 veces después de 25 PDs (Figura 20C).
- En el locus 10q hubo un incremento de 1.67 veces en Pol 2 y de 5.21 veces en CTCF después de 25 PDs (Figura 21B,D). La marca H3K4me3 incremento 6.05 veces después de 25 PDs (Figura 20D).

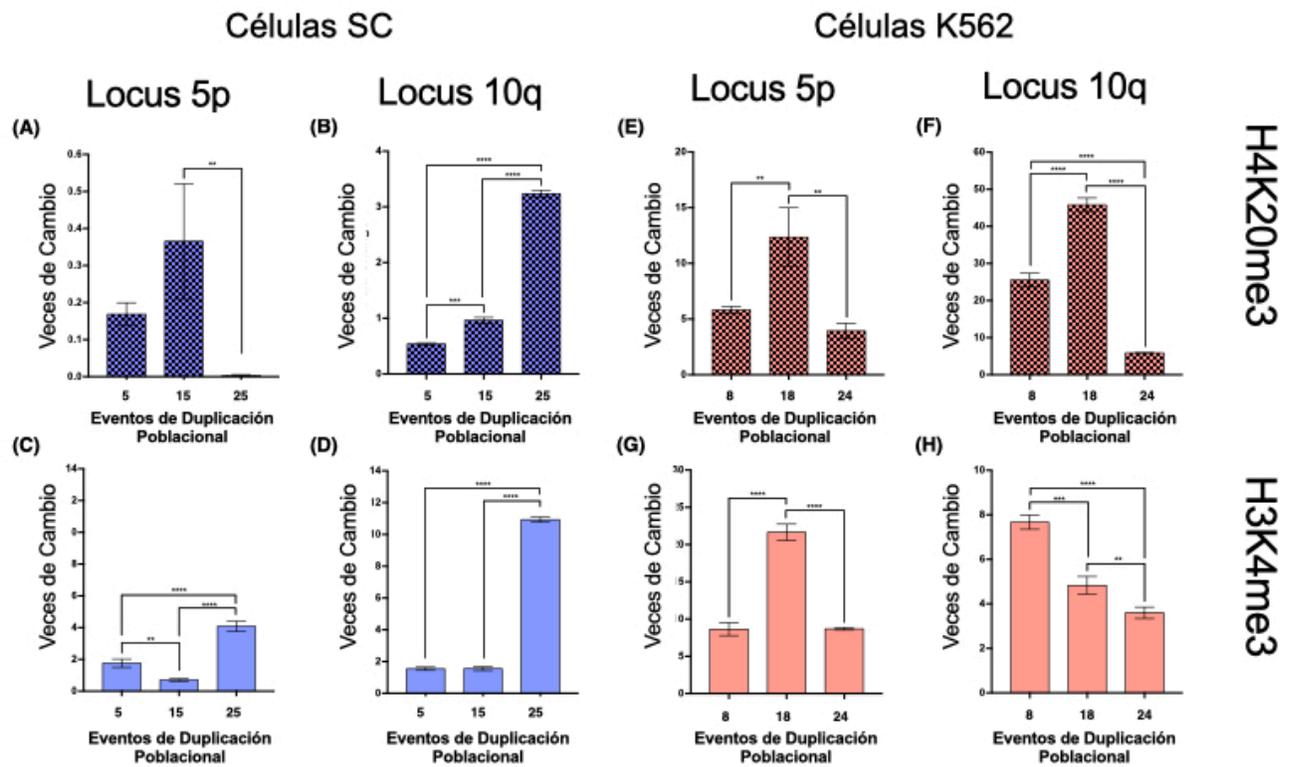


Figura 20. Transcripción de TERRA favorecida en locus con marcas antagónicas. Se realizó una inmuno-precipitación de cromatina para analizar la abundancia de las marcas de histonas H4K20me3 y H3K4me3. (A) H4K20me3, una marca usualmente enriquecida en la heterocromatina constitutiva del telómero, presentó niveles muy bajos en el locus 5p de las células SC; esta marca fue casi indetectable después de 25 PDs. (B) En el locus 10q los niveles de H4K20me3 incrementaron desde los 15 PDs y llegaron a niveles de enriquecimiento significativo después de 25 PDs. (E, F) Los niveles de H4K20me3 se comportaron de manera similar en ambos loci de la línea celular K562; la marca se acumuló después de 18 PDs pero disminuyó a los 24 PDs. El enriquecimiento de H4K20me3 en la línea K562 fue considerablemente mayor en 10q que en 5p. (C, D) H3K4me3, una marca asociada a promotores de genes activos, se acumuló en los dos loci de las células SC después de 25 PDs. El enriquecimiento de H3K4me3 en las células SC fue mayor en 10q que en 5p. (G) H3K4me3 incrementó significativamente en las células K562 a los 18 PDs, pero sus niveles bajaron a sus valores iniciales después de 24 PDs. (H) Los niveles de H3K4me3 se redujeron gradualmente conforme envejecieron las células K562. Los datos se normalizaron contra la precipitación inespecífica de IgG y se analizaron con una ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Valor ajustado de $P < 0.0001$ (****), $= 0.0008$ (***), < 0.01 (**), < 0.05 (*).

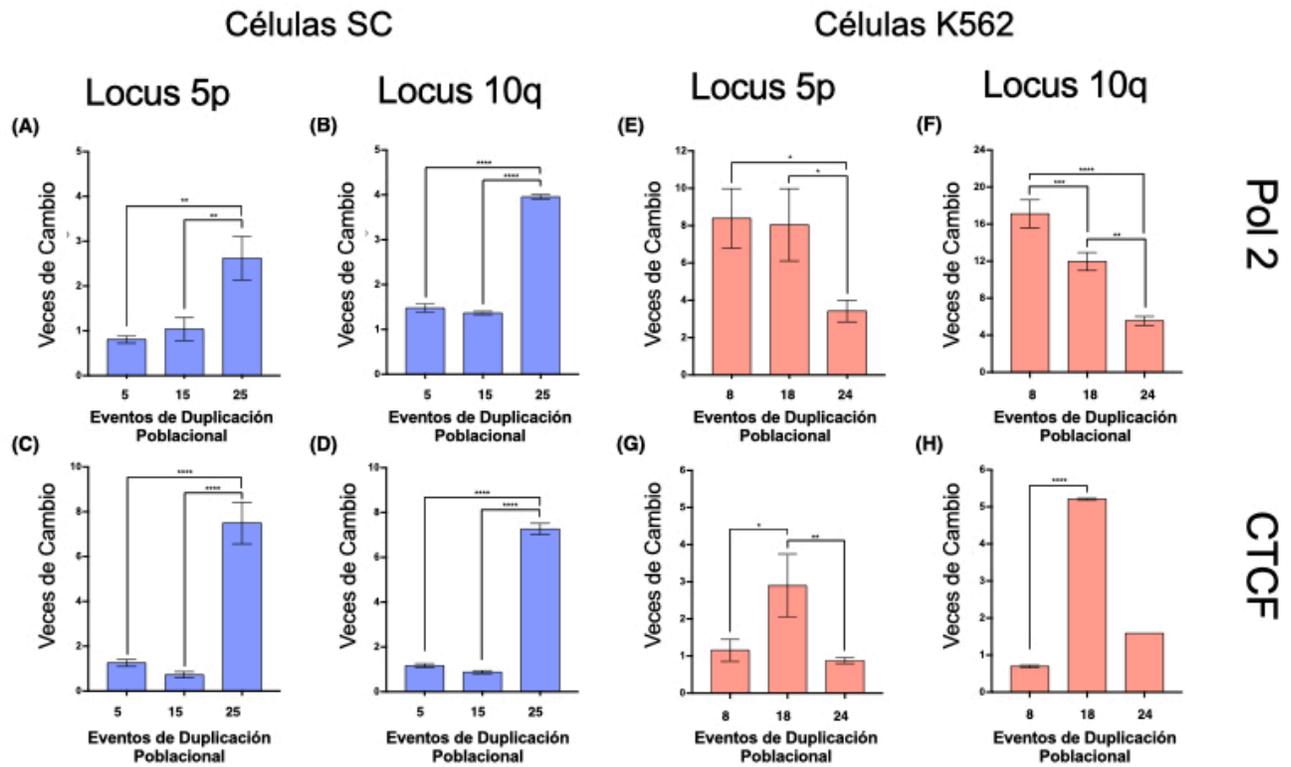


Figura 21. Acumulación de proteínas asociadas a eucromatina en los dos loci analizados de la línea SC. Se realizó una inmuno-precipitación de cromatina para analizar la abundancia de las proteínas asociadas a eucromatina RNA polimerasa 2 (Pol 2) y el factor de unión a CCCTC (CTCF). (A-D) A medida que envejeció el cultivo, las dos proteínas se acumularon en los loci 5p y 10q de las células SC. (E, F) Los niveles de Pol 2 disminuyeron en los loci 5p y 10q conforme fueron envejeciendo las células K562. Los reducidos niveles de Pol 2 que se encontraron después de 24 PDs de las células K562 estaban cerca de los niveles de esta proteína que la línea SC acumuló en el mismo locus después de 25 PDs. (G, H) Los niveles de CTCF incrementaron ambos loci después de 18 PDs de la línea K562, pero pasados 24 PDs bajaron a sus valores originales. Los datos se normalizaron contra la precipitación inespecífica de IgG y se analizaron con una ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Valor ajustado de $P < 0.0001$ (****), $= 0.0008$ (***), < 0.01 (**), < 0.05 (*).

8.4 Eucromatina en las células K562

- En el locus 5p de las células K562 los niveles de Pol II disminuyeron 0.59 veces después de 24 PDs. CTCF se acumuló 1.5 veces después de 14 PDs, pero los niveles regresaron a sus valores iniciales después de 24 PDs (Figura 21E,G). H3K4me3 también incrementó 1.5 veces después de 14 PDs, pero los niveles de esta marca volvieron a sus niveles originales después de 24 PDs (Figura 20G).
- En el locus 10q los niveles de Pol II bajaron 0.3 veces después de 14 PDs y 0.675 veces después de 24 PDs. Sin embargo, los niveles de CTCF incrementaron 6.48 veces después de 14 PDs, aunque volvieron a sus valores después de 24 PDs (Figura 21F,H). Por último, H3K4me3 disminuyó continuamente, 0.36 veces después de 14 PDs y 0.53 veces después de 24 PDs (Figura 20H).

DISCUSIÓN

De acuerdo con la ATCC, la línea celular SC es una línea multi-clonal al momento de adquisición, sin embargo el análisis convencional de su cariotipo reveló un cariotipo hipotriploide después de tan solo 7 PDs. También había una población hiperdiploide creciente después de 10 PDs pero para el final del ensayo más del 75% de las células presentaban un cariotipo hipotriploide (81). Debido a que la selección clonal ocurrió en los pases más tempranos del cultivo, esperábamos contar con un cariotipo estable a lo largo del ensayo. Sin embargo, las nuevas anormalidades encontradas en los cromosomas 5 y 10, junto con la aparición de un nuevo marcador cromosómico después de 27 PDs, pusieron en evidencia la inestabilidad de la clona establecida.

La línea K562 también mostró anormalidades cromosómicas evidentes a medida que envejeció el cultivo. En vista de que se trata de una línea celular inmortalizada, de origen leucémico, no esperábamos alteraciones cromosómicas adicionales en su cariotipo, sin embargo, después de 31 PDs encontramos cuatro aberraciones cromosómicas consistentes y otras 10 alteraciones numéricas que involucraban nueve cromosomas y marcadores cromosómicos adicionales. En la población analizada más temprana de la línea K562 la ploidía reportada estaba distribuída de manera equilibrada entre células hiperdiploides e hipotriploides, pero después de 31 PDs el 80% de las células analizadas mostró un cariotipo hipotriploide (81).

A pesar de que no pudimos seguir de cerca el proceso a través del cual se estableció la clona hipotriploide de la línea SC, el análisis citogenético confirmó que estábamos trabajando con una línea celular monoclonal desde el inicio de nuestro ensayo (86). Esto a su vez, nos permitió evaluar la estabilidad cromosómica, la integridad telomérica, el enriquecimiento subtelomérico de marcas de cromatina y la expresión de TERRA en una sola clona a medida que el cultivo envejecía.

Uno de los primeros cambios que notamos en la línea monoclonal SC fue la expresión elevada de hTERT. Dado que estábamos trabajando con una línea que había experimentado una selección clonal espontánea, ya contábamos con que habría una expresión de la Telomerasa (74,87,88) y efectivamente, encontramos una expresión basal de dicha enzima en las células SC. Sin embargo, hubo un incremento de 1.62 veces en la expresión de hTERT luego de 15 PDs y dichos niveles permanecieron por encima de los niveles registrados en la línea celular leucémica usada como de referencia, K562 (79). A diferencia de las células mieloides, en la línea celular dependiente de ALT, Saos2, la expresión de hTERT se mantuvo significativamente baja, puesto que no depende de la Telomerasa para el mantenimiento de sus telómeros (89).

La expresión de hTERT es crucial para la progresión de una leucemia (78,90–93) así que resultó interesante para nosotros descubrir un incremento en la transcripción de la retrotranscriptasa en las muestras de la línea SC. En casi todos los tumores, e incluso en leucemias, cuando se reactiva la transcripción de Telomerasa la mayor parte de la región cromosómica 5p es amplificada o se ve involucrada en re-arreglos cromosómicos que facilitan la transcripción de hTERT (91,94–96). Sin embargo, Barthel et al. (2017) reportaron que únicamente el 42% de los casos de reactivación de la transcripción de hTERT se originan por factores genéticos como pueden ser la amplificación génica, la mutación de promotores y la generación de variantes estructurales. El 53% de los casos de reactivación de la retrotranscriptasa se deben a la metilación de la secuencia promotora del gen hTERT, es decir un mecanismo epigenético que promueve su transcripción en este caso particular (79,97–99).

En vista de que el análisis citogenético de la línea SC mostró que incluso después de que ocurrieran aberraciones estructurales y numéricas, la región cromosómica 5p no presentó alteraciones, de modo que la reactivación de la transcripción de hTERT en la línea SC debe estar regulada por mecanismos no relacionados con alteraciones genéticas (100). Para apoyar esta teoría tenemos los resultados de la expresión de hTERT en la línea K562, en donde encontramos fluctuaciones en la expresión de hTERT conforme al envejecimiento del cultivo

celular. Tal parece que las células leucémicas puede reactivar la expresión de hTERT en respuesta a una longitud telomérica crítica, para luego silenciar su expresión una vez que la homeostásis telomérica ha sido recuperada. Es más factible que este cambio dinámico de expresión sea regulado por factores epigenéticos, lo cual haría a la modificación post-traducciona de histonas un mejor candidato para explicar los cambios de expresión generados por el proceso de envejecimiento celular (90,100).

No esperábamos la expresión inconsistente de hTERT en las células de origen leucémico debido a que este tipo de neoplasias se caracterizan por tener telómeros cortos pero con una longitud estable (78), además de que, en cáncer, la homeostasis telomérica es mediada por un equilibrio entre el acortamiento asociado a la replicación del DNA y al alargamiento mediado por la Telomerasa (98). Sin embargo, esta fluctuación en la transcripción de hTERT puede ser responsable de las alteraciones cromosómicas adicionales que se describieron anteriormente y del potencial ilimitado de división que presentan las células K562, algo que no se observó en la recién establecida clona de las células SC. Más aún, parece que la expresión constante y elevada de hTERT desencadenó un proceso de senescencia celular en la línea SC, la cual no logró dividirse después de 29 PDs.

En células hTERT-positivas la longitud telomérica es mantenida en un punto estable evitando la unión de la Telomerasa a los telómeros más largos y favoreciendo su unión a las secuencias más cortas; esto es mediado por el complejo shelterina (85). Sin embargo, descubrimos que en células K562 la expresión de hTERT también se vio sub-regulada una vez que la longitud telomérica ya no era crítica. Esto apunta a un mecanismo de regulación telomérica que fomenta la existencia de fases de inestabilidad genómica y muerte celular, pero que a la vez evita la senescencia celular prematura e induce la inmortalidad celular (90). En ausencia de hTERT, la tasa de proliferación de la línea K562 causó una crisis telomérica, lo cual impulsó la generación de nuevos re-arreglos cromosómicos hasta conseguir la subsecuente sobre-expresión de hTERT y extender los telómeros más cortos.

Una vez que estábamos seguros de que las células contaban con un mecanismo de mantenimiento telomérico buscamos determinar si esto podía influenciar la transcripción telomérica. Parece ser que siempre que incrementaba la expresión de hTERT, aumentaba la longitud de TERRA. En las células SC la mayor parte del lncRNA tenía una longitud dos veces mayor en las muestras de 15 PDs (4 kb) que en las de 10 PDs (2 kb) y la longitud máxima del RNA aislado fue >10 kb después de 15 PDs, un incremento considerable tomando en cuenta que a los 10 PDs la longitud máxima era de apenas 2.5 kb. Se observaron resultados similares al analizar el RNA de la línea K562. La mayor parte de TERRA era más larga en las muestras obtenidas después de 18 PDs (3 kb) que en las muestras de 14 PDs (2.5 kb). La longitud máxima del lncRNA también incrementó hasta 6 kb en las muestras de 18 PDs. De manera interesante, la longitud máxima de TERRA fue >4 kb más larga en las muestras de las células SC que en las células de origen leucémico, K562.

A pesar de que creímos que el incremento en la longitud de TERRA era un efecto de la actividad recuperada de la Telomerasa, los resultados de las células Saos2 mostraron que en realidad es la longitud del repetido telomérico lo que afecta esta relación (101,102). TERRA era más largo y más abundante en la línea ALT-dependiente, Saos2; la mayor parte del lncRNA tenía cerca de 6 kb de longitud en los PDs analizados de esta línea celular y no hubo un cambio observable en su longitud entre las muestras de 8 y 15 PDs. Se ha reportado que la transcripción telomérica está favorecida en células ALT-dependientes a causa de la elevada asociación de la RNA Pol II en los promotores de TERRA y la hipometilación de sus islas CpG, así como los bajos niveles de la H3K9me3 (103). Más aún, la transcripción de TERRA promueve la recombinación telomérica y por lo tanto la elongación de los telómeros, en células dependientes de mecanismos ALT (104), lo cual explica la elevada abundancia de TERRA que encontramos en las células Saos2 así como su mayor longitud.

A pesar de las evidentes diferencias en el tamaño de las moléculas de TERRA, la abundancia global del lncRNA no se vió afectada por la expresión de la transcriptasa reversa telomérica. Esta fue la razón por la que decidimos evaluar una población discreta de este lncRNA. Se

analizó la expresión específica de TERRA 5p y TERRA 10q, ya que ambas moléculas provenían de cromosomas que presentaron aberraciones después de 27 PDs de la línea celular SC.

Los resultados mostraron que la expresión de TERRA es variable, dependiendo tanto del cromosoma a partir del cual se transcribe, como de la edad de la población celular. En las células SC TERRA 5p presentó una expresión estable a lo largo de todo el ensayo, mientras que la expresión de TERRA 10q incrementó más de 2 veces después de 29 PDs. En las células K562 la expresión del lncRNA fue diferente. TERRA 5p mantuvo una expresión estable de 8 a 14 PDs pero después de 29 PDs su expresión bajó significativamente. Este abrupto cambio de expresión a los 29 PDs también ocurrió con TERRA 10q, pero cabe mencionar que la expresión de TERRA 10q había incrementado 4 veces pasados 14 PDs, algo que no ocurrió con TERRA 5p. La disminución de la transcripción telomérica que encontramos en las células K562 no afectó los niveles globales de TERRA. Del mismo modo, el incremento en la expresión que observamos en ambas líneas celulares no fue detectado en el Northern Blot.

Esperábamos que la expresión de TERRA fuera más estable en K562, una línea celular inmortalizada que ya había pasado por los procesos consecutivos de acortamiento acelerado y recuperación telomérica de la transformación celular (20,71,72,74,75). Sin embargo, los telómeros de la recién establecida clona de las células SC mostraron ser más estables que los de las células K562. Esto parecía evidente por el perfil de expresión del lncRNA que encontramos en los loci evaluados, pero decidimos confirmar esta hipótesis analizando la longitud telomérica para saber si los cambios en la expresión de TERRA tenían un impacto directo en la homeostasis de sus loci teloméricos.

El análisis de longitud telomérica mostró que la duplicación poblacional indujo un incremento en la longitud de la mayoría de los telómeros de ambas líneas mieloides; a pesar de no parecer sustancial, este alargamiento resultó estadísticamente significativo. Estos resultados fueron de nuestro interés ya que las neoplasias hematológicas pueden mantener una

proliferación indefinida y restaurar la función de sus telómeros por medio de la re-expresión de telomerasa, sin la necesidad de alargar sus telómeros de manera considerable (78,105).

A pesar de que la Telomerasa estaba presente en ambas líneas celulares, el efecto de su expresión fue diferente en cada una. En presencia de hTERT la duplicación poblacional indujo un incremento estable en la longitud telomérica promedio de las células SC. Por otro lado, el alargamiento telomérico fue considerablemente heterogéneo en todas las poblaciones analizadas de la línea K562, inclusive después de una pérdida sustancial de secuencias teloméricas la heterogeneidad en los valores de longitud telomérica siguió siendo significativa entre los brazos cromosómicos de las células K562.

En las células K562 la expresión de hTERT fue recuperada en la misma población en la que se presentó un acortamiento significativo en la longitud telomérica global, PD18. Al analizar estos resultados en conjunto se muestra la serie de eventos desencadenados por el acortamiento telomérico, en donde la re-expresión de hTERT es una respuesta inducida por la longitud crítica de algunas secuencias teloméricas (106). La diferencia de longitud que se encontró entre los telómeros de cada cromosoma demostró que, incluso en presencia de hTERT, el acortamiento telomérico genera una respuesta diferente en cada línea.

El análisis cromosoma-específico mostró que, al inicio del estudio, la mayoría de los telómeros en las células SC eran adversamente cortos, mientras que en las K562 los telómeros eran claramente más largos. La diferencia entre la longitud de los telómeros en la línea SC solo fue significativa en la población celular más temprana. La varianza de los valores ya no fue estadísticamente significativa después de 15 y 27 PDs, lo cual sugiere que se llevó a cabo un proceso de alargamiento telomérico continuo en los brazos cromosómicos de las células SC. Este fenómeno se ha descrito antes, cuando la expresión de hTERT es re-inducida en células sin Telomerasa y se ha observado que la transcriptasa reversa reconoce y extiende preferentemente las secuencias más cortas, hasta llevarlas a una longitud cercana a los valores promedio de la célula (98,105).

Sin embargo, contrario a lo esperado en una célula dependiente de la expresión de Telomerasa, los telómeros de la línea K562 no presentaron un crecimiento uniforme; incluso después de recuperarse de un acortamiento importante la diferencia de longitud entre los telómeros de las células K562 siguió siendo considerable. Cabe mencionar que, una vez recobrada la expresión de hTERT, la recuperación telomérica ocurrió a un ritmo más elevado en las células de origen leucémico.

Los resultados obtenidos en ambas líneas celulares muestran que las secuencias críticamente cortas fueron extendidas a un ritmo constante, homogeneizando gradualmente la longitud telomérica promedio (SC). Pero, al presentarse una pérdida exacerbada de secuencias teloméricas, se indujo un alargamiento acelerado para compensar el abrupto acortamiento (K562).

A pesar de que la longitud telomérica incrementó a lo largo del ensayo, la extensión más significativa en los loci analizados ocurrió en el chr 5. La longitud telomérica inicial de este cromosoma puede ser la razón detrás de su elongación significativa en presencia de hTERT, ya que la extensión telomérica solo se lleva a cabo una vez que un brazo cromosómico ha alcanzado una longitud crítica (105) y los telómeros del chr 5 en las células SC fueron de los más cortos que encontramos al inicio del ensayo.

En cambio, en la línea celular K562 la longitud telomérica promedio en las poblaciones tempranas era bastante similar en los chr 5 y 10, así que la elongación preferencial del chr 5 no puede deberse a una longitud crítica. Del mismo modo, la longitud telomérica estable del chr 10 puede explicar la falta de alargamiento en dicho locus, porque a pesar de tener telómeros más cortos de lo normal, no habían alcanzado una longitud crítica.

Es importante recordar que el papel esencial que desempeña la Telomerasa una vez re-expresada, no es recuperar la longitud telomérica promedio de una célula, sino mantener la función telomérica evitando que los telómeros más cortos lleguen a una longitud crítica (105). Así que, aunque la longitud de los telómeros analizados no haya incrementado de manera

significativa, los resultados mostraron que no hubo más acortamiento telomérico mientras la expresión de hTERT permaneciera detectable.

En el caso de las células SC, en donde la expresión de hTERT se mantuvo elevada a lo largo del envejecimiento celular, hubo una menor incidencia de aberraciones cromosómicas asociadas a la crisis telomérica, tales como fusiones de extremos cromosómicos, traslocaciones no recíprocas, aneuploidía y cambio en el número de copias (90,107). Por otro lado, al final del ensayo, encontramos 14 aberraciones cromosómicas distintas en la línea K562, en la cual la expresión de hTERT fluctuó de manera significativa a lo largo del ensayo.

Comparamos los resultados del análisis de longitud telomérica por Q-FISH con la expresión de TERRA de cada locus con la finalidad de evaluar el efecto *in cis* que la transcripción de TERRA podrían tener sobre la longitud telomérica de un locus en particular. Descubrimos que ni la sobre-expresión, ni la expresión constante de este lncRNA tuvieron un efecto apreciable sobre la longitud telomérica promedio de los loci evaluados.

La única circunstancia en la que hubo un cambio significativo tanto en la transcripción de TERRA como en la longitud telomérica fue cuando la expresión del lncRNA bajó a niveles casi indetectables. Observamos una elongación telomérica significativa en el mismo locus en donde la expresión de TERRA bajó. Por esta razón consideramos que existe una relación inversamente proporcional entre la expresión de TERRA y la longitud del telómero a partir del cual se transcribe. Estos resultados pueden ser explicados a través del efecto de posición telomérica a larga distancia (TPE-OLD), un fenómeno que describe cómo es que los telómeros largos pueden asistir en la propagación de la heterocromatina hacia la región subtelomérica (108). Así que, en realidad fue la longitud telomérica lo que afectó la expresión de TERRA y no al revés.

Hasta ahora, los resultados mostraron como, a medida que una clona celular envejeció, la longitud de sus telómeros mostró una creciente heterogeneidad y la expresión de sus lncRNAs

asociados cambió. Debido a que estos cambios fueron más significativos en las muestras de PDs tardíos decidimos analizar algunas marcas de histonas y proteínas asociadas a cromatina en los loci antes evaluados, para buscar alteraciones en la cromatina local asociadas al proceso de envejecimiento celular.

Al evaluar las marcas asociadas con heterocromatina encontramos distintos patrones de enriquecimiento dependiendo del locus subtelomérico analizado. Tanto la marca de heterocromatina constitutiva H3K9me3 (109,110) y la marca de heterocromatina facultativa H3K27me3 (111) se comportaron de manera similar en el locus 5p de ambas líneas celulares a medida que éstas envejecieron. Hubo un enriquecimiento significativo de ambas marcas de heterocromatina después de 15 PDs en las células SC y después de 24 PDs en K562. A pesar de estos incrementos, la transcripción de TERRA 5p solo se vio afectada en las células K562, indicando que la regulación de la transcripción de TERRA depende de una combinación de factores y no solo de la presencia de marcas de heterocromatina en su sitio de transcripción, ya sea constitutiva o facultativa.

Cuando se analizó el locus 10q se observó un patrón de enriquecimiento diferente entre líneas celulares. A medida que la línea celular SC envejeció, se acumularon ambas marcas de heterocromatina (H3K9me3 y H3K27me3) en el locus 10q. En cambio, en las células K562 no hubo ninguna acumulación de estas marcas al evaluar el mismo locus. Los niveles de H3K27me3 bajaron constantemente y aunque la marca H3K9me3 se empezó a acumular, su abundancia bajó a sus niveles originales después de 24 PDs.

En el análisis de la cromatina local incluimos la H4K20me3, una marca de histonas enriquecida en la heterocromatina constitutiva del telómero, misma que se ha reportado estar involucrada en la regulación de la elongación telomérica y en la inhibición de la recombinación (112). A diferencia de las marcas anteriores, los niveles de H4K20me3 no incrementaron paulatinamente con el envejecimiento del cultivo. En el caso de las células K562, los dos loci evaluados mostraron un incremento en la concentración de esta marca a los 14 PDs, pero

después regresaron a sus niveles originales (5p) o incluso a niveles más bajos (10q). En el locus 5p de las células SC, la marca H4K20me3 llegó a niveles casi indetectables al final del estudio (25 PDs), mientras que en el locus 10q los niveles de H4K20me3 mostraron un incremento de 5 veces al final del ensayo, una diferencia importante si consideramos que en otro locus de esta misma población encontramos los niveles más bajos de esta marca.

Resulta interesante que, a pesar de que la heterocromatinización del telómero correlaciona positivamente con su longitud (108) y que H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3 son todas marcas de histonas asociadas a heterocromatina, esta última se acumuló en el locus en el que no se observó extensión telomérica alguna: SC 10q. Esta relación inversa entre el aumento de H4K20me3 y la longitud telomérica se ha reportado cuando se abroga la expresión de SUV420H1/H2, generando telómeros más largos e induciendo más eventos de intercambio de cromátidas hermanas (113.) De manera que, lo que favoreció la extensión telomérica en los loci analizados no fue la transcripción de TERRA o la ausencia de la misma, sino la pérdida de metilación en las marcas de histonas de heterocromatina sub-telomérica constitutiva.

Cabe mencionar que, los niveles iniciales de estas tres marcas de heterocromatina fueron mayores en los loci de las células K562, pero a medida que el cultivo envejeció, la marca H3K27me3 se acumuló en los loci analizados de las células SC. Al concluir el ensayo, esta marca estaba más enriquecida en la línea SC. Debido a que H3K27me3 es asociada a la heterocromatina facultativa (111), su enriquecimiento en regiones sub-teloméricas en donde H3K4me3 también está presente podría ser una indicación de que la cromatina en este locus puede ser activada para su transcripción. Sin embargo, la transcripción de TERRA en las células SC solamente aumentó en el locus 10q, aunque ambos loci evaluados estuvieran enriquecidos con H3K27me3. Esto nos hizo pensar que la transcripción de este lncRNA no está regulada por el Complejo de Represión Polycomb 2 (PRC2), responsable de la metilación de la H3K27 (114).

Debido a que la eucromatina permite el acceso a la maquinaria transcripcional, también evaluamos el enriquecimiento de H3K4me3, una marca asociada a secuencias promotoras activas (115), junto con la abundancia del factor de unión a CCCTC (CTCF), un elemento de barrera que previene la expansión de la heterocromatina y el silenciamiento de regiones transcripcionalmente activas (116,117), así como la presencia de la RNA polimerasa II fosforilada en la serina 5 (S5P-RNA Pol II), la enzima responsable de la transcripción de TERRA (38,118).

Encontramos una diferencia particular entre las células SC y K562 al analizar las marcas de eucromatina. En las células leucémicas, las marcas asociadas a transcripción mostraron ya sea un incremento inconstante o una continua disminución de sus niveles. Mientras que, en las células SC, los niveles de estas marcas de eucromatina incrementaron en ambos loci después de 25 PDs.

El cambio más evidente en las células SC fue el enriquecimiento de H3K4me3 y de CTCF, pero ambos loci también mostraron una acumulación de la S5P-Pol II. Sin embargo, a pesar del estado favorable de la cromatina, la transcripción de TERRA solo aumentó en el locus 10q de la línea SC. Las diferentes tasas de expresión entre los loci de esta línea podrían deberse únicamente al enriquecimiento de la marca H3K4me3, que aumentó 6 veces en 10q, pero la pérdida de H4K20me3 en el locus 5p también juega una parte importante de este fenómeno.

Se ha reportado que dominios bivalentes de cromatina, enriquecidos simultáneamente con las marcas H3K4me3 y H4K20me3, se localizan cerca de los TSS de genes activos y presentan una transcripción muy eficiente, según se reporta por la menor incidencia de RNA Pol II detenidas en dominios con ambas marcas de histonas presentes (119). Estos antecedentes nos llevan a pensar que la transcripción de TERRA 10q aumentó en las células SC como resultado de la mayor abundancia tanto de H4K20me3 como de H3K4me3 y no solo como una respuesta a la presencia de la RNA Pol II. En las células K562 la presencia simultánea de estas marcas también favoreció la transcripción de TERRA 10q después de 14 PDs; sin

embargo, en ambos loci evaluados en K562 se presentó una disminución en los niveles de RNA Pol II de 0.63 veces, lo cual fue suficiente para comprometer la transcripción de TERRA en los PDs más tardíos de la línea celular de origen leucémico.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio muestra cómo es que una clona celular recupera la homeostasis telomérica, después de haber sufrido aberraciones numéricas y estructurales, a través de la expresión de la telomerasa. Encontramos que la transcripción elevada de la telomerasa fue capaz de impedir la formación de más aberraciones cromosómicas en la clona celular establecida a partir de la línea SC. En cambio, en la línea K562, en donde la expresión de telomerasa no fue estable, ocurrieron aun más aberraciones cromosómicas.

A pesar de su aparente homeostasis, los telómeros de la línea SC mostraron un constante alargamiento; sin embargo estas células dejaron de dividirse aún en presencia de Telomerasa. Por lo tanto, la re expresión de hTERT y la recuperación telomérica no fueron suficientes para transformar células humanas de la estirpe mieloide; a medida que las células envejecen deben ocurrir otras alteraciones, tales como mutaciones en HRAS, TP53 y RB1, para poder obtener el potencial ilimitado de replicación característico de las células cancerosas (120–122).

Existe una correlación entre la recuperación de la expresión de telomerasa y el incremento considerable en la longitud del lncRNA TERRA. Esto está directamente relacionado con la longitud del telómero por lo que la longitud de TERRA puede incrementar en ausencia de hTERT.

Descubrimos que una disminución abrupta en la expresión de TERRA precedió a la elongación acelerada de los telómeros en los loci analizados de las células K562, así que la homeostasis de estos telómeros sí tuvo una relación *in cis* con el lncRNA transcrito a partir de la región sub-telomérica adyacente.

Sin embargo, la interacción entre la transcripción telomérica y la estabilidad de los telómeros parece depender más de la metilación de histonas en las regiones sub-teloméricas adyacentes que de la transcripción de TERRA per se. Esto se puso en evidencia por el efecto del la

pérdida de H4K20me3, que perjudicó la transcripción de TERRA en loci enriquecidos con marcas de eucromatina que se encontraban listos para la transcripción. Esto nos lleva a pensar que, durante el proceso de recuperación telomérica que le sigue a la crisis telomérica y a la inestabilidad genómica, es en realidad la recuperación de la heterocromatina sub-telomérica lo que favorece la estabilización de los telómeros y no solo la presencia de Telomerasa. Acumulando H4K20me3/H3K4me3 en los telómeros que presentan una longitud crítica, se promueve la transcripción de TERRA a partir de dichas secuencias, se recluta la Telomerasa a estos loci y una vez que la extensión telomérica ha dado inicio, se comienzan a acumular las marcas de heterocromatina H3K27me3/H3K9me en la región sub-telomérica adyacente, limitando una vez más la expresión de TERRA. Esta secuencia de eventos estabiliza la longitud telomérica en un punto entre el acortamiento inducido por la replicación y el alargamiento mediado por la Telomerasa.

Así es como la expresión reducida de TERRA puede contribuir a la inestabilidad telomérica e inducir el desarrollo de aberraciones cromosómicas a medida que las células se dividen en ausencia de telómeros estables. La homeostasis alterada del lncRNA TERRA no es una causa sino una consecuencia de la transformación celular y los cambios en su perfil de expresión pueden llevar a inestabilidad telomérica y genómica, condiciones que pueden desencadenar ya sea un proceso de senescencia celular prematura o facilitar la selección clonal de células con potencial de replicación ilimitado.

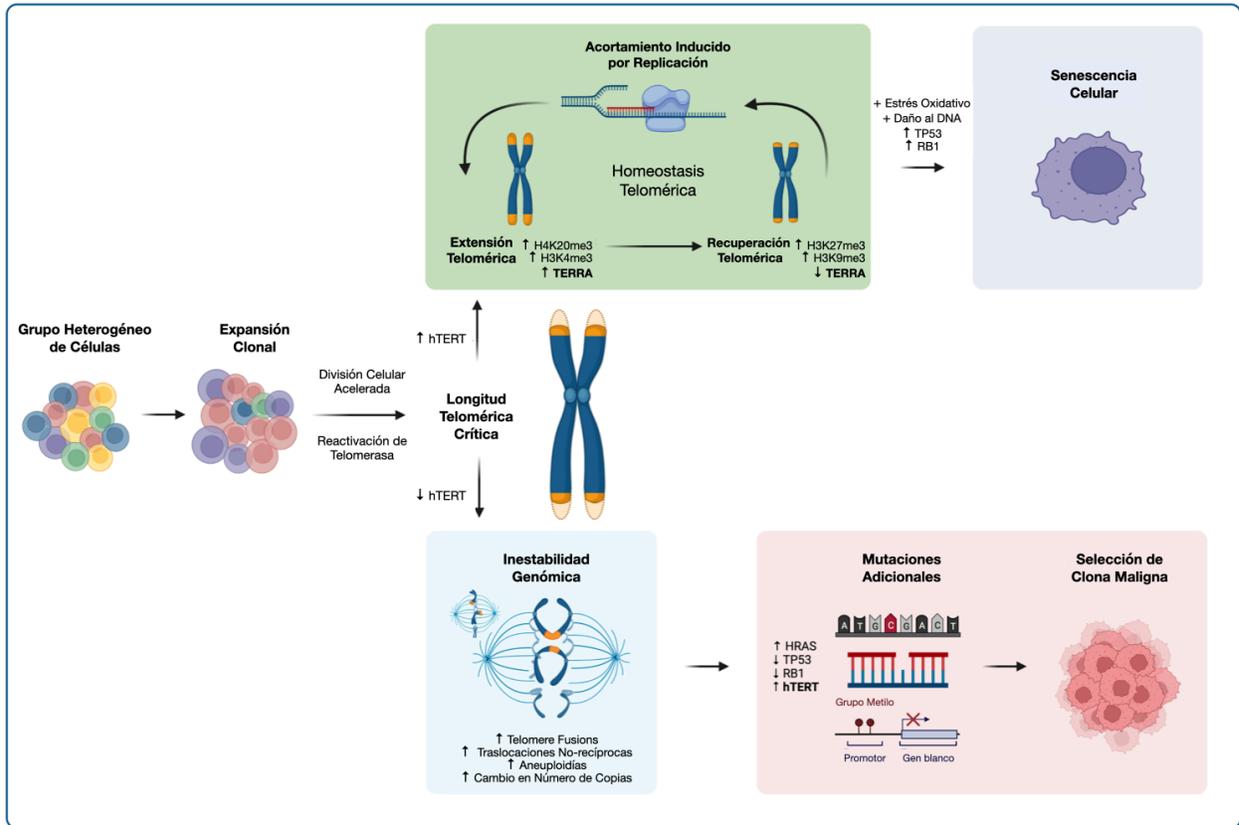


Figura 22. Modelo propuesto para el papel de TERRA en la recuperación telomérica. A pesar de la re-activación de hTERT, la expansión de una clona celular conduce a una longitud telomérica crítica debido a la acelerada división celular. Cuando se sobre-expresa hTERT da inicio la recuperación telomérica y se puede volver a la homeostasis. Si hTERT es incapaz de resolver la pérdida de telómeros entonces se presenta inestabilidad genómica. Dadas las circunstancias adecuadas, ambos escenarios pueden seguir desarrollándose. (Panel superior) En células con una longitud telomérica estable, la proliferación aún puede ser detenida. La acumulación de daño al DNA bajo condiciones fisiológicas de estrés oxidativo pueden llevar al arresto del ciclo celular mediado por TP53/RB1 y a la inducción de senescencia celular (67,123). (Panel inferior) En células con una longitud telomérica crítica se pueden acumular más mutaciones debido a la inestabilidad genómica. Cuando se presentan mutaciones en HRAS, TP53 y RB1 en células que ya re-expresaron hTERT, se puede conducir a las células a una transformación maligna (120–122).

ANEXOS

Índice de figuras

FIGURA 1. ENVEJECIMIENTO CELULAR Y LÍMITE DE HAYFLICK	6
FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL TELÓMERO	7
FIGURA 3. EL COMPLEJO SHELTERINA Y LAS ASAS TELOMÉRICAS	9
FIGURA 4. MANTENIMIENTO DE LA CROMATINA SUBTELOMÉRICA	11
FIGURA 5. TRANSCRIPCIÓN DE TERRA	13
FIGURA 6. EL CUADRUPLIX DE GUANIDINAS	15
FIGURA 7. ACUMULACIÓN DE TERRA A TRAVÉS DEL CICLO CELULAR	17
FIGURA 8. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA NORTHERN BLOT DE TERRA.....	23
FIGURA 9. TOPOGRAFÍA DEL LOCUS 5P EVALUADO	24
FIGURA 10. METAFASES Y CARIOGRAMAS PARA EL ANÁLISIS POR Q-FISH	28
FIGURA 11. SE ESTABLECIÓ UNA CLONA HIPOTRIPLOIDE EN LAS CÉLULAS SC PERO AÚN HUBO INESTABILIDAD CROMOSÓMICA NUMÉRICA.	30
FIGURA 12. LA LÍNEA CELULAR HIPOTRIPLOIDE K562 MOSTRÓ INESTABILIDAD CROMOSÓMICA A MEDIDA QUE ENVEJECÍA EL CULTIVO.....	31
FIGURA 13. EN LAS CÉLULAS SC SE RECUPERÓ LA EXPRESIÓN DE HTERT E INCREMENTÓ LA LONGITUD DE TERRA	33
FIGURA 14. LOS LOCI ANALIZADAS DE TERRA NO TIENEN POTENCIAL DE CODIFICACIÓN.	35
FIGURA 15. LA EXPRESIÓN DE TERRA CAMBIÓ DE MANERA TELÓMERO-ESPECÍFICA.....	36
FIGURA 16. LA LONGITUD TELOMÉRICA GLOBAL INCREMENTO CONSTANTEMENTE EN LAS CÉLULAS SC.	38
FIGURA 17. LONGITUD TELOMÉRICA CROMOSOMA-ESPECÍFICA EN LAS CÉLULAS SC Y K562.....	40
FIGURA 18. CADA BRAZO CROMOSÓMICO MOSTRÓ UN PATRÓN DE ALARGAMIENTO DIFERENTE.	43
FIGURA 19. LAS MARCAS DE HISTONAS ASOCIADAS A HETEROCROMATINA SE ACUMULAN EN LOS DOS LOCI ANALIZADOS DE LA LÍNEA SC.....	45
FIGURA 20. TRANSCRIPCIÓN DE TERRA FAVORECIDA EN LOCUS CON MARCAS ANTAGÓNICAS.	47
FIGURA 21. ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A EUCROMATINA EN LOS DOS LOCI ANALIZADOS DE LA LÍNEA SC.	48
FIGURA 22. MODELO PROPUESTO PARA EL PAPEL DE TERRA EN LA RECUPERACIÓN TELOMÉRICA.	64

Lista de Abreviaturas

● ALT	Alargamiento alternativo de los telómeros
● ANOVA	Análisis de varianzas
● ATCC	Colección de Cultivos Americanos
● cDNA	DNA complementario
● ChIP	Inmuno precipitación de cromatina
● CO ₂	Dióxido de carbono
● CpG	5'-Citosina-fosfato-Guanina-3'
● CTCF	factor de unión a CCCTC
● Cy5	Cianina 5
● D-loop	Asa de desplazamiento
● DAPI	Diamino fenilindol
● dCTP[P32]	Desoxi-citidina trifosfatada marcada con fósforo 32
● DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
● DNA Pol ii	DNA Polimerasa ii
● DNAsa	Desoxirribonucleasa
● DNMT	DNA metil-transferasa
● DSB	ruptura de DNA de doble cadena
● dsDNA	DNA de doble cadena
● Fase S	Fase de síntesis de DNA
● FBS	Suero fetal bovino
● FITC	Isotiocianato de fluoresceína
● G-quads	Cuadruplex de Guanidinas
● H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 en la histona 3
● H3K4me3	Trimetilación de la lisina 4 en la histona 3
● H3K9me3	Trimetilación de la lisina 9 en la histona 3
● H4K20me3	trimetilación de la lisina 20 en la histona 4

● HeLa	Línea celular humana de adenocarcinoma cervical
● HP1A	Homólogo alfa de la proteína de heterocromatina 1
● HR	Recombinación homóloga
● HRAS	GTPasa del virus Harvey del sarcoma de rata
● hTERT	Unidad catalítica de la telomerasa
● IgG	Inmunoglobulina
● IMDM	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Iscove
● K562	Línea celular humana de leucemia mieloide crónica
● kb	Kilobases
● lncRNA	RNA largo no codificante
● NHEJ	Unión de extremos no homólogos
● ORC	Complejo de reconocimiento del origen
● ORF	Marco de lectura abierto
● pb	Pares de bases
● PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
● PDs	Duplicaciones poblacionales
● Pol ii	RNA Polimerasa ii
● POT1	Protección de telómeros 1
● Q-FISH	Hibridación in situ fluorescente cuantitativa
● qPCR	Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa
● RAP1	Proteína activadora/represora 1
● RB1	Proteína de retinoblastoma 1
● RNA	Ácido ribonucleico
● Saos2	Línea celular humana de osteosarcoma
● SC	Línea celular multiclonal humana de origen mieloide
● ssDNA	DNA de cadena sencilla
● SUV39H1/H2	Homólogo 1/2 del supresor de variegación 3-9

● SUV420H1	Homólogo 1 del supresor de variegación 4-20
● T-loop	Asa telomérica
● TAR	Repetidos asociados al telómero
● TBS	Solución amortiguadora de TRIS
● Telomerasa	Transcriptasa reversa telomérica
● TERRA	RNA largo no codificante con repetidos teloméricos
● TP53	Proteína tumoral 53
● TPP1/PTOP/PIP1/TINT1/ACD	Homólogo de proteína de displasia adrenocortical
● TRF1/TRF2	Factor de unión a repetidos teloméricos 1/2
● TSS	Sitio de inicio de la transcripción
● U6	Ribonucleoproteína nuclear pequeña 6
● UA	Unidades arbitrarias

Primers para el análisis por ChIP			
Blanco	Primer	Secuencia (5' - 3')	Marca Asociada
Promotor de p53	Fw	TGCTGGGAGTTGTAGTCTG	CTCF
	Rv	GATGCAGAAGAGGTGCAAG	
GAPDH Exones 5-6	Fw	GGAGTCCACTGGCGTCTTC	H3K4me3
	Rv	GGTTCACACCCATGACGAAC	
GAPDH 5'UTR- Exón 1	Fw	GTTTCTATAAATTGAGCCCCGAG	Ser5-P RNA Pol II
	Rv	AAAAGAAGATGCGGCTGACTG	
MYT1 5'UTR	Fw	CACCCCCAATTCAGCAGAT	H3K9me3
	Rv	TACGCTACCCATGAACCCT	
OCT4/POU5F1 Exón 1	Fw	AGCTGCCCACCTAACTTCTA	H4K20me3
	Rv	AGGGTCTCTCTTTCTGTCCT	
SOX2-OT Intrón	Fw	CTTTCAGTTTCGTTGCTCCAACCCTGAC	H3K27me3
	Rv	CCCTTCTCCCTTTTTGCTGGCTCTCC	

Publicaciones realizadas durante el Doctorado

- E. Fabian-Morales, D. Vallejo-Escamilla, A. Gudiño, A. Rodríguez, R. González-Barrios, Y. L. R. Torres, C. C. Hernández, A. H. Torre-Luján, **D. A. Oliva-Rico**, E. C. O. Guzmán, A. L. Saavedra, S. Frias, L. A. Herrera. Large-scale topological disruption of chromosome territories 9 and 22 is associated with nonresponse to treatment in CML. *Int J Cancer* (2021), doi:10.1002/ijc.33903.
- E. FABIAN-MORALES, C. FERNÁNDEZ-CÁCERES, A. GUDIÑO, M. A. A. ELGUERA, K. TORRES-ARCIGA, M. A. E. ARRAZOLA, L. T. GARCÍA, Y. E. A. MORA, **D. A. OLIVA-RICO**, R. E. C. GUTIÉRREZ, J. D. ORTÍZ, C. C. HERNÁNDEZ, L. A. H. MONTALVO, D. B. DÍAZ-NEGRETE, N. REYNOSO-NOVERÓN. GENOTOXICITY OF MARIJUANA IN MONO-USERS. *FRONTIERS PSYCHIATRY*. 12, 753562 (2021).
- R. E. CÁCERES-GUTIÉRREZ, M. A. ANDONEGUI, **D. A. OLIVA-RICO**, R. GONZÁLEZ-BARRIOS, F. LUNA, C. ARRIAGA-CANON, A. LÓPEZ-SAAVEDRA, D. PRADA, C. CASTRO, L. PARMENTIER, J. DÍAZ-CHÁVEZ, Y. ALFARO-MORA, E. I. NAVARRO-DELGADO, E. FABIAN-MORALES, B. TRAN, J. SHETTY, Y. ZHAO, N. ALCARAZ, C. D. LA ROSA, J. L. REYES, S. HÉDOUIN, F. HUBÉ, C. FRANCASTEL, L. A. HERRERA. PROTEASOME INHIBITION ALTERS MITOTIC PROGRESSION THROUGH THE UPREGULATION OF CENTROMERIC A-SATELLITE RNAs. *FEBS J* (2021), DOI:10.1111/FEBS.16261.

-
-
- O. ISPANIXTLAHUATL-MERÁZ, N. L. DELGADO-BUENROSTRO, A. DÉCIGA-ALCARAZ, M. DEL P. RAMOS-GODINEZ, **D. OLIVA-RICO**, E. O. LÓPEZ-VILLEGAS, G. J. VÁZQUEZ-ZAPIÉN, M. M. MATA-MIRANDA, D. ILHUICATZI-ALVARADO, L. MORENO-FIERROS, C. M. G. CUELLAR, Y. SÁNCHEZ-PÉREZ, Y. I. CHIRINO. DIFFERENTIAL RESPONSE OF IMMOBILE (PNEUMOCYTES) AND MOBILE (MONOCYTES) BARRIERS AGAINST 2 TYPES OF METAL OXIDE NANOPARTICLES. CHEM-BIOL INTERACT. 347, 109596 (2021).

 - MARIA GUADALUPE RICO-ROSILLO. **DIEGO ADRIAN OLIVA-RICO**. GLORIA BERTHA VEGA-ROBLEDO. AGING: SOME THEORIES, GENETIC, EPIGENETIC AND ENVIRONMENTAL CONSIDERATIONS. REV MED INST MEX SEGURO SOC. 2018 OCT 25;56(3):287-294.

 - CRISTIAN ARRIAGA-CANON, INTI ALBERTO DE LA ROSA-VELÁZQUEZ, RODRIGO GONZÁLEZ-BARRIOS, ROGELIO MONTIEL-MANRÍQUEZ, **DIEGO OLIVA-RICO**, FRANCISCO JIMÉNEZ-TREJO, CARLO CORTÉS-GONZÁLEZ, LUIS A HERRERA. THE USE OF LONG NON-CODING RNAs AS PROGNOSTIC BIOMARKERS AND THERAPEUTIC TARGETS IN PROSTATE CANCER. ONCOTARGET. 2018 APR 17;9(29):20872-20890.

 - **DIEGO ADRIAN OLIVA-RICO**, LUIS A HERRERA. REGULATED EXPRESSION OF THE LNCRNA TERRA AND ITS IMPACT ON TELOMERE BIOLOGY. MECH AGEING DEV. 2017 OCT;167:16-23.

 - **DIEGO ADRIAN OLIVA-RICO**, LUIS A HERRERA. ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES. LIBRO-MANUAL DE ONCOLOGÍA, EDICIÓN-6, PAÍS-MÉXICO, EDITORIAL-TATA MCGRAW-HILL, ISBN-978-1-4562-5471-1.

 - MARIA GUADALUPE RICO-ROSILLO. GLORIA BERTHA VEGA-ROBLEDO. **DIEGO ADRIAN OLIVA-RICO**. THE ROLE AND IMPORTANCE OF THE MICRORNAs IN THE DIAGNOSIS AND DEVELOPMENT OF DISEASES. REV MED INST MEX SEGURO SOC. MAY-JUN 2014;52(3):302-7.

 - MARIA GUADALUPE RICO-ROSILLO. GLORIA BERTHA VEGA-ROBLEDO. RAÚL SILVA-GARCIA. **DIEGO ADRIAN OLIVA-RICO**. EPIGENETICS, ENVIRONMENT AND ASTHMA. APRIL 2014ALERGIA 61(2):99-109

Referencias

1. Sinha, S. et al. Telomeric Repeat Containing RNA (TERRA): Aging and Cancer. *CNS & neurological disorders drug targets* 14, 936–946 (2015).
2. Shay, J. W. At the end of the millennium, a view of the end. *Nature Genetics* 23, 382–383 (1999).
3. Hirashima, K. & Seimiya, H. Telomeric repeat-containing RNA/G-quadruplex-forming sequences cause genome-wide alteration of gene expression in human cancer cells in vivo. *Nucleic Acids Research* 43, 2022–2032 (2015).
4. Watson, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New biology* 239, 197–201 (1972).
5. Samassekou, O., Gadji, M., Drouin, R. & Yan, J. Sizing the ends: Normal length of human telomeres. *Annals of Anatomy* 192, 284–291 (2010).
6. Zhao, Y. et al. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *138*, 463–475 (2009).
7. Feuerhahn, S., Chen, L., Luke, B. & Porro, A. No DDRama at chromosome ends: TRF2 takes centre stage. *Trends in biochemical sciences* 40, 275–285 (2015).
8. Gutschner, T. & Diederichs, S. The hallmarks of cancer. *Rna Biol* 9, 703–719 (2012).
9. Sikora, E., Arendt, T., Bennett, M. & Narita, M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Research Reviews* 10, 146–152 (2011).
10. Kappei, D. & Londoño-Vallejo, J. A. Telomere length inheritance and aging. *Mechanisms of ageing and development* 129, 17–26 (2008).
11. Rajaraman, R., Guernsey, D. L., Rajaraman, M. M. & Rajaraman, S. R. Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer Rengaswami Rajaraman*1, Duane L Guernsey2, Murali M Rajaraman3 and Selva R Rajaraman. *Cancer Cell International* 6, 25 (2006).
12. Allsopp, R. C. et al. Telomere length predicts replicative capacity of human

-
-
- fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 10114–10118 (1992).
13. Greider, C. W. Telomeres and senescence: The history, the experiment, the future. *Curr Biol* 8, R178–R181 (1998).
 14. Guilherme, R. S. et al. Terminal 18q deletions are stabilized by neotelomeres. *Molecular cytogenetics* 8, 895 (2015).
 15. Heng, H. H. et al. Chromosomal instability (CIN): what it is and why it is crucial to cancer evolution. *Cancer and Metastasis Reviews* 32, 325–340 (2013).
 16. Oganessian, L. & Karlseder, J. Telomeric armor: the layers of end protection. *Journal of Cell Science* 122, 4013–4025 (2009).
 17. Artandi, S. E. et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 406, 641–645 (2000).
 18. Griffith, J. D. et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503–514 (1999).
 19. Artandi, S. E. & DePinho, R. A. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31, 9–18 (2010).
 20. Counter, C. M. et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* 11, 1921–1929 (1992).
 21. Calado, R. T. & Young, N. S. Telomere Diseases. *New Engl J Medicine* 361, 2353–2365 (2009).
 22. Flynn, R. L. et al. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. *Science* 347, 273–277 (2015).
 23. Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L. & Reddel, R. R. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature Genetics* 26, 447–450 (2000).
 24. Smogorzewska, A., Karlseder, J., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A. & Lange, T. de. DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Current*

biology: CB 12, 1635–1644 (2002).

25. Caslini, C. Transcriptional regulation of telomeric non-coding RNA: implications on telomere biology, replicative senescence and cancer. *RNA Biology* 7, 18–22 (2010).

26. Liu, D., O'Connor, M. S., Qin, J. & Songyang, Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 51338–51342 (2004).

27. Martínez, P. & Blasco, M. A. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. 1–16 (2011) doi:10.1038/nrc3025.

28. Brown, W. R. et al. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *63*, 119–132 (1990).

29. Riethman, H. Human subtelomeric copy number variations. *Cytogenetic and Genome Research* 123, 244–252 (2008).

30. Rudd, M. K. et al. Elevated Rates of Sister Chromatid Exchange at Chromosome Ends. *PLoS Genetics* 3, e32-5 (2007).

31. Blasco, M. A. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nature Reviews Genetics* 8, 299–309 (2007).

32. Gonzalo, S. et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nature Cell Biology* 8, 416–424 (2006).

33. García-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A. H. F. M., Jenuwein, T. & Blasco, M. A. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nature Genetics* 36, 94–99 (2003).

34. Koering, C. E. et al. Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO reports* 3, 1055–1061 (2002).

35. Guttman, M. et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458, 223–227 (2009).

36. Derrien, T. et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis

-
-
- of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research* 22, 1775–1789 (2012).
37. Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoriantseva, L., Giulotto, E. & Lingner, J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318, 798–801 (2007).
38. Schoeftner, S. & Blasco, M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature Cell Biology* 10, 228–236 (2008).
39. Azzalin, C. M. & Lingner, J. Telomeres: the silence is broken. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7, 1161–1165 (2008).
40. Feuerhahn, S., Iglesias, N., Panza, A., Porro, A. & Lingner, J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Letters* 584, 3812–3818 (2010).
41. Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H. & Lieberman, P. M. TERRA RNA Binding to TRF2 Facilitates Heterochromatin Formation and ORC Recruitment at Telomeres. *Molecular cell* 35, 403–413 (2009).
42. Takahama, K. et al. Regulation of Telomere Length by G-Quadruplex Telomere DNA- and TERRA-Binding Protein TLS/FUS. *Chemistry & Biology* 20, 341–350 (2013).
43. Xu, Y. et al. Finding a human telomere DNA-RNA hybrid G-quadruplex formed by human telomeric 6-mer RNA and 16-mer DNA using click chemistry: A protective structure for telomere end. *Bioorganic & medicinal chemistry* 22, 4419–4421 (2014).
44. Parkinson, G. N., Lee, M. P. H. & Neidle, S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* 417, 876–880 (2002).
45. Xu, Y. & Komiyama, M. Structure, function and targeting of human telomere RNA. *Methods (San Diego, Calif.)* 57, 100–105 (2012).
46. RIOU, J.-F., O., GOMEZ, D., MORJANI, H. & TRENTESAUX, C. Quadruplex Ligand Recognition: Biological Aspects. in (The Royal Society of Chemistry, 2006).

-
-
47. Luu, K. N., Phan, A. T., Kuryavyi, V., Lacroix, L. & Patel, D. J. Structure of the Human Telomere in K +Solution: An Intramolecular (3 + 1) G-Quadruplex Scaffold. *Journal of the American Chemical Society* 128, 9963–9970 (2006).
48. Zaug, A. J., Podell, E. R. & Cech, T. R. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 10864–10869 (2005).
49. Balk, B. et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nature Structural & Molecular Biology* 1–8 (2013) doi:10.1038/nsmb.2662.
50. Biffi, G., Tannahill, D. & Balasubramanian, S. An Intramolecular G-Quadruplex Structure Is Required for Binding of Telomeric Repeat-Containing RNA to the Telomeric Protein TRF2. *Journal of the American Chemical Society* 134, 11974–11976 (2012).
51. Wang, Z. et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature Publishing Group* 40, 897–903 (2008).
52. Kouzarides, T. Histone methylation in transcriptional control. *Current opinion in genetics & development* 12, 198–209 (2002).
53. Ohlsson, R., Bartkuhn, M. & Renkawitz, R. CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin. *Chromosoma* 119, 351–360 (2010).
54. Negishi, Y., Kawaji, H., Minoda, A. & Usui, K. Identification of chromatin marks at TERRA promoter and encoding region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467, 1052–1057 (2015).
55. Wang, C., Zhao, L. & Lu, S. Role of TERRA in the Regulation of Telomere Length. *International Journal of Biological Sciences* 11, 316–323 (2016).
56. Maicher, A., Kastner, L., Dees, M. & Luke, B. Deregulated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence. *Nucleic Acids Research* 40, 6649–6659 (2012).

-
-
57. Probst, A. V., Dunleavy, E. & Almouzni, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 192–206 (2009).
 58. Arnoult, N., Beneden, A. V. & Decottignies, A. Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1 α . *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 948–956 (2012).
 59. Cortez, D. Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity. *DNA Repair* 32, 149–157 (2015).
 60. Balk, B., Dees, M., Bender, K. & Luke, B. The differential processing of telomeres in response to increased telomeric transcription and RNA–DNA hybrid accumulation. *RNA Biology* 11, (2014).
 61. Gaillard, H., Herrera-Moyano, E. & Aguilera, A. Transcription-associated genome instability. *Chemical Reviews* 113, 8638–8661 (2013).
 62. Oliva-Rico, D. & Herrera, L. A. Regulated expression of the lncRNA TERRA and its impact on telomere biology. *Mech Ageing Dev* 167, 16–23 (2017).
 63. Flynn, R. L. et al. TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. *Nature* 471, 532–536 (2012).
 64. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70 (2000).
 65. Farnung, B. O., Brun, C. M., Arora, R., Lorenzi, L. E. & Azzalin, C. M. Telomerase Efficiently Elongates Highly Transcribing Telomeres in Human Cancer Cells. *PLoS ONE* 7, e35714 (2012).
 66. Arora, R. et al. RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. *Nature Communications* 5, 1–11 (2014).
 67. Collado, M., Blasco, M. A. & Serrano, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* 130, 223–233 (2007).
 68. Shay, J. W. & Wright, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Bio* 1, 72–76 (2000).

-
-
69. Shay, J. W. & Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787–791 (1997).
70. Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. & Reddel, R. R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J* 14, 4240–4248 (1995).
71. Véronèse, L. et al. Telomeres and chromosomal instability in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 27, 490–493 (2013).
72. Shay, J. W. & Wright, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol* 21, 349–353 (2011).
73. Ge, Z. et al. Chromatin remodeling: recruitment of histone demethylase RBP2 by Mad1 for transcriptional repression of a Myc target gene, telomerase reverse transcriptase. *The FASEB Journal* 24, 579–586 (2010).
74. Halvorsen, T. L., Leibowitz, G. & Levine, F. Telomerase Activity Is Sufficient To Allow Transformed Cells To Escape from Crisis. *Mol Cell Biol* 19, 1864–1870 (1999).
75. Counter, C. M., Botelho, F. M., Wang, P., Harley, C. B. & Bacchetti, S. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* 68, 3410–3414 (1994).
76. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674 (2011).
77. Collins, G. W. & Lagen, M. T. Continuous mammalian cell lines having monocyte/macrophage characteristics and their establishment in vitro. 1–10 (1995).
78. Nogueira, B. M. D., Machado, C. B., Montenegro, R. C., Moraes, M. E. A. de & Moreira-Nunes, C. A. Telomere Length and Hematological Disorders: A Review. *In Vivo* 34, 3093–3101 (2020).
79. Zinn, R. L., Pruitt, K., Eguchi, S., Baylin, S. B. & Herman, J. G. hTERT Is Expressed in Cancer Cell Lines Despite Promoter DNA Methylation by Preservation of Unmethylated

-
-
- DNA and Active Chromatin around the Transcription Start Site. *Cancer Res* 67, 194–201 (2007).
80. Deng, Z. et al. A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *The EMBO Journal* 1–14 (2012) doi:10.1038/emboj.2012.266.
81. Nomenclature, I. S. C. on H. C., McGowan-Jordan, J., Hastings, R. J. & Moore, S. *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (2020). (Karger, 2020).
82. Scheel, C. et al. Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas. *Oncogene* 20, 3835–3844 (2001).
83. Kang, Y.-J. et al. CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res* 45, W12–W16 (2017).
84. Kong, L. et al. CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res* 35, W345–W349 (2007).
85. Lange, T. de. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Gene Dev* 19, 2100–2110 (2005).
86. Jones, N. *Human Cytogenetics: Malignancy and Acquired Abnormalities, Third Edition, A Practical Approach*. *Chromosome Res* 10, 176–176 (2002).
87. Kamal, S. et al. The secrets of telomerase: Retrospective analysis and future prospects. *Life Sci* 257, 118115 (2020).
88. Lewis, K. A. & Tollefsbol, T. O. Regulation of the Telomerase Reverse Transcriptase Subunit through Epigenetic Mechanisms. *Frontiers Genetics* 7, 83 (2016).
89. Giardini, M. A., Segatto, M., Silva, M. S. da, Nunes, V. S. & Cano, M. I. N. *Telomere and Telomerase Biology*. in vol. 125 1–40 (Elsevier, 2014).
90. Roake, C. M. & Artandi, S. E. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nat Rev Mol Cell Bio* 21, 384–397 (2020).

-
-
91. Ropio, J., Merlio, J.-P., Soares, P. & Chevret, E. Telomerase Activation in Hematological Malignancies. *Genes-basel* 7, 61 (2016).
 92. Vicente-Dueñas, C. et al. Essential role for telomerase in chronic myeloid leukemia induced by BCR-ABL in mice. *Oncotarget* 3, 261–266 (2012).
 93. Deville, L., Hillion, J. & Ségal-Bendirdjian, E. Telomerase regulation in hematological cancers: A matter of stemness? *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Mol Basis Dis* 1792, 229–239 (2009).
 94. Heidenreich, B. & Kumar, R. TERT promoter mutations in telomere biology. *Mutat Res Rev Mutat Res* 771, 15–31 (2017).
 95. Zhao, Y., Wang, S., Popova, E. Y., Grigoryev, S. A. & Zhu, J. Rearrangement of upstream sequences of the hTERT gene during cellular immortalization. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 963–974 (2009).
 96. Zhang, A. et al. Frequent Amplification of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene in Human Tumors. *Cancer Research Volume* 60, 6230–6235 (2000).
 97. Barthel, F. P. et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet* 49, 349–357 (2017).
 98. Greider, C. W. Telomerase RNA Levels Limit the Telomere Length Equilibrium. *Cold Spring Harb Sym* 71, 225–229 (2006).
 99. Cristofari, G. & Lingner, J. Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting. *Embo J* 25, 565–574 (2006).
 100. Zhu, J., Zhao, Y. & Wang, S. Chromatin and epigenetic regulation of the telomerase reverse transcriptase gene. *Protein Cell* 1, 22–32 (2010).
 101. Episkopou, H. et al. Alternative Lengthening of Telomeres is characterized by reduced compaction of telomeric chromatin. *Nucleic Acids Res* 42, 4391–4405 (2014).
 102. Beneden, A. V., Arnoult, N. & Decottignies, A. Telomeric RNA expression: length matters. *Frontiers in oncology* 3, 178 (2013).

-
-
103. Arora, R. & Azzalin, C. M. Telomere elongation chooses TERRA ALternatives. *RNA Biology* 12, 938–941 (2015).
104. Silva, B., Arora, R., Bione, S. & Azzalin, C. M. TERRA transcription destabilizes telomere integrity to initiate break-induced replication in human ALT cells. *Nat Commun* 12, 3760 (2021).
105. Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L.-Y. & Greider, C. W. The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability. *Cell* 107, 67–77 (2001).
106. Kyo, S., Takakura, M., Fujiwara, T. & Inoue, M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci* 99, 1528–1538 (2008).
107. McClintock, B. The Fusion of Broken Ends of Chromosomes Following Nuclear Fusion. *Proc National Acad Sci* 28, 458–463 (1942).
108. Barral, A. & Déjardin, J. Telomeric Chromatin and TERRA. *J Mol Biol* 432, 4244–4256 (2020).
109. Nicetto, D. & Zaret, K. S. Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Curr Opin Genet Dev* 55, 1–10 (2019).
110. Becker, J. S., Nicetto, D. & Zaret, K. S. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends Genet* 32, 29–41 (2016).
111. Jamieson, K. et al. Loss of HP1 causes depletion of H3K27me3 from facultative heterochromatin and gain of H3K27me2 at constitutive heterochromatin. *Genome Res* 26, 97–107 (2016).
112. Nelson, D. M. et al. Mapping H4K20me3 onto the chromatin landscape of senescent cells indicates a function in control of cell senescence and tumor suppression through preservation of genetic and epigenetic stability. *Genome Biol* 17, 158 (2016).
113. Benetti, R. et al. Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and

-
-
- derepression of telomere recombination. *J Cell Biology* 178, 925–936 (2007).
114. Wiles, E. T. & Selker, E. U. H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Curr Opin Genet Dev* 43, 31–37 (2017).
115. Guillemette, B. et al. H3 Lysine 4 Is Acetylated at Active Gene Promoters and Is Regulated by H3 Lysine 4 Methylation. *Plos Genet* 7, e1001354 (2011).
116. Dávalos-Salas, M. et al. Gain of DNA methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human retinoblastoma gene promoter. *BMC cancer* 11, 232 (2011).
117. Barski, A. et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Nature* 429, 823–837 (2007).
118. Luke, B. & Lingner, J. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *The EMBO Journal* 28, 2503–2510 (2009).
119. Xu, J. & Kidder, B. L. H4K20me3 co-localizes with activating histone modifications at transcriptionally dynamic regions in embryonic stem cells. *Bmc Genomics* 19, 514 (2018).
120. Whitaker, N. J. et al. Involvement of RB-1, p53, p16INK4 and telomerase in immortalisation of human cells. *Oncogene* 11, 971–6 (1995).
121. Hahn, W. C. et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464–468 (1999).
122. Liu, H.-T. et al. Telomerase activity is not enough for tumor initiation in human cells.pdf. *Afr. J. Biotechnol* 8, 4734–4737 (2009).
123. Galigniana, N. M., Charó, N. L., Uranga, R., Cabanillas, A. M. & Piwien-Pilipuk, G. Oxidative stress induces transcription of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) by engaging PKA signaling and cytoskeleton dynamics. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Mol Cell Res* 1867, 118643 (2020).