



# REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA DNA TOPOISOMERASA II

Memoria presentada por  
**Andrés Manuel Herrero Ruiz**

Tesis doctoral realizada en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, y en el Centro Andaluz de Biología Molecular Y Medicina Regenerativa (CABIMER), para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Directores

**Felipe Cortés Ledesma**

**Silvia Jimeno González**

Tutor

**Agustin Vioque Peña**







## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco al Doctor Felipe Cortés Ledesma y la Doctora Silvia Jimeno González por su ayuda como directores de esta tesis doctoral.



# ÍNDICES



ÍNDICE

**1. INTRODUCCIÓN .....1**

**1.1. Transcripción por la RNA polimerasa II ..... 1**

    1.1.1. RNA Polimerasa II.....2

    1.1.2. Iniciación transcripcional .....3

    1.1.3. Elongación transcripcional.....5

    1.1.4. Terminación transcripcional ..... 10

**1.2. Propiedades topológicas del DNA.....11**

**1.3. Efectos del superenrollamiento del DNA en la transcripción . 14**

**1.4. DNA Topoisomerasas..... 16**

    1.4.1 DNA topoisomerasas tipo I .....17

    1.4.2. DNA topoisomerasas tipo II.....18

    1.4.3. Compuestos inhibidores de las DNA topoisomerasas .....21

**1.5. Papel de las DNA topoisomerasas en transcripción..... 22**

**2. OBJETIVOS.....29**

**3. RESULTADOS .....33**

**3.1. Respuesta transcripcional inducida por la inhibición catalítica de la DNA topoisomerasa II ..... 33**

**3.2. Caracterización del efecto producido por el tratamiento con merbarona..... 38**

    3.2.1. Análisis de la activación de la respuesta a mitógenos y estrés durante el tratamiento con merbarona .....38

    3.2.2. El tratamiento con merbarona no produce la acumulación de complejos de rotura de TOP2 de forma global .....40

    3.2.3. El tratamiento con merbarona no produce roturas de doble cadena....43

    3.2.4. Efecto de la merbarona sobre cada isoforma de TOP2 .....46

**3.3 Caracterización del papel de cada isoforma de TOP2 en el control de la expresión de los ERGs ..... 47**

**3.4 Efectos de la inhibición de TOP2 en la distribución de la Pol II ..... 52**

**3.5 Análisis de la distribución global de TOP2A..... 55**

**3.6 Relación entre TOP2A y la pausa próxima al promotor de Pol II ..... 57**

**3.7 Mecanismo de regulación transcripcional por TOP2A ..... 58**

    3.7.1 Relación entre la actividad de TOP2A y transcripción.....58

    3.7.2 Estudio de la función de TOP2A en la topología del gen *FOS* .....60

3.7.3 Efecto de la disrupción topológica del promotor de <i>FOS</i> sobre su inducción .....	61
<b>3.8 Análisis de la actividad de TOP1 durante la inhibición de TOP2A.....</b>	<b>66</b>
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 TOP2 regula la transcripción de forma independiente de roturas de doble cadena de DNA .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2 TOP2A reprime la transcripción mediante el mantenimiento de la pausa próxima al promotor de Pol II .....</b>	<b>76</b>
<b>4.3 Mecanismo de regulación transcripcional de los ERGs por TOP2A.....</b>	<b>78</b>
<b>4.4 Modelo de trabajo: Regulación topológica de la expresión génica en eucariotas .....</b>	<b>81</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>91</b>
<b>6.1. Procedimientos de cultivo celular.....</b>	<b>91</b>
6.1.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	91
6.1.2. Generación de líneas celulares mutantes CRISPR.....	92
6.1.4. Generación de líneas RPE Cas9 D10A.....	94
<b>6.2. Procedimientos de Biología Molecular y Celular .....</b>	<b>95</b>
6.2.1. Preparación de los gRNAs.....	95
6.2.2. Análisis de mRNA por qPCR (RT-qPCR).....	95
6.2.3. Secuenciación de mRNA total (RNA-seq) .....	96
6.2.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	96
6.2.5. Inmunofluorescencia de $\gamma$ H2AX y de H3S10P .....	99
6.2.6. Western blot.....	100
6.2.7. Ensayo ICE.....	101
6.2.8. Inmunodetección de muestras obtenidas por ICE .....	101
6.2.9. Inmunoprecipitación de complejos de roturas de TOP1 (TOP1cc-IP) .....	102
6.2.10. Análisis de la incorporación de trimetil-psoraleno biotilinado (bTMP) .....	102
<b>6.3. Análisis de datos de secuenciación masiva .....</b>	<b>104</b>
6.3.1. Análisis de secuenciación masiva.....	104
6.3.2. Determinación de los sitios de unión (picos).....	104
6.3.3. Genes diferencialmente expresados.....	104
6.3.4. Análisis de datos de secuenciación públicos disponibles .....	105
6.3.5. Estimación de la pausa próxima al promotor de Pol II .....	105
6.3.6. Filtrado de genes en base a señales de ChIP-seq.....	106
6.3.7. Índice de pausa .....	106
6.3.7. Ratio de liberación de Pol II.....	106

6.3.8. Identificación de elementos reguladores .....	107
6.3.9. Perfiles de la señal de ChIP-seq en promotores.....	107
6.3.10. Análisis de ontología génica.....	108
<b>6.4. Tabla de oligonucleótidos .....</b>	<b>108</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>113</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de los procesos generales que se producen durante la activación génica en organismos superiores....	4
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de distintos estados topológicos del DNA desnudo. ....	13
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática del ciclo catalítico de la DNA topoisomerasa 1 (TOP1) y 2 (TOP2) y drogas que bloquean su ciclo catalítico. ....	20
<b>Figura 4.</b> Análisis de los cambios transcripcionales en respuesta a la inhibición de TOP2A con merbarona. ....	34
<b>Figura 5.</b> Análisis de los genes inducidos tras 2 horas de inhibición de TOP2A con merbarona. ....	35
<b>Figura 6.</b> Análisis de la cinética de inducción transcripcional de dos ERGs en respuesta a la inhibición de TOP2A con merbarona.....	36
<b>Figura 7.</b> Análisis de la cinética de inducción transcripcional en respuesta a la inhibición de TOP2A con merbarona en A549 y MEFs. ....	37
<b>Figura 8.</b> Análisis del efecto de la merbarona sobre la estimulación transcripcional fisiológica de FOS con suero.....	38
<b>Figura 9.</b> Análisis de la activación de rutas de respuesta a mitógenos y estrés durante el tratamiento con merbarona.....	40
<b>Figura 10.</b> Análisis de expresión y de actividad de ambas isoformas de TOP2 y análisis de los complejos de rotura (TOP2cc) inducidos por los diferentes tratamientos.....	42

<b>Figura 11.</b> Análisis comparativo de la formación de roturas de doble cadena (DSBs) y los niveles de expresión del gen <i>FOS</i> durante los diferentes tratamientos.....	45
<b>Figura 12.</b> Análisis de la cinética de inducción transcripcional de <i>FOS</i> en células deficientes en TDP2.....	46
<b>Figura 13.</b> Análisis de la cinética de inhibición de ambas isoformas de TOP2 con merbarona.....	47
<b>Figura 14.</b> Validación de las células deficientes en cada isoformas de TOP2 y análisis de los niveles de expresión de <i>FOS</i> en estas células.	48
<b>Figura 15.</b> Análisis de la inducción de <i>FOS</i> en células deficientes en TOP2B en respuesta a diferentes tratamientos.....	49
<b>Figura 16.</b> Análisis de la inducción de <i>FOS</i> en células deficientes en TOP2A en respuesta a diferentes tratamientos.....	50
<b>Figura 17.</b> Análisis de la inducción de <i>FOS</i> en depleción del complejo BAF en respuesta a diferentes tratamientos.....	51
<b>Figura 18.</b> Análisis de las distribución global de Pol II por CHIP-seq en respuesta al tratamiento con merbarona.....	53
<b>Figura 19.</b> Análisis de la pausa próxima al promotor de Pol II en respuesta al tratamiento con merbarona.....	54
<b>Figura 20.</b> Análisis de la distribución global de TOP2A.....	56
<b>Figura 21.</b> Relación entre pausa próxima al promotor de Pol II y niveles de TOP2A en el promotor.....	58
<b>Figura 22.</b> Análisis de la inhibición de la transcripción sobre la actividad de TOP2A.....	59

<b>Figura 23.</b> Análisis de los niveles de superenrollamiento negativo en el gen <i>FOS</i> durante los distintos tratamientos. ....	61
<b>Figura 24.</b> Caracterización del efecto transcripcional de la generación de cortes de doble cadena (DSBs) en el promotor de <i>FOS</i> mediante el sistema CRISPR/Cas9. ....	62
<b>Figura 25.</b> Análisis de la inducción transcripcional de <i>FOS</i> en presencia de DSBs en su promotor. ....	64
<b>Figura 26.</b> Análisis de la inducción transcripcional de <i>FOS</i> en presencia de SSBs en su promotor. ....	65
<b>Figura 27.</b> Análisis de la actividad global de TOP1 durante los diferentes tratamientos. ....	67
<b>Figura 28.</b> Análisis de la actividad de TOP1 en el gen <i>FOS</i> durante los diferentes tratamientos. ....	69
<b>Figura 29.</b> Representación esquemática del modelo presentado para explicar la inducción transcripcional producida por la inhibición de TOP2A con merbarona. ....	80

**ABREVIATURAS**

<b>bTMP</b>	Trimetil-psoraleno biotilado ( <i>Biotinylated trimethyl-psoralen</i> )
<b>CC</b>	Complejo de rotura ( <i>Cleavage complex</i> )
<b>CPT</b>	Captotecina ( <i>Captothecin</i> )
<b>CRISPR</b>	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas ( <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> )
<b>CTD</b>	Dominio carboxilo terminal ( <i>Carboxy Terminal Domain</i> )
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol ( <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> )
<b>DDR</b>	Respuesta al Daño en el DNA ( <i>DNA Damage Response</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido ( <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DSBs</b>	Roturas de doble cadena ( <i>Double Strand Breaks</i> )
<b>ERGs</b>	Genes de respuesta temprana ( <i>Early Response Genes</i> )
<b>GTFs</b>	Factores generales de transcripción ( <i>General Transcription factors</i> )
<b>ICRF-187</b>	Dexrazoxano ( <i>Dexrazoxane</i> )
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G ( <i>Immunoglobulin G</i> )
<b>Kb</b>	Kilobase ( <i>Kilobase</i> )
<b>Lk</b>	Índice de ligamiento ( <i>Linking number</i> )
<b>MDa</b>	MegaDalton ( <i>MegaDalton</i> )
<b>MEFs</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón ( <i>Mouse embryonic fibroblast</i> )
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección ( <i>Multiplicity of infection</i> )
<b>NFR,</b>	Región libre de nucleosoma ( <i>Nucleosome Free Region</i> )
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PI</b>	Índice de Pausa ( <i>Pausing Index</i> )
<b>PIC</b>	Complejo de Pre-Iniciación ( <i>Pre-Initiation Complex</i> )
<b>PRR</b>	Ratio de liberación de Pol II ( <i>Polymerase 2 release ratio</i> )
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa ( <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic acid</i> )

<b>RPKM</b>	Lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas ( <i>Reads Per Kilobase, per Million mapped reads</i> )
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto ( <i>Revolutions per minute</i> )
<b>SEM</b>	Error estándar de la media ( <i>Standard Error of the Mean</i> )
<b>Ser2-P</b>	Fosforilación en serina 2 ( <i>Serine-2 phosphorylation</i> )
<b>Ser5-P</b>	Fosforilación en serina 5 ( <i>Serine-5 phosphorylation</i> )
<b>SSBs</b>	Roturas de cadena sencilla ( <i>Single Strand Breaks</i> )
<b>TSS</b>	Sitio de inicio de la transcripción ( <i>Transcription Start Site</i> )
<b>TTS</b>	Sitio de terminación de la transcripción ( <i>Transcription Termination Site</i> )
<b>Tw</b>	Índice de torsión ( <i>Twist</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UVA</b>	Ultravioleta A
<b>Wr</b>	Índice de superenrollamiento ( <i>writhe</i> )

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados desde 1968 por James C. Wang fueron inspirados por el descubrimiento del superenrollamiento del DNA (Vinograd et al., 1965) y permitieron identificar la primera enzima capaz de relajar el DNA: La Proteína  $\omega$  de *E. coli* (Wang, 1971), que posteriormente sería rebautizada con el nombre de DNA Topoisomerasa I procariota (Wang y Liu, 1979). Estos descubrimientos sentaron las bases de un nuevo campo de estudio: La Topología del DNA. No fue necesario mucho tiempo para advertir la fuerte asociación de esta nueva proteína con el proceso de transcripción del DNA (Bauer et al., 1977; Higashinakagawa, T., Wahn, H. & Reeder, 1977) y su implicación en la regulación de la expresión génica bacteriana (Friedman, S.B. Margolin, 1968; Graf y Burns, 1973; Margolin et al., 1985). Investigaciones posteriores han demostrado el profundo impacto que el superenrollamiento del DNA ejerce sobre la transcripción (Chong et al., 2014; Kravatskaya et al., 2013; Ma y Wang, 2014a; Ma et al., 2013) y la existencia de mecanismos topológicos de regulación transcripcional en células eucariotas (Kouzine et al., 2004, 2008). Todas estas evidencias postulan al DNA como un elemento activo y dinámico que puede controlar la transcripción gracias a la energía contenida en su estructura, así como la necesaria participación de las DNA topoisomerasas en la regulación transcripcional.

### 1.1. Transcripción por la RNA polimerasa II

La transcripción consiste en la síntesis de RNA a partir de DNA. Existen diversos tipos de RNAs, pero sólo el RNA mensajero (mRNA) codifica proteínas; los principales elementos funcionales de la célula. La síntesis del mRNA es llevada a cabo por la RNA Polimerasa II (Pol II) durante un proceso en el que se pueden distinguir 3 etapas secuenciales: iniciación, elongación y terminación.

### 1.1.1. RNA Polimerasa II

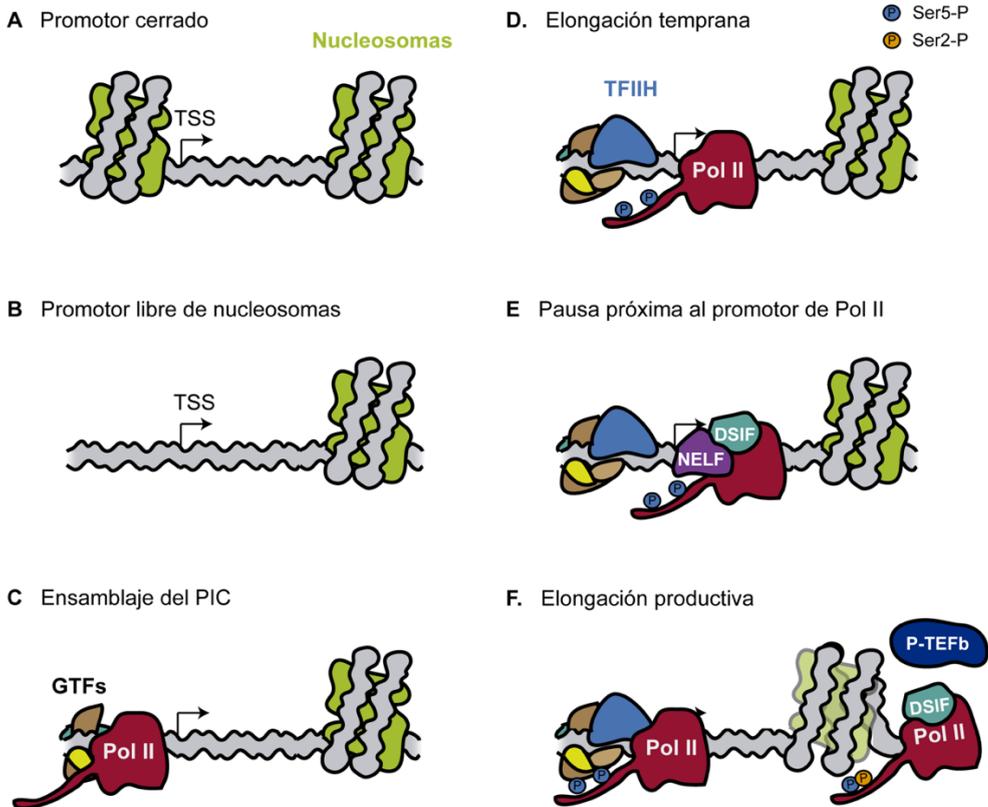
Pol II es un complejo compuesto por 12 subunidades altamente conservadas (RPB1-12) (Woychik y Hampsey, 2002), distribuidas en 4 elementos móviles que delimitan un canal central que permite la entrada del DNA molde hasta el sitio activo (Gnatt et al., 2001), donde se establece un híbrido de 8 nucleótidos entre éste y la molécula de RNA en síntesis (Westover et al., 2004). Asimismo, la subunidad RPB1 de Pol II se caracteriza por presentar un dominio carboxilo terminal (CTD) que se proyecta hacia el exterior del complejo globular, compuesto por repeticiones en tándem de la secuencia consenso  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$  (Corden, 1990), siendo el número de estas repeticiones específico en cada especie (Chapman et al., 2008). El dominio CTD no es necesario para la función catalítica del complejo, sin embargo, las células que carecen de este dominio son inviables (Buratowski y Sharp, 1990; Zehring et al., 1988). Durante la iniciación, este dominio se encuentra principalmente defosforilado (Payne et al., 1989), lo que permite su interacción con diferentes factores implicados en su unión al promotor, como el complejo Mediador (Asturias et al., 1999). Ya en el DNA, el CTD de Pol II sufre progresivas rondas de fosforilación sobre los distintos residuos de serina de las repeticiones (Kim et al., 2009). Así bien, mientras que en los primeros compases de la elongación se produce la fosforilación en serina 7 (Ser7-P) y serina 5 (Ser5-P) (Kim et al., 2009; Ramanathan et al., 2001), esta última es progresivamente sustituida por la fosforilación en serina 2 (Ser2-P) durante elongación productiva (Price, 2000). Estos diferentes estados de fosforilación determinan el orden de asociación de los distintos factores al complejo de elongación, lo que permite coordinar el avance de Pol II con una multitud de procesos que son necesarios para la síntesis eficiente de un mRNA funcional, como el procesamiento del pre-mRNA o la reorganización de la cromatina (Phatnani y Greenleaf, 2006).

### 1.1.2. Iniciación transcripcional

La transcripción comienza con el reclutamiento de Pol II al promotor, de forma dependiente de secuencias específicas que permiten la unión de determinados factores implicados en el proceso (Muller et al., 2007). Sin embargo, la estructura del nucleosoma, donde el DNA se encuentra fuertemente asociado a proteínas de histonas, puede representar una barrera estérica para el reconocimiento de estas secuencias de DNA (Figura 1A) (Kornberg y Lorch, 1999). En consecuencia, el inicio de la transcripción requiere la desestabilización de los nucleosomas de la región del promotor, dando lugar a una región libre de nucleosomas (NFR) (Workman, 2006). En algunos genes, esta reorganización de la cromatina es el principal nivel de regulación (Peterson y Workman, 2000), produciéndose en respuesta a la activación génica mediante la colaboración de diferentes elementos entre los que se incluyen factores transcripcionales específicos, modificadores de histonas como p300/CBP (Shikama et al., 1997) y remodeladores de la cromatina como el complejo SWI/SNF (Tsukiyama y Wu, 1995).

Una vez libre de nucleosomas (Figura 1B), el promotor es accesible a la unión de los factores generales de transcripción (GTFs) (Reese, 2003), que inducen el reclutamiento de Pol II con ayuda del complejo Mediador (Soutourina et al., 2011), dando lugar al complejo de pre-iniciación (PIC) (Luse, 2014) (Figura 1C). Inicialmente, Pol II se asienta sobre el DNA de doble cadena, ya que por sí sola es incapaz de iniciar la apertura de la doble hélice, siendo necesaria la asociación del último GTF, TFIIF (Tirode et al., 1999). TFIIF es un gran complejo compuesto por 10 proteínas, incluyendo dos subunidades helicásicas (XPB y XPD) y una con actividad quinasa (Cdk7) (Fisher, 2005). La apertura de la doble hélice permite que Pol II se asocie a la cadena molde del DNA e inicie la síntesis de la molécula de RNA (Kim et al., 2000). Dada su importancia, el reclutamiento de los GTFs es

también un punto altamente regulable, existiendo genes donde la unión al DNA de estos factores resulta el principal punto limitante de la transcripción, pese a presentar constitutivamente una estructura del promotor libre de nucleosomas (Ahn et al., 2004).



**Figura 1. Representación esquemática de los procesos generales que se producen durante la activación génica en organismos superiores.** **A.** Estructura del promotor cerrado (ocupado por nucleosomas) antes de la activación. **B.** Desestabilización de los nucleosomas de la región promotora. **C.** Ensamblaje del complejo de pre-iniciación (PIC), compuesto por los factores generales de transcripción (GTFs) y Pol II. **D.** Elongación temprana; TFIIH produce la apertura del DNA promotor y fosforila el CTD de Pol II en los residuos serina 5 (Ser5-P) para permitir el escape del promotor e inicio de la síntesis del pre-mRNA. **E.** Pausa próxima al promotor de Pol II; la unión de DSIF y NELF estabilizan el estado pausado del complejo de elongación. **F.** Elongación productiva; el reclutamiento de P-TEFb en su forma activa permite la liberación de NELF y la reanudación de la síntesis, además el CTD de Pol II es fosforilado en los residuos serina 2 (Ser2-P) permitiendo el reclutamiento de factores de elongación auxiliares.

### 1.1.3. Elongación transcripcional

#### 1.1.3.1. Elongación temprana

No todos los factores que conforman el PIC acompañan a Pol II tras iniciación. Algunos, como TFIID, TFIIA, TFIIH o el complejo Mediador, se mantienen asociados al promotor, facilitando la re-iniciación (Yudkovsky et al., 2000), por lo que la fuerte interacción entre estos factores y Pol II puede impedir su salida del promotor. En consecuencia, el avance del complejo de elongación requiere la desestabilización de estas uniones, que se produce por la fosforilación del CTD de Pol II por la actividad de Cdk7 del complejo TFIIH sobre los residuos de serina 5 de las repeticiones (Ser5-P) (Kim et al., 2009; Ramanathan et al., 2001) (Figura 1D). Esta modificación del CTD, además de permitir la progresión de Pol II, favorece el reclutamiento de las enzimas implicadas en la adición de la caperuza al extremo 5' del pre-mRNA (Ghosh et al., 2011) que tiene lugar sobre moléculas nacientes de 25-30 nucleótidos (Moteki y Price, 2002). Este proceso fundamental evita la degradación de la molécula de RNA y favorece a su vez diversos eventos como su procesamiento, exportación y traducción (Ramanathan et al., 2016).

El inicio de la síntesis del RNA es un proceso muy ineficiente en el que Pol II tiende a detenerse y que frecuentemente termina de forma prematura (Jonkers et al., 2014; Luse, 2013; Steurer et al., 2018). De hecho, la mayoría de los genes de organismos superiores presentan una gran acumulación de Pol II en la región próxima al promotor. Este fenómeno fue descrito por primera vez a mediados de 1980, durante el estudio de los genes de choque térmico en *Drosophila melanogaster* (Gilmour y Lis, 1986; Rougvie y Lis, 1988). En estos trabajos se observó que el complejo de elongación se encontraba unido a los promotores de estos genes de forma previa a su estimulación y a la síntesis del mRNA maduro. Hasta entonces se pensaba que la iniciación de la transcripción era el principal punto de regulación

de la expresión génica (Ptashne y Gann, 1997), sin embargo, este hallazgo puso de manifiesto que la elongación temprana también podía regularse y ser el paso limitante de la transcripción. Más tarde, este mismo comportamiento de Pol II fue observado en varios genes de mamífero altamente regulados como *Myc* y *Fos* (Krumm et al., 1992; Plet et al., 1995), estableciéndose ésta acumulación próxima al promotor de Pol II como mecanismo responsable de su alto nivel de regulación. Posteriormente, los estudios genómicos de inmunoprecipitación de cromatina (Chip-seq) demostraron que, lejos de ser una característica particular de un grupo de genes, la pausa próxima al promotor de Pol II ocurría en la mayoría de genes de animales, constituyéndose como un mecanismo de regulación global (Guenther et al., 2007; Kim et al., 2005).

Durante el inicio de la síntesis de RNA, Pol II es especialmente sensible a obstáculos que dificulten su avance, como la presencia de nucleosomas o el estrés topológico producido por la apertura del DNA (Baranello et al., 2016; Izban y Luse, 1992; Jimeno-González et al., 2015; Jonkers et al., 2014). Además, ciertas secuencias de DNA favorecen intrínsecamente la pausa de Pol II, por ejemplo al aumentar la estabilidad del híbrido entre el DNA y el RNA formado en el interior del complejo de elongación (Kireeva et al., 2000) o favorecer la formación de estructuras secundarias del RNA naciente (Zhang y Landick, 2016). Consecuentemente, existen muchos ejemplos de la baja procesividad de la RNA polimerasa durante elongación temprana, tanto en eucariotas como en procariontes. Por ejemplo, un caso bien estudiado es el operón de la histidina en *Escherichia coli*, donde una estructura secundaria del RNA naciente regula el avance de la RNA polimerasa en la región próxima al promotor (Wang et al., 1997). Sin embargo, es en organismos superiores donde esta tendencia intrínseca del proceso ocurre como un mecanismo general regulado por diversos factores.

En la mayoría de genes de animales, Pol II se pausa entre 20-120 nucleótidos tras el sitio de inicio de la transcripción (TSS) (Muse et al., 2007), como consecuencia de la unión de dos factores: el Factor Inductor de la Sensibilidad a DRB (DSIF) y el Factor Negativo de Elongación (NELF) (Figura 1E). El primero de ellos, DSIF, se asocia rápidamente al complejo de elongación mediante el reconocimiento del pre-mRNA naciente (Missra y Gilmour, 2010) y favorece el reclutamiento de las enzimas implicadas en la adición de la caperuza (Pei y Shuman, 2002). Estudios *in vitro* han demostrado que tanto DSIF, como su homólogo procariota NusG, tienen un papel positivo sobre la transcripción (Bernecky et al., 2017; Weixlbaumer et al., 2013), acompañando a Pol II durante la elongación y permitiendo el reclutamiento de diversos factores que aumentan la procesividad del complejo de elongación (Burckin et al., 2005; Cui y Denis, 2003; Yamada et al., 2006).

Sin embargo, la interacción entre DSIF y Pol II permite la asociación del segundo factor, NELF, que evita tanto la reanudación como la terminación prematura de la transcripción (Vos et al., 2018) y estabiliza el estado pausado del complejo de elongación (Yamaguchi et al., 1999). De acuerdo con su función, la falta de NELF reduce la cantidad de Pol II en la mayoría de promotores sin que esto de lugar un incremento de la elongación productiva global (Core et al., 2012; Gilchrist et al., 2010), ya que NELF no es responsable de la pausa de Pol II, sino de su estabilización. Además, la ausencia de NELF reduce la retención de los GTFs e incrementa la ocupación de nucleosomas en la región del promotor (Gilchrist et al., 2010), lo que indica que la pausa próxima al promotor de Pol II es necesaria para el mantenimiento de un estado accesible del promotor libre de nucleosomas.

### ***1.1.3.2. Elongación productiva***

La liberación de la pausa próxima al promotor de Pol II depende de la actividad del Factor Positivo de Elongación b (P-TEFb). P-TEFb es un dímero constituido por la ciclina T1/2 y la quinasa dependiente de ciclina 9 (Cdk9) (Marshall y Price, 1995) capaz de fosforilar a un gran número de proteínas, incluyendo factores de elongación, remodeladores de cromatina y factores de procesamiento del pre-mRNA (Sanso et al., 2016). Esto sugiere el alto grado de coordinación que existe entre la salida de la pausa de Pol II y el resto de procesos del ciclo transcripcional.

Estrictamente, la liberación de la pausa de Pol II depende de la fosforilación de DSIF por P-TEFb (Cheng y Price, 2007). Esta fosforilación convierte a DSIF en un factor puramente positivo al producir la disociación de NELF (Fujinaga et al., 2004; Yamada et al., 2006) y permite que Pol II reanude la síntesis, iniciándose la elongación productiva (Figura 1F). Además, P-TEFb también fosforila el CTD de Pol II (Kim y Sharp, 2001), específicamente sobre los residuos de serina 2 (Ser2-P) (Price, 2000). Esta modificación marca la forma elongante de Pol II y sustituye progresivamente a la fosforilación en serina 5 (Cho et al., 2001). De este modo, a lo largo del gen se establece un gradiente inverso de ambas modificaciones del CTD que permite coordinar el reclutamiento de los factores de elongación y procesamiento del pre-mRNA, incluyendo chaperonas de histonas como SPT6 y FACT (Kaplan et al., 2005; Pavri et al., 2006), remodeladores de la cromatina como CHD1 (Simic et al., 2003) y modificadores de histona como SETD2 (McDaniel y Strahl, 2017), dando lugar al paisaje de la cromatina característico de las regiones transcripcionalmente activas (Vakoc et al., 2006).

En los genes regulados a nivel de iniciación, la actividad P-TEFb no resulta un punto limitante, probablemente porque el reclutamiento de Pol II y de P-TEFb se

encuentran coordinados. De este modo, Pol II entra en elongación productiva inmediatamente después de abandonar el promotor. Sin embargo, la acumulación de Pol II que se observa en la mayoría de promotores indica que la actividad de P-TEFb suele encontrarse regulada de forma independiente a la iniciación (Core et al., 2008; Muse et al., 2007). De hecho, aunque P-TEFb en su forma activa es un heterodímero, la mayor parte de este factor se encuentra secuestrado en un complejo ribonúcleo-proteico compuesto por un RNA no codificante (7SK snRNA) y tres proteínas (HEXIM1, MePCE y LARP7) (Yik et al., 2003). Por tanto, la salida de la pausa de Pol II requiere tanto la liberación de P-TEFb de este complejo inhibitorio como su reclutamiento al promotor de los genes diana. Consecuentemente, la activación de P-TEFb suele producirse mediante la colaboración de diferentes rutas de señalización (Quaresma et al., 2016), en los que participan una gran multitud de factores, como por ejemplo BRD4 (Yang et al., 2005) y Trim28 (McNamara et al., 2016), determinando específicamente el patrón de actividad de P-TEFb, y por tanto, de expresión génica.

El paradigma de la regulación a nivel de pausa de Pol II son los genes de respuesta temprana (ERGs), entre los que se incluyen algunos de los modelos donde se describió por primera vez este mecanismo, como por ejemplo *MYC* y *FOS*. Estos genes se inducen de forma rápida en respuesta a múltiples estímulos a través de la activación de diferentes rutas de señalización (Aida et al., 2006; Krumm et al., 1992). En particular, la expresión de los ERGs puede ser inducida por mitógenos mediante la ruta RhoA-actina y la ruta de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), esta última además, también responde a factores de estrés celular (Bahrami y Drabløs, 2016; Borisova et al., 2018). En condiciones de represión, Pol II se encuentra altamente pausada en los promotores de los ERGs, lo que permite el mantenimiento de una estructura libre de nucleosoma que favorece la iniciación y el acceso de factores reguladores al promotor. De esta forma, en respuesta a la

estimulación, la liberación de la pausa de Pol II produce un enorme incremento en la tasa transcripcional que conduce a la rápida aparición de los mRNAs específicos (Boettiger y Levine, 2009).

Al igual que los ERGs, muchos otros genes críticos implicados en procesos como proliferación celular, respuesta inmune y desarrollo temprano también están altamente regulados a nivel de la pausa de la Pol II, ya que este mecanismo asegura la expresión génica de una forma exacta y sincrónica (Core et al., 2008; Zeitlinger et al., 2007). Sin embargo, no todos los genes que muestran cinéticas de inducción rápidas presentan Pol II pausada previamente a la estimulación, y no todos los genes pausados están altamente regulados o son inducibles (Nissen y Yamamoto, 2000), puesto que la pausa próxima al promotor de Pol II ocurre en la mayoría de genes activos, independientemente de su nivel de expresión o regulación (Gilchrist et al., 2012). De hecho, el tratamiento con el inhibidor específico de P-TEFb, flavopiridol, produce la acumulación de Pol II en todos los promotores activos (Chao y Price, 2001; Ni et al., 2008). Esto sugiere que el mecanismo de pausa de Pol II no produce *per sé* la regulación de la transcripción, constituyendo únicamente un paso adicional controlado por la actividad de P-TEFb en cada promotor.

### 1.1.4. Terminación transcripcional

Una vez Pol II alcanza el final del gen, se encuentra con el sitio de terminación de la transcripción (TTS), donde se produce el procesamiento del pre-mRNA mediante el corte de la molécula por la endonucleasa CPSF-73 (Ryan et al., 2004) y la posterior poli-adenilación del extremo 3' del RNA (Minvielle-Sebastia et al., 1997). El procesamiento del extremo 3' es un proceso esencial que permite la liberación de Pol II del DNA y garantiza la correcta función de la molécula de mRNA. La maquinaria de procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA está

compuesto por múltiples proteínas que se reclutan a la región terminadora de forma específica de secuencia de DNA y mediante interacción con diferentes factores, como el CTD Ser2-P de Pol II (Mandel et al., 2008; McCracken et al., 1997).

Se han propuesto dos modelos para explicar cómo ocurre la terminación (Connelly y Manley, 1988; Logan et al., 1987). El modelo alostérico o del anti-terminador propone que la transcripción a través del sitio de poli-adenilación conduce a un cambio conformacional en el complejo de elongación debido a la disociación de factores de elongación y/o la unión de factores de terminación (Logan et al., 1987). El segundo modelo, el modelo torpedo, propone que el corte en el mRNA genera que un extremo 5' libre en la molécula de RNA asociada a Pol II que es atacado por la exonucleasa 5'-3' XNR2, produciendo su degradación e induciendo la liberación de Pol II (Connelly y Manley, 1988; West et al., 2004). Estos dos modelos no son excluyentes y es probable que la terminación ocurra por la combinación de ambos mecanismos (Luo et al., 2006).

## **1.2. Propiedades topológicas del DNA**

Los cromosomas, en esencia, son enormes filamentos enrollados sobre sí mismos, que se encuentran asociado a multitud de proteínas que además pueden interaccionar entre sí. Por tanto, el DNA se encuentra sujeto a multitud de fuerzas que constriñen su estructura, como el nucleosoma, que impone cierto grado de torsión sobre la doble hélice que lo envuelve (Bermúdez et al., 2010). Asimismo, lejos de ser una molécula estática, durante su metabolismo se requieren diversas alteraciones que modifican su topología, como cambios en los contactos entre el promotor y distintos elementos reguladores de un gen o la separación de ambas hebras de la doble hélice durante la transcripción y replicación.

El parámetro que mejor define la topología de una molécula de DNA es el índice de ligamiento ( $Lk$ ), que hace referencia al número de veces que una cadena de la doble hélice cruza sobre la otra en un plano. El  $Lk$  es una propiedad exclusiva de los dominios topológicos cerrados, ya que si alguno de los extremos del DNA se encuentra libre, no existe tensión topológica al ser disipada por la rotación o movimiento de estos (Bauer et al., 1980). El valor de  $Lk$  es invariable mientras el sistema permanezca cerrado y deriva de la suma de dos parámetros geométricos: el índice de torsión ( $Tw$  del inglés *twist*) y el índice de superenrollamiento ( $Wr$  del inglés *writhe*) (Bates y Maxwell, 2005). En ausencia de nudos y enredos, estos dos parámetros pueden compensarse entre sí, manteniendo el valor del  $Lk$  constante.

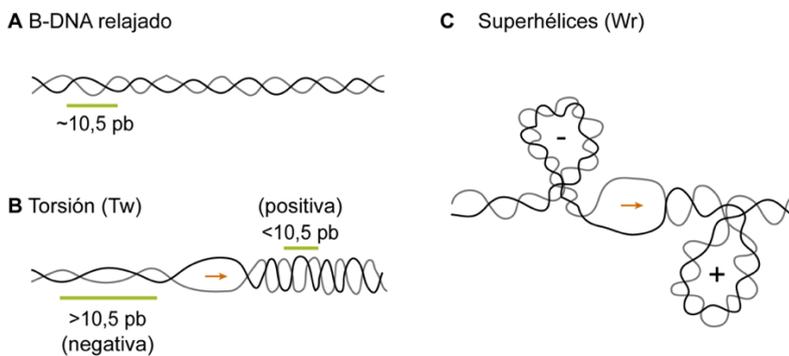
$$Lk = Tw + Wr$$

El  $Tw$  indica cuantas veces gira cada hebra del DNA sobre el eje axial de la doble hélice. En una molécula de DNA relajada, el  $Tw$  viene determinado únicamente por el tamaño de la molécula ya que esta estructura presenta un giro de la hélice dextrógiro cada 10,5 pb (Figura 2A), que por convenio, tiene asignado signo positivo,  $Tw (+)$ . Por su lado, la torsión en dirección opuesta, levógira, se define con signo negativo,  $Tw (-)$  (Figura 2B).

El  $Wr$ , por su parte, es una propiedad espacial del DNA y se define como el número de veces que la doble hélice cruza sobre si misma en un plano bidimensional, formando superhélices. También por convenio, el  $Wr$  es positivo (+) en superhélices levógiras y negativo (-) en superhélices dextrógiras (Figura 2C).

De este modo, un incremento de  $Tw (+)$  conduce al “sobreenrollamiento” de la molécula de DNA, es decir, una estructura con un periodo menor que en su estado relajado, y por tanto, más compacta (Figura 2B). Mientras que el incremento de  $Tw$

(-) produce una conformación más laxa y flexible, descrita como “infraenrollada” al presentar un giro de la hélice  $>10,5$  pb (Figura 2B). En ambos casos, el estrés torsional puede dar lugar a la formación de superhélices en el DNA ( $W_r$ ), que por coherencia se le asigna signo (+) en moléculas de DNA sobre enrolladas, y signo (-) en DNA infraenrollado (Figura 2C). Por esta razón, de forma general, el estrés torsional del DNA es denominado superenrollamiento del DNA, ya que estos estados son dinámicos (Bates y Maxwell, 2005; Bauer et al., 1980), denominándose superenrollamiento negativo (-) al encontrado en el DNA infraenrollado y superenrollamiento positivo (+) al presente en DNA sobre enrollado.



**Figura 2. Representación esquemática de distintos estados topológicos del DNA desnudo. A.** Estructura del DNA relajado; una doble hélice dextrógira con un periodo  $\approx 10,5$  pb. **B.** Estructura del DNA sujeto a estrés topológico en forma de torsión ( $T_w$ ); esta puede ser levógira (negativa) dando lugar a un DNA infraenrollado (periodo  $>10,5$  pb). El incremento de torsión dextrógira (positiva) produce un DNA sobre enrollado (periodo  $<10,5$  pb). **C.** Estructura del DNA sujeto a estrés topológico en forma de superhélices ( $W_r$ ); estas pueden ser dextrógiras (negativas) en el caso de DNA infraenrollado o levógiras (positivas) en DNA sobre enrollado.

A nivel topológico, los cromosomas eucarióticos se consideran un sistema cerrado pese a ser moléculas lineales, debido a que su gran longitud y la asociación con elementos estructurales, como la lámina nuclear, previene el movimiento de los extremos (Crabbe et al., 2012; Espeli y Mariani, 2004). Además, gracias al desarrollo

de técnicas de Captura de Conformación de Cromosomas (3C) y sus variaciones (4C, hi-C) (de Wit y de Laat, 2012) se ha podido observar que los territorios clásicamente identificados en los cromosomas: eucromatina y heterocromatina (Cremer y Cremer, 2001) presentan una estructura fractal (Bancaud et al., 2012) compuesta por dominios topológicamente asociados, que a su vez se subdividen en dominios de menor tamaño (Dixon et al., 2012). Por tanto, ya que el Lk de un dominio topológico cerrado es constante, cualquier alteración local en la estructura del DNA es compensado mediante la formación de superenrollamiento en el DNA, en forma de  $T_w$  o  $W_r$ , alterando la estructura de las zonas adyacentes.

### **1.3. Efectos del superenrollamiento del DNA en la transcripción**

Los cambios topológicos son virtualmente inherentes a todos los procesos del metabolismo cromosómico que requieren la apertura de la estructura del DNA, ya que como se ha explicado en el apartado anterior, estas alteraciones introducen superenrollamiento en la molécula (Liu y Wang, 1987a). El superenrollamiento distorsiona la estructura del DNA, pudiendo dar lugar a la aparición de conformaciones alternativas como cuádruples de guanina (G-4), Z-DNA o favorecer la separación de ambas cadenas (Kano et al., 2015). Sin embargo, estas transiciones estructurales son incompatibles con la presencia de nucleosomas (Wong et al., 2007), y por tanto, sólo ocurren en regiones libres de nucleosomas (Bates y Maxwell, 2005), que se encuentran principalmente asociadas a transcripción, en particular promotores y elementos reguladores (Segal et al., 2006). De este modo, el superenrollamiento del DNA puede alterar la unión de proteínas, como factores de transcripción, y la propia Pol II.

En eucariotas, la fuente principal de superenrollamiento del DNA es la propia transcripción (Liu y Wang, 1987a; Ma y Wang, 2014b). El gran tamaño del complejo

de elongación (con un peso molecular mayor de 2 MDa) (He et al., 2013) probablemente previene su rotación. Esto hace que al separar ambas hebras del DNA, Pol II introduce superenrollamiento (+) por delante de sí misma y superenrollamiento (-) en la parte posterior (Ma y Wang, 2016; Nelson, 1999) (Figura 2B, C). Estas alteraciones topológicas tienen un profundo efecto sobre la transcripción. Así, mientras que el superenrollamiento (-) produce un DNA accesible a la unión de factores, el superenrollamiento (+) puede dificultar el avance de Pol II, al prevenir la separación de las cadenas del DNA (Travers y Muskhelishvili, 2007). En consonancia, estudios *in vitro* han demostrado que la transcripción es más eficiente sobre un DNA superenrollado negativamente (Ma et al., 2013), mientras que *in vivo*, se ha propuesto que el superenrollamiento (+) generado por el avance de la RNA polimerasa, tanto en procariotas como eucariotas, induce la pausa en la región próxima al promotor, siendo necesaria la eliminación de esta tensión topológica para la liberación de la pausa y la elongación productiva (Baranello et al., 2016; Chong et al., 2014).

El análisis de la distribución del superenrollamiento del DNA en células eucariotas han sido posible gracias al uso de psoraleno, un agente intercalante que se incorpora preferencialmente en DNA superenrollado negativamente (Bermúdez et al., 2010). Su uso ha demostrado que los promotores presentan niveles de superenrollamiento (-) dependientes del nivel de expresión génica (Kouzine et al., 2013) y que los dominios topológicos de transcripción activa se encuentran globalmente superenrollados (-) (Naughton et al., 2013). Asimismo, en estos estudios se observó que los promotores de genes pausados presentan mayores niveles de superenrollamiento (-) que los genes no pausados (Kouzine et al., 2013).

La presencia de superenrollamiento (-) en el promotor beneficia el ensamblaje del PIC (Tabuchi y Hirose, 1988), además de favorecer su apertura por TFIIF al

desestabilizar la estructura de doble hélice del DNA (Revyakin et al., 2006), lo que indica que el grado de superenrollamiento del DNA puede jugar un papel regulador sobre la transcripción. Un ejemplo especialmente interesante es el observado en la regulación transcripcional del gen *MYC*, donde una secuencia de DNA localizada aguas arriba al promotor se desnaturaliza parcialmente de forma dependiente de superenrollamiento (Kouzine et al., 2008), lo que permite la unión de factores que modulan su expresión. De esta forma, parte de la regulación transcripcional del gen *MYC* depende del nivel de superenrollamiento acumulado en su promotor. Además, como ya se mencionó anteriormente, este gen es uno de los paradigmas de genes regulados a nivel de pausa próxima al promotor de Pol II, de nuevo demostrando la conexión entre este mecanismo y el estado de superenrollamiento del DNA.

Por último, hay que tener en cuenta que el estrés topológico puede difundir dentro del dominio topológico (Kouzine et al., 2013; Naughton et al., 2013), por lo que, además del efecto local, el superenrollamiento del DNA puede afectar a elementos reguladores distales, como los enhancers, así como promotores de otros genes y modificar las interacciones entre los diferentes elementos del genoma (Racko et al., 2019). Todo esto pone de manifiesto el profundo efecto que el superenrollamiento del DNA puede ejercer sobre la transcripción, siendo particularmente interesante la conexión entre el estado topológico y el mantenimiento de la pausa próxima al promotor de Pol II, el principal punto de regulación de la mayoría de genes de organismos superiores.

### **1.4. DNA Topoisomerasas**

Las DNA topoisomerasas son las únicas enzimas capaces de resolver los problemas topológicos originados como consecuencia de la replicación, recombinación y

transcripción del DNA (Wang, 2002), habiéndose identificado 5 genes que codifican este tipo de enzimas en humanos (TOP1, TOP2A, TOP2B, TOP3A y TOP3B) (Pommier et al., 2016). El ciclo catalítico de todas las DNA topoisomerasas requiere la formación de una rotura transitoria en el DNA, ya que, como se detalló en el apartado “1.2. Propiedades topológicas del DNA”, el valor de Lk de un sistema topológico cerrado es invariable. Estos cortes se producen por una reacción de transesterificación y dan como resultado un intermediario de reacción, llamado complejo de rotura, donde la enzima se mantiene covalentemente unida al DNA a través de un enlace fosfodiéster. Tras liberarse parte del superenrollamiento de la molécula, este enlace es revertido, reconstituyéndose la integridad de la molécula (Champoux, 2001). Las DNA topoisomerasas se clasifican en tipo I, si durante su ciclo catalítico producen el corte de una única cadena, o tipo II, si actúan sobre ambas hebras de la doble hélice del DNA.

#### **1.4.1 DNA topoisomerasas tipo I**

Las DNA topoisomerasas tipo I son enzimas monoméricas que inducen roturas de cadena sencilla (SSBs) transitorias durante su ciclo catalítico (Leppard y Champoux, 2005). Atendiendo al mecanismo para modificar la topología se clasifican en tipo IA y IB.

Las topoisomerasas tipo IA utilizan la rotura para cruzar a través de ella una segunda hebra sencilla de DNA (Lima et al., 1994). El complejo de rotura se encuentra unido al extremo 5'-DNA (Tse-Dinh, 1998) y este mecanismo permite tanto relajar el superenrollamiento del DNA como resolver entrecruzamientos de cadena sencilla (hemicatenados) (Champoux, 2001). En humanos, existen dos representantes de este subgrupo: la DNA topoisomerasa 3 alfa (TOP3 $\alpha$ ) y beta (TOP3 $\beta$ ). La falta de TOP3 $\alpha$  produce letalidad embrionaria (Wu et al., 2010) y

participa junto con la proteína del síndrome de Bloom (BLM) en la disolución de intermediarios de recombinación (Lee et al., 2013). Por otro lado, TOP3 $\beta$  puede actuar tanto sobre moléculas de DNA como de RNA, participando en traducción (Ahmad et al., 2016) y resolviendo los híbridos de RNA:DNA en promotores activos (Yang et al., 2014).

Las topoisomerasas tipo IB tienen un mecanismo de acción distinto (Figura 3A), y además, forman complejos de rotura asociados al extremo 3'-DNA. Estos permiten la rotación controlada del extremo del DNA opuesto de la rotura (5'-DNA) (Leppard y Champoux, 2005), lo que modifica el Lk de la molécula en -1 por cada rotación (Figura 3A), pudiendo producirse varios ciclos de rotación entre el corte y la religación (Koster et al., 2005). En humanos, sólo existe una topoisomerasa IB, la DNA topoisomerasa 1 (Leppard y Champoux, 2005), que posee una isoforma nuclear (TOP1) y otra mitocondrial (TOP1mt) (Zhang et al., 2001). TOP1 se encuentra asociada a regiones transcripcionalmente activas y a la horquilla de replicación, donde favorece el avance de las maquinarias celulares relajando la torsión del DNA.

Como consecuencia de su mecanismo de acción sobre una única cadena, las DNA topoisomerasas tipo I sólo modifican el Tw del DNA, siendo incapaces de eliminar nudos, enredos y encadenamientos dobles. La resolución de estas constricciones topológicas requiere una enzima que actúe sobre superhélices de DNA ( $W_r$ ).

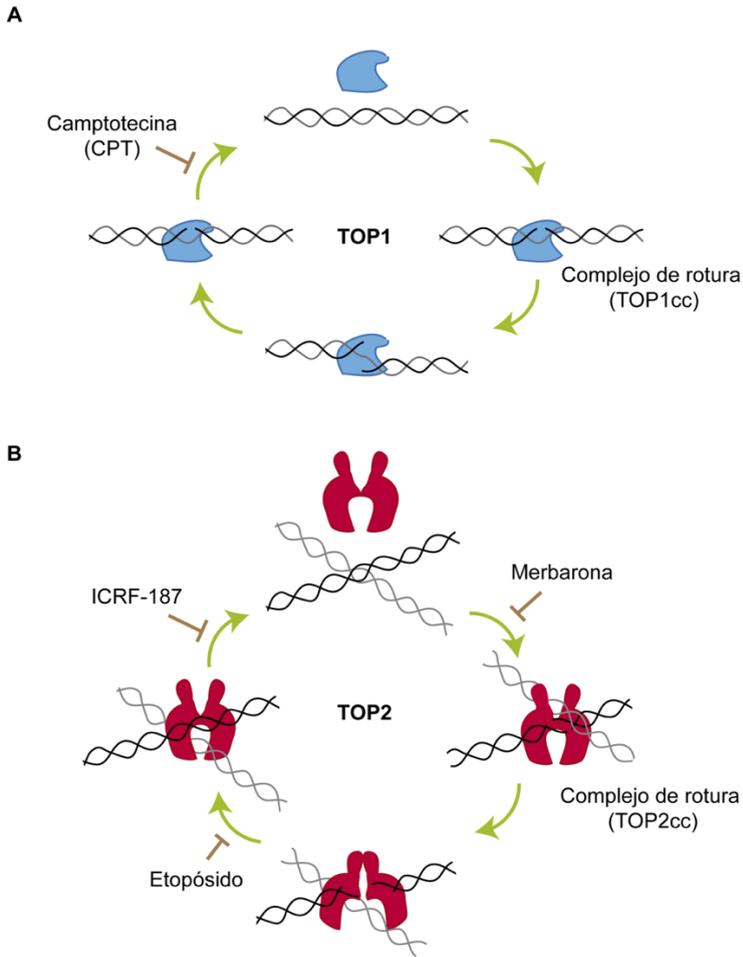
### 1.4.2. DNA topoisomerasas tipo II

Las DNA topoisomerasas tipo II actúan sobre dos segmentos distintos de DNA de doble cadena, requiriendo  $Mg^{2+}$  y la hidrólisis de ATP (Sugino et al., 1978). Como se muestra en la Figura 3B, su ciclo catalítico consiste en: i) el corte de ambas

cadena de uno de los segmentos de DNA, ii) el transporte del segundo segmento a través de la rotura de doble cadena y iii) la religación de la rotura (Champoux, 2001). Este mecanismo modifica el Lk en  $\pm 2$  (Brown y Cozzarelli, 1979) lo que permite que las topoisomerasas tipo II puedan liberar superenrollamiento en el DNA y formar o eliminar encadenamientos en la misma molécula (anudar/desanudar) o entre dos moléculas (catenar/decatenar). En este caso, el complejo de rotura (TOP2cc) consiste en la unión covalente entre ambos extremos 5'-fosfato de la rotura y la enzima, que está compuesto por dos subunidades de la misma isoforma (Nitiss, 1998).

En eucariotas superiores, con la notable excepción de *Drosophila* sp (Shelton et al., 1983), existen dos topoisomerasas tipo II: la DNA topoisomerasa alfa (TOP2A) y beta (TOP2B). Estudios *in vitro* han demostrado que TOP2A relaja de manera más eficiente superenrollamiento (+) sobre DNA desnudo, mientras que TOP2B no muestra esta preferencia (McClendon et al., 2005). A parte de este detalle, ambas isoformas muestran propiedades enzimológicas muy similares pero difieren significativamente en su expresión, regulación y función celular. Los niveles de TOP2B se mantienen constante durante el ciclo celular, mientras que la expresión TOP2A se incrementa en las fases G2/M del ciclo (Woessner et al., 1991), ya que su actividad es esencial para eliminar los catenados que se forman entre las cromátidas hermanas durante replicación, posiblemente como consecuencia de la rotación de la horquilla de replicación (Baxter, 2015). Asimismo, TOP2A puede favorecer la progresión de la replicación y la transcripción mediante la relajación del DNA. Por otro lado, aunque TOP2B no es esencial, los ratones deficientes (*Top2b*<sup>-/-</sup>) mueren poco después de nacer por fallos respiratorios asociados a defectos en el desarrollo neurológico (Yang et al., 2000), habiéndose observado que la falta de TOP2B también produce defectos neurológicos en pez cebra (Nevin et al., 2011). Esto sugiere un papel fundamental de ésta en diferenciación y homeostasis

neuronal, células que sólo presentan actividad TOP2B, por estar en estado postmitótico.



**Figura 3. Representación esquemática del ciclo catalítico de la DNA topoisomerasa 1 (TOP1) y 2 (TOP2) y drogas que bloquean su ciclo catalítico. A.** TOP1 se asocia al DNA e introduce una rotura de cadena sencilla en una de las cadenas, estableciéndose el complejo de rotura (TOP1cc). Posteriormente, se produce la rotación controlada del otro extremo de la rotura, y finalmente, se produce la religación, reconstituyendo la molécula. El inhibidor camptotecina (CPT), bloquea la religación, estabilizando el TOP1cc. **B.** TOP2 se asocia secuencialmente a dos segmentos de DNA de doble cadena, induciendo una rotura de doble cadena en uno de ellos, estableciéndose el complejo de rotura (TOP2cc). Posteriormente, se produce el paso del segundo segmento a través de la discontinuidad, y finalmente, la religación. Los inhibidores catalíticos Merbarona e ICRF-187, bloquean la enzima antes y después del corte y religación, respectivamente, mientras que el etopósido estabiliza el TOP2cc.

### 1.4.3. Compuestos inhibidores de las DNA topoisomerasas

Existen diferentes drogas que bloquean el ciclo catalítico de las DNA topoisomerasas. Estos compuestos se puede agrupar en dos clases principales atendiendo a si producen o no la formación de roturas en el DNA: Venenos de topoisomerasas e inhibidores catalíticos, respectivamente (Topcu, 2001).

Los venenos de topoisomerasas, son un conjunto de drogas que bloquean el ciclo catalítico de la enzima estabilizando el complejo de rotura. Una vez estabilizado este intermediario catalítico puede degradarse vía proteosoma dando lugar a la formación de roturas en el DNA (Ban et al., 2013; Lin et al., 2008; Mao et al., 2001; Zhang et al., 2006). En este grupo se encuentra la camptotecina (CPT) (Figura 3A) que estabiliza los complejos de roturas de TOP1 (TOP1cc) (Porter y Champoux, 1989) y el etopósido (Figura 3B), que produce la acumulación de complejos de rotura de TOP2 (TOP2cc) (Nitiss, 2009). Como consecuencia de su estructura, la degradación de estos intermediarios genera SSBs en el caso del tratamiento con CPT, o DSBs en el caso del tratamiento con etopósido.

El segundo grupo son los inhibidores catalíticos de topoisomerasas, que bloquean el ciclo catalítico de las DNA topoisomerasas sin estabilizar el complejo de rotura. Por tanto, estas drogas no producen de forma directa la formación de roturas en el DNA. Los ejemplos más representativos de este grupo son los inhibidores de TOP2: merbarona (Chen y Beck, 1993) e ICRF-187 (Sehested et al., 1993), estas drogas inhiben a TOP2 antes (merbarona) y después (ICRF-187) del corte y religación del DNA, respectivamente (Figura 3B).

### **1.5. Papel de las DNA topoisomerasas en transcripción**

Como se ha descrito previamente, la transcripción es la principal fuente de superenrollamiento en las células eucariotas y su acumulación produce efectos sobre el proceso, tanto positivos como negativos. Por tanto, el mantenimiento de un estado topológico adecuado mediante la actividad de las DNA topoisomerasas es esencial para su normal desarrollo. Tradicionalmente, el estudio de las DNA topoisomerasas en transcripción se ha centrado en este papel permisivo, resolviendo los problemas topológicos producidos por el avance de Pol II durante la elongación. No obstante, en los últimos años se ha puesto de manifiesto el profundo impacto que puede tener el grado de superenrollamiento en el DNA sobre la regulación transcripcional.

TOP1 se encuentra altamente asociada a regiones transcripcionalmente activas, donde se recluta por el complejo FACT (Pommier et al., 2016). TOP1 regula el ensamblaje del PIC mediante la interacción con los GTFs TFIID y TFIIA (Pommier et al., 2016), de forma independiente de su actividad catalítica. De hecho, pese a su acumulación en el promotor, TOP1 se encuentra inactiva en esta región, ya que su actividad se estimula por la interacción con el CTD Ser2-P de Pol II, la forma elongante de Pol II (Baranello et al., 2016). Se ha propuesto que de esta forma, se permite la acumulación de superenrollamiento (+) por delante de la burbuja transcripcional, lo que favorece el establecimiento de la pausa próxima al promotor de Pol II (Baranello et al., 2016).

Por su lado, el papel en transcripción de TOP2 no se encuentra completamente establecido. La transcripción de genes largos es particularmente sensible a la falta de actividad TOP2 (King et al., 2013), mientras que en levaduras, la falta combinada de Top1 y Top2 produce una inhibición transcripcional global no observada en los

mutantes simples (Pedersen et al., 2012). En este trabajo, además se comprobó que la falta de actividad topoisomerasa afectaba preferencialmente a genes altamente regulados e inducibles (Pedersen et al., 2012). En organismos superiores, la actividad TOP2 se encuentra principalmente asociada a promotores altamente transcritos (Gothe et al., 2019) y en células embrionarias, se ha observado que TOP2A se une a promotores (Thakurela et al., 2013). De forma similar, se ha propuesto que TOP2B participa en la represión de los genes activados por el receptor de ácido retinoico  $\alpha$  (McNamara et al., 2008). Por tanto, existen indicios que relacionan la actividad TOP2 con la transcripción de genes altamente regulados.

Otros estudios han propuesto un papel fundamental de TOP2B durante la activación transcripcional. Este modelo propone que la formación de DSBs en el promotor mediante la actividad de TOP2B es necesaria para disparar la transcripción de los genes diana. Este mecanismo de activación fue inicialmente observado en respuesta a estrógeno, en particular en el gen pS2 (Ju et al., 2006). Los autores observaron que durante la estimulación con estrógeno, TOP2B se reclutaba al promotor de este gen y aparecían DSBs en el promotor, dando lugar al reclutamiento de factores de reparación del DNA como la enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) y el complejo quinasa dependiente de DNA (DNA-PK), compuesto por KU70/86 y su subunidad catalítica (DNA-PKcs). En este trabajo se propuso que la activación de respuesta al daño en el DNA (DDR) conducía a un cambio en la cromatina del promotor que permitía el reclutamiento de Pol II y la activación génica (Ju et al., 2006).

Posteriormente, un segundo estudio demostró que el tratamiento con el veneno de TOP2, etopósido, inducía la expresión de los ERGs en neuronas primarias (Madabhushi et al., 2015), coincidiendo con un incremento global de la forma fosforilada de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX), un marcador bien establecido de DSBs,

dependiente de la quinasa mutada en ataxia telangiectasia (ATM) (Burma et al., 2001) y DNA-PKcs (Stiff et al., 2004) durante interfase. Asimismo, este trabajo mostró que la activación transcripcional de los ERGs en respuesta a estimulación fisiológica también aumentaba los niveles de  $\gamma$ H2AX en la zona transcrita de estos genes (Madabhushi et al., 2015). En base a estas observaciones, se propuso que la activación transcripcional de este importante grupo de genes requería la formación de DSBs dependientes de TOP2B en el promotor, siendo necesario la participación de factores de reparación del DNA como DNA-PKcs, en este caso para el apagado de la transcripción al facilitar la reparación (Madabhushi et al., 2015). Por último, un tercer estudio también describió la aparición de  $\gamma$ H2AX en respuesta a la activación transcripcional tras estimulación por suero y choque térmico (Bunch et al., 2015). Este trabajo nuevamente propuso que las DSBs dependientes de TOP2 y la activación de la DDR eran necesarios para la liberación de la pausa de Pol II y elongación productiva.

Sin embargo, está bien establecido que el daño en el DNA tiene un efecto deletéreo sobre la progresión de Pol II, que dependiendo de su naturaleza produce un efecto sobre la transcripción. Así por ejemplo, la presencia de lesiones en el DNA voluminosas que distorsionan la estructura de la doble hélice, producen el bloqueo del avance del complejo de elongación, lo que permite el reconocimiento y reclutamiento de los factores de reparación apropiados, en un mecanismo ampliamente estudiado denominado reparación del DNA acoplada a transcripción (TCR) (Hanawalt y Spivak, 2008).

En el caso de las DSBs, se ha demostrado que la introducción de una rotura distal al promotor produce la represión transcripcional dependiente de la actividad de ATM (Shanbhag et al., 2010). Por otro lado, existen también múltiples evidencias que indican que la presencia de una rotura de doble cadena próxima a la región

transcripta produce específicamente la represión del gen comprometido, de forma dependiente de DNA-PKcs (Iacovoni et al., 2010; Pankotai et al., 2012). Finalmente, la exposición a radiación ionizante, que produce tanto DSBs como SSBs, produce la represión de la transcripción (Beli et al., 2012; Miller et al., 2010) mediante la actividad de PARP1 (Chou et al., 2010) y se ha descrito que el factor inductor de la pausa, NELF, se recluta a DSBs próximas a promotores activos (Awwad et al., 2017). Por tanto, resulta paradójico que TOP2 produzca la activación de la expresión génica mediante la formación de DSBs en los promotores, cuando existe un cuerpo sólido de evidencias que sugiere el papel represor de las DSBs sobre la transcripción. Pese a esta discrepancia, la conexión entre TOP2 y la pausa de Pol II resulta muy evidente, habiéndose descrito muy recientemente la alta correlación que existe entre la actividad de TOP2B y la acumulación de Pol II pausada en el promotor (Dellino et al., 2019), lo que sugiere la importancia del mantenimiento del estado topológico del promotor por TOP2 en la regulación transcripcional a nivel de pausa próxima al promotor de Pol II.



## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es el análisis de la función de la topoisomerasa tipo II en la regulación transcripcional en células humanas. En base a ello, los objetivos específicos de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Análisis del efecto transcripcional producido por la inhibición catalítica de la topoisomerasa II.
2. Determinación de los sitios de unión de TOP2A en el genoma y análisis de su posible asociación con la regulación de la transcripción a nivel de pausa próxima al promotor de la RNA polimerasa II.
3. Análisis del papel del superenrollamiento de DNA en la regulación transcripcional del gen *FOS*.



### **3. RESULTADOS**

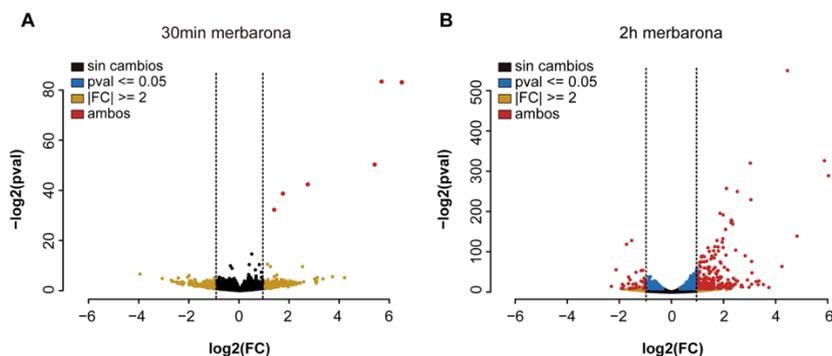


### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Respuesta transcripcional inducida por la inhibición catalítica de la DNA topoisomerasa II

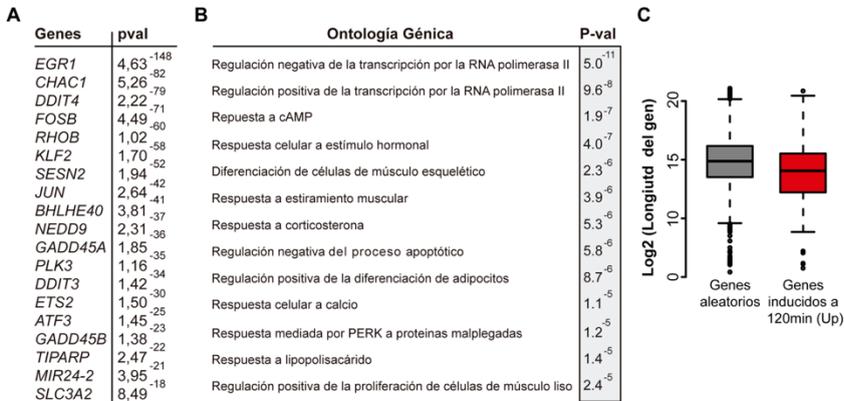
Con el fin de esclarecer el papel de TOP2 en la regulación de la transcripción se decidió analizar los cambios en la expresión génica producidos por su inhibición química. Para ello, se optó por el inhibidor catalítico merbarona, que bloquea la actividad de TOP2 sin estabilizar el complejo de rotura de la enzima (TOP2cc) (Chen y Beck, 1993), y que, por tanto, no genera DSBs dependientes de TOP2 de forma directa. Además, con el fin de evitar los defectos en replicación y segregación de los cromosomas producidos por la falta de actividad topoisomerasa durante la división celular, los experimentos se realizaron en células humanas RPE-1 arrestadas en G0/G1 por privación de suero.

Los cambios transcripcionales se evaluaron mediante secuenciación de mRNA (mRNA-seq) comparando tratamientos con merbarona a distintos tiempos (30 min y 2 h) con la condición control. El tratamiento de 30 minutos con merbarona se tradujo en desrepresión de sólo 5 genes (*FOS*, *FOSB*, *ZFP36*, *DUSP1* y *ATF3*), todos ellos pertenecientes al grupo de los ERGs (Figura 4A), que han sido descrito como genes regulados por TOP2B (Bunch et al., 2015; Madabhushi et al., 2015). Tras 2 horas de tratamiento, se detectaron 261 genes diferencialmente expresados, viéndose inducidos 231 de ellos y reduciendo su expresión sólo 30 (Figura 4B).



**Figura 4. Análisis de los cambios transcripcionales en respuesta a la inhibición de TOP2A con merbarona.** Representación de volcán (volcano plot) de cambios transcripcionales tras 30 minutos (A) o 2 horas (B) de tratamiento con merbarona (200 $\mu$ M) en comparación con DMSO (control) medidos mediante secuenciación de RNA (RNA-seq) en células RPE-1 arrestadas por privación con suero durante 48 horas. El eje x representa el logaritmo en base 2 del “fold change” (FC) y el eje y representa el valor negativo del logaritmo en base 2 del p-valor ajustado (pval). En rojo se muestran los genes con un FC absoluto  $\geq 2$  y un pval  $\leq 0.05$ .

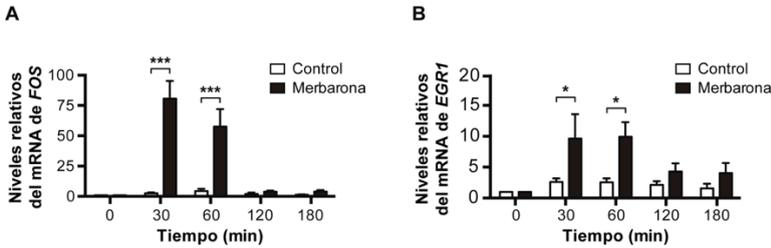
Entre los genes inducidos a 2 horas (Up), nuevamente se observaron un gran número de ERGs (Figura 5A). El análisis de la ontología génica puso de manifiesto que muchos de estos genes participan en la regulación de la respuesta a diferentes estímulos (Figura 5B). Asimismo, el tamaño medio de estos genes fue menor a la media (Figura 5C). En conjunto, estos resultados muestran que la inhibición de TOP2 produce principalmente una rápida activación transcripcional de genes cortos y altamente regulados, lo que sugiere un papel negativo de TOP2 sobre la transcripción de estos genes.



**Figura 5. Análisis de los genes inducidos tras 2 horas de inhibición de TOP2A con merbarona.** **A.** Lista de los genes más inducidos (ordenados por pval) tras 2 horas de tratamiento con merbarona (200µM) en comparación con DMSO (control) medidos mediante secuenciación de RNA (RNA-seq) en células RPE-1 arrestadas por privación con suero durante 48 horas. **B.** Lista de las 10 primeras categorías (ordenadas por pval) de Ontología génica enriquecidas en los genes inducidos a 2 horas con merbarona. **C.** Análisis de la longitud de los genes inducidos a 2 horas con merbarona.

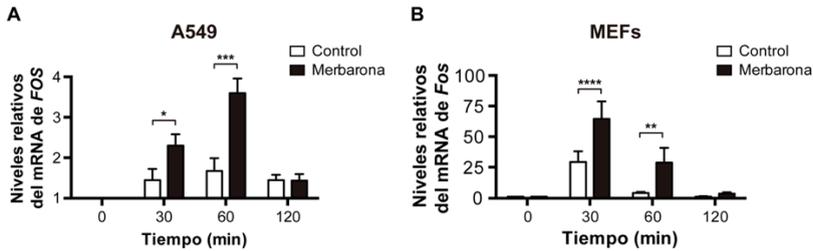
Para corroborar los resultados obtenidos por RNA-seq se analizaron los niveles de mRNA mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR) de *FOS* y *EGR1*, dos ERGs cuya expresión se incrementó en gran medida en los experimentos de RNA-seq. De forma esperada, el tratamiento con merbarona produjo la rápida inducción de ambos genes en comparación con el tratamiento control (Figura 6A, B). Las cinéticas de inducción observadas se asemejaban a las descritas en respuesta a la estimulación con mitógenos (Greenberg y Ziff, 1984), alcanzándose los niveles máximos de mRNA durante la primera hora de tratamiento y retornando a los niveles de partida tras 2 horas. Estos experimentos indican que la inhibición catalítica de TOP2 con merbarona produce la inducción de ERGs, dando lugar a cinéticas de activación similares a las observadas en respuesta a la

estimulación fisiológica del gen modelo *FOS*.



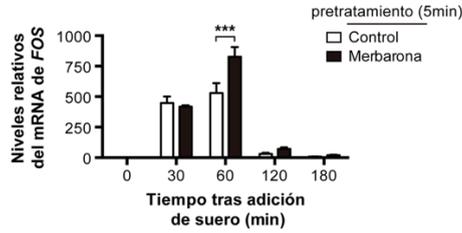
**Figura 6. . Análisis de la cinética de inducción transcripcional de dos ERGs en respuesta a la inhibición de TOP2A con merbarona.** Niveles de mRNA de *FOS* (A) y *EGR1* (B) tras diferentes tiempos de tratamiento con merbarona (200μM) o con DMSO (Control) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el mRNA de *GAPDH* y la señal en la condición sin tratamiento (t=0) se estableció en 1 Se representa la media y error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\*P≤0.05; \*\*P≤0.01; \*\*\*P≤0.001).

Para descartar que esta activación transcripcional fuese específica de nuestra línea celular, comprobamos el efecto del tratamiento con merbarona en otros sistemas biológicos, como la línea humana de adenocarcinoma de pulmón A549 y MEFs (fibroblastos embrionarios de ratón) primarios. En ambos tipos celulares, la incubación con merbarona condujo al incremento del mRNA del gen *FOS* y *Fos*, respectivamente (Figura 7A, B), mostrando cinéticas muy similares a las observadas en la línea RPE-1 (Figura 6A) y poniendo de manifiesto que la inducción de los ERGs en respuesta a la inhibición de TOP2 es un fenómeno reproducible en diferentes líneas celulares y organismos.



**Figura 7. Análisis de la cinética de inducción transcripcional en respuesta a la inhibición de TOP2A con merbarona en A549 y MEFs.** Niveles de mRNA de *FOS* (A) y *Fos* (B) tras diferentes tiempos de tratamiento con merbarona (200 $\mu$ M) o con DMSO (Control) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el mRNA de *GAPDH* y la señal en la condición sin tratamiento (t=0) se estableció en 1. Se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ).

Posteriormente, decidimos comprobar el efecto de la inhibición de TOP2 durante la estimulación fisiológica del gen *FOS* con suero. Como era de esperar, las células incubadas previamente con el vehículo (Control) mostraron un rápido incremento de los niveles de mRNA tras la adición de suero, alcanzando el nivel máximo tras una hora de tratamiento y retornando a los niveles de partida a las dos horas (Figura 8). Las células previamente tratadas con merbarona mostraron una cinética muy similar, sin embargo, alcanzaron unos niveles de inducción superiores a las células control (Figura 8). Este resultado puede indicar que la actividad TOP2 no es necesaria durante la inducción de los ERGs en respuesta a mitógenos. Asimismo, el efecto observado sugiere nuevamente el papel negativo de TOP2 en la transcripción de los ERGs, tanto en condiciones de represión como de estimulación fisiológica.



**Figura 8. Análisis del efecto de la merbarona sobre la estimulación transcripcional fisiológica de *FOS* con suero.** Niveles de mRNA de *FOS* tras diferentes tiempos de re-estimulación con suero (20%) en células previamente tratadas durante 5 minutos con merbarona (200µM) o con DMSO (Control) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el mRNA de *GAPDH* y la señal en la condición sin tratamiento (t=0) se estableció en 1. Se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\*P≤0.05; \*\*P≤0.01; \*\*\*P≤0.001).

### 3.2. Caracterización del efecto producido por el tratamiento con merbarona

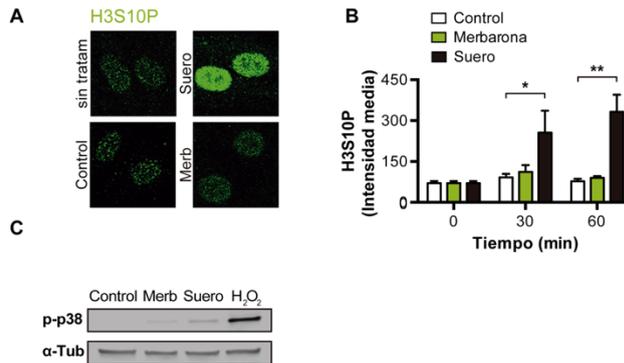
#### 3.2.1. Análisis de la activación de la respuesta a mitógenos y estrés durante el tratamiento con merbarona

Los ERGs son un grupo de genes altamente regulados e inducibles en respuesta a la activación de diferentes cascadas de fosforilación dependientes de mitógenos y factores de estrés. Dichas rutas de señalización son independientes, lo que permite cambios transcripcionales específicos al estímulo presentado. No obstante, la mayoría dan lugar a la activación de factores reguladores esenciales, así como cambios en la estructura de la cromatina que son necesarios para la inducción transcripcional de estos genes, como la fosforilación de la serina 10 de la histona 3 (H3S10P) (Bahrami y Drabløs, 2016).

En primer lugar, quisimos comprobar si el incremento de la expresión de los ERGs al inhibir TOP2A con merbarona estaba causado por una activación transcripcional global en respuesta a mitógenos y estrés celular. Para ello, decidimos evaluar los niveles de H3S10P en distintas condiciones (Clayton y Mahadevan, 2003). Las células arrestadas por privación de suero presentaban niveles bajos de H3S10P (Figura 9A), que se incrementaron tras la estimulación fisiológica con suero, tanto a 30 como 60 minutos (Figura 9A, B), de acuerdo con la activación de rutas de señalización dependientes de mitógenos. Por el contrario, tanto el tratamiento control como el tratamiento con merbarona no alteraron los niveles de esta modificación de H3 (Figura 9A, B), indicando que el aumento de expresión de los ERGs producido por la inhibición de TOP2A es independiente de la activación de esta ruta de señalización celular.

Para corroborar estos resultados, se decidió analizar específicamente la activación de la ruta de señalización de p38, una quinasa activada mediante fosforilación (p-p38) en respuesta a estrés celular, como el inducido por la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o a radiación UV (Borisova et al., 2018). Las células control presentaban niveles bajos de este marcador de estrés celular (Figura 9C), que se incrementaron en respuesta a un tratamiento de 30 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 9C), de acuerdo con la activación de esta ruta de estrés celular. Por el contrario, la adición de merbarona no produjo un incremento en los niveles de activación de p38, de forma similar al suero (Figura 9C). En conjunto, estos resultados descartan que la activación de los ERGs provocada por la

inhibición de TOP2A sea consecuencia de la activación de las rutas canónicas de señalización celular.

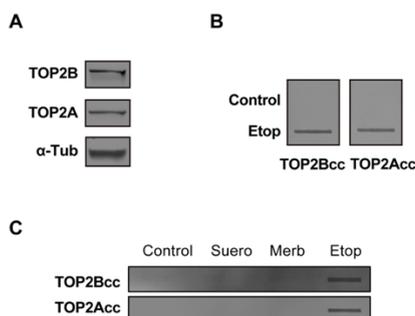


**Figura 9. Análisis de la activación de rutas de respuesta a mitógenos y estrés durante el tratamiento con merbarona.** **A.** Imagen representativa de la señal de fosforilación de la serina 10 de la histona 3 (H3S10P) (verde) en células sin tratamiento o en respuesta a 30 minutos de tratamiento con suero (20%), DMSO (Control) o merbarona (200µM). **B.** Cuantificación de la intensidad media de la señal de H3S10P tras diferentes tiempos de tratamiento con suero (20%), DMSO (Control) o merbarona (200µM). Se representa media+SEM de dos experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\*P≤0.05; \*\*P≤0.01; \*\*\*P≤0.001). **C.** Imagen representativa de los niveles de activación de p38 (p-p38) y tubulina (α-tub) analizadas por western blot tras 30 minutos de tratamiento con suero (1%), DMSO (Control), merbarona (200µM) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2mM).

### 3.2.2. El tratamiento con merbarona no produce la acumulación de complejos de rotura de TOP2 de forma global.

Las células de mamífero cuentan con dos isoformas de TOP2, TOP2A y TOP2B, que difieren en el patrón de expresión a lo largo del ciclo celular como ya se ha descrito en el apartado Introducción. Así pues, en células arrestadas por privación de suero, esperaríamos que TOP2B

fuese la única isoforma presente. Sin embargo, al analizar los niveles de ambas proteínas, observamos que en nuestras condiciones experimentales las células expresaban tanto TOP2B como TOP2A (Figura 10A). A continuación, quisimos comprobar la actividad de ambas isoformas, para ello, utilizamos el ensayo de *Complejos de Enzimas In vivo* (ICE), que permite la purificación de aquellas proteínas unidas covalentemente al DNA. Esta técnica clásica se basa en el establecimiento de un gradiente de cloruro de cesio (CsCl) que permite separar los distintos componentes celulares por diferencia de densidad. En el ensayo ICE, el gradiente de CsCl se utiliza para aislar específicamente los ácidos nucleicos (DNA y RNA) junto con las proteínas asociadas covalentemente del resto de proteínas solubles y componentes celulares, lo cual resulta un método idóneo para analizar la presencia de TOP2cc (Nítiss et al., 2012), ya que se caracteriza por encontrarse unido al DNA mediante un enlace fosfodiéster. Esta técnica se puede utilizar como medida indirecta de la actividad TOP2 celular, mediante la cuantificación de los complejos de rotura acumulados en respuesta a etopósido u otro veneno de TOP2, siendo posible distinguir entre ambas isoformas (TOP2A y TOP2B) con anticuerpos específicos. En las condiciones control, las células presentaban niveles de TOP2cc espontáneos indetectables (Figura 10B). En respuesta a etopósido, observamos la aparición de complejos de rotura de ambas isoformas (TOP2Acc y TOP2Bcc) (Figura 10B), indicando que tanto TOP2A como TOP2B se encuentran activas en nuestras condiciones.



**Figura 10. Análisis de expresión y de actividad de ambas isoformas de TOP2 y análisis de los complejos de rotura (TOP2cc) inducidos por los diferentes tratamientos.** **A.** Imagen representativa de los niveles de expresión de TOP2B, TOP2A y tubulina ( $\alpha$ -tub) por western blot en células RPE-1 arrestadas por privación con suero durante 48 horas. **B.** Imagen representativa de la acumulación de los complejos de rotura de TOP2B (TOP2Bcc) y de TOP2A (TOP2Acc) en respuesta a 5 minutos de DMSO (Control) o etopósido (400 $\mu$ M) obtenidos mediante el ensayo ICE y analizados mediante inmunodetección. **C.** Imagen representativa de la acumulación de TOP2cc en respuesta a 30 minutos de tratamiento con DMSO (Control), suero (1%), merbarona (200 $\mu$ M) o etopósido (20 $\mu$ M).

El modelo actual del papel de TOP2B en la activación de genes de respuesta a hormona (Ju et al., 2006) y los ERGs en neuronas (Madabhushi et al., 2015) propone que la formación de DSBs mediante la actividad de TOP2B en el promotor de estos genes es capaz de inducir su expresión. Por tanto, quisimos comprobar si la merbarona producía por sí misma la acumulación de TOP2cc, pese a que ésta droga ha sido descrita como un inhibidor catalítico (Chen y Beck, 1993). Como habíamos observado previamente, las células control presentaron niveles indetectables de TOP2cc de ambas isoformas (Figura 10C), mientras que el tratamiento con etopósido durante 30 minutos aumentó los niveles de estos intermediarios de reacción (Figura 10C). Por el contrario, la incubación con merbarona no produjo un aumento observable de los niveles globales de TOP2cc en

comparación con la condición control (Figura 10C), descartando que la inducción de la transcripción en respuesta a merbarona se produzca como consecuencia de la estabilización global de TOP2cc. Adicionalmente, comprobamos que durante la estimulación de los ERGs con suero tampoco se producía un incremento en los niveles espontáneos de TOP2cc (Figura 10C), sugiriendo que éstos no se acumulan de forma global durante la activación transcripcional fisiológica.

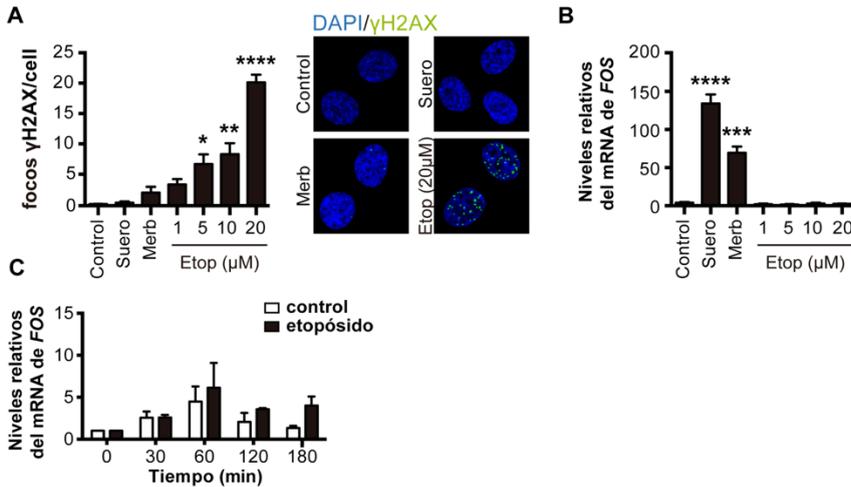
### **3.2.3. El tratamiento con merbarona no produce roturas de doble cadena**

Los resultados anteriores descartaban que la inducción producida por el tratamiento con merbarona fuese consecuencia de la acumulación global de TOP2cc. No obstante, cabía la posibilidad de que esta droga produjese la formación de DSBs sin producir la estabilización de TOP2cc. Por tanto, decidimos analizar la formación de focos de  $\gamma$ H2AX, un marcador bien establecido de DSBs, mediante experimentos de inmunofluorescencia. Las células control presentaron niveles de  $\gamma$ H2AX muy bajos (Figura 11A), mientras que 30 minutos de tratamiento con etopósido incrementó el número de focos de  $\gamma$ H2AX de forma dependiente de dosis (Figura 11A). Por el contrario, el tratamiento con merbarona no aumentó de forma significativa el número de roturas sobre el tratamiento control (Figura 11A). Adicionalmente, comprobamos la formación de DSBs durante activación transcripcional en respuesta a la estimulación fisiológica con suero, sin observarse la aparición de los focos de  $\gamma$ H2AX (Figura 11A).

En paralelo, se analizó la expresión del gen *FOS* producida por estos mismos tratamientos a 30 minutos, observándose una falta de correlación entre los niveles de expresión y la aparición de focos de  $\gamma$ H2AX (Figura 11B). A continuación, se comprobó la expresión del gen *FOS* durante un tratamiento más prolongado con la dosis mayor de etopósido utilizada anteriormente (20 $\mu$ M), sin encontrarse de nuevo cambios significativos en la expresión de *FOS* a los tiempos analizados (Figura 11C). En conjunto, estos experimentos sugieren que la activación de los ERGs no requiere ni se produce por la formación de DSBs en nuestras condiciones experimentales.

Finalmente, quisimos descartar completamente que el incremento transcripcional con merbarona fuese consecuencia de la estabilización de TOP2cc específicamente en los promotores de genes regulados por TOP2, como los ERGs. Para responder esta cuestión, decidimos analizar la inducción del gen *FOS* en células deficientes en la proteína TDP2 (*TDP2*<sup>-/-</sup>), donde el procesamiento y reparación de los TOP2cc y DSBs derivadas ocurre de forma ineficiente (Ledesma et al., 2009). Estas células se generaron mediante la tecnología CRISPR, basada en la nucleasa doble cadena de *Streptococcus pyogenes*, Cas9 (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012), cuya unión al DNA viene determinada mediante homología con una molécula de RNA asociado a la enzima, denominada RNA guía (gRNA). Esta particularidad permite dirigir la actividad de la endonucleasa de doble cadena Cas9 a un locus específico. En este caso, se diseñaron gRNA contra el gen de TDP2 y para facilitar la expresión de Cas9, usamos células RPE-1 que

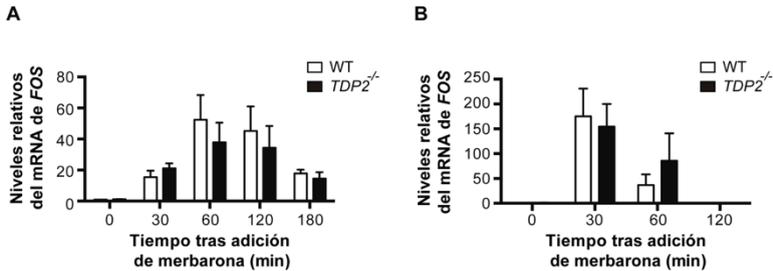
expresaban constitutivamente la proteína Cas9 humanizada de *S. pyogenes* (RPE-1 Cas9) (ver sección 6. Materiales y Métodos).



**Figura 11. Análisis comparativo de formación de roturas de doble cadena (DSBs) y los niveles de expresión del gen *FOS* durante los diferentes tratamientos.** **A.** Imagen representativa (derecha) y cuantificación (izquierda) de los focos de  $\gamma$ H2AX (verde) inducidos tras 30 minutos de tratamiento con DMSO (Control), suero (1%), merbarona (200 $\mu$ M) o concentraciones crecientes de etopósido (1-20 $\mu$ M). El DNA se marcó con DAPI (azul). **B.** Niveles de mRNA de *FOS* en las mismas condiciones que en A analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el mRNA de *GAPDH* y la señal en la condición Control se estableció en 1. **C.** Niveles de mRNA de *FOS* tras diferentes tiempos de tratamiento con etopósido (20 $\mu$ M) o con DMSO (Control) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el mRNA de *GAPDH* y la señal en la condición sin tratamiento (t=0) se estableció en 1. En todos se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante one-way ANOVA (A y B) o two-way ANOVA (C) y test de Bonferroni (\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.001$ ).

Las células *TDP2*<sup>-/-</sup> resultan un modelo idóneo para estudiar el efecto de la formación de TOP2cc y roturas sobre la transcripción. Sin embargo, no observamos diferencias en la inducción de *FOS* producida por el tratamiento con merbarona al comparar las células control y

*TDP2*<sup>-/-</sup> (Figura 12A), lo que nuevamente indica que el tratamiento con merbarona no depende de la formación de TOP2cc.



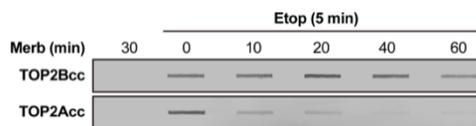
**Figura 12. Análisis de la cinética de inducción transcripcional de *FOS* en células deficientes en *TDP2*.** Niveles de mRNA de *FOS* tras diferentes tiempos de tratamiento con merbarona (200 μM) (A) o re-estimulación con suero (1%) (B) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el mRNA de *GAPDH* y la señal en la condición sin tratamiento (t=0) se estableció en 1. Se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\*P≤0.05; \*\*P≤0.01; \*\*\*P≤0.001).

Igualmente, la estimulación con suero produjo cinéticas de inducción de *FOS* muy similares entre ambas líneas celulares (Figura 12B). Esta falta de un efecto transcripcional en fondo *TDP2*<sup>-/-</sup>, donde TOP2cc y DSBs generados deberían acumularse, sugiere que durante la activación de *FOS* no se produce activamente una acumulación de roturas con un papel regulatorio.

### 3.2.4. Efecto de la merbarona sobre cada isoforma de TOP2

Tras descartar que el tratamiento con merbarona produjese DSBs y/o la activación de la respuesta a estrés celular, quisimos comprobar el efecto inhibitorio del tratamiento con merbarona sobre cada isoforma

de TOP2. Para ello, utilizamos nuevamente el ensayo ICE para analizar la acumulación de TOP2cc inducidos con etopósido como medida indirecta de la actividad TOP2 tras distintos tiempos de incubación con merbarona. Este experimento mostró que TOP2B no se veía inhibida a tiempos cortos de tratamiento con merbarona, siendo necesario una hora de incubación para observar un ligero descenso de la actividad TOP2B global (Figura 13). Por el contrario, la actividad de TOP2A se redujo drásticamente tras los primeros 10 – 20 minutos de tratamiento con merbarona (Figura 13). Este experimento demostró que la merbarona inhibe de forma preferencial a TOP2A con una cinética de inhibición que coincide con los tiempos en los que se produce la inducción de los ERGs, lo que apunta a TOP2A como responsable del fenotipo transcripcional observado.

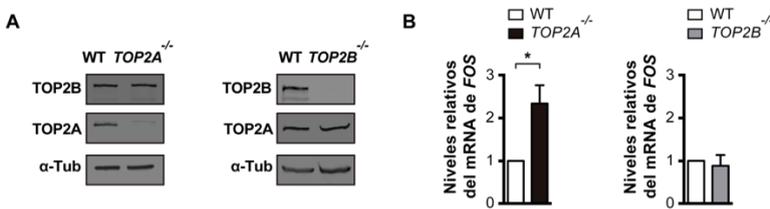


**Figura 13. Análisis de la cinética de inhibición de ambas isoformas de TOP2 con merbarona.** Imagen representativa de la acumulación de los complejos de rotura de TOP2B (TOP2Bcc) y de TOP2A (TOP2Acc) en respuesta a 5 minutos de etopósido (400 $\mu$ M) tras diferentes tiempos de tratamientos con merbarona (200 $\mu$ M). Como control negativo se muestra un tratamiento de 30 minutos con merbarona sin etopósido.

### 3.3 Caracterización del papel de cada isoforma de TOP2 en el control de la expresión de los ERGs

A continuación, quisimos comprobar que inducción de los ERGs observada dependía de TOP2A. Para ello, se decidió comparar la

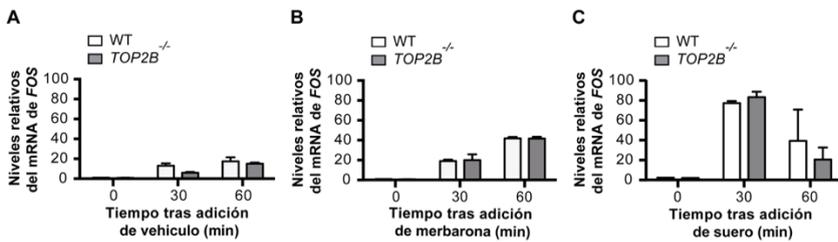
expresión del gen modelo *FOS* en células deficientes en cada isoforma de TOP2 (*TOP2A*<sup>-/-</sup> y *TOP2B*<sup>-/-</sup>) (Figura 14A) generadas mediante la tecnología CRISPR en las células RPE-1 Cas9. En condiciones de represión, pudimos observar que las células *TOP2A*<sup>-/-</sup> presentaban mayores niveles de expresión de este ERG que las células control (Figura 14B, izquierda). Por el contrario, no se apreciaron diferencias al comparar células WT y *TOP2B*<sup>-/-</sup> (Figura 14B, derecha). Este resultado sugiere que TOP2A es necesaria para mantener el estado de represión de *FOS*.



**Figura 14. Validación de las células deficientes en cada isoformas de TOP2 y análisis de los niveles de expresión de *FOS* en estas células.** **A.** Imagen representativa de los niveles de expresión de TOP2B, TOP2A y tubulina ( $\alpha$ -tub) por western blot en células RPE-1 Cas9 deficientes en TOP2A (izquierda) o en TOP2B (derecha) arrestadas por privación con suero durante 48 horas. **B.** Niveles de mRNA de *FOS* en condiciones de represión en células deficientes en TOP2A (izquierda) o en TOP2B (derecha) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el rRNA 28S y la señal en las células silvestre (WT) se estableció en 1. Se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante One-sample t test, valor hipotético = 1 (\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ).

El tratamiento control produjo una respuesta muy leve tanto en las células *TOP2B*<sup>-/-</sup> como WT (Figura 15A), mientras que la incubación con merbarona durante 1 hora incrementó fuertemente los niveles del mRNA de *FOS* (Figura 15B), sin observarse diferencias entre ambas líneas celulares. Este resultado confirma que la activación de los ERGs

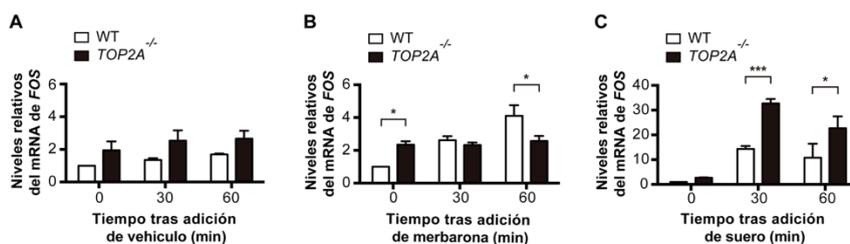
con merbarona no depende de TOP2B. De hecho, ésta no se encuentra inhibida globalmente a los tiempos analizados (Figura 13). Adicionalmente, la estimulación con suero también condujo a una fuerte inducción del gen *FOS* de manera similar en ambos fondos genéticos (Figura 15C), lo que indica que, en nuestras condiciones, TOP2B no es necesaria para la activación transcripcional del gen modelo *FOS*.



**Figura 15. Análisis de la inducción de *FOS* en células deficientes en TOP2B en respuesta a diferentes tratamientos.** Niveles de mRNA de *FOS* en células RPE-1 Cas9 silvestre (WT) o deficientes en TOP2B (*TOP2B*<sup>-/-</sup>) tras diferentes tiempos de tratamiento con DMSO (A), merbarona (200μM) (B) o re-estimulación con suero (1%) (C) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el rRNA 28S y la señal en la condición WT sin tratamiento (t=0) se estableció en 1. Se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\*P≤0.05; \*\*P≤0.01; \*\*\*P≤0.001).

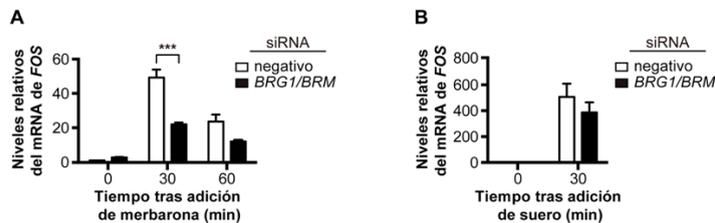
La línea celular *TOP2A*<sup>-/-</sup> tuvo que generarse de forma transitoria antes de cada experimento, ya que TOP2A es esencial para la división celular. Como consecuencia de este procedimiento observamos un incremento de los niveles basales del gen *FOS* tanto en las células WT como *TOP2A*<sup>-/-</sup> en comparación con los niveles normales mostrados por las células RPE-1, lo que redujo la magnitud de las inducciones. No obstante, en estas condiciones, pudimos observar que el tratamiento

con el vehículo no tuvo efecto sobre la expresión de *FOS* tanto en células WT como *TOP2A*<sup>-/-</sup> (Figura 16A). En respuesta a merbarona, la expresión de *FOS* se incrementó entorno a 4 veces únicamente en las células WT (Figura 16B), mientras que en las células deficientes en TOP2A, la expresión de *FOS* permaneció constante tras la adición de merbarona (Figura 16B). Por otro lado, al comparar la estimulación con suero en estas condiciones, observamos que en las células deficientes en TOP2A se alcanzaron niveles de expresión de *FOS* superiores a los observados en células WT (Figura 16C), de acuerdo con los resultados obtenidos mediante la inhibición química con merbarona (Figura 8). Este resultado confirma que la activación de la transcripción causada por el tratamiento con merbarona depende de TOP2A y descarta un efecto indirecto de esta droga. Además, sugiere nuevamente que la falta de actividad de TOP2A favorece la transcripción del gen *FOS* en respuesta a estímulos fisiológicos, de acuerdo con un papel negativo de esta proteína en su regulación.



**Figura 16. Análisis de la inducción de *FOS* en células deficientes en TOP2A en respuesta a diferentes tratamientos.** Niveles de mRNA de *FOS* en células RPE-1 Cas9 silvestre (WT) o deficientes en TOP2A (*TOP2A*<sup>-/-</sup>) tras diferentes tiempos de tratamiento con DMSO (A) merbarona (200 μM) (B) o re-estimulación con suero (1%) (C) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el rRNA 28S y la señal en la condición WT sin tratamiento (t=0) se estableció en 1. Se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\*P≤0.05; \*\*P≤0.01; \*\*\*P≤0.001).

Por último, estudios previos han demostrado que el complejo remodelador de la cromatina BAF es necesario para la unión de TOP2A al DNA en mamíferos (Dykhuizen et al., 2013). Por tanto, decidimos analizar la inducción de *FOS* en respuesta a merbarona en células deficientes en el complejo BAF. Para ello, se llevó a cabo la depleción de ambas subunidades catalíticas del complejo BAF (BRG1 y BRM) mediante RNA interferente (siRNA). La depleción de las subunidades catalíticas del complejo BAF produjo un clara disminución en la inducción de este gen con merbarona, en comparación con las células control (Figura 17A).



**Figura 17. Análisis de la inducción de *FOS* en depleción del complejo BAF en respuesta a diferentes tratamientos.** Ambas subunidades catalíticas del complejo BAF se deplecionaron en células RPE-1 mediante RNA interferencia (siRNA) específicos durante 72 horas. Niveles de mRNA de *FOS* en células transfectadas con un siRNA negativo o contra BRG1/BRM tras diferentes tiempos de tratamiento con merbarona (200 $\mu$ M) (A) o re-estimulación con suero (1%) (B) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el mRNA de *GAPDH* y la señal en la condición siRNA negativo sin tratamiento ( $t=0$ ) se estableció en 1. Se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\* $P\leq 0.05$ ; \*\* $P\leq 0.01$ ; \*\*\* $P\leq 0.001$ ).

Para descartar un defecto general en transcripción causado por la depleción del complejo BAF, comprobamos la activación de *FOS* mediante estimulación con suero, sin observarse diferencias evidentes

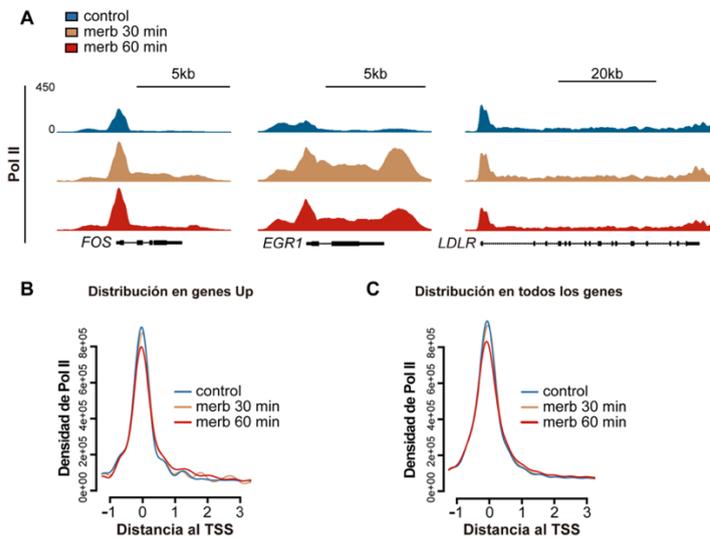
entre las células donde se había deplecionado BRG1/BRM y control (Figura 17B). De acuerdo con el papel del complejo BAF en el reclutamiento de TOP2A al DNA, estos resultados también apoyan que la respuesta transcripcional observada en respuesta a merbarona es consecuencia de la inhibición de TOP2A.

### **3.4 Efectos de la inhibición de TOP2 en la distribución de la Pol II**

Con el fin de entender cómo se produce la activación transcripcional en respuesta a la inhibición de TOP2A, decidimos evaluar los cambios en la distribución de Pol II durante el tratamiento con merbarona mediante ChIP-seq. Al analizar las señales en los ERGs se observó una liberación muy evidente de la pausa de Pol II en respuesta a merbarona tanto a 30 como 60 minutos (Figura 18A). Sin embargo, no todos los ERGs se indujeron en estas condiciones, como es el caso de *LDLR* (Figura 18A), donde no se observó un cambio de distribución de Pol II durante el tratamiento con merbarona.

A continuación, estudiamos la señal acumulada de Pol II tras 30 y 60 minutos de inhibición de TOP2A en los genes inducidos a 2 horas de tratamiento por RNA-seq (Up) (Figura 4B). A 30 minutos de tratamiento, se observaron diferencias sutiles en la distribución de Pol II respecto a la condición control (Figura 18B), mientras que a 60 minutos se produjo una clara reducción de Pol II en el sitio de pausa en estos genes y un incremento en la región codificante (Figura 18B), de acuerdo con la derepresión observada por RNA-seq. Ese resultado indica que la activación transcripcional en respuesta a la inhibición de

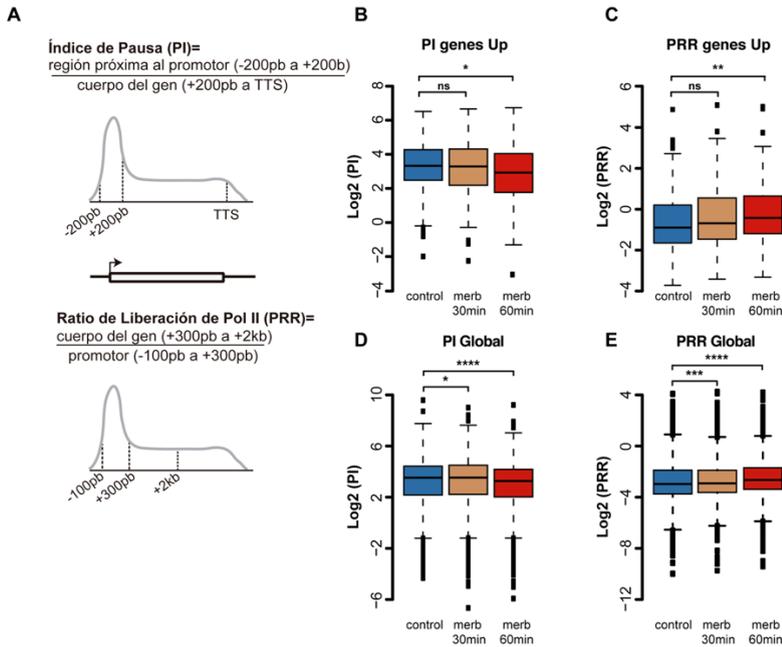
TOP2A se produce por una desregulación de la pausa próxima al promotor de Pol II. Posteriormente, comprobamos si esta liberación de la pausa se producía de manera global, observándose el mismo comportamiento de la señal de Pol II al analizar la distribución acumulada de todos los genes (Figura 18C).



**Figura 18. Análisis de las distribución global de Pol II por ChIP-seq en respuesta al tratamiento con merbarona.** **A.** Señales del ChIP-seq de Pol II en algunos ERGs representativos en la condición control o tras 30 y 60 minutos de tratamiento con merbarona (200 $\mu$ M) en el visualizador genómico UCSC. El eje x representa el número de lecturas por kilobase, por millón de lecturas mapeadas (RPKM). **B.** Señal media del ChIP-seq de Pol II entre -1kb y +3kb del TSS de los genes inducidos a 2 horas de tratamiento con merbarona (Up). **C.** Igual que B para todos los genes transcripcionalmente activos(10,471) (ver sección 6. Materiales y Métodos).

Con el fin de comprobar esta observación se analizaron diferentes parámetros que describen el nivel de pausa de Pol II. El primero de ellos, el Índice de Pausa (PI) define la relación entre la cantidad de Pol II en la región próxima al promotor y en el cuerpo del gen (Figura 19A,

arriba). El segundo, el ratio de liberación de Pol II (PRR) relaciona la señal de Pol II en el inicio del cuerpo del gen con la señal en el promotor (Figura 19A, abajo).



**Figura 19. Análisis de la pausa próxima al promotor de Pol II en respuesta al tratamiento con merbarona.** **A.** Representación esquemática de los parámetros utilizados para cuantificar el nivel de pausa próxima al promotor. **B.** Análisis del valor de PI en la condición control o tras 30 y 60 minutos de tratamiento con merbarona (200 $\mu$ M) de los genes inducidos a 2 horas de tratamiento con merbarona (Up). **C.** Igual que B mostrando el valor de PRR. **D.** Análisis del valor de PI en la condición control o tras 30 y 60 minutos de tratamiento con merbarona (200 $\mu$ M) en todos los genes transcripcionalmente activos (10,471) (ver sección 6. Materiales y Métodos). **E.** Igual que D mostrando el valor de PRR. El eje x representa el logaritmo en base 2 del PI y PRR, respectivamente. Se muestran las diferencias estadísticas mediante U de Mann-Whitney (\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ).

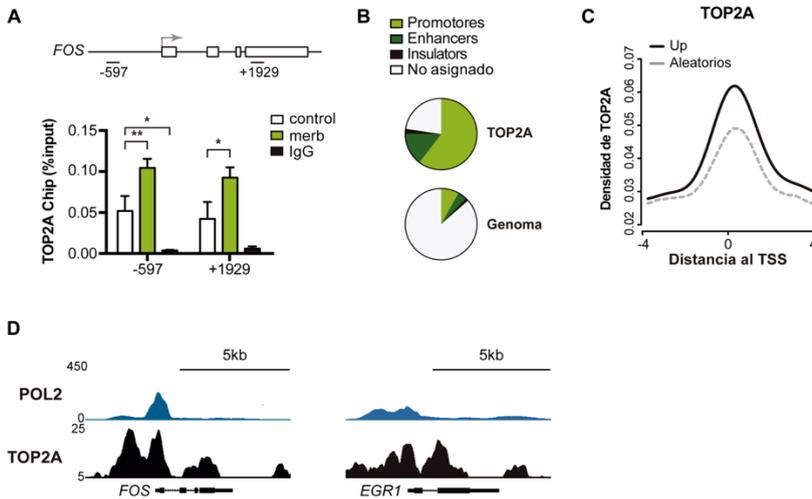
En los genes activados a las 2 horas con merbarona (Up), el análisis de estos ratios demostró un leve descenso del PI tras los primeros 30

minutos de tratamiento (Figura 19B), reduciéndose de forma significativa a los 60 minutos (Figura 19B). Por otro lado, el valor de PRR en estos genes se vio incrementado progresivamente a lo largo del tratamiento, siendo este cambio significativo a 60 minutos (Figura 19C). Al analizar estos parámetros de forma global, pudimos apreciar el descenso significativo del PI tanto a 30 como a 60 minutos (Figura 19D). Asimismo, se observó un incremento significativo del PRR a los tiempos analizados (Figura 19E). Estos resultados sugieren que la inhibición de TOP2A produce la desestabilización de la pausa de Pol II de forma global, dando como resultado el incremento de la transcripción de determinados genes altamente regulados a este nivel, como los ERGs.

### **3.5 Análisis de la distribución global de TOP2A**

La asociación entre TOP2A y transcripción había sido descrita por varios estudios previos, donde se observó su alta presencia en promotores y enhancers (Thakurela et al., 2013; Yu et al., 2017). Por tanto, tras observar la posible relación entre TOP2A y la pausa de Pol II, quisimos analizar la distribución de esta proteína en nuestras condiciones experimentales mediante inmunoprecipitación de cromatina asociada con secuenciación masiva (ChIP-seq). Para ello, se utilizó un anticuerpo previamente caracterizado para este tipo de abordaje (Canela et al., 2017), y se comprobó inicialmente mediante experimentos de ChIP qPCR. Se observó un enriquecimiento de señal en el gen *FOS* en comparación con el control negativo con IgG, que se incrementó tras 30 minutos de tratamiento con merbarona (Figura 20A). Este resultado confirmó la especificidad de la señal obtenida, y

sugiere que TOP2A es activa en el promotor en condiciones de represión.



**Figura 20. Análisis de la distribución global de TOP2A.** **A.** Representación esquemática del gen *FOS* y los amplicones analizados por qPCR. Análisis de la presencia de TOP2A en el promotor de *FOS* mediante ChIP-qPCR en condiciones control o tras 30 minutos de tratamiento con merbarona (200µM). IgG como control negativo. **B.** Anotación funcional de los picos de TOP2A frente a la proporción de los elementos funcionales en genoma humano (ver sección 6. Materiales y Métodos). **C.** Señal media del ChIP-seq de TOP2A entre -4kb y +4kb del TSS de los genes inducidos a 2 horas de tratamiento con merbarona (Up) o el mismo número de genes seleccionados aleatoriamente (ver sección 6. Materiales y Métodos). **D.** Señales del ChIP-seq de TOP2A y Pol II en *FOS* y *EGR1* en la condición control en el visualizador genómico UCSC. El eje x representa el número de lecturas por kilobase, por millón de lecturas mapeadas (RPKM).

De acuerdo con el estudio previo mencionado, los experimentos de Chip-seq mostraron que TOP2A se encontraba preferencialmente asociada a promotores y a enhancers de forma global (Figura 20B). Adicionalmente, al analizar los promotores de los genes inducidos a 2 horas con merbarona (Up) se encontraron niveles superiores de TOP2A en comparación con un mismo número de genes

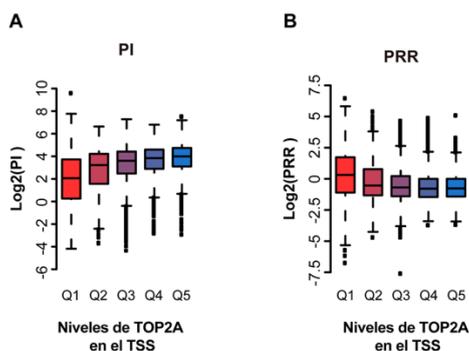
seleccionados al azar (Figura 20C), de acuerdo con un posible papel directo de TOP2A en la regulación de estos genes. Este efecto se pone de manifiesto al analizar los perfiles individuales de algunos genes cuya transcripción se activa en presencia de merbarona (Figura 20D). Estos resultados sugieren nuevamente la participación de TOP2A en la regulación transcripcional de forma general, siendo especialmente relevante en determinados genes, y en particular en ERGs.

### **3.6 Relación entre TOP2A y la pausa próxima al promotor de Pol II**

Con el fin de corroborar la relación entre TOP2A y pausa de Pol II se compararon los índices de pausa de Pol II anteriormente mencionados (PI y PRR) (Figura 19A) con los niveles de TOP2A en la región del promotor de cada gen. En primer lugar, se dividieron todos los genes en quintiles atendiendo a los niveles de TOP2A alrededor del TSS (Q1-Q5) y se determinaron los valores del PI y PRR en cada uno de estos grupos.

Este análisis demostró que la distribución de PI se incrementaba en relación a los niveles de TOP2A (Figura 21A), siendo su valor mayor en los genes con más TOP2A en el promotor (Q5) que en genes con niveles medios (Q3) y bajos de TOP2A (Q1). Consecuentemente, el PRR mostró una relación inversa a la presencia de TOP2A (Figura 21B), presentando los genes con niveles bajos de TOP2A (Q1) valores de PRR superiores a los genes con niveles medios (Q3) y altos de esta

proteína (Q5). Esta correlación sugiere nuevamente una conexión funcional entre TOP2A y la pausa de Pol II a nivel global.



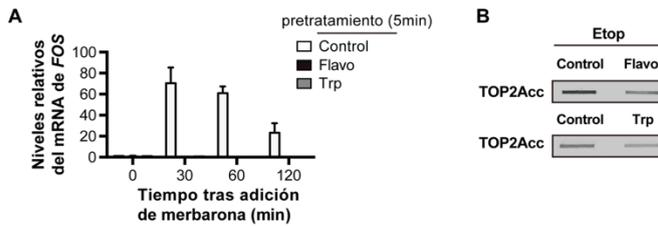
**Figura 21. Relación entre pausa próxima al promotor de Pol II y niveles de TOP2A en el promotor.** Niveles de PI (A) o PRR (B) de todos los genes transcripcionalmente activos divididos en quintiles atendiendo a los niveles de TOP2A en el promotor (Q1-Q5) (ver sección 6. Materiales y Métodos). El eje x representa el logaritmo en base 2 del valor de PI o PRR, respectivamente.

### 3.7 Mecanismo de regulación transcripcional por TOP2A

#### 3.7.1 Relación entre la actividad de TOP2A y transcripción

Como la función principal de las DNA topoisomerasas es la eliminación de las alteraciones topológica del DNA, la presencia y actividad de TOP2A en promotores puede indicar su posible implicación en el mantenimiento del estado topológico de esta región. En eucariotas, la transcripción por la RNA polimerasa II es la fuente principal de superenrollamiento en el DNA. Durante su avance, Pol II introduce superenrollamiento (+) aguas abajo y (-) aguas arriba. Esta tensión topológica tiene un profundo impacto sobre el proceso, tanto

favoreciendo, en el caso del superenrollamiento (-), como dificultando, por acción del superenrollamiento (+). Por tanto, el mantenimiento del estado topológico del DNA resulta esencial para el correcto funcionamiento y regulación de la transcripción.



**Figura 22. Análisis de la inhibición de la transcripción sobre la actividad de TOP2A.** **A.** Niveles de mRNA de *FOS* tras diferentes tiempos de tratamiento con merbarona (200 $\mu$ M) en células previamente tratadas durante 5 minutos con DMSO (Control), flavopiridol (0,5 $\mu$ M) o triptolide (10 $\mu$ M) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el mRNA de *GAPDH* y la señal en la condición sin tratamiento ( $t=0$ ) se estableció en 1. Se representa la media+SEM de dos experimentos independientes. **B.** Imagen representativa de la acumulación de los complejos de rotura de TOP2A (TOP2Acc) en respuesta a 5 minutos de etopósido (400 $\mu$ M) tras 30 minutos de incubación con DMSO (Control), flavopiridol (0,5 $\mu$ M) o triptolide (10 $\mu$ M).

Para comprobar si el superenrollamiento generado por la transcripción era el sustrato principal de TOP2A, se evaluó el efecto de bloquear la transcripción sobre su actividad mediante la inhibición de la salida de la pausa de Pol II con flavopiridol (Flavo) y la inhibición de la iniciación de la transcripción con triptolide (Trp). Inicialmente, se comprobó que el tratamiento durante 30 minutos con estas drogas bloqueaba la transcripción de *FOS* en respuesta a merbarona (Figura 22A). En estas condiciones, se analizaron los niveles de actividad de TOP2A mediante el ensayo ICE, observándose una notable reducción de los TOP2Acc en respuesta a etopósido (Figura 22B). Este resultado sugiere que en

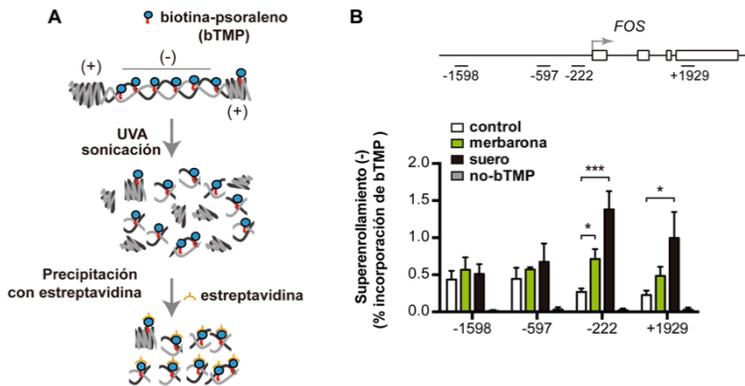
células RPE-1 arrestadas por privación de suero, la función principal de TOP2A está relacionada con la actividad transcripcional de Pol II.

### **3.7.2 Estudio de la función de TOP2A en la topología del gen *FOS***

Dada la dependencia transcripcional de la actividad TOP2A, así como su presencia en promotores, quisimos comprobar si la liberación de la pausa de Pol II producida por la inhibición de TOP2A podía estar causada por un cambio topológico en esta región. Con este objetivo, analizamos el nivel de superenrollamiento del DNA del gen *FOS* mediante la incorporación de un derivado biotinilado de psoraleno (bTMP), un agente intercalante preferencialmente incorporado en DNA superenrollado negativamente. Tras su “crosslink” mediante exposición a radiación UVA, el DNA asociado a bTMP puede purificarse mediante precipitación con estreptavidina y analizado mediante qPCR (Figura 23A).

En estos experimentos, la condición control mostró una señal dependiente de bTMP en todas las regiones analizadas del gen *FOS* (Figura 23B), sin observarse un enriquecimiento específico en la región transcrita, de acuerdo con la baja tasa transcripcional en condiciones de represión. Por el contrario, tras 10 minutos de tratamiento con merbarona se observó un incremento del superenrollamiento (-) específicamente en la región próxima al promotor (Figura 23B). Por otro lado, el análisis del estado topológico del gen *FOS* tras 10 minutos de estimulación con suero mostró la misma tendencia, produciéndose un enriquecimiento mayor de superenrollamiento (-) en el promotor,

así como en el interior del gen (Figura 23B). Estos resultados demostraron que la inhibición de TOP2A con merbarona producía la rápida acumulación de superenrollamiento (-) en el promotor de gen *FOS*.



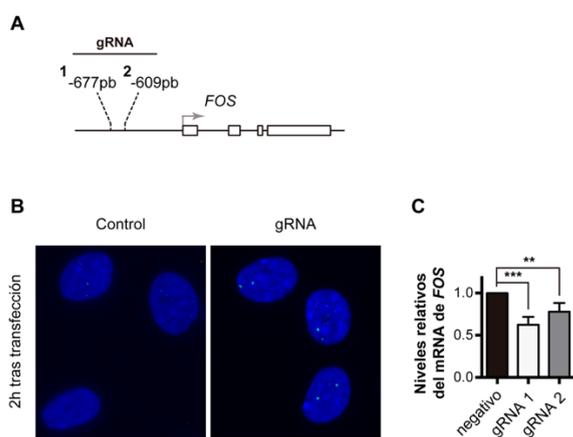
**Figura 23. Análisis de los niveles de superenrollamiento negativo en el gen *FOS* durante los distintos tratamientos.** A. Esquema representativo del protocolo utilizado para purificar específicamente el DNA superenrollado negativamente mediante precipitación de psoraleno biotinilado (bTMP). B. Representación esquemática del gen *FOS* y los amplicones analizados por qPCR. Niveles de superenrollamiento (-) en el gen *FOS* tras 10 minutos de tratamiento con DMSO (Control), merbarona (200 $\mu$ M) o estimulación con suero (1%). El eje x representa el porcentaje de input recuperado tras la precipitación con estreptavidina. Se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ).

### 3.7.3 Efecto de la disrupción topológica del promotor de *FOS* sobre su inducción

Para evaluar si los cambios topológicos del promotor del gen *FOS* podían ser responsables de las inducciones observadas en respuesta a

## RESULTADOS

merbarona, decidimos eliminar el componente topológico del promotor de este gen mediante la formación de una rotura de doble cadena, ya que la rotación de los extremos libres del DNA permite la disipación de la tensión topológica. Para ello, se utilizó nuevamente las células RPE-1 Cas9.



**Figura 24. Caracterización del efecto transcripcional de la generación de cortes de doble cadena (DSBs) en el promotor de *FOS* mediante el sistema CRISPR/Cas9.** **A.** Esquema representativo de la posición a la que se dirigen los RNA guías (gRNAs) diseñados dentro del promotor de *FOS*. **B.** Imagen representativa de la aparición de focos de  $\gamma$ H2AX (verde) en RPE-1 Cas9 tras 2 horas de la transfección con gRNA control (negativo) o el gRNA 1. El núcleo se marcó con DAPI (azul). **C.** Niveles de mRNA de *FOS* tras 2 horas de transfección con gRNA 1, gRNA 2 o gRNA control (negativo) analizados mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el rRNA 28S y la señal en la condición negativo se estableció en 1. Se representa la media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante one-way ANOVA y test de Bonferroni (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

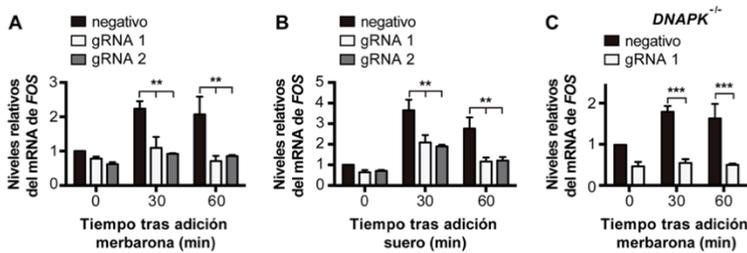
En este caso, se diseñaron dos gRNAs distintos para dirigir la actividad Cas9 al promotor del gen *FOS* (Figura 24A). Tras validar que los gRNAs introducían mutaciones específicamente en las secuencias

diana, y por tanto generaban DSBs, se procedió a determinar el tiempo de tratamiento en el que la mayor parte de las células presentasen DSBs. Tras analizar distintos tiempos de incubación con los gRNAs, se decidió evaluar los niveles de expresión de *FOS* a las 2 horas, al comprobar que la mayor parte de las células presentaba dos focos de  $\gamma$ H2AX (Figura 24B). En estas condiciones, observamos que la presencia de una única rotura de doble cadena en el promotor produce un descenso en los niveles de transcripción basal del gen *FOS* (Figura 24C).

Con el fin de estudiar en más detalle la importancia del componente topológico sobre la transcripción, decidimos analizar el efecto de estas DSBs en la activación transcripcional. En respuesta a merbarona, la presencia de DSBs bloqueó completamente la inducción de *FOS* en comparación con las células que habían sido transfectadas con gRNA negativo (Figura 25A). Por otro lado, la estimulación con suero incrementó la transcripción en todas las condiciones. Sin embargo, las células donde se habían generado DSBs alcanzaron niveles de expresión inferiores a las células control (Figura 25B).

Estos resultados podrían sugerir que la integridad del promotor es necesaria para la inducción producida por la inhibición de TOP2A. No obstante, las roturas próximas a regiones transcritas, además de eliminar la tensión topológica, pueden bloquear el avance de Pol II por la activación de la ruta de respuesta a daño, más concretamente, mediante DNA-PKcs (Pankotai et al., 2012), siendo posible que los resultados obtenidos puedan deberse a la combinación de ambos

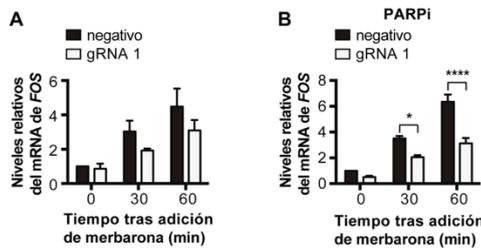
efectos. Por tanto, utilizamos células deficientes en DNA-PKcs ( $DNAPK^{-/-}$ ) para analizar únicamente el efecto producido al comprometer el componente topológico. En las células transfectadas con el gRNA negativo, el tratamiento con merbarona aumentó la expresión de *FOS* (Figura 25C), indicando que DNA-PKcs no es necesaria para su expresión. Por el contrario, la presencia de DSBs en el promotor bloqueó completamente la inducción transcripcional de *FOS* con merbarona (Figura 25C). Este resultado indica que el efecto inhibitorio observado de las DSBs sobre la inducción de *FOS* no es consecuencia de la señalización por DNA-PKcs.



**Figura 25. Análisis de la inducción transcripcional de *FOS* en presencia de DSBs en su promotor.** Se muestra los niveles de mRNA de *FOS* mediante RT-qPCR. Las células RPE-1 Cas9 se transfectaron con el gRNA indicado 2 horas antes de la adición de merbarona (200 $\mu$ M) (A) o suero (1%) (B). Los valores se normalizaron utilizando el rRNA 28S y la señal en la condición negativo (t=0) se estableció en 1. C. Igual que en A y B, en células RPE-1 Cas9 deficientes en DNA-PKcs ( $DNAPK^{-/-}$ ). En todos, se representa la media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ).

Finalmente, decidimos utilizar una estrategia alternativa a la formación de DSBs para confirmar eliminar la topología del promotor de *FOS*. Con este objetivo, se generó una línea celular que expresaba un versión

mutante de la proteína Cas9 (Cas9 D10A) que sólo conserva la función de uno de sus sitios activos, y que por tanto, actúa como una nucleasa de cadena sencilla (Cong et al., 2013) (ver sección 6. Materiales y Métodos). Esta línea celular se empleó para eliminar el componente topológico del promotor de *FOS* mediante la introducción de roturas de cadena sencilla en el DNA (SSBs).



**Figura 26. Análisis de la inducción transcripcional de *FOS* en presencia de SSBs en su promotor.** **A.** se muestra los niveles de mRNA de *FOS* mediante RT-qPCR. Las células RPE-1 Cas9 D10A se transfectaron con el gRNA indicado 2 horas antes de la adición de merbarona (200 $\mu$ M). Los valores se normalizaron utilizando el rRNA 28S y la señal en la condición negativo ( $t=0$ ) se estableció en 1. **B.** Igual que A, con un tratamiento de 30 minutos con el inhibidor de PARP, PJ34 (10 $\mu$ M) previo a la transfección de los gRNAs. En todos, se representa la media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\* $P\leq 0.05$ ; \*\* $P\leq 0.01$ ; \*\*\* $P\leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P\leq 0.0001$ ).

En estos experimentos, la formación de SSBs no afectó a los niveles basales del mRNA de *FOS* en comparación con las células control (tiempo 0, Figura 26A). Sin embargo, en estas condiciones observamos una menor inducción con merbarona, aunque con un efecto modesto y no significativo (Figura 26A). Teniendo en cuenta que la reparación de SSBs es un proceso muy rápido y eficiente (Caldecott, 2003), el efecto sutil podría deberse al reducido número de células con SSBs en este promotor en un momento concreto. Para alargar la vida de este

daño en el DNA y potenciar así su efecto, decidimos bloquear específicamente su reparación mediante la inhibición química de PARP1, la enzima principal encargada de señalar la reparación de SSBs (Fisher et al., 2007). En presencia del inhibidor de PARP, las células RPE-1 Cas9 D10A transfectadas con un gRNA negativo aumentaron la expresión de *FOS* en respuesta a merbarona (Figura 26B), mientras que la generación de SSBs en el promotor de *FOS* produjo un claro defecto de inducción (Figura 26B). De nuevo, este resultado sugiere que la inducción de *FOS* en respuesta a la inhibición de TOP2A requiere la integridad topológica del promotor. Asimismo, la dependencia del PARPi permite descartar que el efecto observado en estos experimentos se deba a la presencia inhibitoria de la proteína Cas9 en el promotor de este gen.

### **3.8 Análisis de la actividad de TOP1 durante la inhibición de TOP2A**

Se ha descrito que la acumulación de superenrollamiento (+) por delante de Pol II favorece el establecimiento de la pausa en la región próxima al promotor y que la actividad de la topoisomerasa 1, eliminando dicho superenrollamiento, es importante para la salida de la pausa (Baranello et al., 2016). Basándonos en este modelo, quisimos estudiar la relación entre TOP1 y TOP2A.

Para ello, decidimos analizar la actividad TOP1 mediante el ensayo ICE. De forma similar a TOP2, fue imposible detectar complejos de rotura de TOP1 (TOP1cc) en las células control (Figura 27A), siendo

necesario el tratamiento con el veneno de TOP1, camptotecina (CPT) para producir su acumulación a nivel global (Figura 27A). Esta estrategia nos permitió evaluar la actividad TOP1 durante los distintos tratamientos, no observándose cambios evidentes tras 30 minutos de incubación con merbarona y con suero (Figura 27B). Este resultado indica que la activación transcripcional tanto con merbarona como con suero no produce un cambio inmediato en la actividad TOP1 global.

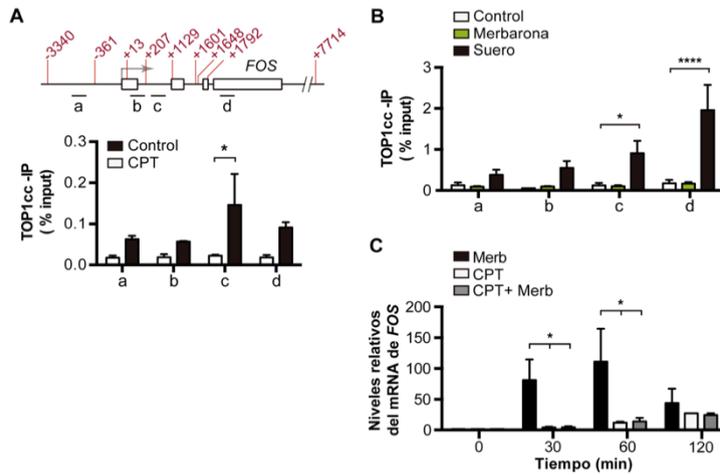


**Figura 27. Análisis de la actividad global de TOP1 durante los diferentes tratamientos.** **A.** Imagen representativa de los complejos de rotura de TOP1 (TOP1cc) inducidos por 5 minutos de tratamiento con camptotecina (CPT) o DMSO (Control) obtenidos mediante el ensayo ICE y analizados mediante inmunodetección. **B.** Imagen representativa de la acumulación de TOP1cc tras 30 minutos de tratamiento con DMSO (Control), merbarona (200µM) o suero (1%) y un tratamiento final de 5 minutos de CPT (10µM). Se muestra también control negativo sin CPT (-).

A continuación, decidimos analizar la actividad TOP1 en el gen *FOS*, como modelo de los genes inducidos en estas condiciones, mediante experimentos de inmunoprecipitación de los TOP1cc obtenidos con el ensayo ICE (TOP1cc-IP). Inicialmente, validamos la especificidad de la señal asociada al gen *FOS* al comprobar que ésta era dependiente del tratamiento con CPT (Figura 28A), en este experimento observamos niveles bajos de actividad TOP1 en condiciones de represión, de acuerdo con el bajo nivel de transcripción basal. Por el contrario, tras

30 minutos de estimulación con suero se produjo un incremento de la actividad TOP1 de forma progresiva a lo largo del gen (Figura 28B), conforme a la función de TOP1 favoreciendo el avance de Pol II. Por el contrario, la inhibición de TOP2A con merbarona a los mismos tiempos no aumentó los niveles de actividad de TOP1 observados en la condición control (Figura 28B), pese a producir una inducción transcripcional comparable al suero a los tiempos analizados (Figura 11B). Estos resultados sugieren que existe un equilibrio entre la actividad de TOP2A y de TOP1 en el promotor de *FOS*, que es responsable del mantenimiento de su estado topológico.

Para comprobar la relación entre la actividad TOP2A y TOP1, quisimos analizar el efecto de la inhibición de TOP1 en la inducción del gen *FOS* con merbarona. Llamativamente, en este experimento observamos que el tratamiento previo con CPT bloqueó completamente la expresión del gen *FOS* en respuesta a la inhibición de TOP2A (Figura 28C), lo que nuevamente pone de manifiesto la interdependencia entre ambas actividades en la regulación transcripcional de *FOS*.



**Figura 28. Análisis de la actividad de TOP1 en el gen *FOS* durante los diferentes tratamientos.** **A.** Representación esquemática del gen *FOS* con los sitios PstI(rojo) respecto al TSS y los amplicones analizados por qPCR. Señal de inmunoprecipitación de TOP1cc (TOP1cc-IP) en los distintos fragmentos producidos por la digestión con PstI del gen *FOS* tras 5 minutos de tratamiento con DMSO (Control) o camptotecina (CPT) (10 $\mu$ M). **B.** Señal de TOP1cc-IP en *FOS* tras 30 minutos de tratamiento con DMSO (Control), merbarona (200 $\mu$ M) o estimulación con suero (1%) y un tratamiento final de 5 minutos de CPT (10 $\mu$ M). **C.** Niveles de mRNA de *FOS* analizados mediante RT-qPCR tras diferentes tiempos de tratamiento con merbarona (200 $\mu$ M), CPT (10 $\mu$ M) o ambas. El tratamiento con CPT se realizó 5 minutos antes que el resto. Los valores se normalizaron utilizando el mRNA de *GAPDH* y la señal en la condición sin tratamiento (t=0) se estableció en 1. En todos, se representa media+SEM de tres experimentos independientes y se muestran las diferencias estadísticas mediante two-way ANOVA y test de Bonferroni (\*P $\leq$ 0.05; \*\*P $\leq$ 0.01; \*\*\*P $\leq$ 0.001, \*\*\*\*P $\leq$ 0.0001).



## **4. DISCUSIÓN**



## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 TOP2 regula la transcripción de forma independiente de roturas de doble cadena de DNA

La aparición de DSBs ha sido descrita durante la activación transcripcional en diferentes contextos fisiológicos, por ejemplo en respuesta a estimulación hormonal (Haffner et al., 2010; Lin et al., 2009; Stork et al., 2016) o durante la estimulación de los ERGs y los genes de respuesta a choque térmico (Bunch et al., 2015; Madabhushi et al., 2015). Sin embargo, actualmente se encuentra bajo discusión si este daño en el DNA representa un requisito para la inducir la expresión génica, o si por el contrario, ocurre como consecuencia de conflictos originados durante el proceso.

En este trabajo, hemos observado que la inhibición catalítica de TOP2A con merbarona produce principalmente un efecto positivo sobre la transcripción, dando como resultado la inducción de genes cortos involucrados y altamente regulados, entre los que se incluyen diferentes miembros de los ERGs. Los experimentos de inmunofluorescencia de  $\gamma$ H2AX descartaron la formación de DSBs con el tratamiento utilizado, mientras que el ensayo ICE corroboró que la merbarona bloqueaba rápidamente la actividad de TOP2A sin producir la estabilización de TOP2cc, tanto de TOP2A como de TOP2B. Del mismo modo, la activación fisiológica de los ERGs con suero no produjo la formación de DSBs, ni la acumulación de TOP2cc. Por último, hemos observado que las células deficientes en TOP2A

presentan niveles de mRNA constitutivamente inducidos del ERG modelo *FOS* y que la estimulación con suero de estas células conduce a una mayor expresión transcripcional.

Curiosamente, la función de TOP2 en la regulación transcripcional de los ERGs había sido sugerida en estudios previos, donde se proponía que la actividad de TOP2B es necesaria para inducir la expresión de estos genes mediante la formación de DSBs en su promotor (Bunch et al., 2015; Madabhushi et al., 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis entran en profundo conflicto con una función positiva de las DSBs dependientes de TOP2B durante la activación transcripcional de los ERGs. De hecho, en nuestras condiciones, TOP2B no es necesaria para la inducción del ERG modelo *FOS* en respuesta a estimulación fisiológica con suero. Por el contrario, resulta muy evidente que TOP2A cumple una función directa de la actividad TOP2A en el mantenimiento del estado de represión de los ERGs.

Una posible explicación para estas diferencias es que algunos de los resultados previos que dieron lugar a dichas conclusiones fueron obtenidos mediante el uso de etopósido, una droga que además de inducir la formación de DSBs, produce la inhibición y degradación vía proteosoma de TOP2 (Ban et al., 2013; Mao et al., 2001; Zhang et al., 2006). Así pues, es posible que las inducciones observadas en estos estudios se deban a la falta de actividad TOP2, y no la formación de roturas en el DNA. Además, es reseñable mencionar que la inducción de DSBs mediante etopósido no produjo un aumento de expresión de

*FOS* en nuestras manos, a diferencia de lo que se describe en uno de estos trabajos (Madabhushi et al., 2015).

En otro de estos trabajos se describió que la actividad de DNA-PKcs era necesaria para la transcripción de los ERGs, observándose además una fuerte señalización de DSBs durante su estimulación transcripcional con suero (Bunch et al., 2015). Estos efectos no fueron observado en nuestras condiciones experimentales, poniendo de manifiesto que la activación de los ERGs puede ocurrir de forma independiente a la aparición de daño en el DNA. Además, el efecto negativo de la inhibición de DNA-PKcs sobre la transcripción descrito en este trabajo también podría indicar que la reparación de las DSBs originadas es completamente necesaria para permitir la transcripción.

Todas estas discrepancias podrían sugerir particularidades del sistema biológico o condiciones experimentales utilizadas en estos estudios. Por ejemplo, en este último trabajo se utilizaron células tumorales HEK293T (Bunch et al., 2015), donde se ha descrito una alta inestabilidad cromosómica (Roschke et al., 2002), lo que podría explicar la mayor tendencia a la aparición de daño en el DNA como consecuencia de su naturaleza cancerígena. No obstante, quisimos abordar directamente esta cuestión y analizar el efecto transcripcional producido por la formación de DSBs en el promotor de un gen. Para ello, utilizamos el sistema CRISPR/Cas9 para comprometer específicamente el promotor del gen modelo *FOS*, lo que nos permitió comprobar que la formación de DSBs, lejos de inducir su transcripción, producía un descenso reproducible de los niveles de expresión. Este

efecto inhibitorio de las DSBs sobre la transcripción ha sido descrito en multitud de estudios (Beli et al., 2012; Chou et al., 2010; Iacovoni et al., 2010; Miller et al., 2010; Pankotai et al., 2012; Shanbhag et al., 2010). Sin embargo, es cierto que las roturas introducidas mediante Cas9 no tienen la misma estructura que las mediadas por TOP2, ya que estas se caracterizan por la presencia de un enlace covalente entre la enzima y el DNA. Por tanto, cabría la posibilidad de que los efectos de ambos tipos de roturas sobre la expresión no sean equivalentes, pudiendo ser interesante evaluar en más detalle esta cuestión.

En conjunto, nuestros resultados descartan que la activación transcripcional de los ERGs requiera la formación de DSBs mediante TOP2 y sugieren que éstas puedan tener un carácter secundario o accidental. En este sentido, diferentes estudios han mostrado que la transcripción es necesaria para la conversión de los TOP2cc inducidos con etopósido en DSBs (Canela et al., 2019; Gómez-Herreros et al., 2017) y se ha descrito que la ausencia de TOP2 compromete la transcripción de genes regulados por TOP2B (Gómez-Herreros et al., 2014, 2017), lo que apoya el papel inhibitorio de las DSBs sobre la transcripción.

### **4.2 TOP2A reprime la transcripción mediante el mantenimiento de la pausa próxima al promotor de Pol II**

Tradicionalmente, el estudio de TOP2 en transcripción se había centrado en su papel como agente facilitador eliminando los problemas topológicos producidos durante el avance de Pol II. Sin embargo, en

los últimos años, diferentes estudios han puesto de manifiesto el profundo control que la topología del DNA y las topoisomerasas pueden ejercer sobre la regulación de la expresión génica (Baranello et al., 2016; Kouzine et al., 2008, 2013; Pedersen et al., 2012; Revyakin et al., 2006).

En esta tesis hemos demostrado que TOP2A se encuentra localizada en promotores y en enhancers, como había sido descrito previamente en otras líneas celulares (Thakurela et al., 2013; Yu et al., 2017). Además, hemos observado su asociación con promotores de genes altamente pausados, una correlación que también se ha descrito para TOP2B (Dellino et al., 2019). De acuerdo con esta asociación funcional entre TOP2 y la pausa próxima al promotor de Pol II, hemos podido observar que la inhibición de TOP2A produce la desestabilización inmediata de este proceso, lo que se traduce en la inducción de genes altamente regulados como los ERGs. Además, estos genes presentan niveles de TOP2A superiores a la media. Sin embargo, no todos los genes asociados a TOP2A incrementaron su expresión en estas condiciones, probablemente porque el mecanismo de la pausa es necesario para la eficiente transcripción de la mayoría de genes. De hecho, la depleción de NELF produce un efecto similar dando lugar a un descenso global de la pausa de Pol II sin provocar un incremento transcripcional en todos los genes (Gilchrist et al., 2010).

En conjunto, nuestros resultados demuestran la asociación de TOP2A con transcripción, sugiriendo su papel general y directo en la regulación de la pausa próxima al promotor de Pol II. Además, la alta correlación

que parece existir entre este mecanismo y TOP2B también sugiere una conexión similar. Por tanto, sería muy interesante evaluar el efecto transcripcional producido por la falta de actividad TOP2B, con el fin de establecer el papel de la actividad TOP2 en la regulación transcripcional de forma general.

### **4.3 Mecanismo de regulación transcripcional de los ERGs por TOP2A**

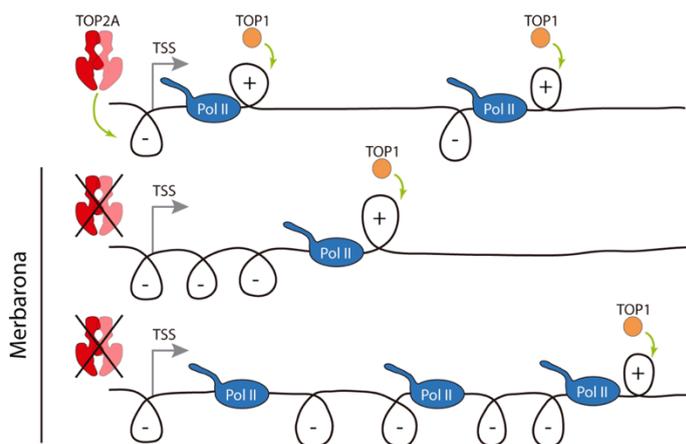
La inhibición de TOP2A con merbarona produce una acumulación de superenrollamiento (-) en el promotor del gen *FOS*, paradigma de genes regulados a nivel de pausa próxima al promotor de Pol II. Para comprobar si esta alteración era causa o consecuencia de la desrepresión observada decidimos eliminar la topología de este promotor mediante la introducción de DSBs (con Cas9) o de SSBs (con el mutante Cas9 D10A). Estos experimentos demostraron que la acumulación de dicho superenrollamiento (-) era responsable de inducción de *FOS* observada al inhibir TOP2A.

Adicionalmente, hemos observado que durante la activación fisiológica de la transcripción del gen *FOS* también se produce una acumulación de superenrollamiento (-) y que la integridad topológica del promotor es necesaria para alcanzar el máximo nivel de inducción. En conjunto, estos resultados pueden sugerir que la topología del promotor funcione como elemento regulador de la transcripción, pudiendo utilizarse la acumulación de superenrollamiento (-) como un mecanismo fisiológico para favorecer la transcripción.

De hecho, diversos estudios han demostrado que el superenrollamiento del DNA afecta la procesividad de Pol II (Chong et al., 2014; Kravatskaya et al., 2013; Ma et al., 2013; Ma y Wang, 2014b) y la presencia de superenrollamiento (-) en el promotor favorece la iniciación de la transcripción (Revyakin et al., 2006; Tabuchi y Hirose, 1988). Además, eliminar el componente topológico mediante cortes en el DNA o la incubación *in vitro* con DNA topoisomerasas que relajan específicamente superenrollamiento (-) tiene un efecto negativo sobre la transcripción (Dunaway y Ostrander, 1993; Sun y Fuchs, 1994). Mientras que por el contrario, se ha propuesto que el superenrollamiento (+) supone una barrera topológica que induce la pausa próxima al promotor, siendo necesaria la actividad de TOP1 para permitir el avance del complejo de elongación (Baranello et al., 2016).

De acuerdo con este último modelo, hemos observado que la estimulación fisiológica de *FOS* produce un aumento de la actividad de TOP1 en la región transcrita. Sin embargo, este efecto no fue observado durante la inducción transcripcional producida por la inhibición de TOP2A, lo que puede explicarse por una menor formación de superenrollamiento (+) en estas condiciones. Este interesante resultado sugiere que la actividad de TOP2A podría ser necesaria para mantener un estado topológico adecuado para el establecimiento y regulación de la pausa próxima al promotor, lo que explicaría la activación transcripcional observada durante su inhibición (ver modelo, Figura 28) y la fuerte asociación de esta proteína con genes altamente pausados. Adicionalmente, no podemos descartar que la actividad TOP2A se encuentre sujeta a una regulación fisiológica, lo

que permitiría ajustar el estado topológico del promotor a las necesidades transcripcionales específicas.



**Figura 29. Representación esquemática simplificada del modelo presentado para explicar la inducción transcripcional producida por la inhibición de TOP2A con merbarona. Arriba:** en condiciones de represión, cada ronda de Pol II genera superenrollamiento (+) por delante y superenrollamiento (-) a su espalda (Liu y Wang, 1987b). El superenrollamiento (+) favorece la pausa de Pol II (Baranello et al., 2016). La actividad TOP2A elimina el superenrollamiento (-), mientras que la actividad TOP1 es responsable del nivel de transcripción basal al controlar la liberación de la pausa de Pol II. **En medio:** la inhibición de TOP2A mediante la adición de merbarona conduce a la acumulación del superenrollamiento (-) como consecuencia de la transcripción basal. **Abajo:** La presencia de superenrollamiento (-) evita la formación de superenrollamiento (+) neto durante el avance de las sucesivas Pol II pudiendo escapar de la región próxima al promotor con mayor facilidad y sin necesidad de actividad TOP1.

Por último, nuestros resultados indican que deben existir mecanismos independientes a TOP2A para reprimir la expresión de los ERGs, puesto que en ausencia de actividad TOP2A pudo observarse un apagado normal tras la inducción de estos genes. De hecho, incluso la proteína FOS participa en la represión de algunos

ERGs (Ofir et al., 1990). Adicionalmente, es posible que la acumulación de tensión topológica pueda también favorecer el apagado de la transcripción. En este sentido, se ha descrito la aparición de estructuras alternativas de DNA dependientes de transcripción tanto en promotores como en regiones reguladoras de la transcripción (Kouzine et al., 2017), siendo posible la implicación en el silenciamiento génico de algunas de ellas, como ocurre en el promotor del gen *MYC* (Kouzine et al., 2008). No obstante, todavía se conoce poco sobre la función de estas alteraciones estructurales producidas por la acumulación de superenrollamiento en el DNA.

#### **4.4 Modelo de trabajo: Regulación topológica de la expresión génica en eucariotas**

En procariotas, el superenrollamiento del DNA resulta un elemento regulador que condiciona la expresión de ciertos genes, en cuya regulación intervienen las topoisomerasas bacterianas (Blot et al., 2006; El y Bossi, 2000; Tan et al., 1994). Los resultados de esta tesis permiten proponer un modelo donde el balance de actividad de TOP1:TOP2 permitiría ajustar la expresión genética en organismos superiores mediante el control del estado topológico del promotor. Según nuestro modelo, la eliminación de superenrollamiento (-) por TOP2A sería necesaria para permitir la formación de superenrollamiento (+) durante elongación temprana, favoreciendo el establecimiento de la pausa de Pol II. La eliminación del superenrollamiento (+) por TOP1 dispararía la elongación productiva. De esta forma, la actividad coordinada de ambas topoisomerasas permitiría mantener un estricto control sobre la

pausa y liberación de cada Pol II, mientras que el desacoplamiento de estas actividades podría permitir que varios complejos de elongación avanzasen a rebufo aprovechando el superenrollamiento (-) producido por el avance de una primera Pol II (Figura 28).

Una conclusión evidente de nuestro modelo es que la transcripción ocurriría en forma de olas transcripcionales, cuya frecuencia y amplitud estarían determinadas por la actividad de TOP1 y TOP2, respectivamente. De acuerdo con esta deducción, en los últimos años se ha propuesto que la transcripción es un proceso discontinuo, que se produce mediante periodos discretos de elongación productiva, denominados olas transcripcionales (Chubb et al., 2006; Fukaya et al., 2016; Suter et al., 2011). Curiosamente, este comportamiento ha sido descrito durante la activación de gen modelo *FOS* (Chen et al., 2019; Senecal et al., 2014). Por tanto, los resultados obtenidos en esta tesis podrían no ser únicamente un fenómeno particular de los genes altamente pausados sino representar un mecanismo global de regulación transcripcional.

Por último, hay que tener en cuenta que el papel de la topología del DNA sobre la transcripción de un gen debe verse fuertemente influida por elementos como la proximidad, la polaridad y la expresión de otros genes, así como el tamaño y la arquitectura del dominio topológico particular en el que se ubica. Esto podría explicar la falta de una respuesta transcripcional homogénea producida por la alteración topológica causada al inhibir TOP2A. Además, no podemos descartar que el superenrollamiento del DNA pueda alterar la interacción entre

el promotor y los elementos reguladores distales. En este sentido, se ha demostrado que la función de NELF y de PAF1 (Chen et al., 2015), ambos factores directamente implicados en la pausa próxima al promotor de Pol II, están fuertemente influida por la interacción promotor-enhancer (Chen et al., 2017; Schaukowitch et al., 2014).

Por tanto, para comprender de forma general el mecanismo de regulación transcripcional dependiente de superenrollamiento resulta imprescindible una mayor comprensión de la organización del genoma, así como de la más que probable interrelación entre arquitectura genómica, topología del DNA y topoisomerasas. Todo ello nos permitiría obtener una visión más completa de la complejidad regulatoria en organismos superiores, permitiéndonos comprender las consecuencias de alteraciones en cada una de estas distintas capas de información.



## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

1. TOP2A es necesaria para el mantenimiento de la represión de un conjunto de genes que se caracterizan por ser cortos y altamente regulados y no se requiere para la inducción fisiológica de los ERGs.
2. TOP2A se localiza preferentemente en promotores de genes con un alto nivel de pausa próxima al promotor de Pol II y su inhibición catalítica genera una liberación global de dicha pausa, lo que sugiere que la pausa próxima al promotor de Pol II está regulada por la actividad de TOP2A.
3. La inducción de cortes de doble cadena con etopósido no induce la expresión del gen *FOS*. De hecho, la formación de cortes de doble cadena en el promotor del gen *FOS* reduce los niveles de transcripción de este gen y produce defectos en su inducción.
4. En condiciones de represión, TOP2A se encuentra presente y activa en el promotor del gen *FOS* eliminando superenrollamiento (-).
5. La acumulación de superenrollamiento (-) en el promotor del gen *FOS* en respuesta a la inhibición de TOP2A permite su transcripción sin el aumento de la actividad TOP1 observada en respuesta a estimulación fisiológica.



## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Procedimientos de cultivo celular

#### 6.1.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las células hTERT RPE-1 (ATCC) se cultivaron en medio Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM) F-12 (Sigma) suplementado con penicilina, estreptomycin y 10% de suero fetal bovino (Sigma) a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. La presencia de micoplasma fue rutinariamente descartada mediante el test comercial MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza).

Las células hTERT RPE-1 con expresión constitutiva de Cas9 (RPE-1 Cas9) y el mutante Cas9 D10A (RPE-1 Cas9 D10A) se cultivaron en DMEM F-12 (Sigma) suplementado con penicilina, estreptomycin y 10% FBS (Sigma) a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> y sometidas rutinariamente a selección con 2 µg mL<sup>-1</sup> blastidina.

Las células A549 y HEK293T se cultivaron en DMEM (Sigma) suplementado con penicilina, estreptomycin y 10% de FBS (Sigma) a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>.

Los MEFs primarios fueron obtenidos a 13 d.p.c. y se cultivaron en medio DMEM (Sigma) suplementado con penicilina, estreptomycin y 15% de FBS (Sigma) y aminoácidos no esenciales a 37°C en 3% CO<sub>2</sub>. Todos los experimentos se realizaron entre P1 y P5.

Todos los experimentos se realizaron en células arrestadas en G0/G1 por privación de suero. De forma general, tras 16 horas en cultivo, el medio de cultivo DMEM (10% suero) o DMEM F-12 (10% suero) se sustituyó por el medio correspondiente con 0.1% suero, lavando las células previamente con PBS. En estas condiciones, las células se incubaron durante 48 horas a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> antes de los experimentos.

### 6.1.2. Generación de líneas celulares mutantes CRISPR

Las células hTERT RPE-1 con expresión constitutiva de Cas9 (RPE-1 Cas9) fueron una amable concesión del laboratorio de Daniel Durocher.

Para generar la línea celular deficiente en TOP2 $\beta$  (TOP2B<sup>-/-</sup>) se utilizaron células RPE-1 Cas9. 2x10<sup>5</sup> células se transfectaron con un gRNA contra el 3er exón del gen TOP2B (CTTCGTCCTGATAC ATATAT) o con un gRNA negativo como control (IDT, 1072544) utilizando RNAiMAX (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del producto. Una fracción de estas células se destinó para extraer DNA genómico y el resto se mantuvo en cultivo. La eficiencia del gRNA se comprobó mediante secuenciación Sanger de productos de PCR generados a partir del DNA genómico de estas células utilizando oligonucleótidos específicos que amplificaban la región de interés (Tabla de oligonucleótidos). El análisis de inserciones y/o deleciones se realizó mediante el programa TIDE (Brinkman et al., 2014). Esta comprobación demostró una tasa de mutación próxima al 100% en las

células transfectadas con el gRNA contra TOP2B en comparación con las células control. Los niveles de TOP2B fueron comprobados mediante western blot.

Del mismo modo, para generar la línea celular deficiente en TOP2A (*TOP2A*<sup>-/-</sup>) se utilizó un gRNA contra el 3<sup>er</sup> exón del gen *TOP2A* (CTCCGCCAGACACCTACAT) y se comprobó utilizando oligonucleótidos específicos (ver tabla oligonucleótidos utilizados en este trabajo). Fue imposible generar líneas estables *TOP2A*<sup>-/-</sup> por lo que se optó por generar estas células de forma transitoria antes de los experimentos. Para ello, las células se arrestaban mediante privación de suero 48 horas antes del protocolo de transfección, manteniendo estas células en cultivo otras 48 h antes de la realización de los experimentos, en estas condiciones se analizó los niveles de TOP2A por western blot.

Para comprometer la topología del promotor del gen *FOS* se utilizaron gRNAs específicos contra su promotor. Se utilizaron dos gRNA distintos: el primero de ellos (gRNA 1) produce el corte a -677pb respecto al TSS de *FOS* (ACTAGCACTGTTCCTGCGTT). El segundo (gRNA 2) produce el corte en el nucleótido -609 también respecto al TSS (CCCTAATTCAGTGCAAAGCG). De forma general, las células RPE-1 Cas9 o RPE-1 Cas9 D10A se arrestaban mediante privación de suero 48 h antes de la transfección. 2 horas después, se obtenía el punto 0 de la cinética y se añadía el tratamiento indicado al resto de placas que se recogían a los tiempos indicados.

La generación línea celular deficiente en *TDP2* (*TDP2*<sup>-/-</sup>), *DNA-PKcs* (*DNAPKcs*<sup>-/-</sup>) y *ATM* (*ATM*<sup>-/-</sup>) fue realizada por Irene Delgado y

Almudena Serrano durante el desarrollo de proyectos independientes al descrito en este trabajo. Para ello, se siguió la misma estrategia descrita anteriormente utilizando gRNA específicos contra el gen TDP2 (CTTGCTGAGTATCTTCAGAT), DNA-PKcs (TACAAGCAAACCGAAATCTC), y ATM (TTGTTCAGGATCTCGAATC). Para comprobar la eficiencia se amplificaron los correspondientes loci utilizando oligos específicos (ver Tabla oligonucleótidos).

### **6.1.3. Producción de lentivirus e infección**

Las células HEK293T recién descongeladas fueron sembradas a una confluencia de 50% en placas de 150 mm, 24 horas después se transfectaron mediante cloruro cálcico con una mezcla en relación 3:2:1 del plásmido de Cas9 D10A (Addgene #63593) y construcciones que codifican para las proteínas de la cápsida (p8.91) y envuelta del virus (pVSVG). Al día siguiente, se refrescó el medio y tras 48 h se procedió a concentrar los virus mediante centrifugación a 22.000 rpm durante 1 hora a 4°C (Coulter Optima L-100K Ultracentrifuge). Una vez obtenidos los lentivirus, estos fueron titulados en células RPE-1 mediante análisis de la multiplicidad de infección (MOI) por qPCR del gen *Alb* y la secuencia HIV-RLT del virus (ver Tabla oligonucleótidos).

### **6.1.4. Generación de líneas RPE Cas9 D10A**

Para generar la línea hTERT RPE-1 con expresión constitutiva del mutante de Cas9 D10A. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células y fueron infectadas con lentivirus (MOI=2) que incluían la versión mutante de Cas9 (Cas9 D10A) (Addgene #63593) (Sanjana et al., 2014). 24 horas después las

células fueron seleccionadas con  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de blasticidina, tras dos semanas en cultivo se comprobó se procedió a las comprobaciones de las células Cas9 D10A.

## 6.2. Procedimientos de Biología Molecular y Celular

### 6.2.1. Preparación de los gRNAs

Para generar los gRNA utilizados en este estudio, los RNA con homología contra la secuencia específica de interés (crRNAs) (IDT) se alinearon con un RNA estructural (TracrRNA) (IDT, 1072532) para formar el gRNA funcional

### 6.2.2. Análisis de mRNA por qPCR (RT-qPCR)

Para los análisis de mRNA, las células fueron arrestadas de manera general por privación de suero 48 horas antes de los tratamientos indicados (a excepción de las células *TOP2A*<sup>-/-</sup>, como se describe arriba). El RNA total fue extraído mediante RNeasy Mini kit (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. El posible DNA contaminante fue eliminado mediante RQ1 DNase (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.  $1 \mu\text{g}$  de RNA total se utilizó para la síntesis de DNA codificante (cDNA) utilizando Maxima H minus First strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente los niveles de cDNA resultante fue analizado mediante qPCR utilizando cebadores específicos contra los mRNA de interés (Tabla de oligonucleótidos). Los niveles de rRNA

28S o el mRNA de *GAPDH* (Tabla de oligonucleótidos) se utilizó como control de los niveles totales de RNA.

### **6.2.3. Secuenciación de mRNA total (RNA-seq)**

La secuenciación del mRNA total fue realizada por el servicio de Genómica de CABIMER. Brevemente, 150 ng de RNA total (obtenido como se describe arriba) se utilizaron para generar las librerías de cDNA utilizando el kit TruSeq Straded mRNA (Illumina) siguiendo el protocolo del fabricante. El tamaño de las librerías fue analizado mediante Bioanalyzer DNA High sensitive Chip y Qubit, y cuantificado mediante qPCR. 1.4 pM de cada librería fue utilizada en la secuenciación con NextSeq 500 HIGH-Output.

### **6.2.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

Para la obtención de la cromatina, las células RPE-1 arrestadas en G0/G1 por privación de suero durante 48 horas se incubaron con los tratamientos indicados. Posteriormente, se fijaron con 1% de formaldehído (Sigma) durante 10 minutos a 37°C y la reacción se bloqueó con la adición de 125 mM glicina (Sigma). Una vez fijadas, las células se recogieron en PBS frío con inhibidores de proteasa (1 mM PMSF y 1x Complete Protease inhibitor cocktail (Roche)) tras varios lavados con PBS frío. Hecho esto, las células se centrifugaron 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación, las células se resuspendieron en Lisis Buffer A (5 mM Pipes pH 8.0, 85 mM KCl,

0.5% NP40, 1 mM PMSF, 1x Complete Protease inhibitor cocktail (Roche)) mediante disgregación mecánica e incubadas durante 10 minutos en hielo. Nuevamente, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1 mL de Lisis Buffer B (50 mM Tris HCl pH 8.1, 1% SDS, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1x Complete Protease inhibitor cocktail (Roche)). En estas condiciones, las células se sonicaron con un Bioruptor UCD-200 (Diagenode), durante 30 ciclos de 30 segundos (nivel alto) y 30 segundos de pausa a 4°C. Hecho esto, se procedió a centrifugar a durante 10 minutos y 4°C a 4000 rpm y máxima velocidad respectivamente. 50µL de cromatina se utilizó para su cuantificación y su análisis, para esto se procedió a revertir la fijación mediante la adición de 350 µL de Lisis Buffer B sin inhibidores de proteasa y 0,25 mg/mL Proteínasa K (Applichem) durante 16 h a 65°C. El DNA se purificó mediante extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol 100%, se cuantificó mediante nanodrop 1000 (ThermoFisher) y se observó su correcto grado de fragmentación mediante gel de agarosa.

Para la inmunoprecipitación, 50µg de cromatina se incubó con 3µg de anticuerpo contra Pol II (Cell Signaling, 14958), TOP2A (Abcam, ab52934) o IgG control en 1 mL de IP buffer (16.7 mM Tris HCl pH 8.1, 0.01% SDS, 1.1% Triton x-100, 1,2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 1mM PMSF, 1x Complete Protease inhibitor cocktail (Roche)) durante 16 h a 4°C en continua agitación y posteriormente con 40µL de bolas magnéticas conjugadas con Proteína A (Dynabeads Protein A (ThermoFisher)) previamente estabilizadas y bloqueadas (1mg/mL BSA (NEB)). Las Dynabeads se lavaron secuencialmente durante 15

minutos a 4°C en continua agitación con solución de lavado 1 (20 mM Tris HCl pH 8.1, 0.1% SDS, 1% Triton x-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1mM PMSF, 1x Complete Protease inhibitor cocktail (Roche)), solución de lavado 2 (20 mM Tris HCl pH 8.1, 0.1% SDS, 1% Triton x-100, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1x Complete Protease inhibitor cocktail (Roche)), solución de lavado 3(10 mM Tris HCl pH 8.1, 1% NP-40, 1% NaDoc, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 1mM PMSF, 1x Complete Protease inhibitor cocktail (Roche)) y dos veces con Tris-HCl ph 8 10mM. Posteriormente, se procedió al protocolo de ChIPmentación (Schmidl et al., 2015) con pequeñas modificaciones utilizando transposasa Tn5 proporcionada por el Servicio de Proteómica del CABD (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo). El DNA se eluyó mediante incubación con 1% SDS TE durante 10 minutos a 65°C, la fijación de la cromatina se revirtió con 0.6 mg/mL Proteinase K (ThermoFisher) durante 16h a 65°C y se purificó mediante PCR purification kit (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las librerías fueron amplificadas mediante N-1 ciclos (siendo N el número de ciclos en el que se comprobó que la reacción de amplificación por qPCR comenzaba su fase exponencial) usando NEBNext High-Fidelity Polymerase (NEB) y purificadas con bolas Sera-Mag Select (GE Healthcare. Estas librerías fueron analizadas por Bioanalyzer 2100 dsDNA HS kit y Qubit y cuantificadas mediante qPCR. 1.4pM de cada librería se utilizó en la secuenciación con NextSeq 500 HIGH-Output y 1x75bp de longitud.

### 6.2.5. Inmunofluorescencia de $\gamma$ H2AX y de H3S10P

Las células hTERT RPE-1 o hTERT RPE-1 Cas9 se sembraron sobre cubreobjetos. Tras 16 horas, las células se arrestaron en G0/G1 por privación de suero durante 48 horas y se incubaron con los tratamientos indicados a 37°C. A continuación, las células se fijaron con 4% paraformaldehído (PFA) durante 10 minutos y se procedió con el protocolo de inmunofluorescencia como se describe en (Álvarez-Quilón et al., 2014). De forma breve, las células se permeabilizaron durante 2 minutos con PBS-0.2% (v/v) tritón X-100 y bloqueadas durante 30 minutos con PBS-5% (m/v) BSA (VWR) y se procedió con la incubación del anticuerpo primario durante 1h en PBS-1% (m/v) BSA. A continuación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS-0,1% (v/v) Tween-20) y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (A488 contra ratón en el caso de  $\gamma$ H2AX (Jackson) (1:1000); A488 contra conejo en el caso de H3S10P (Invitrogen)(1:1000)) durante 30 minutos en PBS-1% (m/v) BSA. Las células se lavaron 3 veces con PBS-0,1% (v/v) Tween-20 . El DNA se marcó con DAPI (Sigma) (1:10000) durante 5 minutos y se montaron en portaobjetos utilizando vectashield (Vector Labs). Los focos de  $\gamma$ H2AX fueron cuantificados manualmente mediante conteo doble ciego de 40 células por cada condición y experimento. Los niveles de H3S10P se analizaron mediante análisis de imagen con Metamorph. Anticuerpos primarios y concentración:  $\gamma$ H2AX (Millipore), 05-636 (1:5000), H3S10P (Millipore, 06-570) (1:1000).

### 6.2.6. Western blot

Las células hTERT RPE-1 se arrestaron por privación de suero durante 48 horas antes de proceder a la extracción de proteínas. Esta se realizó mediante la lisis con RIPA buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40 y 1% sodium deoxycholate) con inhibidores de proteasas (PIC, Sigma) y fosfatasa (PhIC, Sigma) durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas con un Bioruptor UCD-200 (Diagenode), durante 3 ciclos de 30 segundos (nivel alto) y 30 segundos de pausa a 4°C. La concentración de proteínas total fue determinada por ensayo colorimétrico con Bradford (Applichem). Tras normalizar, las muestras se hirvieron a 96°C durante 5 minutos en Laemmli Buffer. Cantidad equivalente ( $\approx 20 \mu\text{g}$  de proteína total) de muestra se cargaron en gels 10% de poliacrilamida para analizar los niveles de p-p38; o 4-20% Mini-PROTEAN tris-Glycine Precast Protein Gels (Biorad) para analizar TOP2A y TOP2B. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a membranas de baja fluorescencia (Immobilon-FL Transfer Membranes (Millipore)) durante 2h a 250 mA. Las membranas fueron bloqueadas con Odyssey Blocking buffer (LI-COR Biosciences) durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario correspondiente en Odyssey Blocking buffer 0.1% (v/v) Tween-20 durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-0.1% (v/v) Tween-20. Tras esto, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (680 RD contra-ratón (LI-COR Biosciences) (1:10000) y 800CW contra conejo (LI-COR Biosciences) (1:10000)) en

Odyssey Blocking Buffer-0.1% (v/v) Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron ( 3 veces con TBS-0.1% (v/v) Tween-20 y lavado final con TBS). Las membranas se analizaron con Odyssey CLx utilizando el programa ImageStudio Odyssey CLx. Anticuerpos primarios y concentración: TOP2B (Proteintech, 20549-1-AP) (1:1000), TOP2A (Santa Cruz, SC-365916) (1:1000), p-p38 (Cell signaling, 9211) (1:1000) y alfa-tubulin (Sigma, T9026) (1:5000).

### **6.2.7. Ensayo ICE**

Las células hTERT RPE-1 arrestadas por privación de suero durante 48 horas se incubaron con los tratamientos y tiempos indicados previamente a la adición de 400 $\mu$ M Etopósido (Sigma), vehiculo (DMSO) o 10 $\mu$ M Camptotecina (Sigma) durante 5 minutos y fueron inmediatamente lisados en 1% (w/v) Sarkozyl (Sigma) con 1mM PMSF y 1 x Complete Protease inhibitor cocktail (Roche). A continuación, las muestras se procesaron como previamente descrito en (Nitiss et al., 2012). Brevemente, los lisados fueron homogeneizados y posteriormente sometidos a una centrifugación en un gradiente de CsCL (Applichem) a 57.000 rpm durante 20 h a 25°C usando 3.3 mL 13x 33mm polyallomer Optiseal tubes (Beckman Coulter) en un rotor TLN100 (Beckman Coulter). Posteriormente, el DNA precipitado fue lavado con Etanol 70% y resuspendido en H<sub>2</sub>O mQ.

### **6.2.8. Inmunodetección de muestras obtenidas por ICE**

Para la detección de los complejos de rotura tanto de TOP2A, TOP2B

y TOP1, las muestras obtenidas por el ensayo ICE se cuantificaron con nanodrop 1000 (ThermoFisher). Cantidades equivalentes (entre 0,5-2µg) de muestra se incubaron con benzonasa (NEB) durante 30 minutos en hielo. Hecho esto, las muestras fueron transferidas directamente sobre una membrana de nitocelulosa (Odyssey Nitrocellulose Membranes (LI-COR Biosciences)) utilizando Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (Biorad). La inmunodetección se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado de Western Blot. Anticuerpos primarios y concentración: TOP2B (Proteintech, 20549-1-AP) (1:1000), TOP2A (Santa Cruz, SC-365916), TOP1 (abcam, ab3825).

### **6.2.9. Inmunoprecipitación de complejos de roturas de TOP1 (TOP1cc-IP)**

20 µg de DNA obtenido mediante ensayo ICE en los tratamientos indicados se digirió con 0,8U/µL PstI (NEB) durante 16h a 37°C que se inactivó posteriormente (20 minutos 80°C). La inmunoprecipitación se realizó siguiendo el mismo protocolo utilizado para ChIP utilizando un anticuerpo primario contra TOP1 (abcam, ab109374) y omitiendo el paso de tagmentación final.

### **6.2.10. Análisis de la incorporación de trimetil-psoraleno biotilnado (bTMP)**

La incorporación de trimetilpsoraleno-biotinilado (bTMP) se utilizó como medida indirecta del grado de superenrollamiento en el DNA

como se describe previamente (Naughton et al, 2013). Brevemente, Las células hTERT RPE-1 arrestadas en G0/G1 por privación de suero durante 48 horas se incubaron con los tratamientos indicados durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió 200 $\mu$ M EZ-Link Psoralen-PEG3-Biotin (ThermoFisher) y 0,01% digitonina (Sigma) durante 5 minutos a 37°C en oscuridad. Las células fueron expuestas a UVA (360 nm) durante 20 min en hielo para unir covalentemente (“*crosslink*”) el bTMP al DNA. A continuación, el DNA se purificó mediante digestión con SDS/proteinasa K y posterior extracción con fenol:cloroformo. Las muestras se trataron con RNAsa (ThermoFisher) durante 1h a 37°C y se fragmentaron mediante sonicación usando Bioruptor UCD-200 (Diagenode), 10 ciclos 30 segundos de sonicación (nivel alto) y 30 segundos de pausa a 4°C. Finalmente, el DNA se purificó mediante fenol:cloroformo y precipitación con etanol 100%.

Para la precipitación del DNA, 20  $\mu$ g de DNA se incubó con bolas magnéticas conjugadas con streptavidina (Dynabeads MyOne streptavidin T1 (ThermoFisher)) previamente bloqueadas (1mg/mL BSA (NEB)) durante 16h a 4°C. A continuación, las Dynabeads se lavaron siguiendo el mismo protocolo descrito para ChIP. Para eluir el DNA y revertir la unión bTMP-DNA, las Dynabeads se incubaron en 10mM EDTA, 95% Formamida durante 10 minutos a 65°C y el DNA se purificó mediante PCR purification kit (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

### **6.3. Análisis de datos de secuenciación masiva**

El análisis de los datos de secuenciación masiva fue realizado por el Dr. Pedro M. Martínez.

#### **6.3.1. Análisis de secuenciación masiva**

Las lecturas fueron demultiplexadas, filtradas por calidad con FastQC (Andrews, 2010) y mapeadas en el genoma humano (hg19) usando Bowtie 1.2 (Langmead et al., 2009) con la opción “-m 1”, para descartar las lecturas que mapeen en más de un sitio. Las repeticiones independientes de ChIP-seq fueron combinadas en una muestra final donde cada repetición contribuye con el mismo número de lecturas.

#### **6.3.2. Determinación de los sitios de unión (picos)**

Para la computación de los sitios de unión del ChIP-seq (Picos), se utilizó la herramienta MACS2 (Zhang et al., 2008) con la opción “-q 0.01”.

#### **6.3.3. Genes diferencialmente expresados**

Se utilizó el paquete R DESeq2 (Love et al., 2014) para identificar los genes diferencialmente expresados a partir de los datos obtenidos de RNA-seq siguiendo las especificaciones de los autores. Sólo aquellos

genes con un p valor ajustado  $\leq 0.05$  y un fold change absoluto  $\geq 2$  fueron considerados diferencialmente expresados.

### **6.3.4 Análisis de datos de secuenciación públicos disponibles**

Los datos de secuenciación públicos disponibles utilizados en este estudio incluyen datos de ChIP-seq de diferentes proteínas: CTCF (ENCSR000DVI), H3K4me3 (ENCSR000DVK), H3K27ac (GSM2865066) y H3K27me3 (DRR003586). Los archivos BAM de CTCF y H3K4me3 (hg19) se descargaron de ENCODE. Los datos crudos de H3K27ac and H3K27me3 fueron filtrados por calidad y mapeados en el genoma humano (hg19) usando Bowtie 1.2 con la opción “-m 1”.

### **6.3.5. Estimación de la pausa próxima al promotor de Pol II**

Para estimar el nivel de pausa se utilizó el llamado “índice de pausa” (PI) y “ratio de liberación de Pol II” (PRR). El PI se define como la relación entre el enriquecimiento de Pol II dentro del promotor y en el cuerpo del gen, mientras que el PRR es un parámetro inverso al PI, donde se restringe el análisis en el cuerpo del gen a las primeras 2kb aguas abajo del TSS. Nos basamos en estudios previos (Chen et al., 2015; Day et al., 2016) para la estimación de ambos parámetros.

### **6.3.6. Filtrado de genes en base a señales de ChIP-seq**

Se seleccionaron los genes anotados en UCSC que presentasen un pico de Pol II en la región entre 0-500bp aguas abajo al TSS. Adicionalmente, aquellos genes que no presentaban un picos de Pol II fueron seleccionados si en la región entre 0-500bp aguas abajo al TSS presentaban: 1) Un valor de lecturas por millón (RPM) de Pol II mayor de 0.5, o 2) Un valor mayor de 0.5 en la diferencia del H3K4me3 RPM, cómo marca de promotor activo. Finalmente, se descartaron los genes de un tamaño menor de 2kb y aquellos genes que se encontraban a menos de 1kb entre sí. Finalmente, el número total de genes seleccionados fue 10,471 ( $\approx 45\%$  de los genes humanos).

### **6.3.7. Índice de pausa**

El nivel de Pol II dentro de promotores fue computado como la suma de las lecturas de ChIP-seq 400 pb alrededor del TSS de cada gen. El nivel de Pol II dentro del gen fue computado como. La media del número de lecturas en ventanas de 400 pb a lo largo del gen, comenzando 200 pb aguas abajo del TSS. Finalmente, el índice de pausa (PI) fue estimado como el ratio entre ambas medidas.

### **6.3.7. Ratio de liberación de Pol II**

El nivel de Pol II dentro de promotores fue computado como la suma

de las lecturas desde 100 pb aguas arriba del TSS hasta 300 pb aguas abajo del TSS. El nivel de Pol II en el cuerpo del gen fue computado como la suma de lecturas desde 300 pb aguas abajo del TSS hasta 2 kb aguas abajo del TSS. Una vez normalizado cada valor por su correspondiente ventana de tamaño, el ratio de liberación de Pol II (PRR) fue estimado como el nivel de Pol II en el inicio del cuerpo del gen dividido por los niveles de Pol II en el promotor.

### **6.3.8. Identificación de elementos reguladores**

Los elementos reguladores, denominados promotores, “enhancers” e “insulators” fueron definidos como se describe a continuación. Para definir los promotores, fueron considerados todos los genes anotados en UCSC. Posteriormente, los promotores fueron definidos como  $\pm 3$  kb desde cada TSS. Los “enhancers” fueron definidos como picos de H3K27ac que no coincidiesen con promotores y los “insulators” fueron definidos como picos de CTCF que no coincidiesen con las otras dos categorías.

### **6.3.9. Perfiles de la señal de ChIP-seq en promotores**

Las lecturas del ChIP-seq alrededor de los TSSs fueron computados y suavizados usando los paquetes de R bamsignals (Mammana y Helmuth, 2019) y nucleR (Flores y Orozco, 2011), respectivamente. Para general el perfil de la señal de ChIP-seq de TOP2A en los promotores de genes aleatorios (Figura 19C), se escogieron 50 conjuntos aleatorios del mismo tamaño muestral (231 genes) que los genes inducidos a 2 horas con merbarona y se determinaron las lecturas

del ChIP-seq de TOP2A alrededor de los TSSs. Finalmente, en la gráfica se muestra la mediana de las lecturas alrededor de los TSSs.

### 6.3.10. Análisis de ontología génica

Los enriquecimientos de los términos de ontología génica (GO) asociados a los genes diferencialmente expresado tras 2 horas de tratamiento con merbarona se computaron usando el test exacto de Fisher y el algoritmo estándar (weight01). Para calcular la significancia de estos enriquecimientos se utilizó el paquete de R TopGO (Alexa y Rahnenfuhrer, 2019). Para determinar el universo de genes, se partió de todos los genes expresados (genes en cuyos exones mapeasen más de 10 lecturas de RNA-seq). Posteriormente, los genes expresados fueron asociados a al menos 1 término GO y se obtuvieron las categorías GO de los genes diferencialmente expresados.

### 6.4. Tabla de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia
hFOS_mRNA.fw	CGAGCGCAGAGCATTGG
hFOS_mRNA.rv	CCITTCGGATTCTCCTTTTCTCTT
hEGR1_mRNA.fw	AGCAGCACCTTCAACCCTC
hEGR1_mRNA.rv	TTTGGCTGGGGTAACTGGTC
h28S_mRNA.fw	TACCCACCCGACCCGTCTTG
h28S_mRNA.rv	CTGGAGAGGCCTCGGGATCC

hGAPDH_mRNA.fw	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
hGAPDH_mRNA.rv	AATGAAGGGGTCATTGATGG
mFOS_mRNA.fw	CGACCATGATGTTCTCGGGT
mFOS_mRNA.rv	TCCATCCTACTGCTGCGTTC
mGAPDH_mRNA.fw	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
mGAPDH_mRNA	GGATGCAGGGATGATGTTCT
ATM.fw	GCCTTTGACCAGAATGTGCC
ATM.rv	TGCCAAATTCATATGCAAGGCA
DNA-PKcs.fw	TGCGATCTTCTGGCCCATTT
DNA-PKcs.rv	AGCTACTTGGGAGGCTGAGA
TDP2.fw	CAAAGTGCAGCGTGATTAATG
TDP2.rv	TAACAGTTCAAGGTTGTGGGC
TOP2B.fw	TTACCTGCGTCAATGGCTCC
TOP2B.rv	AAACCCATGTTCGTGTGTCCA
TOP2A.fw	GCCAGTTCAGTGACACTCA
TOP2A.rv	CTGGCCGCAGCGAATTTAAA
hFOS -1598.fw (Región A)	CCAGGGGAGCTGGGAGGG
hFOS -1598.rv (Región A)	GCCAGGGCCGTCTCCAGG
hFOS -597.fw	TGCTAGTATTGCTCGAGCCC
hFOS -597.rv	ACAGGACCCCGAGGACTTAA
hFOS -222.fw	GAGCAGTTCCTGCAATCC
hFOS -222.rv	GCATTTTCGAGTTCCTGTCT
hFOS +37.fw (Región B)	AAAACGCTTGTTATAAAAGCAGT GG

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

hFOS+37.rv( Región B)	AGATGCGGTTGGAGTACGAG
hFOS +364.fw (Región C)	GCAGACTCCTTCTCCAGCAT
hFOS +364.rv (Región C)	AAGGGAGCCCCCTACTCAT
hFOS +1929.fw (Región D)	GGGAAAGTTGGAGATTGAGCAT
hFOS +1929.rv (Región D)	GTATACAGAGGGATAAAGGAAA GCATAAG
HIV-LTR.fw	AGCTTGCCTTGAGTGCTTCAA
HIV-LTR.rv	AGGGTCTGAGGGATCTCTAGTT A
hAlb.fw	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT
hAlb.rv	ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, M., Xue, Y., Lee, S.K., Martindale, J.L., Shen, W., Li, W., Zou, S., Ciaramella, M., Debat, H., Nadal, M., et al. (2016). RNA topoisomerase is prevalent in all domains of life and associates with polyribosomes in animals. *Nucleic Acids Res.* *44*, 6335–6349.
- Ahn, S.H., Kim, M., y Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol. Cell* *13*, 67–76.
- Aida, M., Chen, Y., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Wada, T., y Handa, H. (2006). Transcriptional pausing caused by NELF plays a dual role in regulating immediate-early expression of the junB gene. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6094–6104.
- Alexa, A., y Rahnenfuhrer, J. (2019). topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R Packag. version 2.36.0.
- Álvarez-Quilón, A., Serrano-Benítez, A., Lieberman, J.A., Quintero, C., Sánchez-Gutiérrez, D., Escudero, L.M., y Cortés-Ledesma, F. (2014). ATM specifically mediates repair of double-strand breaks with blocked DNA ends. *Nat. Commun.* *5*, 3347.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.bab>.
- Asturias, F.J., Jiang, Y.W., Myers, L.C., Gustafsson, C.M., y Kornberg, R.D. (1999). Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* *283*, 985–987.
- Awwad, S.W., Abu-Zhayia, E.R., Guttman-Raviv, N., y Ayoub, N. (2017). NELF-E is recruited to DNA double-strand break sites to promote transcriptional repression and repair. *EMBO Rep.* *18*, 745-764.
- Bahrami, S., y Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Adv Biol* *62*, 37-49.
- Ban, Y., Ho, C.W., Lin, R.K., Lyu, Y.L., y Liu, L.F. (2013). Activation of a novel ubiquitin-independent proteasome pathway when RNA polymerase II encounters a protein roadblock. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 4008–4016.

- Bancaud, A., Lavelle, C., Huet, S., y Ellenberg, J. (2012). A fractal model for nuclear organization: current evidence and biological implications. *Nucleic Acids Res.* *40*, 8783–8792.
- Baranello, L., Wojtowicz, D., Cui, K., Devaiah, B.N., Chung, H.J., Chan-Salis, K.Y., Guha, R., Wilson, K., Zhang, X., Zhang, H., et al. (2016). RNA Polymerase II Regulates Topoisomerase 1 Activity to Favor Efficient Transcription. *Cell* *165*, 357-371.
- Bates, A.D., y Maxwell, A. (2005). DNA topology. Oxford Univ. Press. New York.
- Bauer, W.R., Ressner, E.C., Kates, J., y Patzke, J. V. (1977). A DNA nicking-closing enzyme encapsidated in vaccinia virus: partial purification and properties. *Proc Natl Acad Sci USA* *74*, 1841–1845.
- Bauer, W.R., Crick, F.H., y White, J.H. (1980). Supercoiled DNA. *Sci Am* *243*, 100–113.
- Baxter, J. (2015). ‘Breaking up is hard to do’: the formation and resolution of sister chromatid intertwinings. *J. Mol. Biol.* *427*, 590–607.
- Beli, P., Lukashchuk, N., Wagner, S.A., Weinert, B.T., Olsen, J. V., Baskcomb, L., Mann, M., Jackson, S.P., y Choudhary, C. (2012). Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response. *Mol. Cell* *46*, 212-225.
- Bermúdez, I., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J.E., y Roca, J. (2010). A method for genome-wide analysis of DNA helical tension by means of psoralen-DNA photobinding. *Nucleic Acids Res.* *38*, e182.
- Bernecky, C., Plitzko, J.M., y Cramer, P. (2017). Structure of a transcribing RNA polymerase II-DSIF complex reveals a multidentate DNA-RNA clamp. *Nat Struct Mol Biol* *24*, 809–815.
- Blot, N., Mavathur, R., Geertz, M., Travers, A., y Muskhelishvili, G. (2006). Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *EMBO Rep.* *7*, 710–715.
- Boettiger, A.N., y Levine, M. (2009). Synchronous and stochastic patterns of gene activation in the *Drosophila* embryo. *Science*

325, 471–473.

- Borisova, M.E., Voigt, A., Tollenaere, M.A.X., Sahu, S.K., Juretschke, T., Kreim, N., Mailand, N., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., Akutsu, M., et al. (2018). P38-MK2 signaling axis regulates RNA metabolism after UV-light-induced DNA damage. *Nat. Commun.* *9*, 1017.
- Brinkman, E.K., Chen, T., Amendola, M., y Van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* *42*.
- Brown, P.O., y Cozzarelli, N.R. (1979). A Sign Inversion Mechanism for Enzymatic Supercoiling of DNA. *Science* *206*, 1081-1083.
- Bunch, H., Lawney, B.P., Lin, Y.F., Asaithamby, A., Murshid, A., Wang, Y.E., Chen, B.P.C., y Calderwood, S.K. (2015). Transcriptional elongation requires DNA break-induced signalling. *Nat. Commun.* *6*, 10191.
- Buratowski, S., y Sharp, P.A. (1990). Transcription initiation complexes and upstream activation with RNA polymerase II lacking the C-terminal domain of the largest subunit. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 5562–5564.
- Burckin, T., Nagel, R., Mandel-Gutfreund, Y., Shiue, L., Clark, T.A., Chong, J.L., Chang, T.H., Squazzo, S., Hartzog, G., y Ares, M.J. (2005). Exploring functional relationships between components of the gene expression machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 175–182.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., y Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* *276*, 42462-42467.
- Caldecott, K.W. (2003). DNA Single-Strand Break Repair and Spinocerebellar Ataxia. *Cell* *112*, 7-10.
- Canela, A., Maman, Y., Jung, S., Wong, N., Callen, E., Day, A., Kieffer-Kwon, K.R., Pekowska, A., Zhang, H., Rao, S.S.P., et al. (2017). Genome Organization Drives Chromosome Fragility. *Cell* *170*, 507-521.e18.
- Canela, A., Maman, Y., Huang, S.N., Wutz, G., Tang, W., Zagnoli-Vieira, G., Callen, E., Wong, N., Day, A., Peters, J.M., et al. (2019). Topoisomerase II-Induced Chromosome Breakage and Translocation Is Determined by Chromosome Architecture

- and Transcriptional Activity. *Mol. Cell* 75, 252-266.e8.
- Champoux, J.J. (2001). DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function, and Mechanism. *70*, 369-413.
- Chao, S.H., y Price, D.H. (2001). Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 31793–31799.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Hintermair, C., y Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet.* 24, 289-296.
- Chen, M., y Beck, W.T. (1993). Teniposide-resistant CEM cells, which express mutant DNA topoisomerase II alpha, when treated with non-complex-stabilizing inhibitors of the enzyme, display no cross-resistance and reveal aberrant functions of the mutant enzyme. *Cancer Res.* 53, 5946-5953.
- Chen, F., Woodfin, A.R., Gardini, A., Rickels, R.A., Marshall, S.A., Smith, E.R., Shiekhattar, R., y Shilatifard, A. (2015). PAF1, a molecular regulator of promoter-proximal pausing by RNA Polymerase II. *Cell* 162, 1003–1015.
- Chen, F.X., Xie, P., Collings, C.K., Cao, K., Aoi, Y., Marshall, S.A., Rendleman, E.J., Ugarenko, M., Ozark, P.A., Zhang, A., et al. (2017). PAF1 regulation of promoter-proximal pause release via enhancer activation. *Science* 357, 1294-1298.
- Chen, L.F., Lin, Y.T., Gallegos, D.A., Hazlett, M.F., Gómez-Schiavon, M., Yang, M.G., Kalmeta, B., Zhou, A.S., Holtzman, L., Gersbach, C.A., et al. (2019). Enhancer Histone Acetylation Modulates Transcriptional Bursting Dynamics of Neuronal Activity-Inducible Genes. *Cell Rep.* 26, 1174-1188.e5.
- Cheng, B., y Price, D.H. (2007). Properties of RNA polymerase II elongation complexes before and after the P-TEFb-mediated transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* 282, 21901–21912.
- Cho, E., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., y Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev.* 15, 3319-3329.
- Chong, S., Chen, C., Ge, H., y Xie, X.S. (2014). Mechanism of transcriptional bursting in bacteria. *Cell* 158, 314–326.

- Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiácovo, M.P., y Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* *107*, 18475-18480.
- Chubb, J.R., Trcek, T., Shenoy, S.M., y Singer, R.H. (2006). Transcriptional pulsing of a developmental gene. *Curr. Biol.* *16*, 1018–1025.
- Clayton, A.L., y Mahadevan, L.C. (2003). MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett.* *546*, 51-58.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., y Marraffini, L. a (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* *339*, 819-823.
- Connelly, S., y Manley, J.L. (1988). A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes Dev* *2*, 440–452.
- Corden, J.L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biol. Sci.* *15*, 383–387.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., y Lis, J.T. (2008). Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* *322*, 1845–1848.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., Gilchrist, D.A., Fargo, D.C., Kwak, H., Adelman, K., y Lis, J.T. (2012). Defining the status of RNA polymerase at promoters. *Cell Rep* *2*, 1025–1035.
- Crabbe, L., Cesare, A.J., Kasuboski, J.M., Fitzpatrick, J.A.J., y Karlseder, J. (2012). Human telomeres are tethered to the nuclear envelope during post-mitotic nuclear assembly. *Cell Rep.* *2*, 1521–1529.
- Cremer, T., y Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 292–301.
- Cui, Y., y Denis, C.L. (2003). In vivo evidence that defects in the transcriptional elongation factors RPB2, TFIIS, and SPT5 enhance upstream poly(A) site utilization. *Mol. Cell. Biol.* *23*,

7887–7901.

- Day, D.S., Zhang, B., Stevens, S.M., Ferrari, F., Larschan, E.N., Park, P.J., y Pu, W.T. (2016). Comprehensive analysis of promoter-proximal RNA polymerase II pausing across mammalian cell types. *Genome Biol.*
- Dellino, G.I., Palluzzi, F., Chiariello, A.M., Piccioni, R., Bianco, S., Furia, L., De Conti, G., Bouwman, B.A.M., Melloni, G., Guido, D., et al. (2019). Release of paused RNA polymerase II at specific loci favors DNA double-strand-break formation and promotes cancer translocations. *Nat. Genet.*
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., y B.; R. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376 – 380.
- Dunaway, M., y Ostrander, E.A. (1993). Local domains of supercoiling activate a eukaryotic promoter in vivo. *Nature* 361, 746-748.
- Dykhuisen, E.C., Hargreaves, D.C., Miller, E.L., Cui, K., Korshunov, A., Kool, M., Pfister, S., Cho, Y.J., Zhao, K., y Crabtree, G.R. (2013). BAF complexes facilitate decatenation of DNA by topoisomerase II $\alpha$ . *Nature.*
- El, H.D., y Bossi, L. (2000). Activation and silencing of leu-500 promoter by transcription-induced DNA supercoiling in the *Salmonella* chromosome. *Mol. Microbiol.* 37, 583–594.
- Espeli, O., y Marians, K.J. (2004). Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol* 52, 925–931.
- Fisher, R.P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *j. Cell Sci.* 118.
- Fisher, A.E.O., Hohegger, H., Takeda, S., y Caldecott, K.W. (2007). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Accelerates Single-Strand Break Repair in Concert with Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5597 LP - 5605.
- Flores, O., y Orozco, M. (2011). nucleR: a package for non-parametric nucleosome positioning. *Bioinformatics* 27, 2149-2150.
- Friedman, S.B. Margolin, P. (1968). Evidence for an altered operator specificity: catabolite repression control of the leucine operon in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol* 95, 2263–2269.

- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., y Peterlin, B.M. (2004). Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol* 24, 787–795.
- Fukaya, T., Lim, B., y Levine, M. (2016). Enhancer control of transcriptional bursting. *Cell* 166, 358–368.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., y Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 2579–2586.
- Ghosh, A., Shuman, S., y Lima, C.D. (2011). Structural insights to how mammalian capping enzyme reads the CTD code. *Mol. Cell* 43, 299–310.
- Gilchrist, D.A., Dos Santos, G., Fargo, D.C., Xie, B., Gao, Y., Li, L., y Adelman, K. (2010). Pausing of RNA polymerase II disrupts DNA-specified nucleosome organization to enable precise gene regulation. *Cell* 143, 540–551.
- Gilchrist, D.A., Fromm, G., Dos Santos, G., Pham, L.N., McDaniel, I.E., Burkholder, A., Fargo, D.C., y K., A. (2012). Regulating the regulators: the pervasive effects of Pol II pausing on stimulus- responsive gene networks. *Genes Dev* 26, 933–944.
- Gilmour, D.S., y Lis, J.T. (1986). RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol Cell Biol* 6, 3984–3989.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., y Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292, 1876–1882.
- Gómez-Herreros, F., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., McCormack, M., Grealley, M.T., Rulten, S., Romero-Granados, R., Counihan, T.J., Chaila, E., Conroy, J., Ennis, S., et al. (2014). TDP2 protects transcription from abortive topoisomerase activity and is required for normal neural function. *Nat. Genet.* 46, 516–521.
- Gómez-Herreros, F., Zagnoli-Vieira, G., Ntai, I., Martínez-Macías, M.I., Anderson, R.M., Herrero-Ruiz, A., y Caldecott, K.W.

- (2017). TDP2 suppresses chromosomal translocations induced by DNA topoisomerase II during gene transcription. *Nat. Commun.* *8*.
- Gothe, H.J., Bouwman, B.A.M., Gusmao, E.G., Piccinno, R., Petrosino, G., Sayols, S., Drechsel, O., Minneker, V., Josipovic, N., Mizi, A., et al. (2019). Spatial Chromosome Folding and Active Transcription Drive DNA Fragility and Formation of Oncogenic MLL Translocations. *Mol. Cell* *75*, 267-283.e12.
- Graf, L.H.J., y Burns, R.O. (1973). The supX-leu-500 mutations and expression of the leucine operon. *Mol Gen Genet* *126*, 291–301.
- Greenberg, M.E., y Ziff, E.B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* *311*, 433–438.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., y Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* *130*, 77–88.
- Haffner, M.C., Aryee, M.J., Toubaji, A., Esopi, D.M., Albadine, R., Gurel, B., Isaacs, W.B., Bova, G.S., Liu, W., Xu, J., et al. (2010). Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. *Nat. Genet.* *42*, 668–675.
- Hanawalt, P.C., y Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 958-970.
- He, Y., Fang, J., Taatjes, D.J., y Nogales, E. (2013). Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature* *495*, 481–486.
- Higashinakagawa, T., Wahn, H. & Reeder, R.H. (1977). Isolation of ribosomal gene chromatin. *Dev. Biol.* *55*, 375-386.
- Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., y Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J* *29*, 1446-1457.
- Izban, M.G., y Luse, D.S. (1992). Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *J. Biol. Chem.* *267*,

13647-13655.

- Jimeno-González, S., Ceballos-Chávez, M., y Reyes, J.C. (2015). A positioned +1 nucleosome enhances promoter-proximal pausing. *Nucleic Acids Res.* *43*, 3068-3078.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., y Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided. *337*, 816-822.
- Jonkers, I., Kwak, H., y Lis, J.T. (2014). Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *Elife* *3*, e02407.
- Ju, B.G., Lunyak, V. V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., y Rosenfeld, M.G. (2006). A Topoisomerase IIb–Mediated dsDNA Break Required for Regulated Transcription. *312*, 1798-1802.
- Kanoh, Y., Matsumoto, S., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kono, N., Renard-Guillet, C., Masuda, K., Iida, K., Nagasawa, K., Shirahige, K., et al. (2015). Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances. *Nat Struct Mol Biol* *22*, 889–897.
- Kaplan, C.D., Holland, M.J., y Winston, F. (2005). Interaction between transcription elongation factors and mRNA 3'-end formation at the *Saccharomyces cerevisiae* GAL10-GAL7 locus. *J. Biol. Chem.* *280*, 913–922.
- Kim, J.B., y Sharp, P.A. (2001). Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *J. Biol. Chem.* *276*, 12317–12323.
- Kim, M., Suh, H., Cho, E.J., y Buratowski, S. (2009). Phosphorylation of the yeast Rpb1 C-terminal domain at serines 2, 5, and 7. *J. Biol. Chem.* *84*, 26421–26426.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D., y Ren, B. (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* *436*, 876–880.
- Kim, T.K., Ebright, R.H., y Reinberg, D. (2000). Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIIH. *Science* *288*, 1418–1422.

- King, I.F., Yandava, C.N., Mabb, A.M., Hsiao, J.S., Huang, H.S., Pearson, B.L., Calabrese, J.M., Starmer, J., Parker, J.S., Magnuson, T., et al. (2013). Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* *501*, 58-62.
- Kireeva, M.L., Komissarova, N., Waugh, D.S., y Kashlev, M. (2000). The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex. *J. Biol. Chem.* *275*, 6530-6536.
- Kornberg, R.D., y Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* *98*, 285-294.
- Koster, D.A., Croquette, V., Dekker, C., Shuman, S., y Dekker, N.H. (2005). Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature* *434*, 671-674.
- Kouzine, F., Liu, J., Sanford, S., Chung, H.J., y Levens, D. (2004). The dynamic response of upstream DNA to transcription-generated torsional stress. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
- Kouzine, F., Sanford, S., Elisha-Feil, Z., y Levens, D. (2008). The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 146-154.
- Kouzine, F., Gupta, A., Baranello, L., Wojtowicz, D., Ben-Aissa, K., Liu, J., Przytycka, T.M., y Levens, D. (2013). Transcription-dependent dynamic supercoiling is a short-range genomic force. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 396-403.
- Kouzine, F., Wojtowicz, D., Baranello, L., Yamane, A., Nelson, S., Resch, W., Kieffer-Kwon, K.R., Benham, C.J., Casellas, R., Przytycka, T.M., et al. (2017). Permanganate/S1 Nuclease Footprinting Reveals Non-B DNA Structures with Regulatory Potential across a Mammalian Genome. *Cell Syst.* *4*, 344-356.e7.
- Kravatskaya, G., Chechetkin, V.R., Kravatsky, Y. V., y Tumanyan, V.G. (2013). Structural attributes of nucleotide sequences in promoter regions of supercoiling-sensitive genes: how to relate microarray expression data with genomic sequences. *Genomics* *101*, 1-11.

- Krumm, A., Meulia, T., Brunvand, M., y Groudine, M. (1992). The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region. *Genes Dev.* *6*, 2201–2213.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., y Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* *10*, R25.
- Ledesma, F.C., El Khamisy, S.F., Zuma, M.C., Osborn, K., y Caldecott, K.W. (2009). A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature* *461*, 674–678.
- Lee, S.H., Siaw, G.E., Willcox, S., Griffith, J.D., y Hsieh, T.S. (2013). Synthesis and dissolution of hemicatenanes by type IA DNA topoisomerases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* *110*, e3587–e3594.
- Leppard, J.B., y Champoux, J.J. (2005). Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* *114*, 75–85.
- Lima, C.D., Wang, J.C., y Mondragon, A. (1994). Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of E. coli DNA topoisomerase I. *Nature* *367*, 138–146.
- Lin, C., Yang, L., Tanasa, B., Hutt, K., Ju, B.G., Ohgi, K., Zhang, J., Rose, D.W., Fu, X.D., Glass, C.K., et al. (2009). Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell* *139*, 1069–1083.
- Lin, C.P., Ban, Y., Lyu, Y.L., Desai, S.D., y Liu, L.F. (2008). A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *J. Biol. Chem.* *283*, 21074–21083.
- Liu, L.F., y Wang, J.C. (1987a). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* *84*, 7024–7027.
- Liu, L.F., y Wang, J.C. (1987b). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* *84*, 7024–7027.
- Logan, J., Falck-Pedersen, E., Darnell, J.E.J., y Shenk, T. (1987). A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse b maj-globin gene. *Proc Natl Acad Sci* *84*, 8306–8310.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Love, M.I., Huber, W., y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq. *Genome Biol.* 15, 550.
- Luo, W., Johnson, A.W., y Bentley, D.L. (2006). The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: Implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes Dev* 20, 954–965.
- Luse, D.S. (2013). Promoter clearance by RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* 1829, 63-68.
- Luse, D.S. (2014). The RNA polymerase II preinitiation complex: Through what pathway is the complex assembled? *Transcription* 5, e27050.
- Ma, J., y Wang, M.D. (2014a). Interplay between DNA supercoiling and transcription elongation. *Transcription* 5, 1-4.
- Ma, J., y Wang, M.D. (2014b). RNA polymerase is a powerful torsional motor. *Cell Cycle* 13, 337–338.
- Ma, J., y Wang, M.D. (2016). DNA supercoiling during transcription. *Biophys. Rev.* 8, 75-87.
- Ma, J., Bai, L., y Wang, M.D. (2013). Transcription under torsion. *Science* 340, 1580–1583.
- Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A.R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T.X., Yamakawa, H., Pao, P.C., et al. (2015). Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell* 161, 1592-1605.
- Mammana, A., y Helmuth, J. (2019). bamsignals: Extract read count signals from bam files. R Packag. version 1.16.0.
- Mandel, C.R., Bai, Y., y Tong, L. (2008). Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci* 65, 1099–1122.
- Mao, Y., Desai, S.D., Ting, C.Y., Hwang, J., y Liu, L.F. (2001). 26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 40652–40658.
- Margolin, P., Zumstein, L., Sternglanz, R., y Wang, J.C. (1985). The *Escherichia coli* supX locus is topA, the structural gene for DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 5437–5441.
- Marshall, N.F., y Price, D.H. (1995). Purification of P-TEFb, a

- transcription factor required for the transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* *270*, 12335-12338.
- McClendon, A.K., Rodriguez, A.C., y Osheroff, N. (2005). Human topoisomerase II $\alpha$  rapidly relaxes positively supercoiled DNA: implications for enzyme action ahead of replication forks. *J. Biol. Chem.* *280*, 39337–39345.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S., Wickens, M., y Bentley, D.L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* *385*, 357–361.
- McDaniel, S.L., y Strahl, B.D. (2017). Shaping the cellular landscape with Set2/SETD2 methylation. *Cell. Mol. Life Sci.* *74*, 3317–3334.
- McNamara, R.P., Reeder, J.E., McMillan, E.A., Bacon, C.W., McCann, J.L., y D’Orso, I. (2016). KAP1 Recruitment of the 7SK snRNP Complex to Promoters Enables Transcription Elongation by RNA Polymerase II. *Mol. Cell* *61*, 39-53.
- McNamara, S., Wang, H., Hanna, N., y Miller, W.H. (2008). Topoisomerase II Negatively Modulates Retinoic Acid Receptor Function: a Novel Mechanism of Retinoic Acid Resistance. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 2066-2077.
- Miller, K.M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S.E., Britton, S., y Jackson, S.P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 1144-1151.
- Minvielle-Sebastia, L., Preker, P.J., Wiederkehr, T., Strahm, Y., y Keller, W. (1997). The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation. *Proc Natl Acad Sci* *94*, 7897–7902.
- Missra, A., y Gilmour, D.S. (2010). Interactions between DSIF (DRB sensitivity inducing factor), NELF (negative elongation factor), and the Drosophila RNA polymerase II transcription elongation complex. *Proc Natl Acad Sci* *107*, 11301–11306.
- Moteki, S., y Price, D. (2002). Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Mol. Cell* *10*, 599–609.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Muller, F., Demeny, M.A., y Tora, L. (2007). New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors. *J. Biol. Chem.* *282*, 14685–14689.
- Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., y Adelman, K. (2007). RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat. Genet.* *39*, 1507–1511.
- Naughton, C., Avlonitis, N., Corless, S., Prendergast, J.G., Mati, I.K., Eijk, P.P., Cockroft, S.L., Bradley, M., Ylstra, B., y Gilbert, N. (2013). Transcription forms and remodels supercoiling domains unfolding large-scale chromatin structures. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 387–395.
- Nelson, P. (1999). Transport of torsional stress in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 14342–14347.
- Nevin, L.M., Xiao, T., Staub, W., y Baier, H. (2011). Topoisomerase II $\beta$  is required for lamina-specific targeting of retinal ganglion cell axons and dendrites. *Development* *138*, 2457–2465.
- Ni, Z., Saunders, A., Fuda, N.J., Yao, J., Suarez, J.R., Webb, W.W., y Lis, J.T. (2008). P-TEFb is critical for the maturation of RNA polymerase II into productive elongation in vivo. *Mol Cell Biol* *28*, 1161–1170.
- Nissen, R.M., y Yamamoto, K.R. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NF $\kappa$ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* *14*, 2314–2329.
- Nitiss, J.L. (1998). Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* *1400*, 63–81.
- Nitiss, J.L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 338–350.
- Nitiss, J.L., Soans, E., Rogojina, A., Seth, A., y Mishina, M. (2012). Topoisomerase assays. *Curr. Protoc. Pharmacol.* *3*.
- Ofir, R., Dwarki, V.J., Rashid, D., y Verma, I.M. (1990). Phosphorylation of the C terminus of fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature* *348*, 80–82.

- Pankotai, T., Bonhomme, C., Chen, D., y Soutoglou, E. (2012). DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 276–282.
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., y Reinberg, D. (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125, 703–717.
- Payne, J.M., Laybourn, P.J., y Dahmus, M.E. (1989). The transition of RNA polymerase II from initiation to elongation is associated with phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of subunit Ila. *J. Biol. Chem.* 264, 19621–19629.
- Pedersen, J.M., Fredsoe, J., Roedgaard, M., Andreasen, L., Mundbjerg, K., Kruhøffer, M., Brinch, M., Schierup, M.H., Bjergbaek, L., y Andersen, A.H. (2012). DNA Topoisomerases Maintain Promoters in a State Competent for Transcriptional Activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 8, e1003128.
- Pei, Y., y Shuman, S. (2002). Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5. *J. Biol. Chem.* 277, 19639–19648.
- Peterson, C.L., y Workman, J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev* 10, 187–192.
- Phatnani, H.P., y Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev.*
- Plet, A., Eick, D., y Blanchard, J.M. (1995). Elongation and premature termination of transcripts initiated from c-fos and c-myc promoters show dissimilar patterns. *Oncogene* 10, 319–328.
- Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S.Y.N., y Nitiss, J.L. (2016). Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 703–721.
- Porter, S.E., y Champoux, J.J. (1989). The basis for camptothecin enhancement of DNA breakage by eukaryotic topoisomerase I. *Nucleic Acids Res.* 17, 8521–8532.
- Price, D.H. (2000). P-TEFb, a Cyclin-Dependent Kinase Controlling Elongation by RNA Polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2629–2634.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Ptashne, M., y Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386, 569–577.
- Quaresma, A.J.C., Bugai, A., y Barboric, M. (2016). Cracking the control of RNA polymerase II elongation by 7SK snRNP and P-TEFb. *Nucleic Acids Res.* 44, 7527–7539.
- Racko, D., Benedetti, F., Dorier, J., y Stasiak, A. (2019). Are TADs supercoiled? *Nucleic Acids Res.* 47, 521-532.
- Ramanathan, A., Robb, G.B., y Chan, S.H. (2016). mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* 44, 7511-7526.
- Ramanathan, Y., Rajpara, S.M., Reza, S.M., Lees, E., Shuman, S., Mathews, M.B., y Pe'ery, T. (2001). Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *J. Biol. Chem.* 276, 10913–10920.
- Reese, J.C. (2003). Basal transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 13, 114–118.
- Revyakin, A., Liu, C., Ebright, R.H., y Strick, T.R. (2006). Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science* 314, 1139-1143.
- Roschke, A. V., Stover, K., Tonon, G., Schäffer, A.A., y Kirsch, I.R. (2002). Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia* 4, 19-31.
- Rougvie, A.E., y Lis, J.T. (1988). The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 54, 795–804.
- Ryan, K., Calvo, O., y Manley, J.L. (2004). Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease. *RNA* 10, 565–573.
- Sanjana, N.E., Shalem, O., y Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* 11, 783-784.
- Sanso, M., Levin, R.S., Lipp, J.J., Wang, V.Y., Greifenberg, A.K., Quezada, E.M., Ali, A., Ghosh, A., Larochelle, S., Rana, T.M., et al. (2016). P-TEFb regulation of transcription termination factor Xrn2 revealed by a chemical genetic screen for Cdk9

- substrates. *Genes Dev.* 30, 117–131.
- Schaukowitz, K., Joo, J.Y., Liu, X., Watts, J.K., Martinez, C., y Kim, T.K. (2014). Enhancer RNA facilitates NELF release from immediate early genes. *Mol. Cell* 56, 29-42.
- Schmidl, C., Rendeiro, A.F., Sheffield, N.C., y Bock, C. (2015). ChIPmentation: fast, robust, low-input ChIP-seq for histones and transcription factors. *Nat. Methods* 12, 964-965.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thåström, A., Field, Y., Moore, I.K., Wang, J.-P.Z., y Widom, J. (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* 442, 772–778.
- Sehested, M., Jensen, P.B., Sørensen, B.S., Holm, B., Friche, E., y Demant, E.J. (1993). Antagonistic effect of the cardioprotector (+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) on DNA breaks and cytotoxicity induced by the topoisomerase II directed drugs daunorubicin and etoposide (VP-16). *Biochem. Pharmacol.* 46, 389–393.
- Senecal, A., Munsky, B., Proux, F., Ly, N., Braye, F.E., Zimmer, C., Mueller, F., y Darzacq, X. (2014). Transcription factors modulate c-Fos transcriptional bursts. *Cell Rep.*
- Shanbhag, N.M., Rafalska-Metcalf, I.U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S.M., y Greenberg, R.A. (2010). ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* 141, 970-981.
- Shelton, E.R., Osheroff, N., y Brutlag, D.L. (1983). DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Purification and physical characterization. *J. Biol. Chem.* 258, 9530-9535.
- Shikama, N., Lyon, J., y La Thangue, N.B. (1997). The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol* 7, 230-236.
- Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., y Arndt, K.M. (2003). Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *EMBO J.* 22, 1846–1856.
- Soutourina, J., Wydau, S., Ambroise, Y., Boschiero, C., y Werner, M. (2011). Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription in vivo. *Science* 331, 1451–1454.

- Steurer, B., Janssens, R.C., Geverts, B., Geijer, M.E., Wienholz, F., Theil, A.F., Chang, J., Dealy, S., Pothof, J., van Cappellen, W.A., et al. (2018). Live-cell analysis of endogenous GFP-RPB1 uncovers rapid turnover of initiating and promoter-paused RNA Polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* *115*, E4368-E4376.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., y Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* *64*, 2390-2396.
- Stork, C.T., Bocek, M., Crossley, M.P., Sollier, J., Sanz, L.A., Chedin, F., Swigut, T., y Cimprich, K.A. (2016). Co-transcriptional R-loops are the main cause of estrogen-induced DNA damage. *Elife* *5*, e17548.
- Sugino, A., Higgins, N.P., Brown, P.O., Peebles, C.L., y Cozzarelli, N.R. (1978). Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc Natl Acad Sci USA* *75*, 4838-4842.
- Sun, L.E.I., y Fuchs, J.A. (1994). Role of DNA Supercoiling. *176*, 4617-4626.
- Suter, D.M., Molina, N., Gatfield, D., Schneider, K., Schibler, U., y Naef, F. (2011). Mammalian genes are transcribed with widely different bursting kinetics. *Science* *332*, 472-474.
- Tabuchi, H., y Hirose, S. (1988). DNA supercoiling facilitates formation of the transcription initiation complex on the fibroin gene promoter. *J. Biol. Chem.* *263*, 15282-15287.
- Tan, J., Shu, L., y Wu, H.Y. (1994). Activation of the leu-500 promoter by adjacent transcription. *J. Bacteriol.* *176*, 1077-1086.
- Thakurela, S., Garding, A., Jung, J., Schübeler, D., Burger, L., y Tiwari, V.K. (2013). Gene regulation and priming by topoisomerase II $\alpha$  in embryonic stem cells. *Nat. Commun.* *4*, 2478.
- Tirode, F., Busso, D., Coin, F., y Egly, J.M. (1999). Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol. Cell* *3*, 87-95.
- Topcu, Z. (2001). DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *J. Clin. Pharm. Ther.* *26*, 405-416.

- Travers, A., y Muskhelishvili, G. (2007). A common topology for bacterial and eukaryotic transcription initiation? *EMBO Rep.* 8, 147–151.
- Tse-Dinh, Y.C. (1998). Bacterial and archeal type I topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta* 1400, 19–27.
- Tsukiyama, T., y Wu, C. (1995). Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 83, 1011–1020.
- Vakoc, C.R., Sachdeva, M.M., Wang, H., y Blobel, G.A. (2006). Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9185–9195.
- Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., y Laipis, P. (1965). The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 53, 1104–1111.
- Vos, S.M., Farnung, L., Urlaub, H., y Cramer, P. (2018). Structure of paused transcription complex Pol II–DSIF–NELF. *Nature* 560, 601–606.
- Wang, J.C. (1971). Interaction between DNA and an Escherichia coli protein  $\omega$ . *J. Mol. Biol.* 55, 523–533.
- Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 430–440.
- Wang, J.C., y Liu, L.F. (1979). DNA topoisomerases: Enzymes that catalyze the concerted breaking and rejoining of DNA backbone bonds. *Mol. Genet. Parte III (H. H. Tay)*, 65–88.
- Wang, D., Severinov, K., y Landick, R. (1997). Preferential interaction of the his pause RNA hairpin with RNA polymerase  $\beta$  subunit residues 904–950 correlates with strong transcriptional pausing. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8433–8438.
- Weixlbaumer, A., Leon, K., Landick, R., y Darst, S.A. (2013). Structural basis of transcriptional pausing in bacteria. *Cell* 152, 431–441.
- West, S., Gromak, N., y Proudfoot, N.J. (2004). Human 5'  $\rightarrow$  3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* 432, 522–525.
- Westover, K.D., Bushnell, D.A., y Kornberg, R.D. (2004). Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science* 303, 1014–1016.
- de Wit, E., y de Laat, W. (2012). A decade of 3C technologies: Insights

- into nuclear organization. *Genes Dev.* *26*, 11-24.
- Woessner, R.D., Mattern, M.R., Mirabelli, C.K., Johnson, R.K., y Drake, F.H. (1991). Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ.* *2*, 209–214.
- Wong, B., Chen, S., Kwon, J.A., y Rich, A. (2007). Characterization of Z-DNA as a nucleosome-boundary element in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 2229–2234.
- Workman, J.L. (2006). Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev.* *20*, 2009–2017.
- Woychik, N.A., y Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* *108*, 453-463.
- Wu, J., Feng, L., y Hsieh, T.S. (2010). *Drosophila* topo III $\alpha$  is required for the maintenance of mitochondrial genome and male germline stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *107*, 6228–6233.
- Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., y Handa, H. (2006). P-TEFb-Mediated Phosphorylation of hSpt5 C-Terminal Repeats Is Critical for Processive Transcription Elongation. *Mol. Cell* *21*, 227–237.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., y Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* *97*, 41–51.
- Yang, X., Li, W., Prescott, E.D., Burden, S.J., y Wang, J.C. (2000). DNA topoisomerase IIbeta and neural development. *Science* *287*, 131-134.
- Yang, Y., McBride, K.M., Hensley, S., Lu, Y., Chedin, F., y Bedford, M.T. (2014). Arginine methylation facilitates the recruitment of TOP3B to chromatin to prevent R loop accumulation. *Mol. Cell* *53*, 484–497.
- Yang, Z., Yik, J.H., Chen, R., He, N., Jang, M.K., Ozato, K., y Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol. Cell* *19*, 535-545.

- Yik, J.H., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J.L., Link, A.J., y Zhou, Q. (2003). Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol. Cell* 12, 971-982.
- Yu, X., Davenport, J.W., Urtishak, K.A., Carillo, M.L., Gosai, S.J., Kolaris, C.P., Byl, J.A.W., Rappaport, E.F., Osheroff, N., Gregory, B.D., et al. (2017). Genome-wide TOP2A DNA cleavage is biased toward translocated and highly transcribed loci. *Genome Res.* 27, 1238-1249.
- Yudkovsky, N., Ranish, J.A., y Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225–229.
- Zehring, W.A., Lee, J.M., Weeks, J.R., Jokerst, R.S., y Green-leaf, A.L. (1988). The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 3698–3702.
- Zeitlinger, J., Stark, A., Kellis, M., Hong, J.W., Nechaev, S., Adelman, K., Levine, M., y Young, R.A. (2007). RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat. Genet.* 39, 1512–1516.
- Zhang, J., y Landick, R.A. (2016). Two-Way Street: Regulatory Interplay between RNA Polymerase and Nascent RNA Structure. *Trends Biochem Sci* 41, 293–310.
- Zhang, A., Lyu, Y.L., Lin, C.-P., Zhou, N., Azarova, A.M., Wood, L.M., y Liu, L.F. (2006). A protease pathway for the repair of topoisomerase II-DNA covalent complexes. *J. Biol. Chem.* 28, 35997–36003.
- Zhang, H., Barcelo, J.M., Lee, B., Kohlhagen, G., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., y Pommier, Y. (2001). Human mitochondrial topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10608-10613.
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoutte, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al. (2008). Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 9, R137.

