



---

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

Estudio del Rol de KANSL2 en células de glioblastoma: caracterización  
de su función nucleolar y red transcripcional

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Lic. Lucia Canedo**

Directora de tesis: Dra. Carolina Perez Castro

Consejero de Estudios: Dr. Martín Monte

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires  
– CONICET – Instituto Partner de la Sociedad Max Planck

Buenos Aires, 22 de Octubre de 2021

## **Resumen**

La hipertrofia nucleolar de las células cancerosas es considerado como un marcador clínico de malignidad tumoral estrechamente asociada con la capacidad tumorigénica. KANSL2 es una subunidad del complejo modificador de cromatina letal no específico (NSL) involucrado en la regulación epigenética, y recientemente descubrimos que regula las propiedades de célula madre en Glioblastoma (GBM). En una etapa previa, se observó preliminarmente que la proteína de fusión KANSL2-RFP tenía localización nucleolar. En esta tesis se continuó con la caracterización más detallada de KANSL2 endógena, en particular su localización, y sus funciones, en asociación con la proteína KAT8 acetiltransferasa de histonas del complejo NSL.

Determinamos que la localización nucleolar de KANSL2 endógena es dependiente, y por lo tanto dinámica, del ciclo celular, sugiriendo un potencial rol durante la biogénesis del ARN ribosomal (rRNA). Los resultados obtenidos mediante la sobreexpresión de KANSL2-RFP apoyaron el efecto positivo de KANSL2 para la síntesis de rRNA. El silenciamiento de KANSL2 confirmó el efecto sobre la síntesis de rRNA y su rol regulador de la proliferación celular. Se observó también que habría una regulación recíproca positiva entre KANSL2 y KAT8. Estos resultados sugieren fuertemente que el complejo NSL regula positivamente la expresión del rRNA con una participación clave de KANSL2.

En resumen, en esta tesis se reporta una función novedosa de KANSL2, la cual vincula la regulación epigenética y el estado metabólico durante la progresión tumoral en GBM.

Por último, se analizó la red transcripcional de genes y vías de señalización potencialmente moduladas por KANSL2 mediante un ensayo de transcriptómica (RNAseq) en células de GBM derivadas de pacientes con silenciamiento estable de KANSL2 crecidas en cultivos 3D. Los resultados obtenidos indican que KANSL2 posee un potencial rol modulador en el fenotipo celular mesenquimal invasivo y regula funciones celulares básicas. Estos resultados permiten hipotetizar nuevas funciones de KANSL2 en GBM y continuar evaluando su rol regulador en esta enfermedad.

# “Study of the role of KANSL2 in glioblastoma cells: characterization of its nucleolar function and transcriptional network”

## **Abstract**

Nucleolar hypertrophy of cancer cells is considered a clinical marker of tumor malignancy closely associated with tumorigenic capacity. KANSL2 is a subunit of the non-specific lethal chromatin modifier complex (NSL) involved in epigenetic regulation, and we recently discovered that it regulates stem cell properties in Glioblastoma (GBM). In a previous step, the KANSL2-RFP fusion protein was preliminarily observed to have nucleolar localization. This thesis continued with the more detailed characterization of endogenous KANSL2, in particular its location, and its functions, in association with the histone KAT8 acetyltransferase protein of the NSL complex.

We determined that the nucleolar localization of endogenous KANSL2 is dependent, and therefore dynamic, on the cell cycle, suggesting a potential role during ribosomal RNA (rRNA) biogenesis. The results obtained by overexpression of KANSL2-RFP supported the positive effect of KANSL2 for rRNA synthesis. KANSL2 silencing confirmed the effect on rRNA synthesis and its regulatory role in cell proliferation. It was also observed that there would be a positive reciprocal regulation between KANSL2 and KAT8. These results strongly suggest that the NSL complex positively regulates rRNA expression with a key involvement of KANSL2.

In summary, this thesis reports a novel function of KANSL2, which links epigenetic regulation and metabolic state during tumor progression in GBM.

Finally, the transcriptional network of genes and signaling pathways potentially modulated by KANSL2 was analyzed using a transcriptomic assay (RNAseq) in

GBM cells derived from patients with stable KANSL2 silencing grown in 3D cultures. The results obtained indicate that KANSL2 has a potential modulating role in the invasive mesenchymal cell phenotype and regulates basic cell functions. These results allow us to hypothesize new functions of KANSL2 in GBM and to continue evaluating its regulatory role in this disease.

## Agradecimientos

Agradezco a los organismos que hicieron posible que realizara mi trabajo doctoral: CONICET, Instituto Nacional del Cancer y Fulbright–Fundación Bunge y Born – Fundación Williams.

A la fundación Fleni por su colaboración constante con nuestro grupo.

Al Dr. Joaquín Espinosa y a su grupo de trabajo por recibirme en la Universidad de Colorado.

A mi directora por permitirme integrar su equipo y ser mi mentora durante mi tesis de licenciatura y doctorado.

Al instituto IBioBA y todas las personas que forman y han formado parte de él, especialmente a quienes integraron nuestro grupo de trabajo: Melina Muñoz Bernart, Nicolás Budnik, Marina Cuenca, Fiorella Belforte y Laura Thomas.

Finalmente, agradezco a mi familia por acompañarme todos los días.

## **INDICE**

INTRODUCCIÓN.....	5
Glioblastoma.....	5
<i>Cancer Stem Cells</i> .....	7
El nucleolo.....	6
Epigenética.....	9
KAT8.....	13
Nucleolo y epigenética.....	13
Nucleolo y Cáncer.....	17
Nucleolo y <i>stem</i> .....	19
KAT8 en cáncer.....	20
El complejo NSL.....	22
KANSL2.....	252
Resultados Previos.....	25
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	33
Objetivo General.....	33
Objetivos Específicos.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Cultivo celular.....	34
Fraccionamiento subcelular.....	35
Inmunofluorescencia.....	36
Análisis de colocalización.....	36
Sincronización celular.....	37
Citometría de Flujo.....	37
Transfección transitoria en células de mamífero.....	38
Silenciamiento estable y transitorio de KANSL2.....	39
qRT-PCR.....	40
Western Blot.....	41
Ensayo de proliferación por cristal violeta.....	42
Ensayo de MTT.....	43
Ensayo de luciferasa.....	43
Cultivo de esferas.....	43
RNAseq.....	44
Análisis estadístico.....	45
RESULTADOS.....	46
1. Primera caracterización de KANSL2.....	46
2. Caracterización de la localización subcelular de KANSL2.....	52
3. KANSL2 en el ciclo celular.....	60
4. KANSL2 como regulador de rRNA.....	65
5. Regulación recíproca entre KANSL2 y KAT8.....	74
6. KANSL2 y KAT8 como reguladoras de la proliferación.....	80
7. Análisis de la transcriptómica de células silenciadas de KANSL2.....	85
DISCUSIÓN.....	105
La localización subcelular de KANSL2 como parte de su caracterización.....	106
La regulación de KANSL2 sobre el rRNA y la proliferación.....	110
La potencial regulación de KANSL2 sobre KAT8.....	112
Explorar <i>pathways</i> regulados por KANSL2.....	116
REFERENCIAS.....	122

# INTRODUCCIÓN

## Glioblastoma

El Glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario maligno más frecuente del sistema nervioso central (CNS). Tiene una incidencia de alrededor de 3 casos por cada 100.000 habitantes al año y una expectativa de supervivencia <5% a los 5 años luego del diagnóstico. La edad promedio de los diagnosticados es de 65 años. Si bien la incidencia global es baja, su alta letalidad lo convierten en unos de los mayores desafíos en el campo de la oncología clínica (Aaron C Tan *et. al.* 2020).

Los síntomas varían de acuerdo a la ubicación del tumor pero suelen incluir cefalea, convulsiones y alteraciones motoras o visuales, entre otras.

La organización mundial de la salud (WHO) clasifica los gliomas del grado I al IV según su perfil histopatológico. Aquellos de grado I suelen tener un potencial proliferativo bajo por lo que responden mejor al procedimiento quirúrgico. Los gliomas de grado II al IV, en cambio, son muy agresivos y tienen un peor pronóstico. El GBM es un glioma de grado IV, altamente agresivo, invasivo y heterogéneo (Annette M Molinaro *et. al.* 2019).

El GBM puede originarse *de novo* (tumores primarios) o desarrollarse a partir de astrocitomas de grado II o III (tumores secundarios). Los primeros representan el 90% de los casos y suelen presentar el biomarcador IDH1 (*Isocitrate Dehydrogenase*) en su forma *wildtype*. Los tumores secundarios, normalmente IDH1 mutantes, son más comunes en pacientes jóvenes y presentan una mejor respuesta a la terapia (Tabla 1).

Otras alteraciones moleculares de importancia en el GBM incluyen mutaciones en los genes EGFR (*epidermal growth factor receptor*), PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), TERT (*telomerase reverse transcriptase*) y TP53 (*tumor protein p53*), entre otras. Estas alteraciones fueron destacadas dentro de la definición de GBM por la WHO recién en el año 2016 (Louis DN, 2016). La incorporación de marcadores moleculares como herramientas diagnósticas representa un gran avance y responde a la necesidad de diseñar terapias con mayor grado de especificidad.

	IDH-wildtype glioblastoma	IDH-mutant glioblastoma	References
Synonym	Primary glioblastoma, IDH-wildtype	Secondary glioblastoma, IDH-mutant	{1830}
Precursor lesion	Not identifiable; develops de novo	Diffuse astrocytoma Anaplastic astrocytoma	{1827}
Proportion of glioblastomas	~90%	~10%	{1797}
Median age at diagnosis	~62 years	~44 years	{214,1078,1797, 2103}
Male-to-female ratio	1.42:1	1.05:1	{214,1417,1797}
Mean length of clinical history	4 months	15 months	{1797}
Median overall survival			
Surgery + radiotherapy	9.9 months	24 months	{1797}
Surgery + radiotherapy + chemotherapy	15 months	31 months	{2810}
Location	Supratentorial	Preferentially frontal	{1417}
Necrosis	Extensive	Limited	{1417}
<i>TERT</i> promoter mutations	72%	26%	{1801,1830}
<i>TP53</i> mutations	27%	81%	{1797}
<i>ATRX</i> mutations	Exceptional	71%	{1519}
<i>EGFR</i> amplification	35%	Exceptional	{1797}
<i>PTEN</i> mutations	24%	Exceptional	{1797}

**Tabla 1:** Comparación entre tumores de GBM IDH *wildtype* y IDH mutante según los criterios de la WHO (Louis DN, 2016).

Los tratamientos actuales del GBM consisten en resección quirúrgica o biopsia, seguido de una combinación de radiación ionizante y quimioterapia. Sin embargo, estas terapias sólo logran prolongar la vida de los pacientes unos meses, siendo la supervivencia promedio de 12-18 meses al momento del diagnóstico (Ron Batash *et. al.* 2017).

El objetivo de la cirugía es obtener un diagnóstico y aliviar los síntomas clínicos pero resulta insuficiente como único método de tratamiento debido a la imposibilidad de una remoción del 100% del tumor a causa de su morfología difusa (Niklas Thon *et. al.* 2019).

La temozolomida (TMZ) es un agente quimioterapéutico que se emplea usualmente en combinación con la radioterapia. El bevacizumab también es indicado, adicionalmente, en algunos casos (J J C Verhoeff *et. al.* 2010). Las diferentes modalidades de tratamiento ofrecidas al paciente dependen de los biomarcadores, alteraciones genéticas e histopatología de su tumor específico.

La complejidad molecular y celular de este tipo de tumores precisa de un estudio exhaustivo para poder desarrollar nuevas y mejores terapias que puedan prolongar y mejorar la expectativa y calidad de vida de los pacientes.

### **Cancer Stem Cells**

Las células tumorales con propiedades de células madre o *cancer stem cells* (CSC) representan una subpoblación tumoral con capacidad de autoperpetuación (*self renewal*) y diferenciación hacia otros tipos celulares (multipotencia) (Michael F Clarke *et. al.* 2006). Su nombre deriva de las similitudes compartidas con las células madre embrionarias.

Las CSC han sido vinculadas al desarrollo de tumores, la metástasis y la adquisición de resistencia a las terapias empleadas (Wen-Ting Liao *et. al.* 2014). Esto las convierte en potenciales blancos terapéuticos por lo cual, actualmente, son un área de gran interés en la investigación científica.

Los tumores de GBM se caracterizan por presentar una jerarquización de sus células, es decir, heterogeneidad poblacional de células que poseen distintos grados de especialización o diferenciación. Además, se caracterizan por presentar constante comunicación con el microambiente tumoral (distintos componentes celulares, incluidas células inmunitarias, y no celulares dentro y alrededor del tumor) (Syreeta DeCordova *et. al.* 2020).

Se han descrito al menos, tres microambientes típicos en GBM; el nicho hipóxico, el perivascular y el invasivo. Se ha reportado que las CSC cumplen un rol clave en el remodelado de cada uno de ellos, por lo cual se les adjudica como responsables principales de la resistencia al tratamiento y la recurrencia común en GBM (Dolores Hambardzumyan *et. al.* 2015). De hecho, las regiones hipóxicas y necróticas del centro del tumor promueven la existencia de subpoblaciones de CSC adaptadas a sobrevivir en esas condiciones restrictivas. En dicha zona se encuentran células con mutaciones que promueven la angiogénesis y así contribuyendo al remodelado del nicho perivascular, y favoreciendo la progresión tumoral (Marco Papale, 2020). En el nicho invasivo, se encuentran mutaciones que aumentan el potencial de invasión y metástasis, como por ejemplo aquellas relacionadas al remodelado de la matriz extracelular y al anclaje célula-célula y célula-matriz (Briana C Prager *et. al.* 2020).

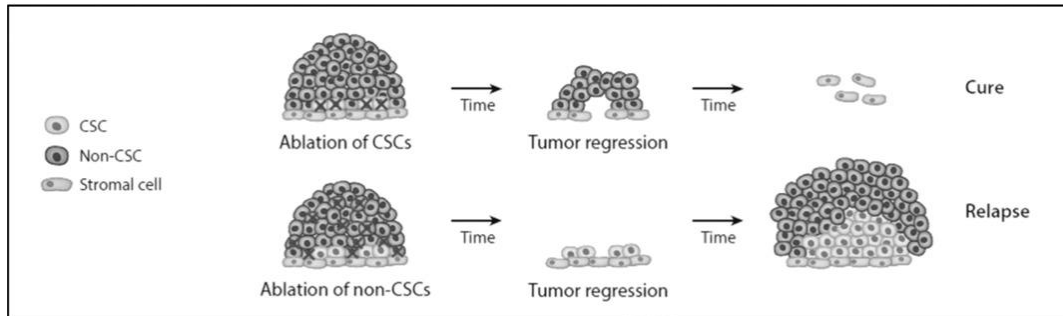
La interacción de las CSC con el medio circundante no sólo favorece las mutaciones genéticas, sino también los cambios de estado celular asociados a la epigenética (Marta Prieto-Vila *et. al.* 2017). Esto promueve la adaptabilidad del tumor a distintos escenarios que favorecen a la diversificación y crecimiento (Yue Zhao *et. al.* 2018).

Se ha puesto mucho esfuerzo en los últimos años en desarrollar metodologías para identificar las CSC. Tradicionalmente, se utilizaban marcadores de genes maestros del desarrollo embrionario como OCT4/POU5F1, SOX2, NANOG, SALL4, y también componentes de vías de señalización como pSTAT3 entre otros (Amy Bradshaw *et. al.* 2016). Sin embargo, con el advenimiento de nuevas tecnologías se ha podido verificar la coexistencia de al menos 3 o 4 subtipos de células con distinto grado de plasticidad y función dentro del tumor como las proneurales, neurales, clásicas, y mesenquimales, cada una de ellas con un perfil transcripcional distintivo que ha permitido la asignación de biomarcadores (Mario L Suvà *et. al.* 2014).

Además de contribuir a sostener el medio circundante que compone al GBM, se ha descrito que las CSC poseen ciertas características que las hacen resistentes a las terapias convencionales como la capacidad de inactivar, inhibir o expulsar ciertos compuestos quimioterapéuticos y su elevada capacidad de reparación del daño al DNA (Qi-En Wang *et. al.* 2015).

Como parte de dicha capacidad de adaptación, se ha visto que los tratamientos con radiación ionizante (RI) y TMZ suelen aumentar la expresión de marcadores asociados a plasticidad, modificando así la dinámica de composición celular de los tumores, y favoreciendo la adquisición de un fenotipo de CSC generalmente invasivo, que dificulta aún más la eficacia del tratamiento (Radu O Minea *et. al.* 2020).

Por estas características, se considera a las CSC como las principales responsables de la falla en el tratamiento clínico (Figura 1) y, por lo tanto, cualquier terapia eficiente para el tratamiento de GBM deberá considerarlas como blanco específico.



**Figura 1.** Esquema que resalta la importancia de desarrollar terapias específicas contra las CSC para evitar la recidiva del tumor luego del tratamiento (Heba M Hesham *et. al.* 2018).

El proceso de metástasis no suele estar asociado al GBM, posiblemente debido a la corta expectativa de vida de esta enfermedad. Sin embargo, estos tumores son altamente invasivos y pueden colonizar en forma radial diferentes regiones del cerebro (Tamara T Lah *et. al.* 2020).

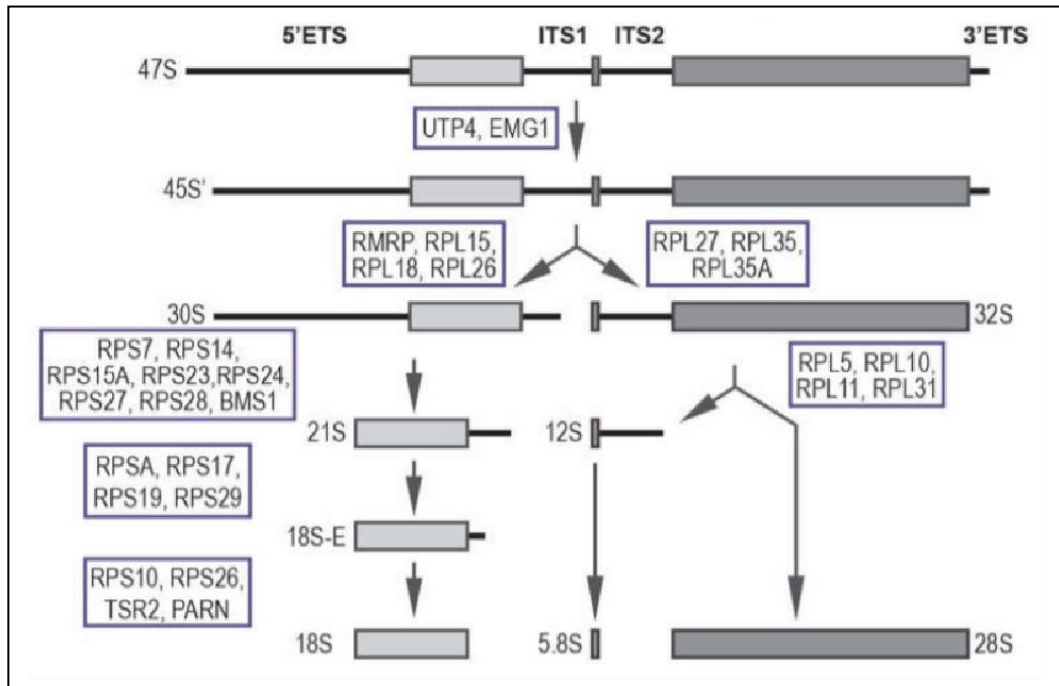
### **El nucleolo**

El nucleolo es el compartimento más prominente del núcleo, donde ocurre la transcripción del RNA ribosomal (rRNA), su procesamiento y el ensamblado de las subunidades mayor (60S) y menor (40S) del ribosoma. Dichas subunidades luego viajan al citoplasma donde terminan su maduración (Lisa Kofler *et. al.* 2020).

En los nucleolos, la RNA polimerasa I transcribe al rRNA precursor, conocido como 45S/47S, el cual es procesado y clivado para producir los rRNAs 28S, 18S y 5.8S (Figura 2). El 5S es transcrito fuera de los nucleolos por la RNA polimerasa III (M R Paule *et. al.* 2000). Durante estos procesos intervienen un gran número de factores como SnoRNAs (*small nucleolar RNAs*), endonucleasas, exonucleasas, entre otras (Junnan Liang *et. al.* 2019).

Por muchos años, la biogénesis ribosomal se consideraba como un proceso fundamental e inalterado de la célula. Se creía que su único rol era generar ribosomas. Sin embargo, en los últimos años se comenzó a ver que tanto el nucleolo como los procesos que en el mismo ocurren cumplen diversos roles en varias funciones celulares como la respuesta a estrés, la reparación

del DNA, la estabilidad genómica y la regulación de la expresión génica, entre otras (Shannon E Weeks *et. al.* 2019).



**Figura 2.** Representación esquemática de la transcripción y procesamiento de los rRNA 18S, 5.8S y 28S por la RNA polimerasa I en los nucleolos (Maxime Aubert *et. al.* 2018).

Los nucleolos son estructuras dinámicas tanto a lo largo del ciclo celular como en respuesta a cambios ambientales (Danièle Hernandez-Verdun *et. al.* 2006 y Hweon Park *et. al.* 2015). El tamaño y número de los nucleolos varían a lo largo del ciclo y en respuesta al contexto celular (Anthony K L Leung *et. al.* 2003). Los nucleolos se forman al final de la mitosis en el momento en que comienza a reactivarse la síntesis de rRNA. Esto se encuentra regulado por la inactivación de CDK1-ciclina B durante la telofase e involucra la re-localización de la maquinaria de síntesis y procesamiento de rRNA hacia las regiones conocidas como NORs (*nucleolar organizer regions*), donde se forman los nucleolos (Danièle Hernandez-Verdun *et. al.* 2006). Al recomenzar la mitosis, se rompe la envoltura nuclear y los componentes nucleolares se vuelven a dispersar. Si bien durante la mitosis ya no existen nucleolos conformados, ciertos factores de la maquinaria de transcripción de Pol I, como UBF

(*Upstream binding factor*) y SL1, permanecen anclados al rDNA en los NORs, lo cual permite la rápida reanudación de la función nucleolar (Sobol, M. *et. al.* 2013).

Las proteínas nucleolares suelen asociarse y disociarse de manera continua en los nucleolos, alternando su localización con el nucleoplasma (Phair and Misteli 2000). Se ha observado que el estado metabólico de la célula tiene un rol esencial en la función nucleolar ya que, por ejemplo, la localización nucleolar de ciertas proteínas esenciales como B23 depende de los niveles celulares de ATP y GTP (Shav-Tal, Y. *et. al.* 2005).

La demanda de proteínas de una célula varía en respuesta a las señales del ambiente por lo que la producción de ribosomas se encuentra finamente regulada, y esto ocurre especialmente en la producción de rRNA que es el paso limitante de la biogénesis ribosomal (Ferdinand von Walden *et. al.* 2019). Por eso, cambios en la síntesis de rRNA tienen el potencial de repercutir en el destino celular y la proliferación, entre otros. Esto se evidencia en diversas condiciones de estrés o de daño que disminuyen indefectiblemente la síntesis de rRNA. Al contrario, condiciones que promueven el crecimiento y la proliferación inducen la síntesis de rRNA (Marco Gaviraghi *et. al.* 2019).

Si bien se esperaría que un aumento de la proliferación, acompañado del aumento en la producción de ribosomas, se correlacione con una mayor área nucleolar, no siempre ocurre dicha asociación. Por ejemplo, las células de cáncer de pulmón anaplásico de células pequeñas que proliferan rápidamente tienen un área nucleolar reducido por núcleo, mientras que las células de carcinoma de pulmón de células grandes de crecimiento más lento tienen un área nucleolar por núcleo mucho mayor (Daniele Zink *et. al.* 2004). Las células madre embrionarias suelen tener un único nucleolo de gran área mientras que las células diferenciadas usualmente tienen nucleolos mas pequeños (Eran Meshorer *et. al.* 2006). Los nucleolos no sólo constituyen las regiones de mayor actividad transcripcional de la célula sino que cumplen funciones importantes de la organización de la arquitectura nuclear, como se describe más adelante (Gupta, S., & Santoro, R. 2020).

## **Epigenética**

Una célula humana contiene cerca de 2 metros de DNA dentro de un núcleo de 6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Esto es posible gracias al alto grado de empaquetamiento que alcanza el DNA debido a su interacción con proteínas histonas. La unidad fundamental de la cromatina es conocida como nucleosoma y se compone de 147 pares de bases de DNA envuelto alrededor de un octámero de histonas, que corresponden a 2 copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Amber R Cutter *et. al.* 2015).

La organización topológica de la cromatina no es uniforme a lo largo del genoma, encontrándose áreas con distintos grado de compactación. Estas estructuras son dinámicas y se encuentran reguladas por diversos factores y en respuesta al contexto celular. La accesibilidad de una región del DNA es entonces un requisito para su eficiente transcripción y la epigenética cumple así un rol clave en la regulación de la expresión génica (Sandy L Klemm *et. al.* 2019).

La compactación de la cromatina es modulada mediante modificaciones químicas en el DNA y las histonas. Se han descrito más de 130 modificaciones postraduccionales sobre histonas entre las que se encuentra la fosforilación, la metilación y la acetilación, entre otras. La combinación de las distintas modificaciones agrega un mayor nivel de complejidad en lo que ha sido llamado el código de histonas. Las modificaciones entre histonas pueden tener efectos sobre la interacción de la histona modificada con el DNA, con otras histonas o con otras proteínas no histonas (C David Allis *et. al.* 2016).

Las enzimas que catalizan la acetilación son las acetiltransferasas (HATs) y para la reacción se usa el metabolito acetyl-CoA como sustrato. Las histonas son proteínas con carga positiva y su acetilación en sus residuos de lisina en los extremos amino terminal, neutralizan esas cargas positivas lo cual disminuye su afinidad por el DNA (Andrew J Bannister *et. al.* 2011).

La acetilación de histonas es un proceso reversible, siendo las histonas deacetilasas (HDACs) las responsables de catalizar la remoción del grupo N-acetyl. La sobreexpresión de HDACs ha sido reportada en un gran número de patologías incluido el cáncer, en donde se lo asocia con un peor pronóstico (Hui Yang *et. al.* 2014). En particular, las HDACs han sido vinculadas al silenciamiento de supresores tumorales y genes apoptóticos (Li, Y. *et. al.* 2016).

Se ha visto, por ejemplo, que el tratamiento con inhibidores de HDACs puede revertir el silenciamiento del supresor tumoral p53, lo cual induciría la apoptosis en células tumorales. La inhibición de HDACs también reduce la capacidad de autoperpetuación de las CSC mediante el silenciamiento de factores *stem* (Elena Kunadis *et. al.* 2020, y Cheng-Yu Tsai *et. al.* 2021). Es por esto que las HDACS son hoy en día un área de gran interés en oncología debido a su potencial terapéutico.

## **KAT8**

KAT8/MOF (*Lysine acetyltransferase 8/Males Absent on the First*) es una enzima que pertenece a la familia de acetiltransferasas MYST, con miembros altamente conservados en eucariotas y responsables de gran parte de la acetilación en el núcleo. Fue identificada como la principal responsable de la acetilación de la lisina 16 de la histona 4 (H4K16ac) (Thomas Conrad *et. al.* 2012) entre otras modificaciones, como a la H5K5, H4K8 y H4K12 acetiladas. Estas acetilaciones y en especial la H4K16ac, se relacionan generalmente con el relajamiento de la cromatina y el aumento de la tasa transcripcional.

Se puede encontrar a la KAT8 en distintos complejos multiproteicos y al parecer, cada uno posee funciones específicas (para más detalles ver sección NSL) (Aliaksandra Radzisheuskaya *et. al.* 2021).

KAT8 ha sido vinculada a una gran diversidad de procesos entre ellos el desarrollo embrionario, la apoptosis, la reparación del daño al DNA, la respuesta celular al estrés (Xiangzhi Li *et. al.* 2010) y, como se describe a continuación, la modulación epigenética del rRNA. KAT8 también tiene funciones durante el desarrollo de cáncer que se describirá más adelante.

## **Nucleolo y epigenética**

La cantidad de ribosomas que se producen es regulada principalmente por la acumulación de rRNA. Una célula diploide humana tiene alrededor de 200 copias del gen de rDNA organizadas en forma de *tandem repeats*. Estos se ubican en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22 (David T McSwiggen *et. al.* 2019).

Los nucleolos constituyen las zonas de mayor transcripción de la célula así como también las regiones de mayor grado de heterocromatinización. Esto se

debe a que algunas copias del gen de rDNA son transcriptas, mientras que otras se encuentran inhibidas epigenéticamente (Guetg, C. & Santoro, R. 2012).

Las copias de rDNA pueden clasificarse en 3 estados: silenciado, inactivo o activo, de acuerdo al grado de relajación de la cromatina y su consecuente nivel de expresión. Las copias inactivas se encuentran entre las regiones de mayor grado de compactación del genoma. Presentan marcas epigenéticas represivas como H3K9me2 and H3K9me3, metilación de CpG en el promotor e interacción con HDACs (Nemeth, A. & Längst, G. 2011).

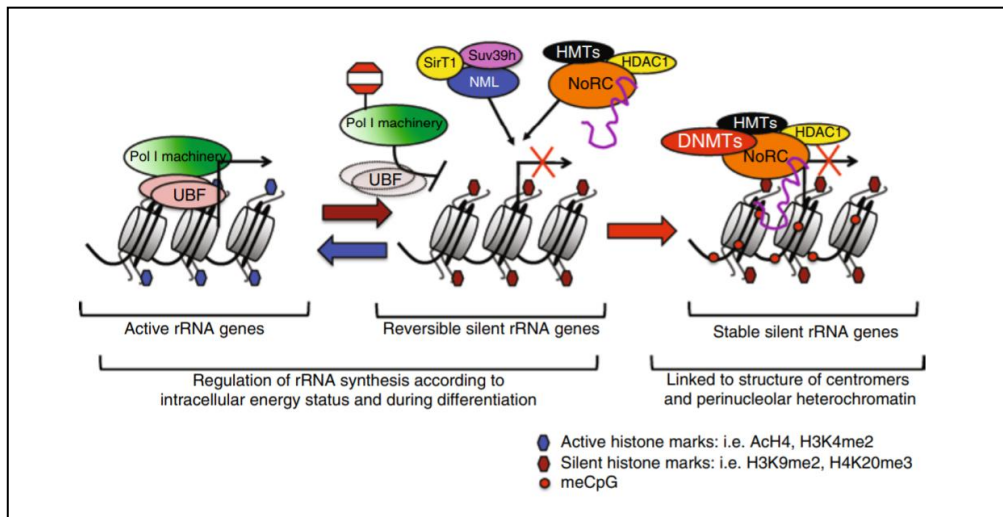
La coexistencia de copias activas e inactivas de rDNA en la misma célula permite plantear dos modelos de regulación de los niveles de rRNA, ya sea mediante el control de la tasa de transcripción de la polimerasa I o el cambio en el número de genes ribosomales transcriptos. Sin embargo, estudios de cromatina demuestran que el número de copias activas y silenciadas de rDNA se mantiene similar entre células arrestadas y proliferantes (French, S. L. *et. al.* 2003). Estos datos sugieren que aquellas copias altamente heterocromatinizadas de rDNA nunca son transcriptas, y la célula responde al aumento en las demandas de rRNA mediante la regulación de la tasa transcripcional de las copias activas del gen (Goodfellow, S. J. & Zomerdiijk, J. C. 2013). Entonces, dado que las copias inactivas no son usadas para transcribir rRNA, surge la fascinante incógnita acerca de cuál es su función y que rol desempeñan los nucleolos, más allá de la biogénesis ribosomal. Si bien no son usadas para producir rRNA, resultan esenciales ya que la delección de las copias inactivas genera una respuesta al daño al DNA seguida de apoptosis o senescencia (Kobayashi, T. 2008).

Se ha visto que las zonas heterocromatinizadas donde están las copias inactivas de rDNA son capaces de interactuar con otras regiones compactadas del núcleo como los telómeros, centrómeros y el cromosoma X inactivado en hembras (Bersaglieri & Santoro, 2019; Guetg & Santoro, 2012; Padeken & Heun, 2014). Si bien no se conoce la razón de estas interacciones y teniendo en cuenta la naturaleza esencial de las copias silenciadas de rDNA, se ha planteado que podrían cumplir un rol fundamental en la arquitectura nuclear (Cerqueira, A. V. & Lemos, B. 2019).

Existen mecanismos responsables de mantener el estado epigenético de las copias de rDNA a lo largo del ciclo celular (Figura 3). El principal

responsable conocido de este proceso es el complejo epigenético NoRC, formado por TIP5 (BAZ2A, TTF1-*interacting protein* 5) y SNF2H. (Santoro et al. 2002; Strohner et al. 2001). El complejo NoRC es reclutado al promotor de rDNA mediante la interacción con un *long non-coding* RNA (lncRNA) llamado pRNA (*promoter associated* RNA) que interactúa con TIP5 (Mayer et al. 2006; Yan, Q. *et. al.* 2019). Su función es mediar la formación de heterocromatina en las copias inactivas de rDNA así como en centrómeros y telómeros mediante el reclutamiento de diversas proteínas moduladoras de la cromatina.

Las copias activas de rDNA presentan marcas epigenéticas activas como por ejemplo, AcH4 y H3K4me3, y se encuentran asociadas con la maquinaria de transcripción de la polimerasa I, incluyendo UBF. En respuesta a estrés celular o durante procesos fisiológicos como la diferenciación celular, la síntesis de rRNA disminuye debido a cambios epigenéticos que suelen involucrar un mayor grado de metilación y menor grado de acetilación del promotor de rDNA. Sin embargo, las copias de rDNA que nunca son transcritas y las cuales se asocian con otras regiones de mayor compactación en el núcleo presentan una mayor cantidad de marcas epigenéticas represivas como por ejemplo, metilación CpG (Santoro R. 2011).



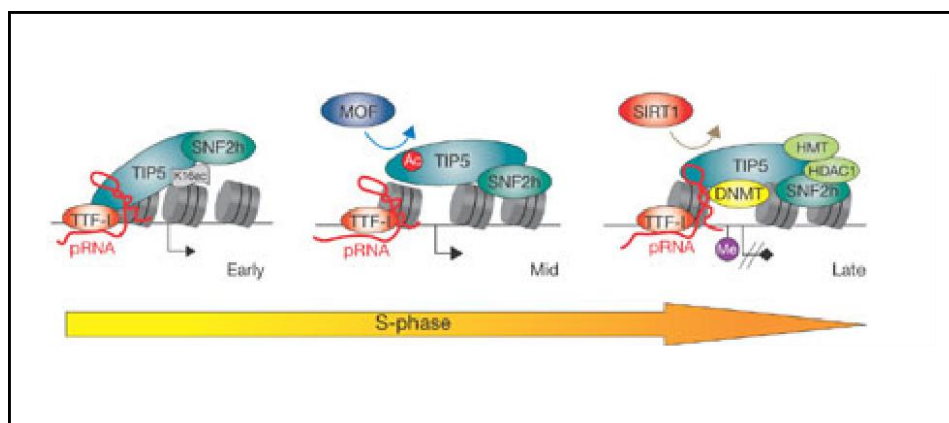
**Figura 3.** Representación esquemática de la modulación epigenética de los distintos estados de genes de rDNA (Santoro R. 2011).

Las copias inactivas de rDNA permanecen altamente heterocromatinizadas durante el ciclo celular, pero este proceso necesita la flexibilidad para revertirse

durante la fase S y permitir su replicación. Luego, en G2 debe recuperar su estado epigenético característico. Se ha visto que la acetiltransferasa KAT8 (MOF) es crucial en este proceso (Figura 4), ya que regula la actividad del complejo NoRC de manera ciclo celular específica (Zhou et al. 2009).

El DNA se replica de manera diferencial durante la fase S, comenzando con las regiones donde la cromatina es más laxa, como las copias de rDNA que son transcritas así como otras zonas de alta expresión génica. Durante la mitad de la fase S, se comienzan a replicar las zonas con mayor grado de compactación, como las copias de rDNA silenciadas por NoRC (Heinz, K. S. *et al.* 2019). Dado que NoRC se encuentra interactuando físicamente con las copias silenciadas de rDNA, se necesita abolir esta interacción para permitir el progreso de la horquilla de replicación. Esto se logra mediante la acetilación de KAT8 sobre TIP5, subunidad de NoRC. Como consecuencia, el complejo NoRC se desprende del promotor, se relaja la cromatina y las copias de rDNA son replicadas. Luego, al final de la fase S, SIRT1 deacetila a TIP5 para que el complejo NoRC vuelva a interactuar con el promotor de rDNA y reclutar más HDACs y metiltransferasas y así, recuperar la marca epigenética represiva de la región (Zhou et al. 2009) (Figura 4).

La acetilación de KAT8 sobre TIP5 es necesaria para que el complejo NoRC se desprenda del promotor. Sin embargo, es el mismo KAT8 el cual también acetila al promotor de rDNA para que el complejo NoRC se vuelva a unir. Es decir, KAT8 cumple una función dual de forma ciclo celular dependiente.



**Figura 4.** Representación esquemática de la actividad de KAT8 sobre el complejo NoRC durante la fase S del ciclo celular (Zhou, Y. et. al. 2009).

Sin embargo, se desconocen los mecanismos implicados en la modulación de estas dos funciones, que vaya hacia la función de acetilación del promotor de rDNA o hacia la acetilación de la subunidad TIP5 de NoRC durante la fase S del ciclo celular.

Cabe destacar que la regulación de la epigenética del rDNA por parte de KAT8 ha sido descripta solamente en el contexto de la replicación del DNA y su función en la biogénesis ribosomal no ha sido explorada aún, ya sea en un contexto fisiológico o asociada a algún proceso patológico.

### **Nucleolo y Cáncer**

Las células tumorales suelen tener nucleolos grandes y una elevada tasa de biogénesis ribosomal. Es por esto que la hipertrofia nucleolar es considerada en la clínica como un signo de malignidad desde hace más de 100 años (Montanaro et al. 2008; Weeks et al. 2019).

La carcinogénesis se asocia por lo general con una mayor actividad de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores. Se ha visto que estos genes modulan, directa o indirectamente, la tasa de biogénesis ribosomal (Stępiński, D. 2018).

Muchos oncogenes, promueven la biogénesis ribosomal lo cual contribuye a satisfacer las mayores demandas de traducción de proteínas de las células tumorales. Por ejemplo, tanto el factor Myc como la vía PI3K-AKT-mTOR

regulan positivamente la biogénesis ribosomal tanto a nivel de síntesis de rRNA como de proteínas ribosomales (Chan, J. *et. al.* 2011).

También la señalización mediada por mTOR está asociada a la progresión tumoral e involucra el aumento de la capacidad global de producción de proteínas de la célula cancerosa a través de la regulación de la biogénesis ribosomal (Gentilella, A. *et. al.* 2015).

En los últimos años, se ha comenzado a explorar el rol del nucleolo en diversos procesos biológicos esenciales como, por ejemplo, la reparación de daño al DNA y se ha determinado que proteínas con funciones en reparación al daño al DNA cumplen también una función regulatoria en la biogénesis ribosomal y viceversa (Ogawa, L. M. *et. al.* 2017).

También, el nucleolo ha sido descrito como un guardián de la homeostasis y de la integridad genómica, y se ha comprobado que la disminución en la síntesis de rRNA es uno de los primeros pasos de la respuesta celular a estrés. Se han identificado más de 4,500 proteínas nucleolares, muchas de las cuales tienen una localización dinámica que incluye tanto el nucleoplasma y el citoplasma. La p53 es una proteína protectora del genoma y su disfunción fue asociado en numerosos tipos tumorales, y su nivel de expresión se encuentra bajo en condiciones fisiológicas debido a su interacción con la E3 ubiquitín ligasa HDM2. Sin embargo, en condiciones de estrés celular, HDM2 es secuestrada dentro de los nucleolos, favoreciendo la estabilización y consecuentemente el aumento de p53 (Xie, N. *et. al.* 2016). Otro ejemplo de la relación que hay entre la expresión de rRNA con la respuesta a estrés es la disminución en los niveles de ATP que tiene un efecto represivo sobre la transcripción de rDNA.

La síntesis de rRNA resulta entonces un punto clave de convergencia de la interacción de la célula con su entorno y uno de los moduladores claves de la homeostasis y la proliferación (Grummt, I. 2013). Por estos motivos, la biogénesis ribosomal es actualmente considerada una gran oportunidad terapéutica en diversas patologías y su estudio resulta, ahora más que nunca, imprescindible.

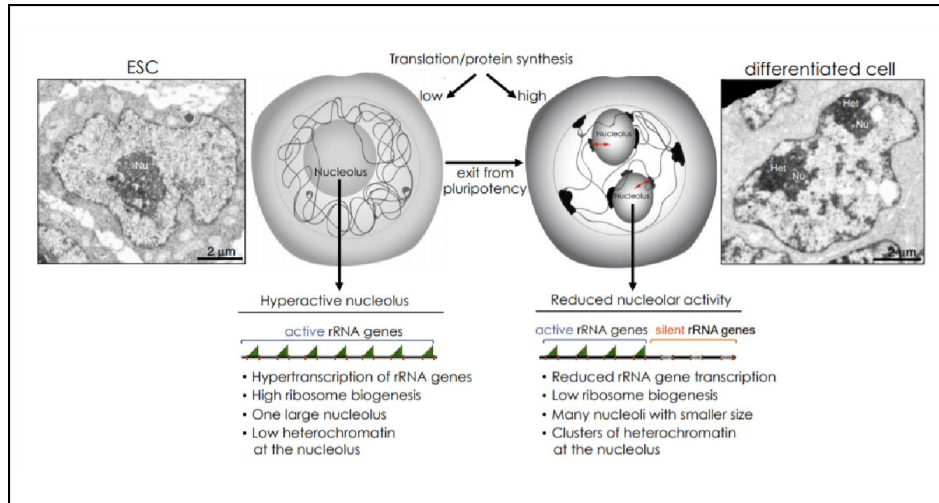
## **Nucleolo y stem**

Recientemente, el nucleolo y la síntesis de rRNA también han sido vinculadas al mantenimiento de la plasticidad y la diferenciación celular (Gupta, S. & Santoro, R. 2020). Se ha observado que factores de pluripotencialidad como POU5F1/Oct4 y SOX2 son capaces de unirse al promotor de rDNA regulando su transcripción (Zentner et al. 2014). Más aún, se demostró que una de las propiedades que sostienen el estado de pluripotencialidad en células madre son los elevados niveles de rRNA y que su disminución está implicada en el proceso de diferenciación celular (Gabut, M. *et. al.* 2020, Hayashi, Y. *et. al.* 2014).

Las células madre embrionarias (ESCs) se caracterizan por poseer un estado transcripcional hiperactivo de los genes de rDNA, con una relajación mayor de la cromatina en la región, en comparación con las células diferenciadas (Gupta, S. & Santoro, R. 2020). También se ha demostrado que las células embrionarias tienen menor grado de silenciamiento de rDNA debido a un menor reclutamiento de NoRC al rDNA (Savić, N. Bär *et. al.* 2014).

Las células madre normales no cuentan con esas copias silenciadas de rDNA, sino que todas ellas están activas, lo cual se traduce en una elevada biogénesis ribosomal (Kresoja-Rakic, J. & Santoro, R. 2019). Esto implica que durante el proceso de diferenciación celular tiene lugar un silenciamiento generalizado de rDNA y la formación de zonas heterocromatinizadas tanto en los nucleolos como la periferia nuclear. Este proceso de heterocromatización y disminución de la síntesis de rRNA y proteínas ribosomales, no sólo lleva a un estado de diferenciación celular sino que resulta clave en la determinación del destino celular, ya que su inhibición retiene a las células en un estado de pluripotencia (Savic et al. 2014; Watanabe-Susaki et al. 2014; Woolnough et al. 2016, Leone et al. 2017).

Entonces en células madre embrionarias los genes de rDNA poseen un estado transcripcional hiperactivo en comparación con células diferenciadas y el silenciamiento de la maquinaria de síntesis o pérdida de actividad conlleva a estados de diferenciación (Gupta, S. & Santoro, R. 2020).



**Figura 5.** Microscopía electrónica de barrido detallando los nucleolos de células madre embrionarias y células diferenciadas con una esquematización de los mismos. Gupta, S. & Santoro, R. (2020).

En ensayos de sobreexpresión de la proteína nucleolar Fibrilarina (FBL), la cual es necesaria en el procesamiento de pre-rRNA (Shubina, M. Y. *et. al.* 2016), se observó que promueve el estado *stem* mientras que su silenciamiento favorece la diferenciación (Watanabe-Susaki, K. *et. al.* 2014). En ensayos de inhibición de la polimerasa I, ya sea mediante el tratamiento con Actinomicina D o el inhibidor cx-5461, mostraron la reducción de la expresión de marcadores pluripotenciales, mientras que aumentaron la expresión de marcadores de diferenciación (Woolnough *et al.* 2016). Estos resultados sugieren que la síntesis y procesamiento de rRNA son procesos muy ligados al sostenimiento *stem*.

### **KAT8 en cáncer**

El gen que codifica KAT8 es esencial en el desarrollo ya que su abolición impide que los embriones de ratón progresen más allá del estadio de blastocisto (Thomas, T. *et. al.* 2008).

La reducción de los niveles de KAT8 lleva a la acumulación de aberraciones cromosómicas, a un arresto de células en la fase G2/M y a una disminución en la capacidad de reparación del DNA (Li, X. *et. al.* 2010). Por

estos motivos, KAT8 ha sido propuesto como una proteína protectora del genoma.

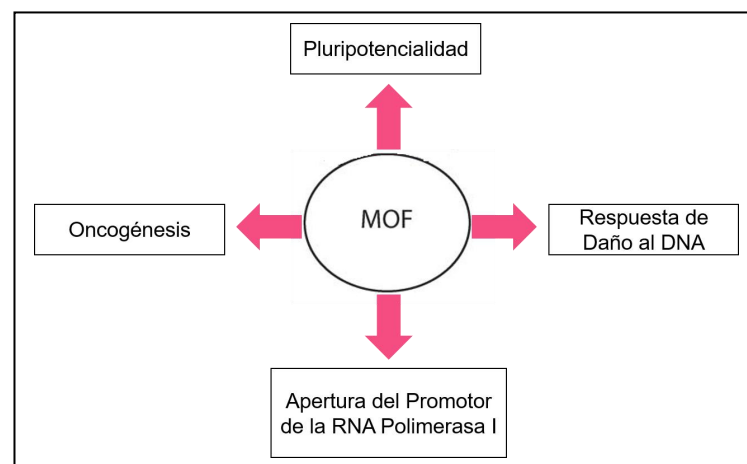
KAT8 es capaz de acetilar residuos de proteínas que no son histonas como la p53 en su lys120 (Mellert, H. S. *et. al.* 2011), luego del daño al DNA, promoviendo la apoptosis. De hecho las mutaciones en la lys120 de p53 son frecuentes en cáncer y conllevan la abolición de la transcripción de genes pro-apoptóticos como Bax y PUMA. Como era de esperarse, la depleción de KAT8 impide que se activen las vías de estos dos genes.

La sobreexpresión de KAT8 tiene un efecto positivo sobre la capacidad de reparación del DNA ante eventos de radiación ionizante. Al contrario, su silenciamiento hace a las células más vulnerables a esta forma de terapia (Gupta, A. *et. al.* 2005). En particular, se ha determinado que KAT8 se encuentra dentro de los blancos de fosforilación de ATM (*Ataxia telangiectasia-mutated*), una serina/treonina quinasa central en la reparación de daño al DNA (DSB) como los inducidos por ejemplo por el tratamiento con TMZ (Nadkarni, A. *et. al.* 2012) o por radiación ionizante (RI) (Gupta, A. *et. al.* 2014). ATM se autofosforila en respuesta al daño al DNA, lo cual la convierte en su forma dimérica inactiva a una forma monomérica activa, generando la cascada de señalización necesaria para reparar el daño inducido por RI. Durante el proceso, la KAT8 es fosforilada en Thr392 por ATM y sería clave en la vía de reparación de DSB durante la fase S/G2. Además, la activación de ATM estaría relacionada a la generación de células tumorales con propiedades *stem* en GBM en células de pacientes (Agnihotri, S. *et. al.* 2014) y se reportó que su ablación revierte el efecto de la radiorresistencia en este tipo de tumor (Nadkarni, A. *et. al.* 2014).

En algunos tipos de tumores, la expresión de KAT8 y su actividad se ha visto reducida, tanto en los niveles de su expresión como en la acetilación de la H4K16. En particular, se ha propuesto a la reducción de KAT8 como un potencial marcador tumoral en cáncer de mama y meduloblastoma. Asimismo, se ha detectado una correlación entre la baja expresión de KAT8 y un peor pronóstico, evidenciado por una menor supervivencia de los pacientes. Sin embargo, los niveles de expresión de KAT8 en muestras de pacientes es heterogénea y su rol en cáncer es aun preliminar. De hecho, también se han reportado aumentos en los niveles de expresión de KAT8 en algunos tumores,

como en cáncer de pulmón (Su, J. Wang *et. al.* 2016). Es posible, entonces, que exista un componente tejido específico que module la función de KAT8 en distintos tipos de cáncer. Sobre todo, hay evidencias en el marco del presente Tesis y en un trabajo publicado (Dong, Z. *et. al.* 2019) indicando que KAT8 es un promotor tumoral en GBM.

Por lo tanto el rol de KAT8 en diferentes patologías como el cáncer, así como de las proteínas que regulan su función es un campo de investigación aún por explorar. Conocer las funciones de estas proteínas permitiría desarrollar su futuro uso como biomarcadores y explorar futuras terapias.



**Figura 6:** Esquema representando algunas de las funciones en las cuales está implicado KAT8.

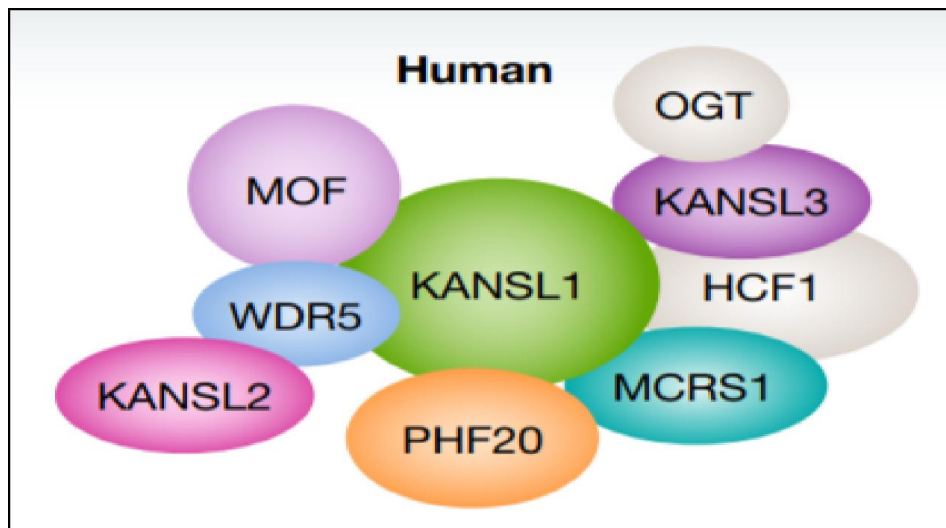
### **El complejo NSL**

KAT8 forma parte de dos complejos epigenéticos multiproteicos que se encuentran ampliamente conservados entre organismos como *Drosophila Melanogaster* y en humanos. Estos complejos son el complejo MSL (*Male Specific Lethal*) y el NSL (*Non Specific Lethal*), y la participación de KAT8 en ellos es mutuamente excluyente (Radzisheuskaya, A. *et. al.* 2021). Sus nombres derivan de los efectos determinados en estudios in vivo en *Drosophila* donde el silenciamiento de las subunidades del complejo MSL causaba un efecto en los machos exclusivamente, mientras que el silenciamiento de miembros del complejo NSL afectaba negativamente la supervivencia de tanto machos como hembras.

El complejo MSL fue el primero en ser caracterizado, como un regulador de la compensación de dosis en el cromosoma X del macho de *Drosophila Melanogaster*, pero luego se descubrieron otras funciones en mamíferos (Georgiev, P. *et. al.* 2011). Una reciente publicación indica que la acetilación de la H4K16 por KAT8 ocurre mayormente a través del complejo MSL (Radziskeuskaya, A. *et. al.* 2021).

El complejo NSL se une principalmente a promotores de genes y ha sido vinculado al aumento transcripcional de genes relacionados al estrés celular así como de aquellos con funciones esenciales (Feller, C. *et. al.* 2012). La principal actividad epigenética dependiente de KAT8 en este complejo es la acetilación de la H4K5 y K8 en la región promotora de los genes blanco (Radziskeuskaya, A. *et. al.* 2021). Sin embargo dado que los complejos MSL y NSL compiten por la incorporación de KAT8, la actividad de uno podría afectar la del otro.

El complejo NSL está compuesto por KAT8, KANSL1 (KAT8 *regulatory NSL complex subunit* 1), KANSL2, KANSL3, MCRS1 (*Microspherule Protein* 1), WDR5 (*WD repeat-containing protein* 5), OGT1 (*O-linked N-acetylglucosamine Isoform* 1), HCF1 (*Host cell factor C*) y PHF20 (PHD *Finger Protein* 20) (Cai, Y. *et. al.* 2010) (Figura7).



**Figura 7.** Representación esquemática del complejo NSL. Adaptado de Sheikh, B. N. *et. al.* 2019.

Las proteínas del complejo NSL se encuentran ampliamente conservadas siendo el porcentaje de similitud de secuencia entre humanos y ratones

cercano al 100% para todas sus subunidades (Sheikh, B. N. *et. al.* 2019). Algunas subunidades forman parte también de otros complejos epigenéticos con la excepción de KANSL1, KANSL2, KANSL2 y PHF20 que sólo han sido vinculadas al complejo NSL. WDR5, por ejemplo, pertenece al complejo NSL y al complejo MLL/SET, donde interactúa con KANSL2 y RBBP5 (*Retinoblastoma-Binding Protein 5*), respectivamente. Estas interacciones son también mutuamente excluyentes por lo que se puede apreciar la complejidad del remodelado epigenético y la forma en que los grandes complejos remodeladores de la cromatina se encuentran interrelacionados.

En CSC, se han reportado altos niveles de RBBP5 y podría estar cumpliendo un rol en la regulación de la autoperpetuación mediante la activación de genes maestros del desarrollo (Alvarado, A. G. *et. al.* 2017).

El complejo MLL/SET es una dimetilasa de H3K4, actuando como un regulador de la expresión génica. Por esto, se ha propuesto que ambos complejos NSL y MLL/SET tendrían una función en conjunto como moduladores epigenéticos (Zhao, X. *et. al.* 2013). Sin embargo, aún se desconocen los detalles de dicha relación entre ambos complejos.

MYC es un oncogén muy caracterizado que ha sido implicado en diversos tipos de cáncer y cuya función como factor transcripcional necesita de su interacción directa con WDR5. La proteína MYC se une físicamente con WDR5, de la misma forma que RBBP5 y KANSL2 se unen a WDR5. Por tanto, estas 3 proteínas competirían por el mismo sitio de unión a WDR5. Los niveles MYC suelen estar elevados en tumores de GBM con respecto al tejido normal (Annibali, D. *et. al.* 2014). Dado que MYC y KANSL2 presentan el mismo perfil de sobreexpresión y ambas compiten por la unión de WDR5, surge la incógnita acerca del efecto que podría provocar la relación entre ambas proteínas en el desarrollo tumoral.

Recientemente, se han comenzado a explorar otras funciones del complejo NSL por fuera del núcleo. Por ejemplo, se ha detectado la presencia de KAT8, KANSL1 y KANSL3 en la mitocondria y se ha reportado que el silenciamiento de esas proteínas reduce la tasa de respiración celular (Chatterjee, A. *et. al.* 2016).

Todos estos antecedentes indican que los miembros del complejo NSL son importantes para el correcto funcionamiento de la homeostasis celular. De

hecho, la desregulación de miembros de este complejo y la reducción de los niveles de marcas epigenéticas específicas resultan en desórdenes del desarrollo (Sheikh, B. N. *et. al.* 2020), desordenes neurodegenerativos (Karoutas, A. *et. al.* 2019) y distintos tipos de tumores.

Algunas de las subunidades podrían tener roles pro-oncogénicos en cáncer. MCRS1, por ejemplo, se encuentra sobreexpresada en carcinoma colorectal, gliomas y cáncer de pulmón (Li, C. *et. al.* 2016) y recientemente se reportó que la proteína PHF20 es clave en el GBM regulando su proliferación, así como la adquisición de propiedades de célula madre y respuesta invasiva (Ma, Q. *et. al.* 2020).

Sin embargo, la caracterización de la mayoría de estas proteínas es aún preliminar y se desconoce qué roles cumplen en el desarrollo tumoral. Pareciera que existen componentes tejido específicos que hacen necesario el estudio de cada subunidad en un contexto tumoral particular. Hasta la fecha, la mayoría de los trabajos se han centrado en KAT8 por ser la enzima del complejo, pero se desconoce si los efectos asociados a KAT8 están relacionados a su participación dentro del complejo y, por ende, regulados por los niveles y actividad de las distintas subunidades.

## **KANSL2**

KANSL2 es una subunidad del complejo NSL. A partir de algoritmos bioinformáticos desarrollados en el laboratorio (Rohr, C. O. *et. al.* 2013), se determinó *in silico* que el gen de KANSL2 posee en sus regiones regulatorias potenciales sitios de unión para las proteínas del *core* transcripcional de pluripotencialidad (POU5F1/SOX2), sugiriendo su regulación en el contexto *stem* (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016). Como parte preliminar de este trabajo de tesis y en colaboración, verificamos que KANSL2 se expresa en células pluripotentes embrionarias humanas y de ratón. Además, determinamos que KANSL2 se expresa en líneas comerciales de glioma humano así como en líneas de GBM derivadas de pacientes (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016). Asimismo, comprobamos que regula en forma recíproca a POU5F1, es decir, el silenciamiento en la expresión de una de las dos proteínas produce una disminución en los niveles de expresión de la otra. Además, la reducción en la expresión de KANSL2 incrementa la expresión de genes de diferenciación, así

como la disminución de la potencia *stem* celular También observamos que el silenciamiento de KANSL2 inhibe el crecimiento tumoral en ensayos *in vivo* (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016). Estos resultados sugieren que KANSL2 tiene un rol como modulador de plasticidad celular en GBM, lo cual lo convierte en un gen de gran potencial en la clínica.

Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos de acción de KANSL2. Se ha propuesto que KANSL2 actuaría como una posible moduladora de KAT8, debido a que forma parte del complejo NSL. Sin embargo, a diferencia de otros miembros del complejo NSL, como KANSL1 y KANSL3, la función de KANSL2 no ha sido explorada en detalle. Se postula incluso que podría cumplir funciones independientes de KAT8.

KANSL2 es un gen ubicado en el cromosoma 12q13.11 humano, e inicialmente se lo nombró C12orf41. Puede también encontrarse en la literatura como FLJ20436 o NSL2. En humanos se han identificado 15 transcritos con distintos niveles de validación.

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	UniProt
KANSL2-201	<a href="#">ENST00000420613.7</a>	2373	<a href="#">492aa</a>	Protein coding	<a href="#">Q9H9L4</a>
KANSL2-212	<a href="#">ENST00000550347.5</a>	2714	<a href="#">675aa</a>	Protein coding	<a href="#">F8VX10</a>
KANSL2-215	<a href="#">ENST00000553086.5</a>	1830	<a href="#">454aa</a>	Protein coding	<a href="#">F8VXI8</a>
KANSL2-203	<a href="#">ENST00000547087.5</a>	831	<a href="#">206aa</a>	Protein coding	<a href="#">H0YHR2</a>
KANSL2-213	<a href="#">ENST00000550870.1</a>	593	<a href="#">108aa</a>	Protein coding	<a href="#">F8VRX7</a>
KANSL2-214	<a href="#">ENST00000550931.5</a>	461	<a href="#">133aa</a>	Protein coding	<a href="#">F8VUX5</a>
KANSL2-208	<a href="#">ENST00000548304.1</a>	343	<a href="#">69aa</a>	Protein coding	<a href="#">F8VP38</a>
KANSL2-202	<a href="#">ENST00000546701.5</a>	1881	<a href="#">155aa</a>	Nonsense mediated decay	<a href="#">A0A024R131</a> <a href="#">Q9H9L4</a>
KANSL2-211	<a href="#">ENST00000549574.5</a>	1625	<a href="#">340aa</a>	Nonsense mediated decay	<a href="#">H0YIQ8</a>
KANSL2-206	<a href="#">ENST00000548147.5</a>	1514	<a href="#">25aa</a>	Nonsense mediated decay	<a href="#">H0YHH4</a>
KANSL2-205	<a href="#">ENST00000547582.5</a>	581	<a href="#">74aa</a>	Nonsense mediated decay	<a href="#">H0YID1</a>
KANSL2-209	<a href="#">ENST00000548701.5</a>	922	No protein	Processed transcript	-
KANSL2-210	<a href="#">ENST00000549463.5</a>	650	No protein	Processed transcript	-
KANSL2-204	<a href="#">ENST00000547536.1</a>	509	No protein	Retained intron	-
KANSL2-207	<a href="#">ENST00000548254.1</a>	468	No protein	Retained intron	-

**Tabla 2.** Las variantes transcripcionales reportadas de KANSL2 en humanos. Fuente ENSEMBL.

El análisis de la proteína KANSL2 en la base de datos UNIPROT muestra la existencia de 10 variantes proteicas.

Entry	Entry name	Length	Mass	Gene names
Q9H9L4	KANL2_HUMAN	492	55,042	KANSL2 C12orf41, NSL2
F8VX10	F8VX10_HUMAN	675	74,681	KANSL2
H0YHR2	H0YHR2_HUMAN	206	22,860	KANSL2
F8VXI8	F8VXI8_HUMAN	454	50,957	KANSL2
F8VUX5	F8VUX5_HUMAN	133	14,755	KANSL2
H0YIQ8	H0YIQ8_HUMAN	340	38,553	KANSL2
F8VP38	F8VP38_HUMAN	69	7,956	KANSL2
F8VRX7	F8VRX7_HUMAN	108	12,281	KANSL2
HUYID1	HUYID1_HUMAN	74	7,861	KANSL2
H0YHH4	H0YHH4_HUMAN	25	2,885	KANSL2

**Tabla 3.** Las variantes proteicas reportadas de KANSL2 en humanos obtenida de UNIPROT.

Al ser KANSL2 un gen recientemente identificado, no existen muchas publicaciones asociadas al gen. Sin embargo, esos estudios se centran en la variante canónica, Q9H9L4 de 55 kDa. La misma es codificada por el transcrito denominado canónico en ENSEMBL.

El segundo transcrito con mayor nivel de validación en ENSEMBL codifica para la variante proteica de KANSL2 denominada FBVX10, de 74 kDa. Dicha secuencia es idéntica a la canónica pero presenta un extremo N terminal más extenso debido a un inicio de la transcripción alternativo.

Estudios *in silico* indican que KANSL2 cuenta con dos potenciales sitios de unión al DNA en los residuos 28-92 y 302-364. Estos dominios se encuentran ampliamente conservados, lo cual hace pensar que podrían cumplir un rol importante en la función de KANSL2. Si bien no se demostró que sean funcionales, la proteína podría tener un potencial rol como factor de transcripción, o con capacidad de direccionar al complejo NSL a sus genes blanco y, de esa forma, modular la actividad de KAT8.

Previamente, nosotros reportamos que la disminución en los niveles de KANSL2 en células de GBM conlleva una disminución generalizada en los niveles de H4K16ac (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016), similar al efecto reportado en estudios de depleción de KAT8 (Taipale et al. 2005), indicando que los niveles de expresión de KANSL2 podrían afectar no solamente a la actividad del

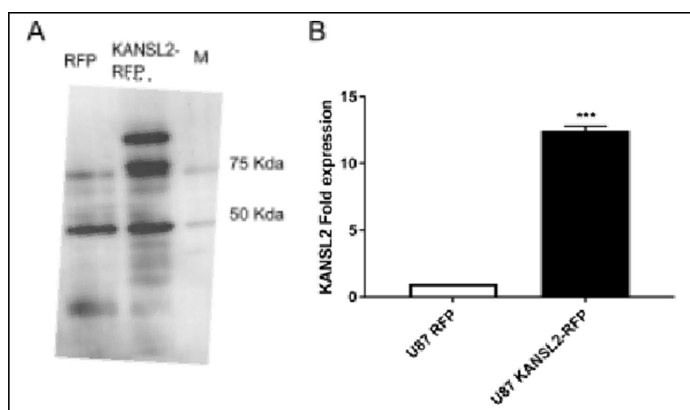
complejo NSL mediante la regulación de KAT8, sino también al complejo MSL, probablemente vía KAT8, responsable de la acetilación de H4K16ac.

### **Resultados Previos**

Durante el desarrollo de la tesis de licenciatura, se realizó una construcción génica que permite expresar a la proteína KANSL2 murina fusionada al *tag* fluorescence, RFP, como una herramienta que pudiese servir para realizar futuros ensayos de caracterización de la proteína, ya que no se disponía de un buen anticuerpo comercial.

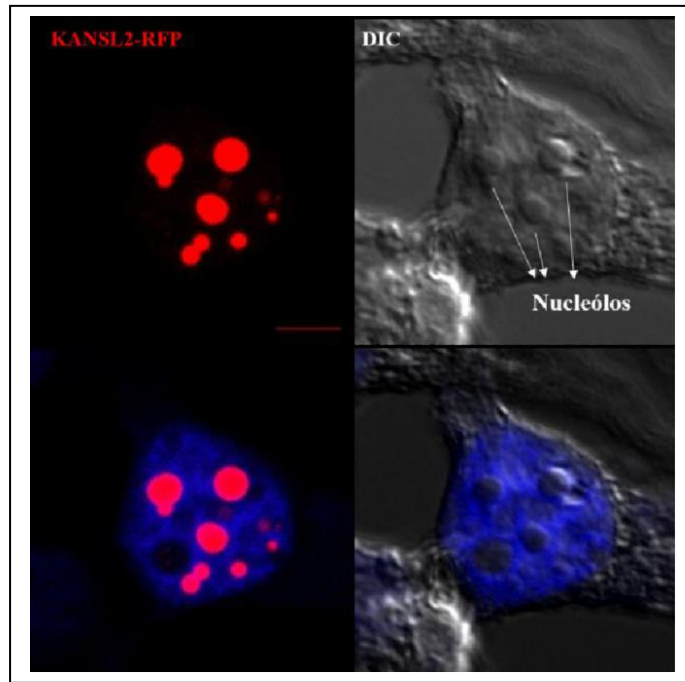
La secuencia aminoacídica de KANSL2 canónica con el programa PSORT II muestra un motivo de localización mitocondrial en el extremo N terminal y un sitio de clivaje mitocondrial (PRL|EG) comenzando en el aminoácido 49. El programa predice una localización preferentemente mitocondrial según las siguientes probabilidades: 52.2 %: Mitocondrial , 39.1 %: Nuclear , 8.7 %: Citoplasmático.

Debido a la señal de direccionamiento mitocondrial en el extremo N-terminal determinada *in silicio*, se decidió fusionar el RFP al extremo carboxi-(C)-terminal de KANSL2. La expresión y tamaño relativo de la proteína fusión KANSL2-RFP fue verificada por *western blot* a partir de células de glioblastoma U87MG transfectadas. El peso molecular del *tag* fluorescente RFP es de (28-30 kDa) mientras que la isoforma clonada de KANSL2 tiene un peso molecular de aproximadamente 55 kDa. La marca de la proteína sobreexpresada coincidió con la sumatoria de ambos pesos moleculares. También se corroboró la sobreexpresión de KANSL2 mediante un ensayo de qRT-PCR, empleándose *primers* específicos (Figura 8).



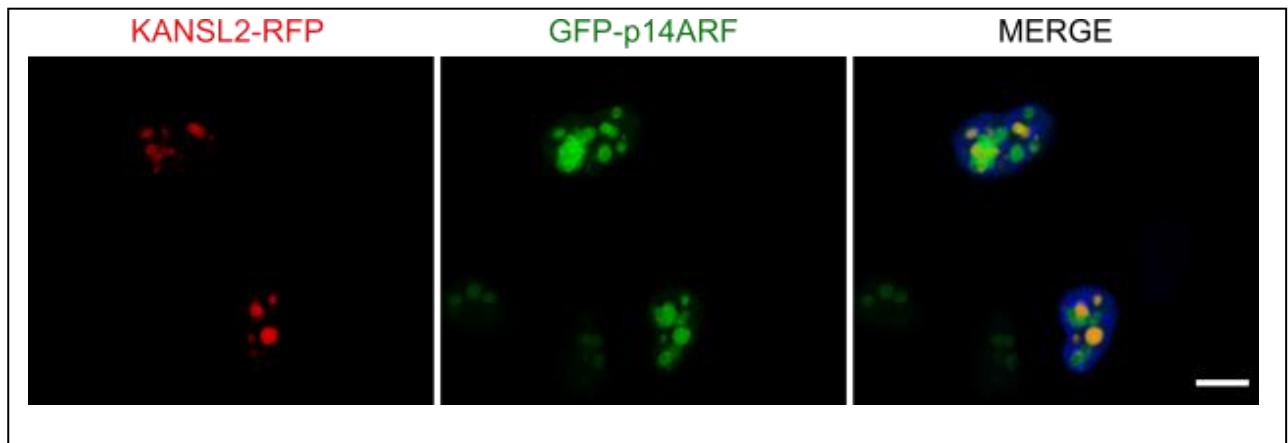
**Figura 8.** Clonado y expresión de KANSL2-RFP A) *Western Blot* de KANSL2 en células U87 transfectadas con KANSL2-RFP. B) qRT-PCR de KANSL2 en la sobreexpresión de KANSL2-RFP en U87. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

A pesar de las predicciones *in silico* de su localización subcelular, los experimentos preliminares de localización subcelular con esta construcción indicaron una clara marca nuclear en forma de focos de variable tamaño (Figura 9).



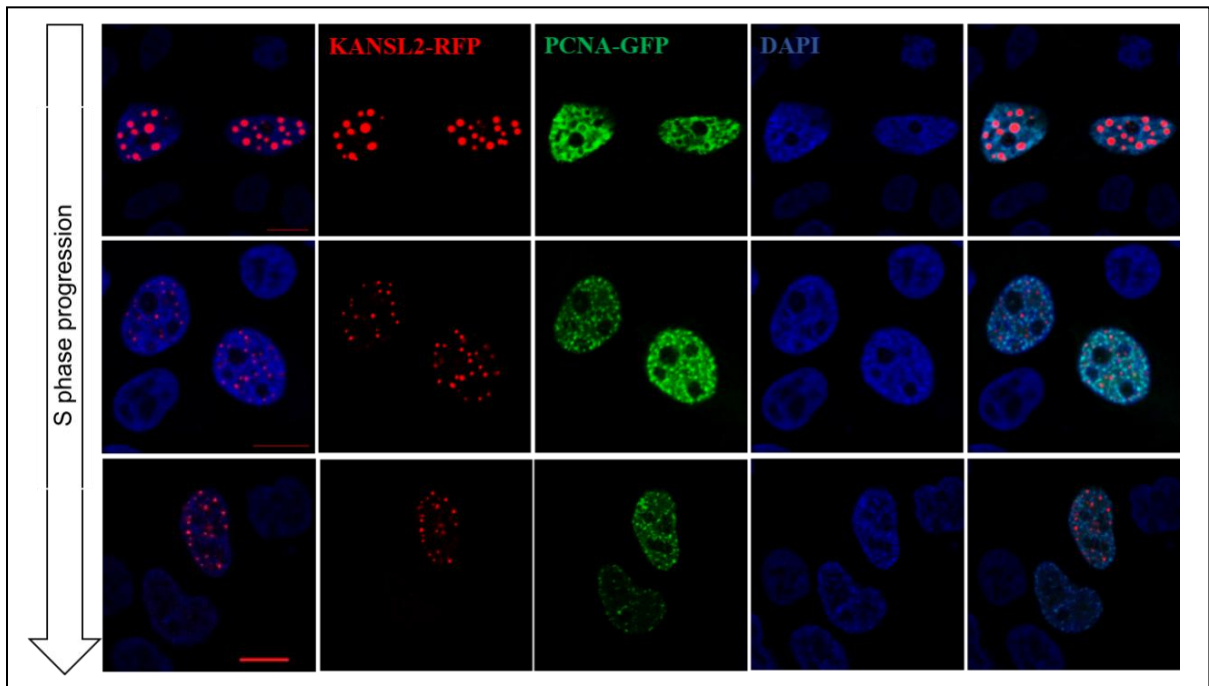
**Figura 9.** Fotografía confocal representativa de células HEK293T transfectadas con KANSL2-RFP. El segundo panel muestra una foto de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). Los nucleolos se ven como estructuras con relieve (Strzalka, W. *et. al.* 2011). Se los ha marcado con flechas. Barra, 5  $\mu$ m. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Estos focos de KANSL2-RFP se encontraron en regiones del núcleo no marcadas por DAPI, indicativo de los nucleolos (Sirri, V. *et. al.* 2008). Además, experimentos de co-transfección con la proteína nucleolar GFP-p14ARF (*ARF tumor suppressor*), mostraron una co-localización parcial (Figura 10), sustentando la hipótesis de una localización nucleolar de KANSL2-RFP (Fatyol, K. & Szalay, A. A. (2001).



**Figura 10. Fotografía confocal representativa de la sobreexpresión de KANSL2-RFP en células HEK293T y el marcador nucleolar GFP-p14ARF. Células HEK. Barra de Escala 10  $\mu$ m.**

Dada la alta diversidad observada en la localización de la proteína de fusión dentro de los nucleolos y entre las distintas células, se evaluó si la misma podía cambiar su ubicación a lo largo del ciclo, como ocurre con muchas proteínas nucleolares (Stenström, L. *et. al.* 2020). El estudio permitió identificar un patrón diferencial de localización de KANSL2-RFP con una disminución en la marca nucleolar durante la fase S del ciclo celular (Figura 11), utilizando como control la proteína PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), componente de la maquinaria de replicación (Schönenberger, F. *et. al.* 2015).



**Figura 11.** Fotografía confocal representativa de células HEK293T co-transfectadas con el marcador de replicación del DNA PCNA-GFP y KANSL2-RFP. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de Escala 10  $\mu$ m.

Nuestros estudios preliminares de KANSL2 describen una localización heterogénea con presencia de marca nucleolar dinámica durante la fase S. KAT8, la enzima del complejo NSL del cual KANSL2 forma parte, ha sido vinculado al remodelado epigenético del rDNA, con un rol dual y fundamental durante la fase S. Sin embargo, la función de KAT8 sobre las actividades asociadas al nucleolo no han sido exploradas. Por estos motivos, planteamos la posibilidad de una potencial acción en conjunto de KANSL2 y KAT8 en la regulación del rRNA.

# **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La hipertrofia de los nucleolos se ha considerado durante mucho tiempo un marcador clínico de malignidad tumoral y está estrechamente asociada con la capacidad de tumorigénesis de las células cancerosas. KANSL2 es una subunidad del complejo epigenético NSL y regula las propiedades de célula madre en GBM. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos a través de los cuales KANSL2 cumple sus funciones tumorigénicas. Previamente, se observó que la proteína KANSL2-RFP sobreexpresada tiene localización nucleolar. Basado en esto, se postula que KANSL2 cumple funciones tumorigénicas a través de una modulación de la función nucleolar.

## **Proponemos las siguientes hipótesis:**

- KANSL2 es un regulador positivo de la biogénesis ribosomal, y la proliferación celular.
- KANSL2 posee un potencial rol modulador sobre KAT8.
- KANSL2 regula genes asociados a procesos celulares básicos y de identidad celular.

## **Objetivo General**

- Caracterizar el rol de KANSL2 con énfasis en la función nucleolar.
- Describir potenciales blancos de regulación por KANSL2 y vías de señalización involucradas.

## **Objetivos Específicos**

- Estudiar la localización subcelular de KANSL2 endógeno.
- Estudiar el potencial rol regulatorio de KANSL2 sobre la síntesis de rRNA y en la proliferación.
- Estudiar el potencial rol regulatorio de KANSL2 sobre KAT8.
- Explorar nuevos *pathways* y genes blancos regulados por KANSL2 en células de GBM

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

La mayoría de los reactivos utilizados en esta tesis fueron obtenidos de la empresa SIGMA y Thermo Fisher.

## **Cultivo celular**

Las líneas humanas HEK293T (células embrionarias de riñón), HELA (células epiteliales de cérvix), U87MG (células de glioblastoma) fueron crecidas en medio DMEM, y la línea murina P19 (células de carcinoma embrionario murino) fue crecida en medio  $\alpha$ -MEM. Los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 2 mM y 50 U/ml penicilina/estreptomicina. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Las líneas G03 y G08 fueron obtenidas mediante una colaboración con el instituto FLENI. Las mismas habían sido derivadas de biopsias de GBM grado 4 y caracterizadas previamente por la institución (Videla Richardson, G. A. *et. al.* 2016) Fueron cultivadas en medio libre de suero y suplementado con B27, N2, 20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF en placas con un coating de *geltrex* para permitir su adhesión.

Las líneas de GBM derivadas de pacientes F18 y F24, se utilizaron en el ensayo de RNAseq y se obtuvieron mediante una colaboración con el Dr. Michael W. Graner y grupo del Dr. Joaquin Espinosa de la Universidad de Denver, Colorado. USA

Todas las líneas celulares (comerciales y previamente establecidas y derivadas de pacientes por los colaboradores) utilizadas en esta tesis fueron testadas por PCR en forma rutinaria para evidenciar la presencia de micoplasma.

Para el tratamiento con Actinomicina D (SIGMA A9415-2MG) se empleó la concentración 0,5 µg/ml durante 1 hora a 37°C.

Las muestras de tejido humano así como líneas celulares establecidas y derivadas de pacientes forman parte del banco de tejidos y células del Hospital Fleni quienes derivaron y publicaron previamente a la presentación de esta

tesis (Videla Richardson, G. A.) y posteriormente en colaboración (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016).

El IBloBA y el Fleni poseen un convenio de colaboración científica, así como la aprobación del comité de ética para el protocolo de investigación 25/15 "Estudio de la proteínas MYST y KANSL2 en Glioblastoma"

### **Inmunohistoquímica**

Las biopsias de GBM se realizaron en el FLENI como se describió anteriormente (Videla Richardson, G. A., 2016) y forman parte del banco de tejidos. Para la tinción inmunohistoquímica con el teñidor automático Leica Bond Max, se utilizaron el anticuerpo anti-KANSL2 (Sigma-Aldrich HPA038497). Las imágenes se adquirieron con una cámara digital NikonDXN1200F controlada por el software EclipseNet (versión 1.20.0 build 61). También se utilizó un análisis estereológico imparcial para cuantificar elementos marcados con anti-KANSL2 y anti-Ki-67 (NCL-Ki67-MM1 Novocastra Laboratories) en muestras tumorales utilizando el software Stereo Investigator Optical Dissector (MBF Biosciences, MicroBrightField, Inc). Este procedimiento estuvo a cargo del servicio de Patología del Hospital Fleni.

### **Fraccionamiento subcelular**

El protocolo de fraccionamiento subcelular y purificación de nucleolos fue adaptado de la bibliografía (Li, Z. F. & Lam, Y. W. 2015). Brevemente, las células fueron lisadas en buffer A (10 mM Hepes, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT). Se las centrifugó a 300 x g durante 10 minutos para separar la fracción citoplasmática (sobrenadante) y nuclear (precipitado). Los núcleos fueron resuspendidos en la solución S1 (0,25 M Sacarosa, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) y agregados sobre igual volumen de la solución S2 (0,35 M Sucrose, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>). Luego de una centrifugación a 1430 x g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en solución S2. Los núcleos fueron sonicados 8 veces en ciclos de 10 segundos de sonication y 10 segundos de descanso sobre hielo para evitar sobrecalentar la muestra. Luego, se agregó todo el volumen sobre igual volumen de la solución S3 (0,88 M Sucrose, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>). Se centrifugaron las muestras a 2800 x g para precipitar la fracción nucleolar. El

sobrenadante corresponde a la fracción nucleoplásmica. Los nucleolos precipitados fueron resuspendidos en solución S2.

### **Inmunofluorescencia**

Las células fueron plaqueadas el día anterior en una placa *multiwell* que contenía vidrios previamente esterilizados por flameo.

La fijación se realizó con 4% PFA (paraformaldehído) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La permeabilización se hizo con PBS 1X 0,1% Tritón X-100 durante 10 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó con BSA 5% en TBS-tween 0,05% durante 1 hora en la mesada. Entre cada uno de estos pasos se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X.

Las células fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal específico en cámara húmeda a 4°C. Los anticuerpos secundarios empleados se encuentran acoplados a los fluoróforos Alexa 488 o Alexa 647. Su incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Con el fin de delimitar los núcleos se empleó DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) durante 15 minutos para teñir el DNA. Finalmente, los vidrios fueron montados a un portaobjeto con la ayuda de Mowiol (Aqueous mounting media) (81381-50G SIGMA) y se selló los bordes con esmalte para preservar la muestra.

Las fotos fueron tomadas con un microscopio confocal AxioObserver Z1 LSM710 (Carl Zeiss). Se utilizó el *software* ZEISS ZEN Microscope para la adquisición de las imágenes.

### **Anticuerpos empleados**

KANSL2 (Sigma-Aldrich, HPA038497)

FBL (Santa Cruz Biotechnology, sc166000)

UBF (Santa Cruz Biotechnology, sc13125)

KAT8 (Santa Cruz Biotechnology, sc-271691)

Beta Actina (Santa Cruz Biotechnology, sc-4778)

GAPDH (Abcam, ab8245)

### **Análisis de colocalización**

Los análisis de co-localización fueron realizados mediante el lenguaje de programación *Python* y a través de una colaboración con la licenciada Marina Cuenca. Se empleó el método de Otsu o el coeficiente de correlación de Pearson (Ghayé, J. *et. al.* 2013) para cuantificar la co-localización de KANSL2 con el marcador nucleolar. La segmentación de objetos permitió caracterizar la localización en una región de interés ignorando, en este caso, la tinción del citoplasma.

El coeficiente de Pearson puede adquirir valores entre -1 y 1, correspondientes a los casos ideales de co-localización negativa y positiva respectivamente, Este valor no depende de la intensidad de la señal sino en la relación entre 2 señales distintas. Como referencia, se realizó un control positivo de co-localización de UBF consigo mismo. Para este control se realizó una inmunofluorescencia anti UBF, empleando 2 anticuerpos secundarios acoplados a disintos fluoróforos.

### **Sincronización celular**

Las células fueron sincronizadas mediante 2 pulsos de timidina 2 mM (T1895-1G SIGMA). La primera incubación con timidina tuvo una duración de 20 horas. Luego, se lavaron las células y se las incubó con medio fresco durante 11 horas. Se realizó una segunda incubación de 14 horas con timidina 2 mM. Concluido el segundo pulso de timidina se considero ese instante el T0 del experimento. Las células fueron incubadas con medio fresco y se obtuvo muestra en intervalos de 3 horas para ser analizadas por *Western blot*, inmunofluorescencia y citometría de flujo.

### **Citometría de Flujo**

Las células fueron levantadas con tripsina y lavadas con PBS. Fueron fijadas con 2 ml de etanol 70% frío, agregado con gotero mientras las muestras eran vortexeadas. Luego, se lavó las células una vez más con PBS y se las incubó durante media hora con 1 µg/ml de yoduro de propidio (P1304MP Life Technologies) a 4 °C.

Para analizar las muestras se utilizó un citómetro FACSCantoII (BD Biosciences, USA) y el *software* FlowJo.

### **Transfección transitoria en células de mamífero**

Las células HEK293T fueron crecidas en placas de 6 wells e incubadas con 500 ng de DNA total y PEI (polietilenimina) en relación 1:6 en NaCl 150 mM durante 4 horas. Luego, se les cambió el medio de cultivo. En el caso de las co-transfecciones se empleó una masa final de DNA de 500 ng, con partes iguales de ambos plásmidos.

En el caso de la transfección de de KANSL2, se utilizaron 100 ng (masa mínima detectable transfectada), y se completó a masa final de 500 ng de DNA con el plásmido PRK5 vacío como *carrier* de modo de aumentar la eficiencia.

Las células U87 y células derivadas de pacientes, G08 y G03, presentaron una baja eficiencia al ser transfectadas por PEI por lo que esas transfecciones emplearon lipofectamina 2000 (Invitrogen 11668-019). El DNA fue incubado durante 20 minutos con lipofectamina 2000 y medio Opti-MEM y luego agregado a los wells a transfectar.

El plásmido PCNA-GFP fue obtenido del laboratorio de la Dra. Vanesa Gottifredi y el plásmido GFP-p14ARF fue obtenido del laboratorio del Dr. Martín Monte.

El plásmido rDNA-LUC fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Samson T. Jacob (pHrD-IRES-LUC) (Ghoshal, K. *et. al.* 2004).

El plásmido Flag-KAT8 fue desarrollado por el Dr. Ronald C. Conaway (PCDNA3/Flag-MYST1) (Cai, Y. *et. al.* 2010).

### **Silenciamiento estable y transitoria de KANSL2**

Los silenciamientos estables fueron realizados con los siguientes plásmidos lentivirales shRNA Sigma Mission:

	Gen	Secuencia target	Región target	ID
shRNA KANSL2 I	KANSL2	AGATACTGATGGCCCTAATAT	3'UTR	TRCN0000434815
shRNA KANSL2 II	KANSL2	ACAGTGAAGCTGATAGCATAG	CDS	TRCN0000435099
shRNA KANSL2 III	KANSL2	CGAGAGAACTTAAAGCGATTA	CDS	TRCN0000167130
shRNA KAT8 I	KAT8	GCAAGATCACTCGCAACCAAA	CDS	TRCN0000034875
shRNA KAT8 II	KAT8	CGAAATTGATGCCTGGTATTT	CDS	TRCN0000034876

**Tabla 4.** Secuencias nucleotídicas de los shRNAs empleados en los ensayos de silenciamiento estable.

Se emplearon células HEK293T como empaquetadoras de virus. Las mismas fueron transfectadas en relación 1:2:2 con el shRNA específicos y los plásmidos empaquetadores pCMV-VSV-G y pCMV Delta R8.9. Como control se empleó el plásmido pLKO.5-puro Non-Target shRNA (#SHC202), el cual contiene una secuencia shRNA que no reconoce ningún gen. El plásmido pLKO GFP fue empleado también como control de transfección e infección. A las 24 horas luego de la transfección de las HEK 293T, se tomó el sobrenadante de cada placa, se lo centrifugó 5 minutos a 1000 xg y se lo filtró con filtros de nitrocelulosa 0,45 µm. Esto nos permitió obtener las partículas virales del sobrenadante sin ningún resto de células.

Los sobrenadantes virales se agregaron a las placas de las células a infectar, previamente plaqueadas. 48 horas después, se comenzó la selección de las células infectadas con 2,5µg/ml de puromicina hasta la muerte del control negativo.

El silenciamiento transitorio se realizó mediante una transfección con RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific 13778-075) del Dharmacon SMARTpool: ON-TARGETplus KANSL2 siRNA. Este reactivo contiene una mezcla de 4 siRNA con el fin de minimizar los efectos *off target*.

### **qRT-PCR**

El RNA total fue extraído con el reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific 15596018). Se sintetizó el DNA copia (cDNA) usando la transcriptasa reversa MMLV (Promega), empleándose random primers (Biodynamics). Se retrotranscribieron 1 µg de cada RNA, previamente cuantificados en un espectrofotometro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). El RNA fue desnaturalizado durante 10 minutos a 55 °C.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a 37 °C durante 60 minutos. La qRT-PCR se realizó por triplicado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System. Se emplearon los genes GAPDH y Beta-Actina como genes normalizadores.

La expresión relativa de los genes se calculó mediante el método  $2\Delta Ct$ .

El programa de qRT-PCR utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial: 5 minutos a 95°C
2. Desnaturalización del DNA molde: 30 segundos a 95 °C
3. Apareamiento: 30 segundos a 60 °C
4. Extensión: 40 segundos a 72 °C

Se realizaron 40 ciclos entre los pasos 2-4.

Al finalizar los ciclos, se realizó una *melting curve* para corroborar la presencia de un único amplicón, cuyo peso molecular fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa y Bromuro de Etidio.

Se listan a continuación los *primers* empleados:

KANSL2Fw	CACAGGCAACCCAGACTACC
KANSL2Rv	CCCTGAGTGGGAAGAAACCC
BetaActinaFw	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
BetaActinaRv	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
GAPDHFw	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG
GAPDHRv	TGATGACAAGCTTCCCGTTCTC
45SrRNAFw	GAACGGTGGTGTGTCGTTCC
45SrRNARv	GCGTCTCGTCTCGTCTCACT
KAT8Fw	CTTGTCTACCCACTCGTCCAG
KAT8Rv	CGGAGAAACGTACCTGTGCC
UBFFw	ACCAGCCACCTCCGAACAG
UBFRv	AGGCAGGCTCTCGAGGAAAC
POLR1EFw	GGTGTGACTGCTCTGGTCAG
POLR1ERv	GGTGCAATGGCTGTTCTCCTC
18SFW	GTAACCCGTTGAACCCATT
18SRV	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
POU5F1 Fw	GCTGGAGAAGGAGAAGCTGG
POU5F1 Rv	GCTAAGCTGCAGAGCCTCAA

**Tabla 5.** Secuencias nucleotídicas de los primers empleados en los ensayos de qRT-PCR.

### **Western Blot**

Las células fueron lisadas con el buffer RIPA (Tris HCl pH 7,5 20 mM, Tritón X-100 1%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) complementado con ortovanadato (inhibidor competitivo general de las proteínas fosfotirosilfosfatasa) y el cocktail de inhibidor de proteasas (Roche).

La concentración de las muestras fue determinada mediante el test colorimétrico de Bradford, (Bio-Rad protein assay), empleando una curva patrón de BSA. Se determinó mediante dilución de las muestras y del “blanco” que el nivel de detergentes del buffer no interfiriera con la lectura del ensayo.

Las mediciones se realizaron a una lectura de absorbancia de 595 nm en espectrofotómetro.

Previo a la corrida electroforética, las muestras fueron sonicadas e incubadas a 95°C durante 5 minutos.

Se realizó un SDS-PAGE en geles 10% poliacrilamida, sembrándose 20-30 µg totales de proteína por calle.

La transferencia se realizó durante 1 hora a 100V, empleándose una membrana de PVDF 0,45 µM (Millipore). Se utilizó rojo Ponceau S (Sal sódica del ácido 3-hidroxi-4- (2-sulfo-4- [4-sulfofenilazo] fenilazo) -2,7-naftalenodisulfónico) para verificar la eficiencia de la transferencia proteica y como un paso previo de la normalización de la cantidad total de proteína presente en la membrana.

Las membranas fueron bloqueadas con 3% BSA en TBS-Tween 0,05% durante 1 hora e incubadas con el anticuerpo primario diluido en la solución 3% BSA de bloqueo, durante toda la noche a 4°C con agitación.

Luego, se realizaron 4 lavados cada 5 minutos con TBS-Tween 0,05% y se incubó las membranas en agitación durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente anti-Rabbit o anti-Mouse (Bio-Rad 1721019 y 1706516, respectivamente).

Las membranas fueron reveladas mediante la reacción de quimioluminiscencia empleándose ECL (Supersignal, Thermo Fisher Scientific).

Se reveló también con anticuerpos anti-GAPDH o Beta-Actina como control de carga.

La cuantificación se realizó relativa al gen normalizador a través del programa IMAGEJ.

### **Ensayo de proliferación por cristal violeta**

Las células fueron cultivadas en quintuplicado en placa de 96 wells a una densidad de  $1,0 \times 10^3$  células/well. Fueron fijadas con metanol durante 15 minutos y luego lavadas con PBS. Luego, fueron teñidas con cristal violeta durante 15 minutos. Se enjuagó la placa y agregó metanol para solubilizar en colorante. Se midió la absorbancia a 570 nm para determinar la biomasa celular presente en los wells. Los resultados de absorbancia fueron relativizados a la medición de las 24 horas post plaqueo.

### **Ensayo de MTT**

Se plaquearon 10.000 células por well de p96 por quintuplicado. Se agregó 10 µl del reactivo de MTT (10 mg/mL) por well y se incubó durante 4 horas a 37° C hasta la visualización de un precipitado oscuro en el fondo del well. Luego se agregó 100 µl de isopropanol HCl 6 M. Luego de una incubación con agitación durante 15 minutos, se leyó la absorbancia a 570 nm con espectrofotómetro. Este ensayo determina el potencial de reducción de una célula. Dado que las células que se dividen rápidamente muestran altas tasas de reducción de MTT, es una medida indirecta de la viabilidad y proliferación celular.

### **Ensayo de luciferasa**

Las células fueron plaqueadas en 24 wells ( $3 \times 10^5$  cells/well) y co-transfectadas con los plásmidos reporteros correspondientes y β-galactosidasa (RSV β-galactosidase) como control de eficiencia de transfección.

24 horas después, fueron lisadas y se midieron las actividades luciferasa (mediante un luminómetro) y β-galactosidasa a 420 nm de absorbancia. En el primer caso, se agregó empleó el kit *Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer* (PROMEGA), mientras que el ensayo de β-galactosidasa se realizó mediante la incubación de los sobrenadantes con ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) a 37 °C hasta la aparición de color amarillo intenso.

Los valores de luciferasa en cada condición fueron relativizados a su control de β-galactosidasa.

### **Cultivo de esferas**

Para los ensayos de cultivos tridimensionales (3D), las células de glioblastoma tanto comerciales como derivadas de pacientes, fueron cultivadas en placas no adherentes con medio DMEM/F12 (invitrogen) sin suero y suplementado con B27, N2, 20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF (Solari, N. E. F. *et al.* 2016 y Videla Richardson, G. A. *et al.* 2016).

## **RNAseq**

Se procesaron 12 muestras totales provenientes de 2 experimentos independientes de silenciamiento de KANSL2 realizados en 2 líneas celulares derivadas de pacientes. En cada línea, se generaron las líneas shRNA NT (control), shRNAKANSL2 099 (shRNA KANSL2 II) y shRNA KANSL2 130 (shRNA KANSL2 III).

Las líneas celulares F18 y F24 utilizadas fueron obtenidas mediante una colaboración con el Dr. Michael W. Graner de la Universidad de Colorado. Ambas líneas pertenecían a tumores de GBM grado IV que fueron desarrollados en su laboratorio mediante el método Howard Fine y empleando un medio de cultivo con factores stem (medio Neurobasal A con agregados de suplementos N2 and B27, bFGF, EGF).

La línea celular F24 pertenecía a un paciente Masculino, IDH.1 positivo de 38 años, mientras que la línea celular F18 se obtuvo a partir de una paciente femenina IDH-1 negativa.

La integridad de los RNAs fue evaluada mediante Agilent RNA 6000 Pico Kit y Agilent 2100 Bioanalyzer System.

La cantidad de RNA total enviado a la empresa por cada condición fue de 1 µg.

Las librerías se realizaron mediante el Kit para illumina NEBNext® Ultra Directional RNA Library. Las mismas fueron secuenciadas con un Illumina NovaSeq 6000. La secuenciación fue *paired end* y se obtuvieron lecturas de 150 pb.

A partir de las lecturas obtenidas de la secuenciación realizada por la empresa NOVEGENE, se realizó un control de calidad de las mismas usando el software FastQC (Andrews S. *et. al.* 2010). Para el alineado con el genoma de referencia GRCh38 (ultima version disponible del genoma de referencia de *Homo sapiens*) y se utilizaron los programas HISAT2 y SAMtools para posteriormente obtener la cuantificación de la expresión a con el programa HTseq-count. Por último, el análisis de expresión diferencial entre las muestras silenciadas y sus respectivos controles fue realizado utilizando el software DEseq2 de bioconductor. Este trabajo estuvo a cargo del equipo bioinformático de la Universidad de Colorado. Parte del análisis también se realizó en el

laboratorio de la Dra. Perez Castro en colaboración con el estudiante de doctorado Nicolás Budnik.

Los análisis de expresión funcional (*Gene ontology*) fueron realizados mediante la herramienta *ENRICH*R (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) utilizando la base de datos *Bioplanet 2019*. Por otro lado, se utilizó la herramienta *toppcluster* (<https://toppcluster.cchmc.org/>).

Para el análisis de correlación de KANSL2 con otros genes de muestras de tumores de pacientes, se utilizó la base de datos TCGA-GBM (*Pancancer Atlas*) obtenida a partir de la herramienta *CBioportal* (<http://cbioportal.org/>) (Chen, E. Y *et. al.* 2013; Kuleshov, M. V. *et. al.* 2016; Xie, Z. *et. al.* 2021).

### **Análisis estadístico**

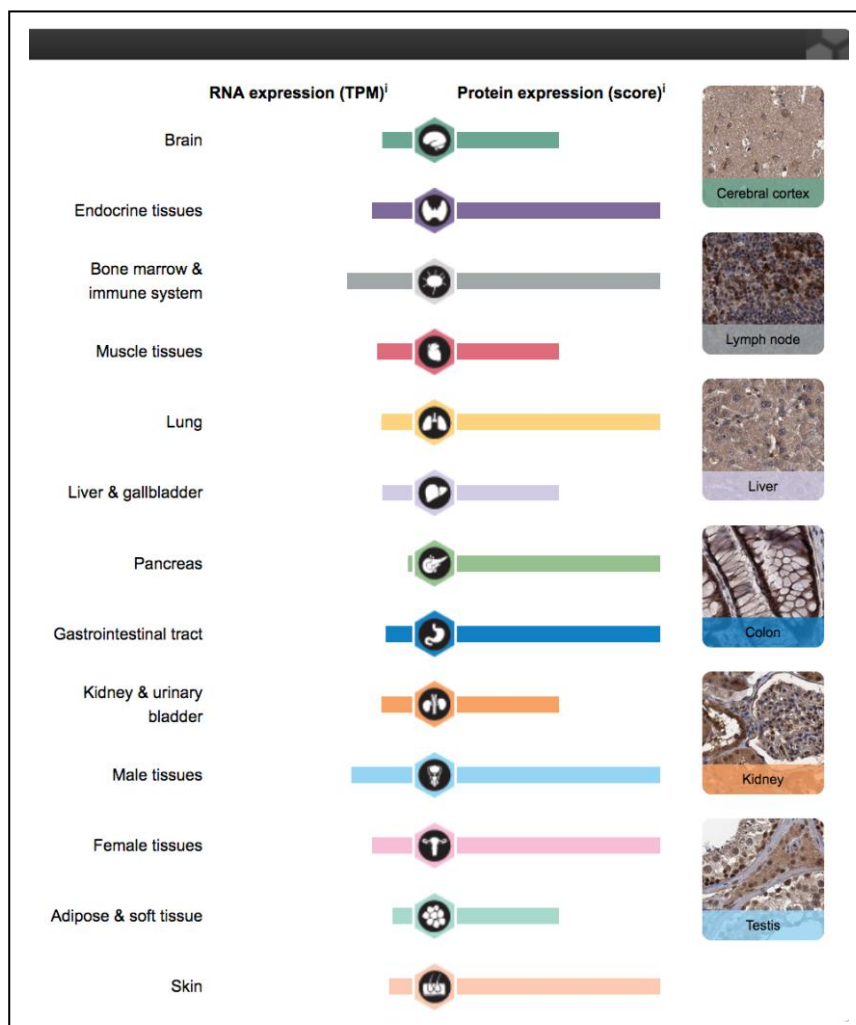
Los experimentos fueron analizados con el software Prism GraphPAD v7.0. Los resultados se expresan como media aritmética y desvío estándar de la media (Media  $\pm$  SEM) como medidas de tendencia central y de dispersión de al menos 3 experimentos independientes.

La significancia estadística de los datos fue evaluada mediante los ensayos de T de student y ANOVA de un factor según \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

# RESULTADOS

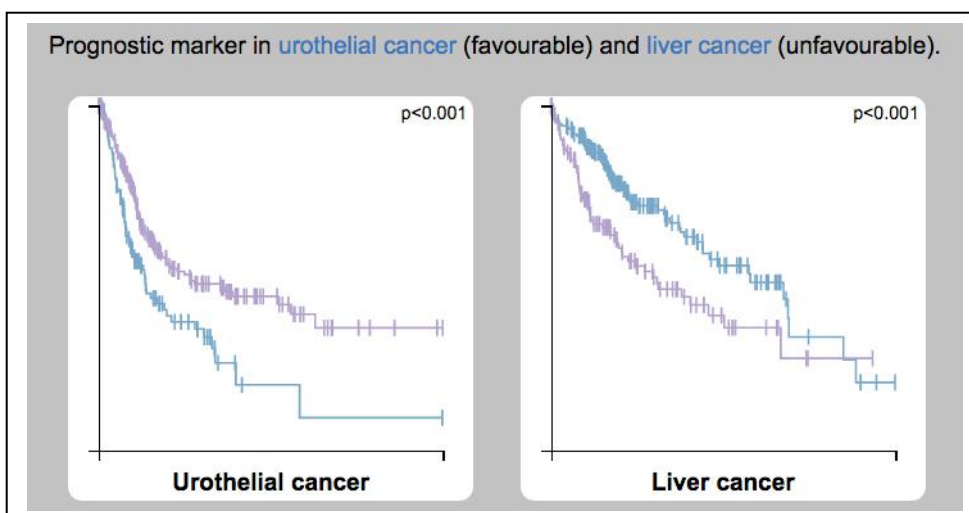
## 1. Primera caracterización de KANSL2

El análisis de expresión de KANSL2 en tejido normal del *Human Protein Atlas Project* muestra una expresión tanto del mRNA como de la proteína en una gran variedad de tejidos. El cerebro presenta una expresión intermedia, siendo los sistemas respiratorios, genitales y endocrinos aquellos con mayor expresión de KANSL2.



**Figura 12.** Niveles de expresión de mRNA y proteína de KANSL2 en distintos tejidos del cuerpo humano obtenidas del *Human Protein Atlas*

Ensayos de correlación entre los niveles de expresión de KANSL2 y la supervivencia de pacientes oncológicos en el *Human Protein Atlas* muestran distintos perfiles según el tipo de cáncer. Por ejemplo, en el caso de pacientes con cáncer urotelial, los niveles altos de KANSL2 correlacionan con una mayor supervivencia por lo que se lo describe como un gen de pronóstico favorable. Sin embargo, el efecto opuesto fue observado para cáncer de hígado.

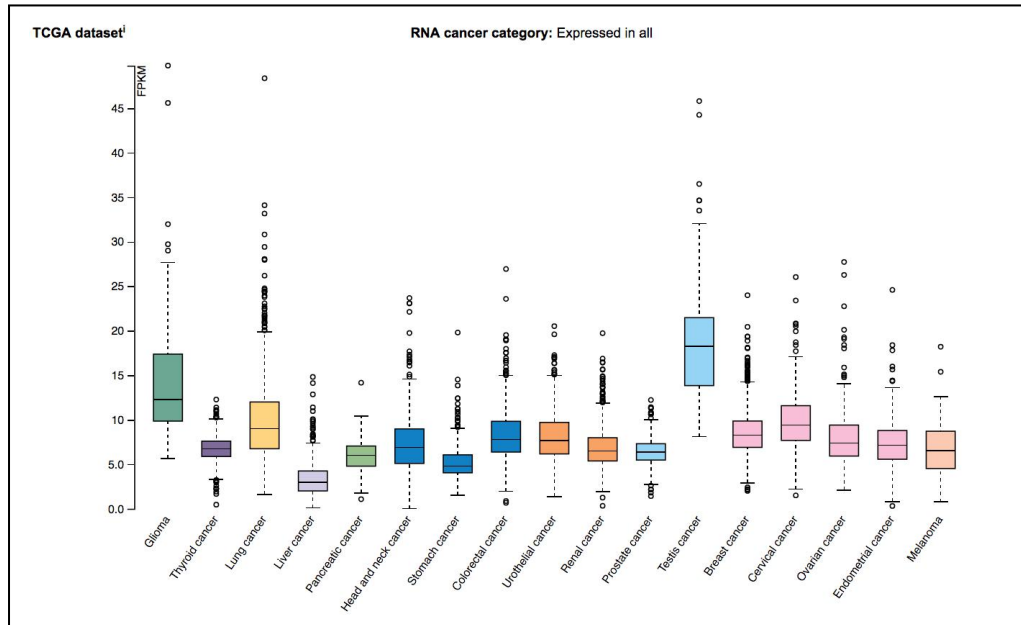


**Figura 13.** Curvas de supervivencia de pacientes con niveles de expresión de KANSL2 bajos (azul) y altos (violeta) en A) cáncer urotelial B) cáncer de hígado, con distintos niveles de expresión de KANSL2 obtenidas del *Human Protein Atlas*.

Como se ha mencionado previamente, se han encontrado distintos perfiles de correlación de supervivencia y niveles de expresión para los diversos miembros del complejo NSL. Por ejemplo, para KAT8 se observa que existen diferentes niveles de expresión y de relación con la supervivencia de pacientes con tumores de distinto origen. Por ejemplo, KAT8 tiene niveles disminuidos en cáncer gástrico (Zhu *et al.* 2015) y de ovario (Liu *et al.* 2013), pero sus niveles se encuentran elevados en cáncer de pulmón (Zhao *et al.* 2013). Esto indica la complejidad de la red de diferentes factores involucrados en los distintos tipos de cáncer. Sugiere, además, la existencia de factores tejido dependientes que afecten los niveles y roles de estas proteínas en los distintos tipos de tumores.

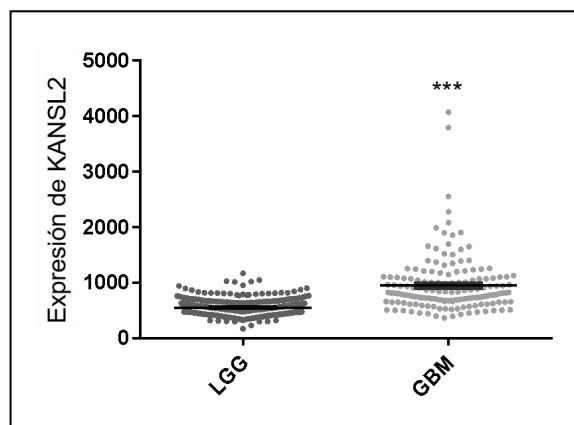
Al analizar la expresión del mRNA de KANSL2 en las bases de datos de *The cancer genome atlas* (TCGA) observamos que los tumores que presentan

mayor expresión de KANSL2 son los gliomas y el cáncer testicular. Estos resultados se obtuvieron a partir de los datos de 153 y 134 tumores distintos respectivamente.



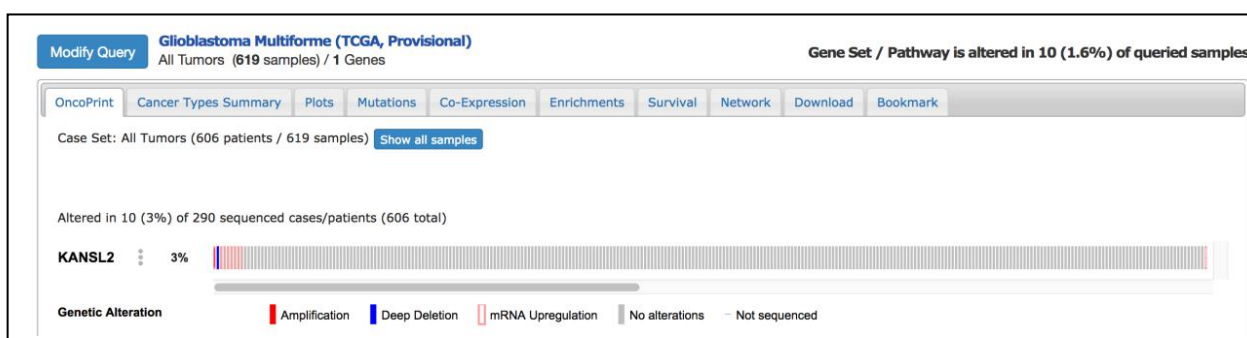
**Figura 14.** Expresión de KANSL2 (mRNA) en distintos tipos de tumores. Datos de RNAseq obtenidos a partir de TCGA.

Mediante un análisis comparativo de la expresión de KANSL2 en la base de datos de TGCA, se pudo determinar que se cuantifico un mayor nivel de expresión de KANSL2 en GBM (grado IV) que en LGG (*Low Grade Glioma*, que corresponde a aquellos tumores de grado II y III según la WHO). Esta base de datos cuenta con 606 y 516 pacientes para cada tipo de tumor, respectivamente.



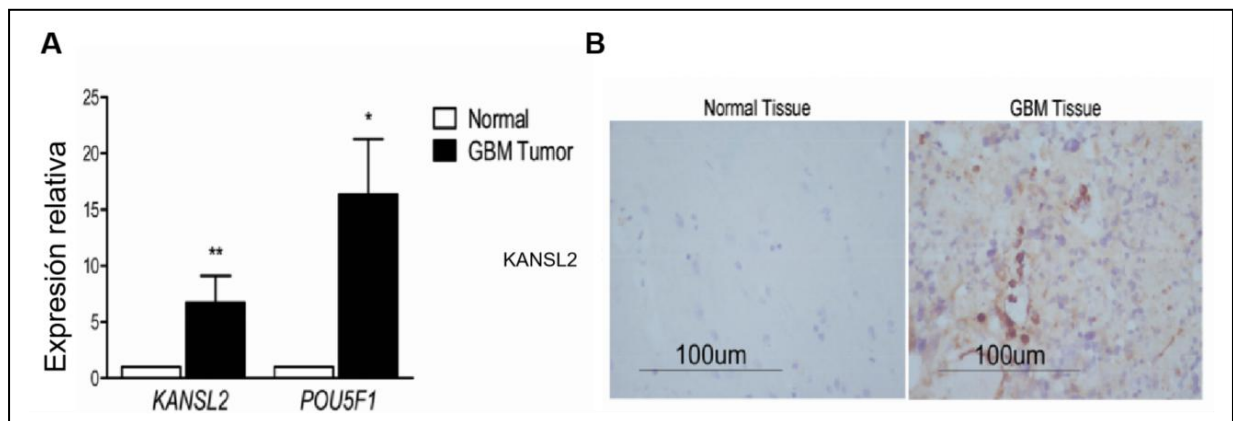
**Figura 15.** Expresión del mRNA de KANSL2 en la base de tumores de GBM de TCGA. Las cohortes TCGA LGG y GBM constan de 516 y 606 pacientes, respectivamente. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba t de Student,  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,005$ , y  $***p \leq 0,0005$ .

Pese a tener niveles alterados en varios tipos de tumores, KANSL2 muestra una muy baja frecuencia de tasa de mutaciones en los tipos de tumores analizados. Según puede verse en la base de cBioPortal, en GBM se reportaron alteraciones genéticas en KANSL2 solamente en el 3% de los tumores evaluados, la mayoría de las cuales corresponde a eventos de amplificación.



**Figura 16.** Frecuencia de alteraciones en el gen KANSL2 en tumores de GBM obtenido de cBioPortal cancer Genomics.

La falta de mutaciones no contradice un potencial rol pro tumoral de KANSL2, ya que podría estar siendo desregulada a otros niveles en la patología, como por ejemplo su expresión, estabilidad, localización o función. En concordancia, nuestro grupo de trabajo ha determinado que los niveles de KANSL2 se encuentran elevados tumores de GBM en relación a tejido normal (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016). Estos datos fueron evaluados por qRT-PCR como en estudios de inmunohistoquímica (Figura 17).



**Figura 17.** Patrón de expresión de KANSL2 en muestras de GBM humanas. A, análisis de qRT-PCR de KANSL2 y POU5F1 en tumores GBM humanos (n = 8) y un control (corteza humana). Los valores se normalizaron a los correspondientes al tejido normal. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. B, las muestras de tejido normal no tienen señal detectable para KANSL2; GBM presenta una expresión de KANSL2 de moderada a intensa ( $\times 400$ ) y se limita principalmente a los vasos sanguíneos tumorales y las células tumorales perivasculares. También se observaron pocas células aisladas con una fuerte tinción de KANSL2 en el tejido “normal” circundante al tumor. Adaptada de Solari, N. E. F. *et. al.* 2016. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

## **Conclusiones**

-KANSL2 se expresa en todos los tejidos incluido el cerebro.

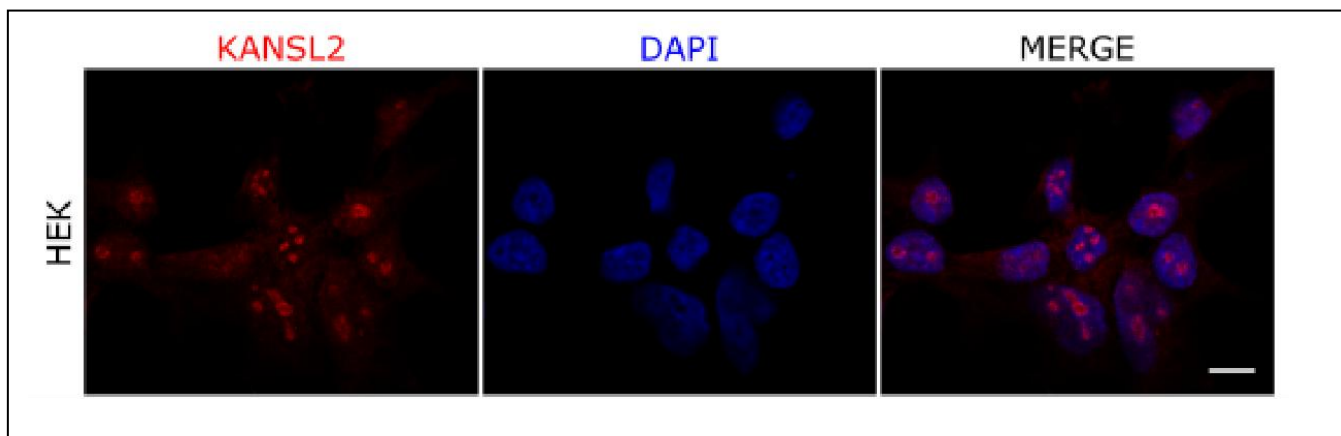
-KANSL2 pareciera mostrar un patrón de expresión y función tejido dependiente, ya que sus niveles correlacionan de distinta forma con la sobrevida de los pacientes en distintos tipos de tumores.

-La expresión de KANSL2 se encuentra elevada en gliomas, siendo mayor su expresión en GBM con respecto a LGG.

-KANSL2 presenta baja frecuencia mutacional en GBM.

## **2. Caracterización de la localización subcelular de KANSL2**

A continuación, se estudió la localización subcelular de KANSL2 endógeno en distintos tipos celulares. Se realizó una inmunofluorescencia (IF) en células HEK293T y se empleó DAPI para teñir el DNA y distinguir los núcleos y los nucleolos (los cuales se evidencian como regiones oscuras sin tinción de DAPI) (Pontvianne, F. *et. al.* 2016).



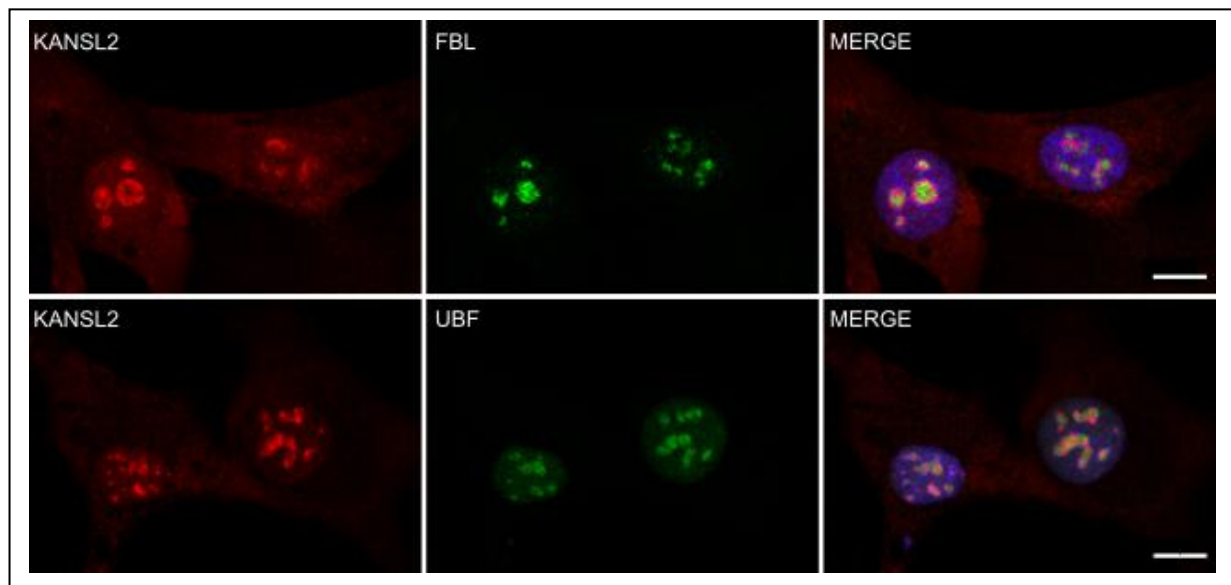
**Figura 18.** Fotografía confocal representativa de la localización subcelular de KANSL2 en células HEK293T. Las células fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo anti-KANSL2. Se evaluaron más de 200 células. Barra, 10  $\mu$ m.

Como se puede observar (Figura 18), KANSL2 endógeno presentó una localización subcelular muy heterogénea entre las distintas células, con clara marca de los nucleolos, de manera similar a lo reportado en los ensayos preliminares de localización de la construcción KANSL2-RFP. A diferencia de KANSL2-RFP, se detectó sin embargo, marcas tanto en los núcleos como en los citoplasmas. Algunas células presentaron acúmulos subnucleares cuyo tamaño y número presentaron también gran variabilidad.

KANSL2 es un gen que presenta diversas isoformas, las cuales serían capaces de ser reconocidas por el anticuerpo empleado. Esto podría explicar el patrón de localización heterogéneo observado para KANSL2 endógeno.

Para confirmar que los acúmulos subnucleares de KANSL2 endógeno se encontraban en los nucleolos, se emplearon 2 marcadores nucleolares: FBL (*rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin*) y UBF (*Upstream binding factor*).

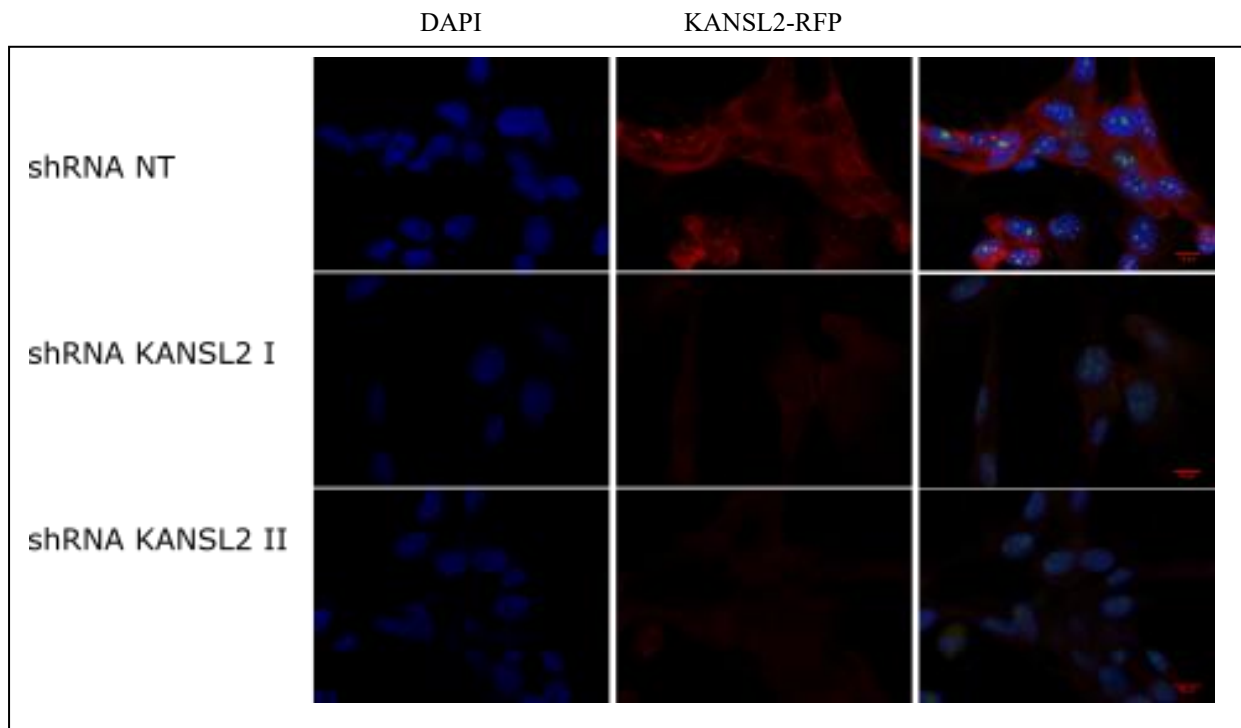
Se realizó un ensayo de IF en células U87MG, línea comercial modelo de GBM. Como se puede observar claramente (Figura 19), KANSL2 presentó co-localización parcial con ambos marcadores.



**Figura 19.** Fotografía confocal representativa de la localización nucleolar de KANSL2. Detección de KANSL2 endógeno en células U87 mediante inmunofluorescencia. Se observó colocación de KANSL2 con los marcadores nucleolares FBL (panel superior) y UBF (panel inferior). Se evaluaron más de 200 células. Barra, 10  $\mu$ m.

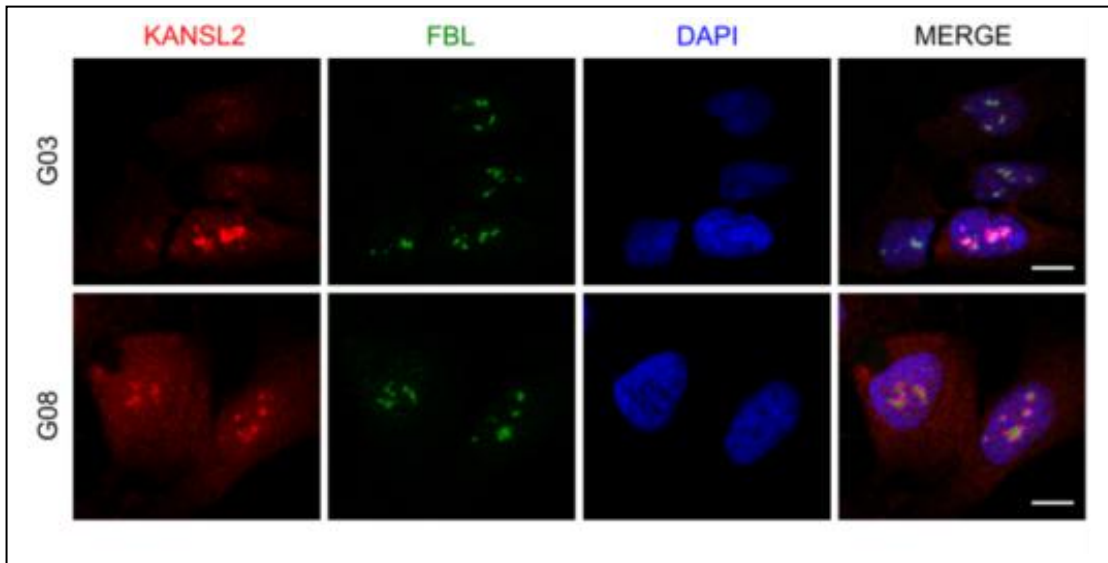
Como control y para confirmar la especificidad del anticuerpo empleado, se realizó una IF en células U87MG con silenciamiento estable para KANSL2 (ver generación de estables silenciadas en la sección 4. KANSL2 como regulador de rRNA). En este caso, la señal para KANSL2 endógena disminuyó significativamente (Figura 20), indicando que las señales detectadas en la Figura 19 eran específicas.

En todas las líneas tumorales evaluadas (HEK293T, HELA, U87MG, LN229, entre otras), las IF para la detección endógena de KANSL2 revelaron un patrón similar, independientemente del tipo de tejido de origen (resultados no mostrados). Nuevamente, la marca nuclear detectada para KANSL2 endógena no fue homogénea sino que presentó un variable número y tamaño de acúmulos dentro de la célula. Dichos focos subnucleares coinciden con zonas depletadas de la tinción con DAPI que corresponden a los nucleolos.



**Figura 20.** Fotografía confocal representativa de la inmunofluorescencia de KANSL2 endógeno en células U87MG con silenciamiento estable de KANSL2. (NT: non-targeting y dos shRNA independientes: shRNA KANSL2 I y shRNA II) Barra, 10  $\mu$ m.

También se verificó la localización endógena de KANSL2 mediante IF en líneas derivadas de pacientes de GBM grado IV. Se utilizaron las líneas G03 y G08 que poseen mayor similitud genética a los tumores obtenidos de pacientes (Videla Richardson, G. A. *et. al.* 2016) que las líneas comerciales de GBM. Aunque el ensayo se realizó en un formato 2D, como en las U87MG, las condiciones de cultivo de estas líneas incluye el agregado de factores que promueven la expresión de diversos marcadores de plasticidad celular (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016). El patrón de localización subcelular de KANSL2 en las líneas G03 y G08 reprodujo lo observado en las células comerciales (Figura 21).

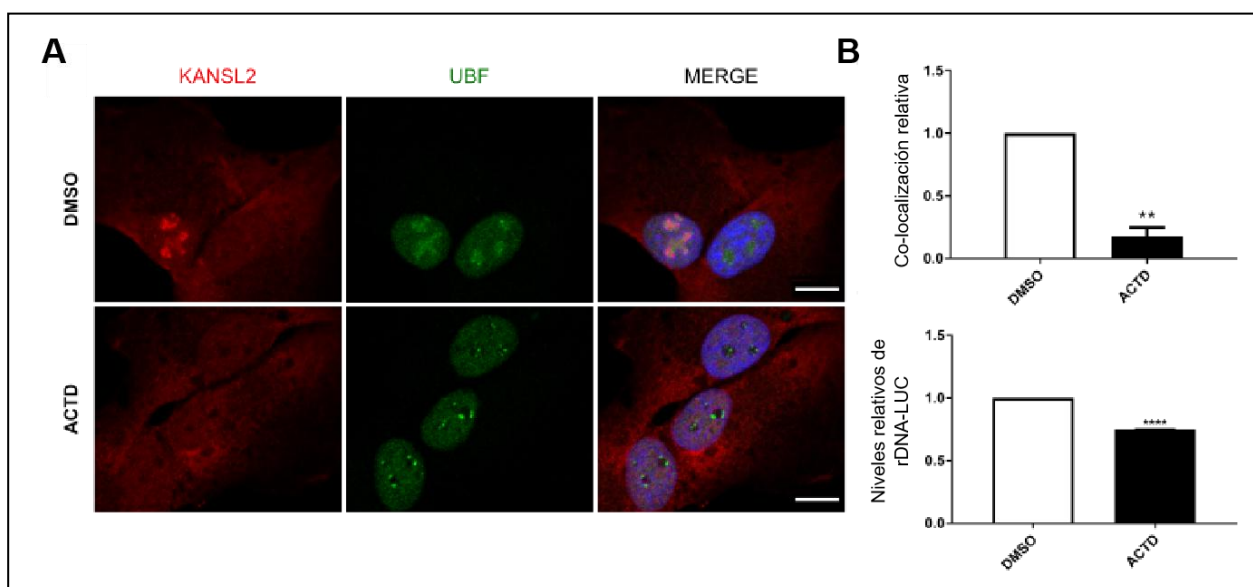


**Figura 21.** Fotografía confocal representativa de la localización nucleolar de KANSL2. Detección de KANSL2 endógeno mediante inmunofluorescencia en las líneas celulares derivadas de pacientes de glioblastoma G03 (panel superior) y G08 (panel inferior). Se observó colocalización de KANSL2 con el marcador nucleolar FBL. Se evaluaron 100 células. Barra, 10  $\mu\text{m}$ .

Para caracterizar el comportamiento de KANSL2 en el nucleolo, se realizó un tratamiento con ACTD (actinomicina D). La ACTD es un inhibidor de RNA polimerasas. La RNA polimerasa más activa en la célula es la RNA polimerasa I, responsable de la transcripción del RNA ribosomal en los nucleolos, y a bajas dosis de ACTD, se inhibe a la RNA pol I mayoritariamente (Shav-Tal, Y. *et. al.* 2005). Como consecuencia de la inhibición de la síntesis de rRNA, muchos de los componentes nucleolares son re-localizados fuera de nucleolos. Algunos factores esenciales, como UBF son desplazados desde los nucleolos hacia las zonas perinucleolares en forma de pequeños focos (Pistoni, M. *et. al.* 2010), lo cual favorece la pronta reanudación de la síntesis de rRNA en caso de finalizar la inhibición. Por este motivo, el cambio de la localización de UBF endógeno fue empleado como control positivo de la técnica.

La dosis empleada para el tratamiento con ACTD se determinó realizando una curva de concentración para la línea U87 en base a las dosis empleadas en otras líneas celulares en la bibliografía. Se trabajó con la menor dosis a la cual se observó el cambio de localización de UBF, en ausencia de muerte celular. Como control se utilizó el vehículo DMSO.

El tratamiento de las células con ACTD, generó una disminución de la marca por IF para KANSL2 de patrón nucleolar. Mediante un análisis de la cuantificación relativa entre UBF, utilizado como control y KANSL2, se verificó que la señal de KANSL2 en el nucleolo disminuyó significativamente durante el tratamiento (Figura 22).



**Figura 22.** Fotografía confocal representativa de la localización de KANSL2 endógeno frente al tratamiento con Actinomicina D. El tratamiento a bajas dosis de Actinomicina D (ACTD) inhibe la transcripción de rRNA en los nucleolos. A) Como control positivo se empleó a UBF el cual, ante la desorganización nucleolar, migra hacia la periferia del nucleolo. Barra, 10  $\mu$ m. B) Arriba. Cuantificación de la colocalización relativa entre KANSL2 y UBF en células U87 tratadas con ACTD. Abajo. Actividad relativa luciferasa de la construcción rDNA-LUC transfectada en células tratadas con ACTD. Se evaluaron más de 300 células. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

De igual manera, bajo estas condiciones, se transfectó a las células con un plásmido reportero del promotor del gen de rRNA (pHrD-IRES-LUC) (Ghoshal,

K. *et. al.* 2004). La cuantificación de la actividad luciferasa evidenció una disminución significativa en la actividad transcripcional de la RNA polimerasa I (Figura 22B), lo cual sirve como control del tratamiento con ACTD.

Estos resultados sugieren que la localización de KANSL2 se correlaciona con la actividad transcripcional en los nucleolos y podría ser dinámica dependiendo de las condiciones celulares.

Previamente, se había planteado la posibilidad de que la marca heterogénea de KANSL2 estuviera relacionada a la existencia de varias isoformas. Por este motivo, se realizó un fraccionamiento subcelular en células de GBM U87MG. Se evaluaron las fracciones citoplasmáticas (Cp), nucleoplasmáticas (Np) y nucleolares (No), empleándose a las proteínas GAPDH y FBL como controles de cada fracción (Taha, M. S. *et. al.* 2014, Amin, M. A. *et. al.* 2007).

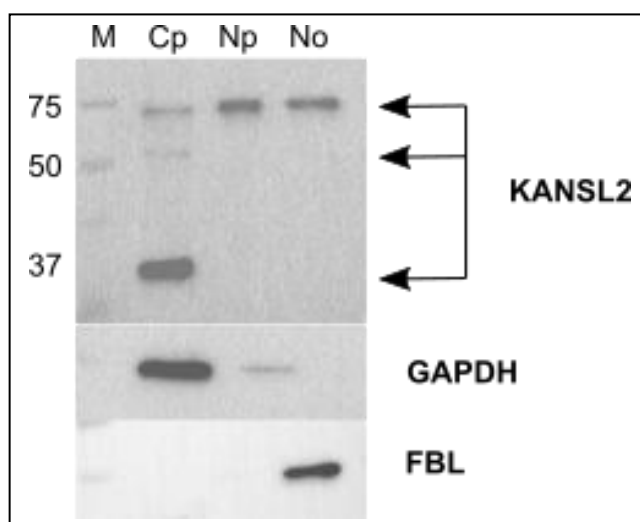
La evaluación electroforética de los distintos extractos proteicos obtenidos de los compartimientos celulares reveló bandas específicas correspondientes a KANSL2 con diferente movilidad. Una primera observación a destacar es que todas las bandas detectadas se encontraron en la fracción citoplasmática. Esto no necesariamente implica que todas ellas se encuentran en el citoplasma, sino que podría tratarse de algún nivel bajo de contaminación de otras fracciones. Si bien la técnica de fraccionamiento subcelular mediante gradiente de sacarosa permite enriquecer en las distintas fracciones, esto no implica que la purificación sea de manera absoluta.

La banda de 37 kDa aproximada fue detectada solamente en la fracción citoplasmática (Figura 23), lo cual sugiere que la localización de esta isoforma es citoplasmática. El tamaño de esta banda coincide con una de las isoformas reportadas en las bases de datos UNIPROT. Sin embargo, la misma esta catalogada en ensembl como posible blanco de *nonsense mediated decay*. Por lo tanto, no se pudo aseverar la identidad de esta banda. Cabe destacar, sin embargo que en ensayos de silenciamiento específico para KANSL2, se evidenció por *western blot* una disminución en la intensidad de esta banda sugiriendo que la misma es específica de KANSL2.

Las fracciones nucleares y nucleolares presentaron mayormente la banda de 75 kDa. Según las bases de datos bioinformáticos, KANSL2 posee una isoforma de este peso molecular, producto de un sitio alternativo de inicio

de la transcripción. Por lo tanto, es posible que esta sea la isoforma de igual secuencia que la canónica de 55 kDa pero con un extremo N terminal diferencial.

La banda de 55 kDa, cuyo peso coincide con la isoforma denominada canónica, tuvo bajos niveles de detección en todas las condiciones. De hecho, en la figura 23, se detectó únicamente en la fracción citoplasmática pero, al ser tan bajos sus niveles, no fue detectado en la demás fracciones, tal vez por encontrarse por debajo de los límites de detección por esta técnica.



**Figura 23.** Fraccionamiento subcelular revelado por *western blot* para KANSL2. Las distintas fracciones subcelulares de células U87: citoplasma (Cp), nucleoplasma (Np) y nucleolo (No). Se empleó GAPDH y FBL como controles de las fases citoplasmática y nucleolar, respectivamente.

## **Conclusiones**

-KANSL2 posee una localización celular heterogénea y con presencia de marca nucleolar.

-Las líneas celulares derivadas de pacientes de GBM reproducen el perfil de localización de KANSL2 endógena de las células HEK293T y U87MG.

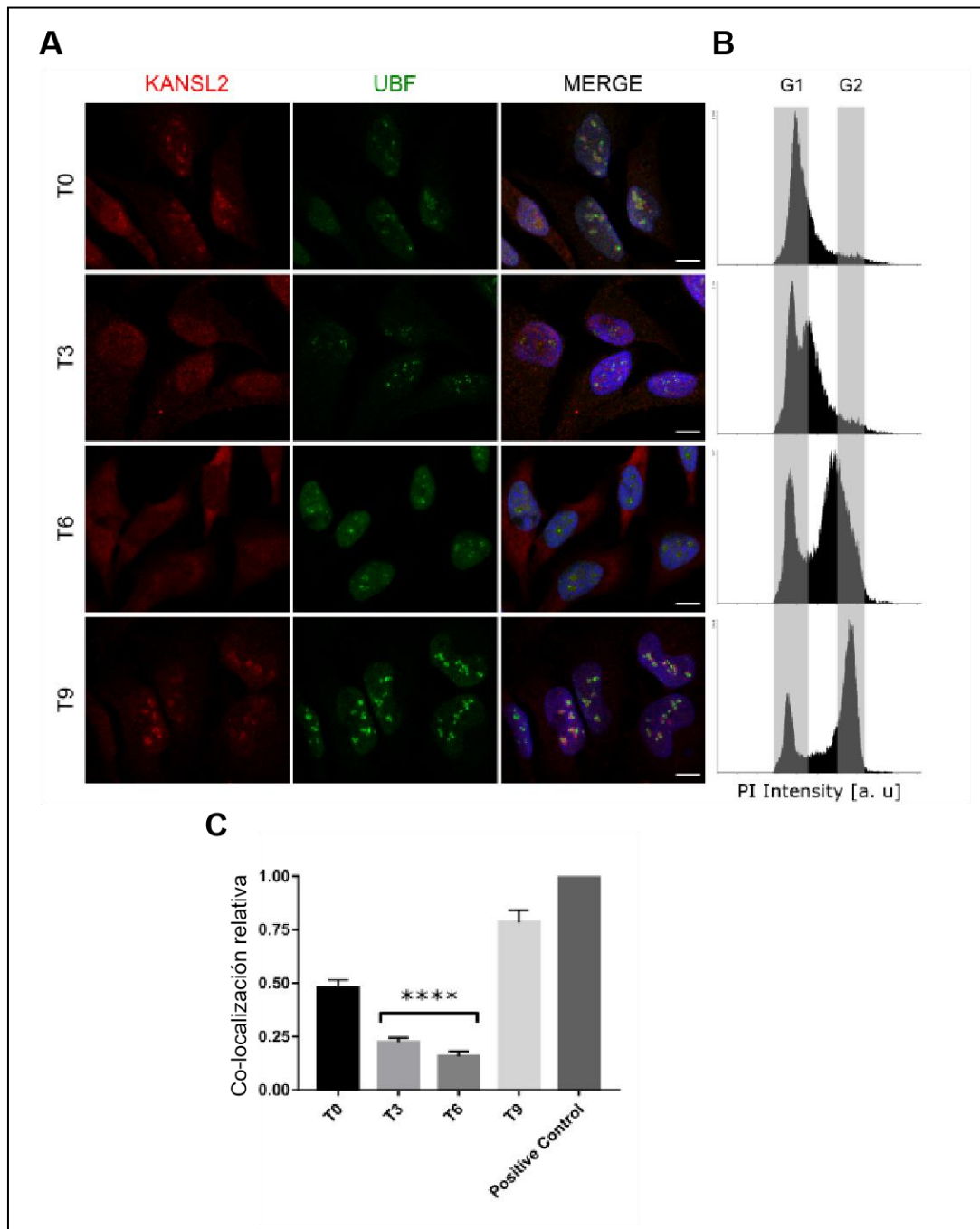
-La localización de KANSL2 dependería de la actividad nucleolar y dependería de la actividad de RNA polimerasa I.

-Habría localización subcelular diferencial isoforma dependiente.

### **3. KANSL2 en el ciclo celular**

Ya en resultados preliminares habíamos observado que cultivos asincrónicos de células HEK293T mostraban que la localización nucleolar de la proteína KANSL2-RFP disminuía durante la fase S del ciclo celular. Se decidió entonces evaluar si el comportamiento de la proteína KANSL2 endógena era dinámico a lo largo del ciclo celular. Para esto, fue necesario poner punto la sincronización del ciclo celular mediante un doble pulso de timidina. Se decidió trabajar con la línea celular HeLa por dificultades técnicas en la puesta a punto de la sincronización en la línea U87MG. Con altas dosis de timidina, se interrumpe el metabolismo de deoxinucleótidos mediante inhibición competitiva. La consecuencia de esto es el bloqueo de la síntesis de DNA. Así, este método permite bloquear las células en la transición entre las fases G1 y S. Se emplearon 2 pulsos con un intervalo de tiempo de rescate con medio de cultivo normal para obtener una sincronización uniforme de las células como esta reportado previamente (Chen, G. & Deng, X. 2018). Una vez concluido el tratamiento, se reinició el ciclo celular.

A distintos tiempos luego del tratamiento de sincronización, se determinó la localización de KANSL2 mediante IF. Como control, se realizó una tinción con anti-UBF para delimitar los nucleolos y se cuantificó su colocalización con KANSL2. Además, para cada tiempo evaluado, se realizó una tinción con yoduro de propidio. Esto permitió corroborar la sincronización de cada muestra en el citómetro de flujo (Figura 24).



**Figura 24.** Localización nucleolar en células HeLa sincronizadas A) Colocalización de KANSL2 endógeno con UBF en células HeLa sincronizadas con doble pulso de timidina T0, T3 (3 hs), T6 (6 hs) y T9 (9 hs). Barra, 10  $\mu$ m. B) Perfiles de intensidad de yoduro de propidio obtenidos por citometría de flujo correspondiente a cada uno de los tiempos evaluados (unidades arbitrarias, a.u). C) Colocalización relativa de KANSL2 y UBF en las distintas muestras sincronizadas. Se evaluaron 300 células . \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

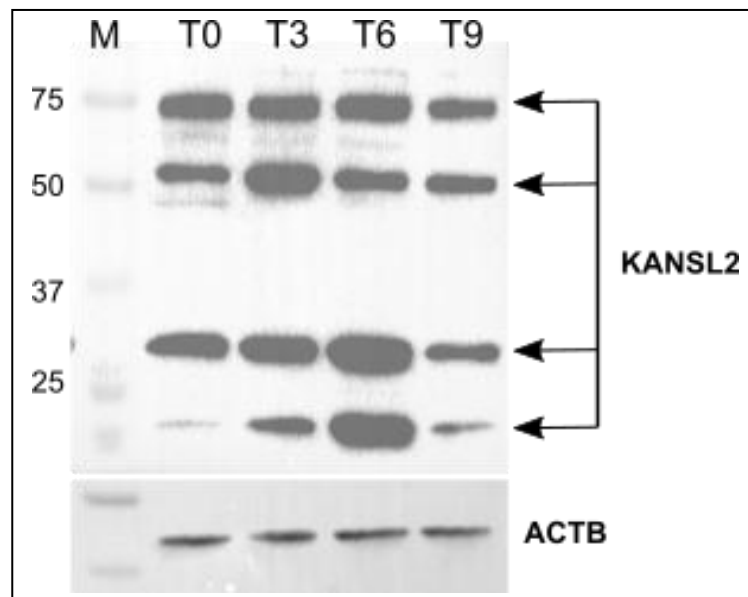
Como se puede observar (Figura 24), se detectó una disminución de la marca nucleolar de KANSL2 a las 3 y 6 horas (T3 y T6). En estos tiempos se verificó un enriquecimiento poblacional de células en la fase S, como puede verse en el análisis del ioduro de propidio. KANSL2 no sólo disminuyó su localización nucleolar sino también cambió su patrón, observándose la desaparición del puntillado previo adoptando una marca más homogénea. Además, una comparación entre los tiempos T3 y T6, muestra que la marca de KANSL2 a las 3 hs (T3) es predominantemente nuclear, mientras que a las 6 hs (T6) es citoplasmática. Si bien estas proteínas pueden presentar distintas localizaciones subcelulares (Chatterjee, A. *et. al.* 2016), esta es la primera vez que se determina que KANSL2 presenta re-localización en forma dinámica durante la progresión del ciclo celular.

Dado el patrón observado, nos preguntamos si, además de un cambio de localización subcelular, podrían existir variaciones en los niveles proteicos de KANSL2 en las distintas fases. Para ello, se determinó mediante *western blot* los niveles de KANSL2 en cada tiempo de sincronizada. Se empleó actina (ACTB) como control de carga. Como puede observarse (Figura 25), el mayor cambio detectado ocurrió en las bandas de menor peso molecular. En primer lugar, se puede detectar una banda de 25 kDa que, previamente no había sido visualizada en el fraccionamiento (Figura 23). El hecho de que el perfil de bandas específicas de KANSL2 sufra variaciones, sugeriría cierto dinamismo en la expresión de las distintas isoformas de KANSL2 en función de la condición de cultivo. En este caso, la banda de menor peso molecular tuvo su máxima intensidad en los tiempos T3 y T6. Dado que el porcentaje de células que se encuentra normalmente en fase S en un cultivo asincrónico es bajo, esto explicaría porque esta banda de 25 kDa es difícil de detectar.

En segundo lugar, notamos que la isoforma de aproximadamente 37 kDa, de localización citoplasmática aumenta durante la fase S. Esto podría concordar con el aumento de la marca citoplasmática en esta etapa del ciclo.

La banda de 75 kDa, que había sido la detectada mayormente en núcleos y nucleolos (Figura 23), y no presentó grandes variaciones en sus niveles de expresión en las distintas fases. Esto sugiere que la disminución de las marcas nuclear y nucleolar de KANSL2 no estaría asociado con una disminución de los

niveles de expresión de esta isoforma, sino de su re-localización dentro de la célula.



**Figura 25.** Western blot de KANSL2 en las distintas fases sincronizadas de células HeLa. ACTB fue usado como control de carga. Los niveles totales de KANSL2 no presentan variación durante el ciclo lo cual sugiere que la disminución de la marca nucleolar durante la fase S se debería a una redistribución de la proteína.

Nota: la banda de aproximadamente 55 kDa se evidencia en todas las células y en general en menor proporción que las otras isoformas.

## **Conclusiones**

-La localización subcelular de KANSL2 es dinámica a lo largo del ciclo celular.

-La marca nucleolar de KANSL2 endógena disminuye durante la fase S, de manera similar a la construcción heteróloga KANSL2-RFP.

- KANSL2 posee una localización mayoritariamente citoplasmática al final de la fase S del ciclo, lo cual concuerda con un aumento en la expresión de la isoforma citoplasmática de 37 kDa. También se detectó una cuarta isoforma de menor peso molecular, alrededor de 20-25 kDa, durante la fase S.

- La disminución de KANSL2 nuclear/nucleolar no se correlaciona con cambios en los niveles de la isoforma 75 kDa. por lo cual podría tratarse de una re-localización de la proteína dentro de la célula.

#### **4. KANSL2 como regulador de rRNA**

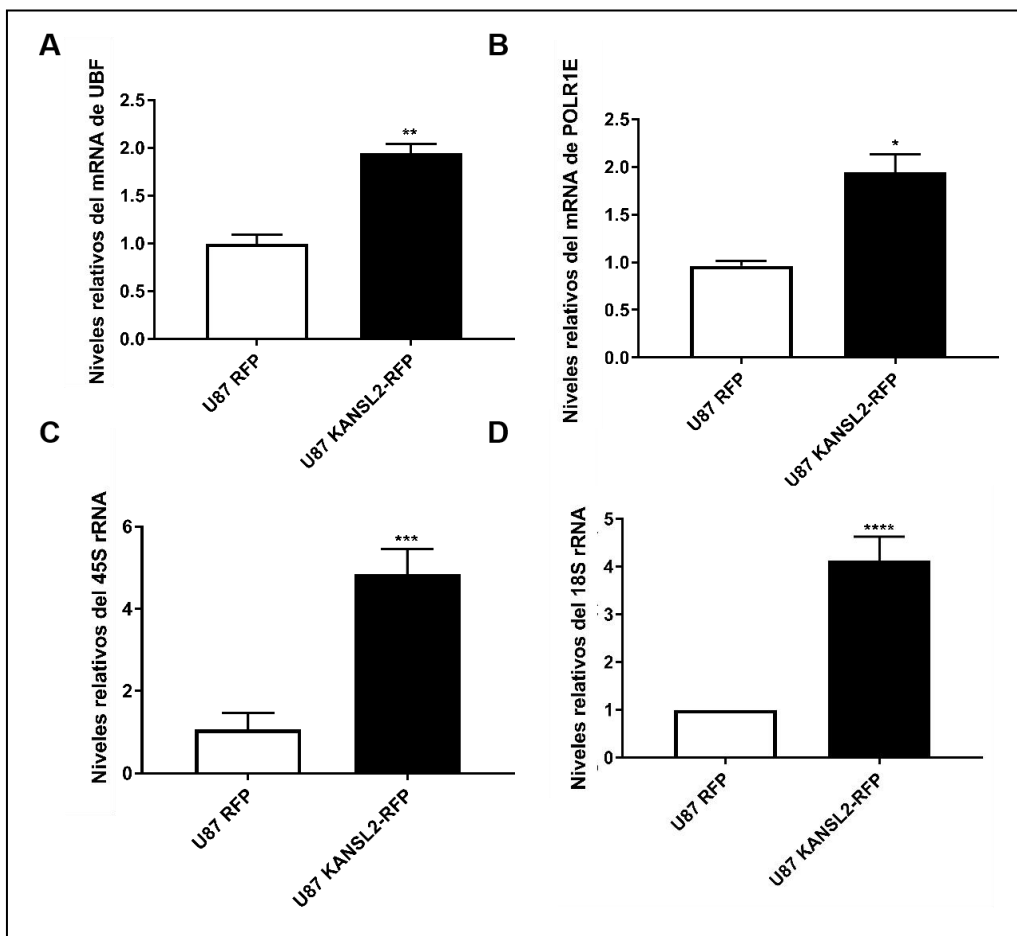
La localización nucleolar de KANSL2 y su dinámica durante las distintas fases del ciclo celular nos llevó a preguntar si esta proteína podría estar desempeñando alguna función en la regulación de la transcripción de los rRNAs.

La transcripción de los rRNAs se reanuda en la fase G1 luego de la mitosis y aumenta progresivamente hasta alcanzar un valor máximo durante las fases S y G2 (Zaidi, S. K. *et. al.* 2016).

Los rRNAs ribosomales se sintetizan primero como un RNA precursor, 45S, el cual es luego procesado y clivado en los correspondientes rRNAs 18S, 28S, y 5S. Debido a la corta vida media del 45S, se cuantificaron sus niveles por qRT-PCR, como indicador de la tasa de transcripción de la RNA polimerasa I en los nucleolos. Se cuantificó también el 18S para determinar el nivel de rRNA maduro (Figura 26).

Además se evaluó la expresión de los genes UBF y POLR1E que forman parte de la maquinaria de la RNA polimerasa I y resultan indispensables para la síntesis de rRNA. Conjuntamente, se empleó un plásmido reportero que refleja la actividad transcripcional de la Pol I, el plásmido rDNA-LUC que contiene el promotor del rDNA ribosomal humano río arriba del gen de la luciferasa (Ghoshal, K. *et. al.* 2004).

Como se muestra en la figura 26, se observó un aumento significativo de todos los genes evaluados bajo condiciones de sobreexpresión de KANSL2-RFP. Tanto UBF, POLR1E, el 45S y el 18S aumentaron sus niveles frente a un aumento de expresión de KANSL2-RFP, sugiriendo que esta proteína podría estar modulando positivamente la biogénesis ribosomal.



**Figura 26.** Análisis por qRT-PCR de expresión relativa de A) UBF B) POLR1E C) 45S rDNA D) 18S rRNA de la sobreexpresión de KANSL2-RFP en células U87MG. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

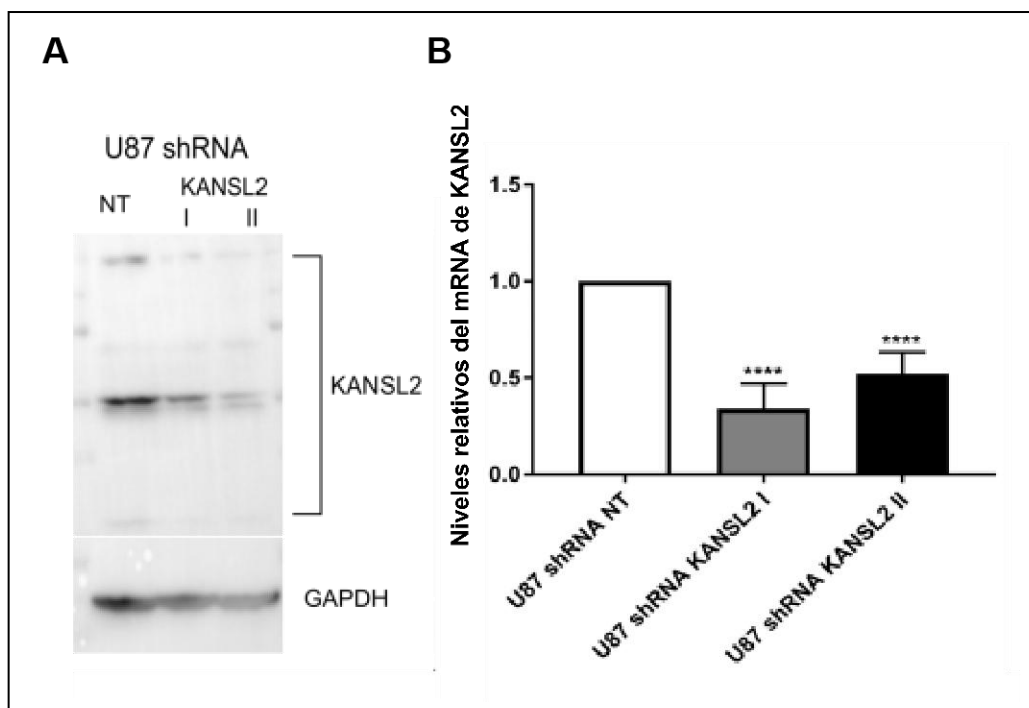
Hasta la fecha no hemos podido generar una línea celular estable para la sobreexpresión de KANSL2 ya que, al poco tiempo e independientemente de la presión de selección, las células transfectadas tienden a reprimir los niveles de este gen. Dado que KANSL2 forma parte de un complejo multiproteico, es posible que un balance estequiométrico en la expresión de sus componentes esté cumpliendo algún rol inhibitorio de manera de sostener un cierto nivel de expresión de KANSL2 o que influya en la estabilidad de la proteína. Por lo tanto los experimentos de ganancia de función por sobreexpresión a lo largo de la tesis, se realizaron de manera transitoria.

También se evaluó el efecto de la disminución en los niveles de KANSL2 sobre la síntesis de rRNA. Para ello, primero, se puso a punto la generación de

partículas virales con shRNAs específicos para la secuencia de KANSL2 y su posterior infección para ensayos de silenciamiento estable.

Se seleccionaron dos secuencias independientes para shRNAs, las cuales fueron nombradas shRNA KANSL2 I y II, que lograron diferentes niveles de silenciamiento. La primera reconoce una región en el 3'UTR del mRNA de KANSL2 mientras que la segunda reconoce la región codificante. Como control se empleó un shRNA non targeting (shRNA NT) el cual expresa una secuencia sin ninguna homología significativa con ningún transcripto expresado en humanos (ver Materiales y Métodos).

Luego de obtener las correspondientes líneas estables en células U87MG, se midieron los niveles de KANSL2 mediante *western blot* y qRT-PCR (Figura 27). Como se puede observar, se observó una disminución significativa de los niveles de KANSL2 tanto del mRNA como de la proteína (aproximadamente. 0,5x).

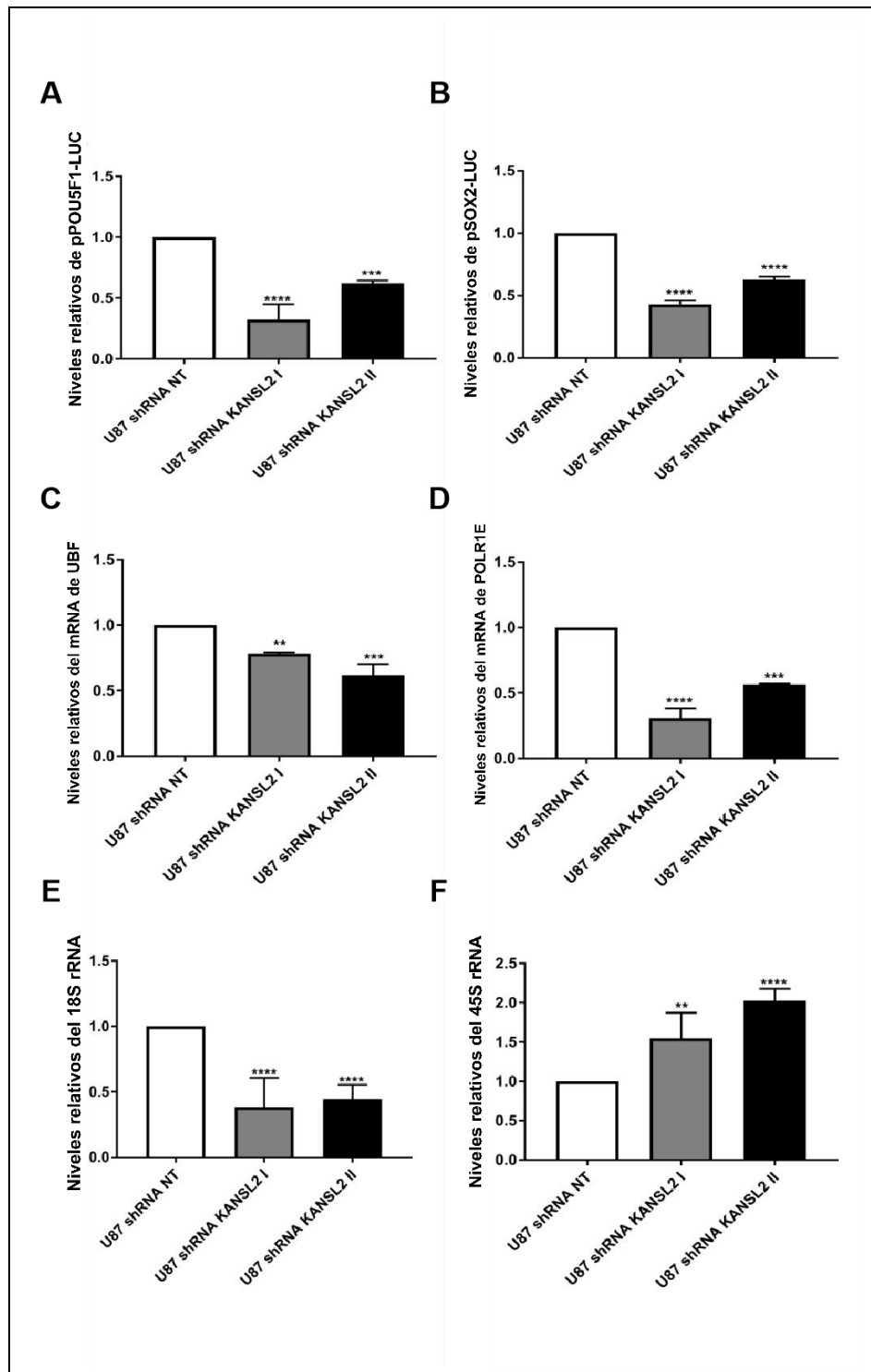


**Figura 27.** A) Western blot para KANSL2 de células U87MG con silenciamiento estable para KANSL2. GAPDH fue usado como control de carga. B) qRT-PCR de KANSL2 en las líneas silenciadas de GBM U87MG. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$

A pesar de que el silenciamiento genera un gran estrés en células, fue posible seleccionar aquellas células que crecen normalmente y mantienen silenciada la expresión de proteína por varias semanas. Sin embargo, como KANSL2 es un gen esencial, luego de un tiempo las células logran suprimir el silenciamiento recuperando su expresión, y por lo tanto la obtención de células estables silenciada debe hacerse con frecuencia (la infección viral y selección). Por esta razón, debe medirse el nivel de silenciamiento cada vez que se necesita realizar un experimento de manera de trabajar dentro de un mismo rango de silenciamiento (igual o mayor al 50%).

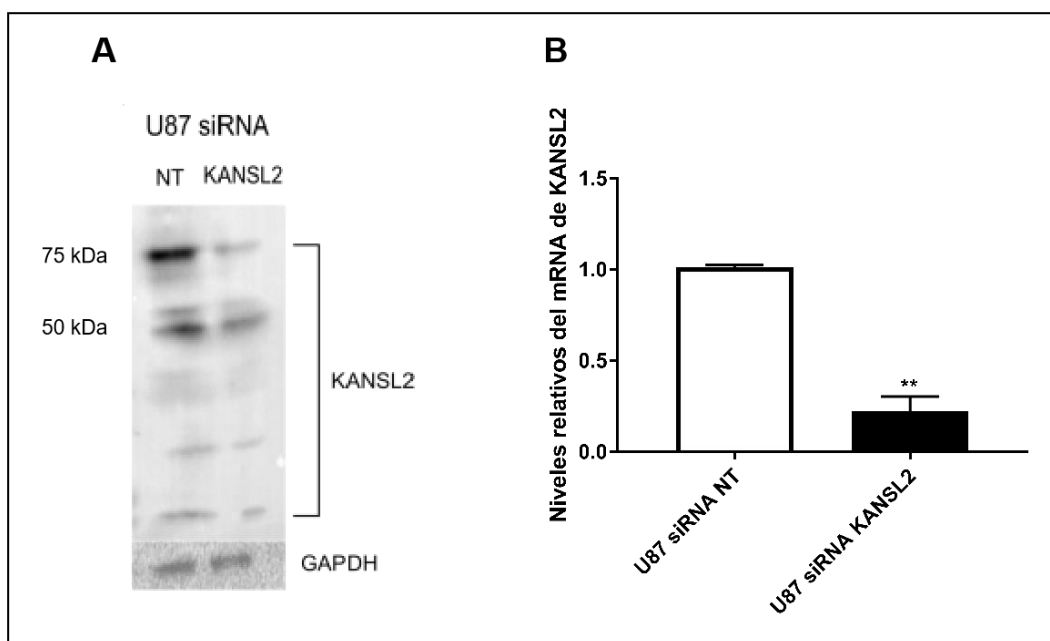
A continuación, se procedió a evaluar el efecto de KANSL2 silenciada sobre los genes involucrados en la biogénesis ribosomal. Como control funcional del efecto de modular la expresión de KANSL2, se evaluó la actividad luciferasa de dos construcciones reporteras de dos genes maestros del desarrollo POU5F1 y SOX2 (Figura 28). El silenciamiento de KANSL2, mostró menores niveles de actividad de estos dos promotores en comparación al control, de acuerdo con los datos publicados (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016).

Como muestra la figura 28, se observó una disminución en los niveles de mRNA tanto del gen de UBF como de la subunidad POLR1E en las células con KANSL2 silenciada. Además, se observó una reducción significativa en los niveles del 18S rRNA. Sin embargo, y a diferencia de lo esperado, se observó un aumento en los niveles del pre-rRNA 45S en las células con silenciamiento de KANSL2. Es decir, el 45S mostró un perfil similar de expresión en ambos tipos de células: el silenciamiento y la sobreexpresión de KANSL2.



**Figura 28.** Efecto del silenciamiento de KANSL2 en células de GBM U87MG. Niveles relativos de la actividad luciferasa para la construcción en A) pPOU5F1-LUC y B) pSOX2-LUC transfectada en células U87MG. Análisis de qRT-PCR de expresión relativa de C) UBF, D) POLR1E, E) 18S rRNA, y F) 45S rDNA, en el silenciamiento estable de KANSL2. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

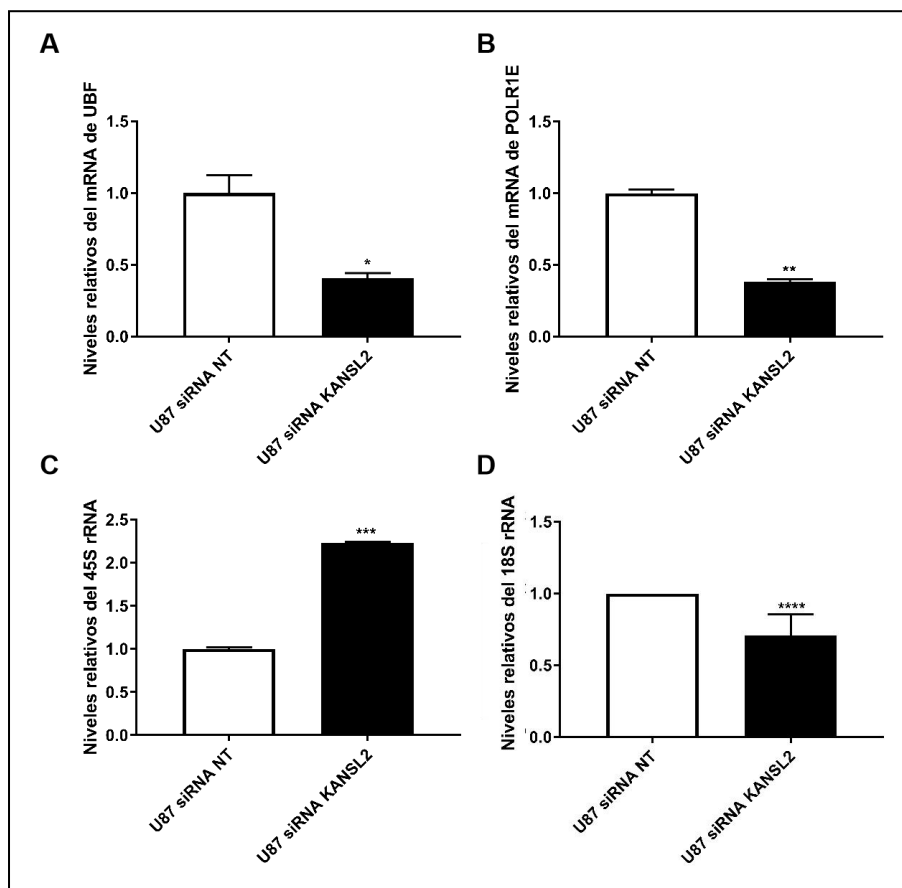
Teniendo en cuenta el resultado inesperado del perfil del 45S, se realizó un nuevo silenciamiento (Figura 29), esta vez de forma transitoria de KANSL2 para validar los resultados obtenidos. Se empleó un siRNA específico para KANSL2 con su control correspondiente.



**Figura 29.** A) Western blot de KANSL2 en U87MG con silenciamiento transitorio para KANSL2. GAPDH fue usado como control de carga. B) Niveles del mRNA de KANSL2 determinados por qRT-PCR .

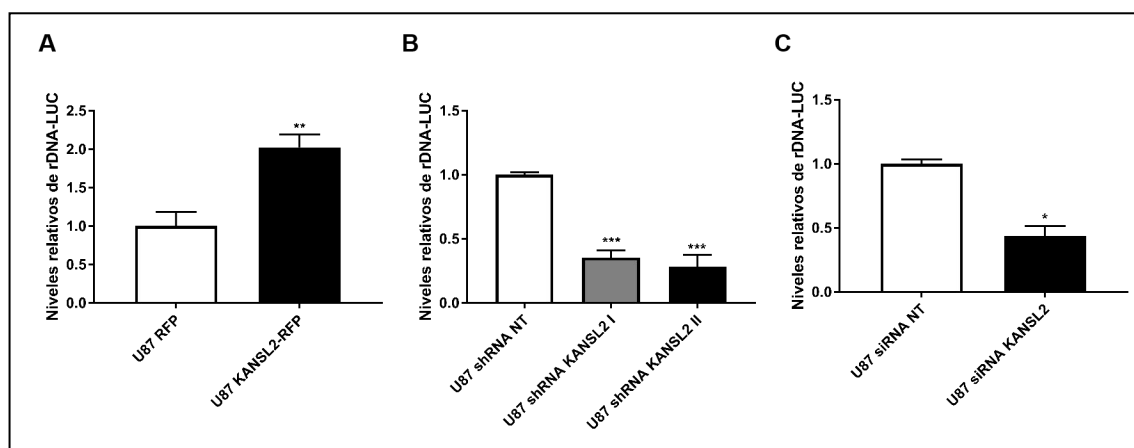
Como muestra la figura 30, se observó el mismo efecto en las silenciadas transitorias que las determinadas en las líneas silenciadas estables. Se observaron una reducción en la expresión del 18S rRNA, así como de UBF y POLR1E. Además, se repitió que los niveles del 45S rRNA se vieron aumentados.

Por lo tanto, si bien el perfil de expresión del 18S fue opuesto en los ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de KANSL2, el 45S presentó el mismo perfil de niveles aumentados en todos los casos. Teniendo en cuenta que el 45S es precursor del 18S, decidimos evaluar, entonces, la regulación transcripcional del gen de rDNA mediante la construcción reportera para el promotor del rDNA-LUC que se utilizó anteriormente.



**Figura 30.** Análisis de qRT-PCR de expresión relativa de A) UBF B) POLR1E C) 45S rRNA D) 18S rRNA en el silenciamiento transitorio de KANSL2 en células U87MG. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

Como muestra la figura 31, el ensayo con el promotor reportero permitió distinguir diferencias entre los distintos niveles de KANSL2. Se detectó una inhibición de la transcripción del reportero tanto en las células silenciadas para KANSL2 de manera estable como transitorias. Sin embargo, en el caso de la sobreexpresión de KANSL2 se reportó un aumento de la actividad del reportero.



**Figura 31.** Ensayo de luciferasa del promotor del rDNA en A) la sobreexpresión de KANSL2, B) el silenciamiento estable de KANSL2 y C) la transfección con siRNA KANSL2 en células U87MG. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

En base a esto resultados, y teniendo en cuenta los niveles medidos del 18S, postulamos que la acumulación de 45S rRNA en las células silenciadas para KANSL2, podría deberse a potenciales defectos en su procesamiento. Esta hipótesis permitiría conciliar un aumento en los niveles de 45S, con una menor actividad transcripcional del promotor de rDNA y niveles disminuidos del 18S. En el caso de la sobreexpresión de KANSL2, el aumento en los niveles de transcripción del gen de rDNA explicaría los niveles incrementados del 45S y el 18S.

## **Conclusiones**

-La sobreexpresión de KANSL2-RFP aumentó los niveles de factores involucrados en la síntesis de rRNA asociados al complejo de la RNA Pol I, como UBF y POLR1E.

-La sobreexpresión de KANSL2-RFP aumentó la actividad reportera de luciferasa bajo regulación del promotor de rDNA (rDNA-LUC), indicando mayor actividad transcripcional.

-Los silenciamientos estables y transitorios de KANSL2 disminuyeron la expresión del 18S, UBF y POLR1E. Además disminuyeron la actividad del reportero de rDNA-LUC, indicando menor actividad transcripcional.

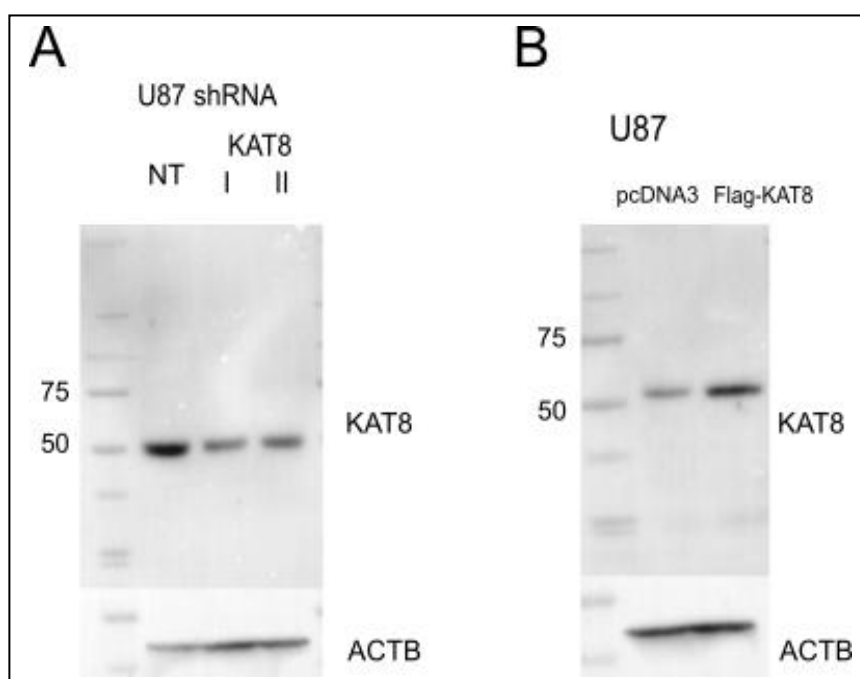
- Tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de KANSL2 produce un aumento en los niveles de 45S. Se postula que el aumento del 45S podría deberse a una mayor tasa de transcripción en el caso de la sobreexpresión de KANSL2 y a una acumulación por potenciales fallas durante su procesamiento en el caso de los ensayos de silenciamiento.

## 5. Regulación recíproca entre KANSL2 y KAT8

KAT8 ha sido la única proteína del complejo NSL vinculada a los nucleolos, aunque su rol ha sido explorado desde la perspectiva de replicación del rDNA y no tanto como un potencial modulador de la biogénesis ribosomal. Tampoco se sabe si KAT8 realiza este rol de manera independiente o como parte de algunos de los complejos epigenéticos de los cuales forma parte.

Nos preguntamos si KANSL2 ejerce su rol regulador de la síntesis de rRNA como parte del complejo NSL, y como potencial modular de KAT8. Decidimos entonces evaluar el efecto de KAT8 sobre el rRNA y su relación potencial con KANSL2. Para esto contamos con herramientas de sobreexpresión y silenciamiento estable de KAT8.

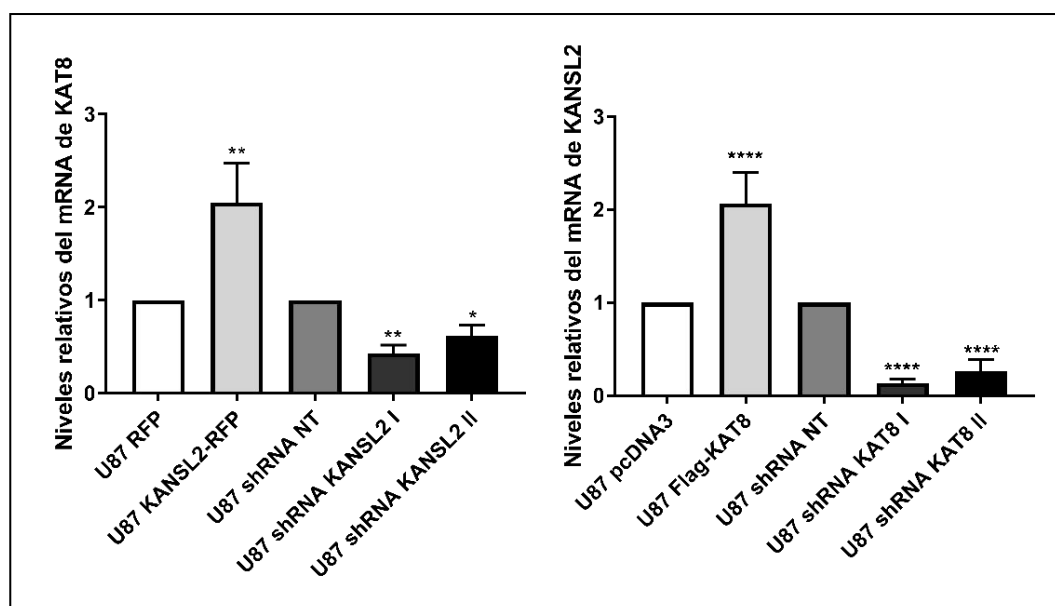
Nuevamente, se generaron célula U87MG estables para el silenciamiento de KAT8, a través del uso de dos shRNAs específicos. Para la sobreexpresión transitoria, se utilizó el plásmido publicado (Cai, Y. *et. al.* 2010) que codifica para la construcción Flag-KAT8. Los niveles de expresión de KAT8 fueron evaluados por *western blot* (Figura 32).



**Figura 32.** *Western blot* de KAT8 en U87MG con A) silenciamiento estable mostrando una reducción del 50%. B) sobreexpresión (Flag-KAT8) mostrando un aumento del 100% de KAT8. ACTB fue usado como control de carga.

Luego, se cuantificaron los niveles de expresión de KAT8 y KANSL2, en células con sobreexpresión o silenciamiento estable de KANSL2 y KAT8, respectivamente. Como muestra la figura 33, se observó una correlación positiva entre los niveles de mRNA para ambos genes, lo cual sugiere una retroalimentación positiva entre ambos. Dado que ambas proteínas son parte del mismo complejo epigenético, la observación de una potencial modulación recíproca en la expresión de sus componentes agregaría un nivel más de regulación del complejo NSL.

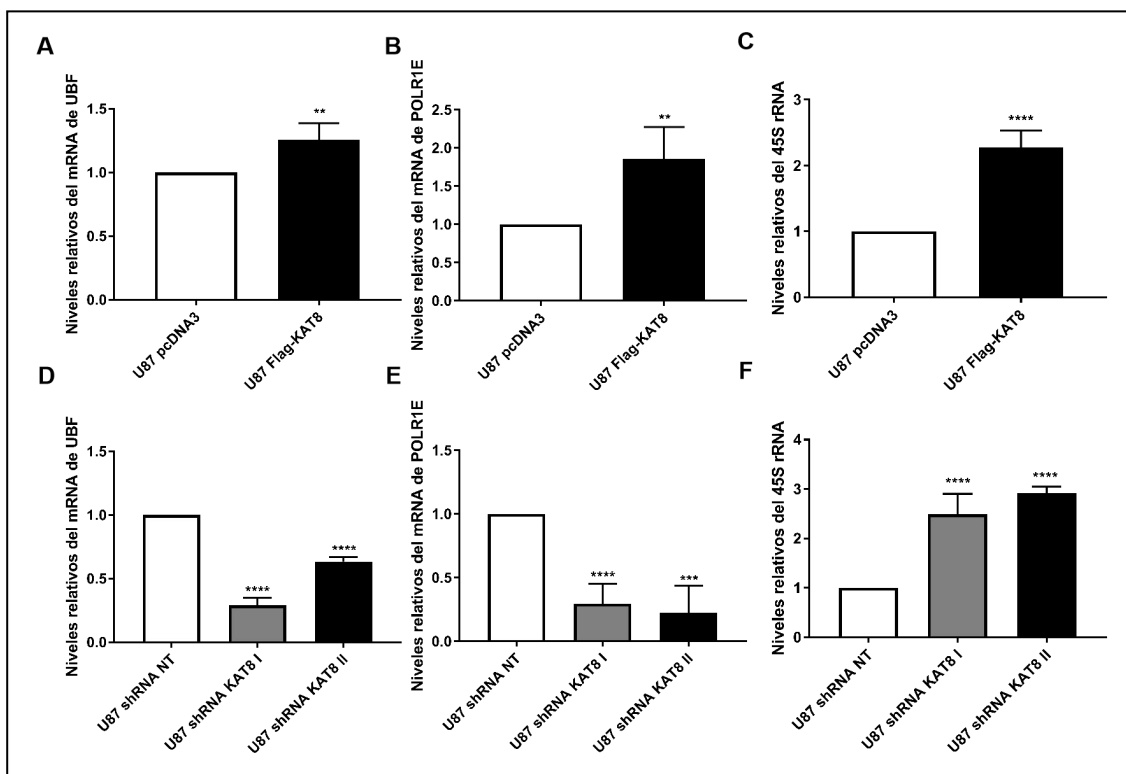
Si bien hasta la fecha no se ha descrito que estos genes se regulen mutuamente de manera recíproca, se había postulado que KANSL2 funcionaría como un potencial modulador de KAT8. En un trabajo previo, nosotros determinamos que cambios en los niveles de KANSL2 afectaban los niveles de H4K16 Ac a nivel global, una actividad muy asociada a KAT8 (Solari, N. E. F. *et al.* 2016).



**Figura 33:** Análisis por qRT-PCR de expresión relativa KAT8 y KANSL2 en el silenciamiento y sobreexpresión de KANSL2 y KAT8, respectivamente en células U87MG \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

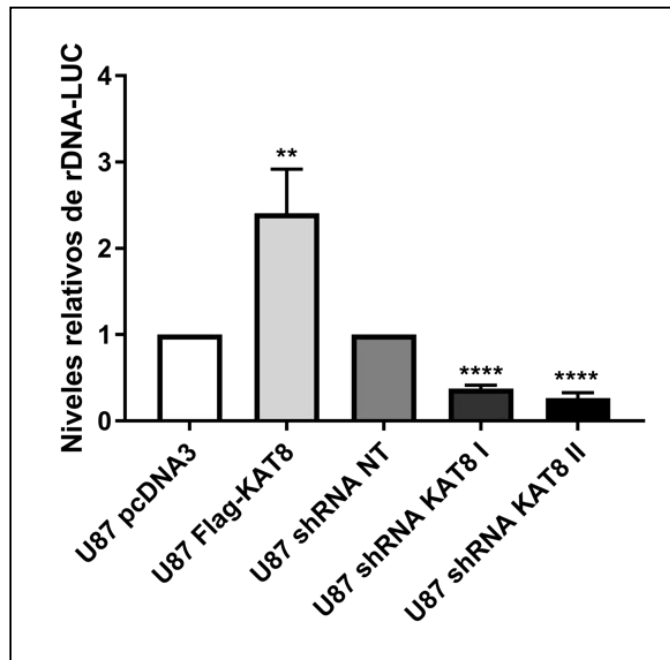
También se determinó por qRT-PCR en células con la sobreexpresión y el silenciamiento de KAT8, la expresión de los genes ribosomales así como parte de los genes de la maquinaria de síntesis de la RNA Pol I, correspondiente a

UBF, POLR1E y el 45S, los cuales mostraron el mismo perfil que lo observado con KANSL2 (Figura 34). Esto estaría en concordancia con la regulación positiva recíproca entre ambos genes.



**Figura 34.:** Análisis por qRT-PCR de expresión relativa UBF, POLR1E y el 45S rRNA por sobreexpresión de KAT8 (A, B, C, respectivamente) y en el silenciamiento de KAT8 (D, E y F respectivamente) en células U87MG. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

De nuevo, se observaron niveles incrementados del 45S rRNA tanto para el silenciamiento como para la sobreexpresión de KAT8. Para evaluar si los niveles de expresión de KAT8 también podían modular la actividad transcripcional del promotor de rDNA, realizamos el ensayo de actividad de luciferasa para la construcción reportera de rDNA-Luc frente a la sobreexpresión y silenciamiento de KAT8 en las células U87MG. Como muestra la figura 35, se observó el mismo perfil que el obtenido para los distintos niveles de KANSL2. Es decir, la sobreexpresión de KAT8 correlaciona con una mayor actividad transcripcional del promotor de rDNA, mientras que lo contrario ocurre en las células con silenciamiento estable de KAT8.

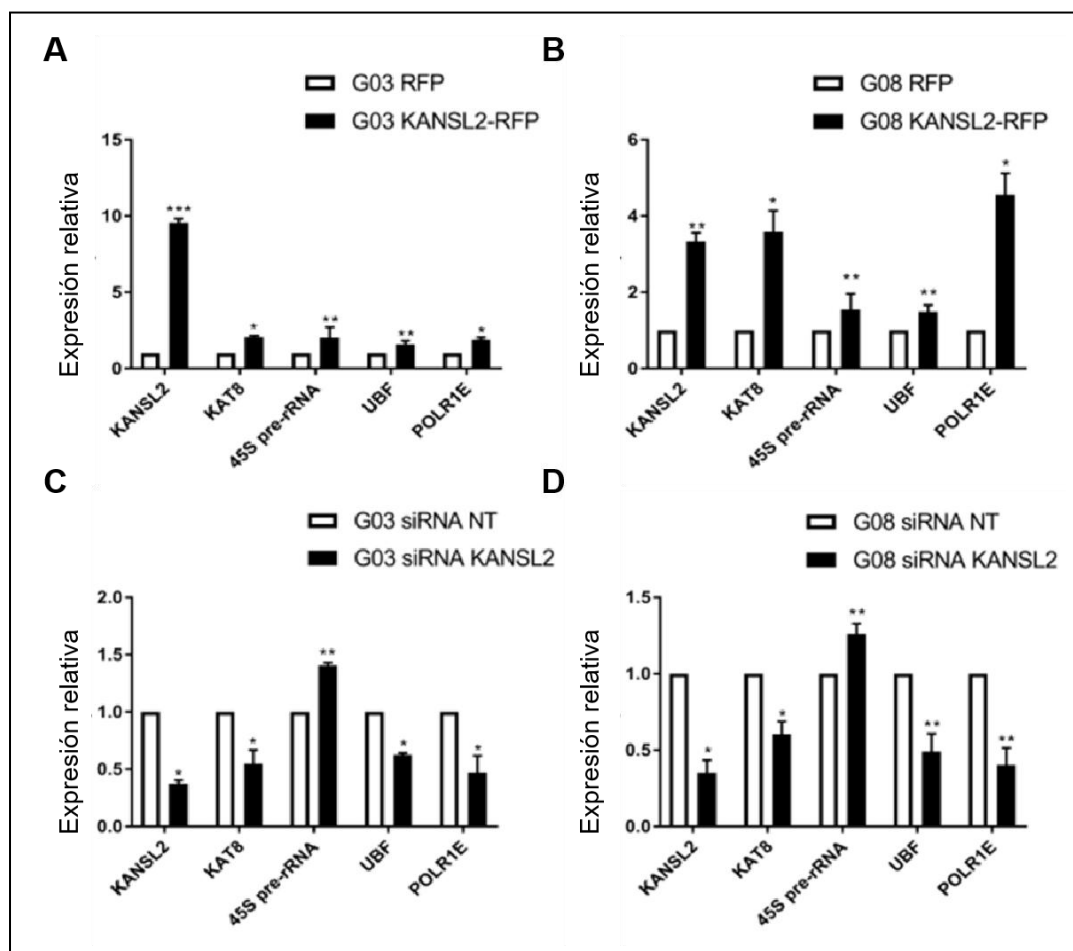


**Figura 35.** Ensayo de luciferasa del promotor del rDNA (rDNA-Luc) en células U87MG con la sobreexpresión y el silenciamiento estable de KAT8. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

La suma de estos resultados sugiere que los niveles de KAT8 afectarían la transcripción de rDNA en forma similar con lo observado con KANSL2 y permite hipotetizar un rol en conjunto de ambas proteínas como moduladoras de la síntesis de rRNA.

Por último, como se mencionó en secciones anteriores, se evaluaron también en células derivadas de pacientes de GBM, G03 y G08, con el fin de validar los resultados obtenidos hasta el momento con la línea comercial. Se realizó un ensayo de sobreexpresión de KANSL2-RFP así como un ensayo de silenciamiento transitorio de KANSL2 mediante siRNA.

Como muestra la figura 36, ambas líneas reprodujeron los resultados previos para ambos tipos de ensayo. Es decir, la sobreexpresión de KANSL2-RFP en ambas líneas aumentó los niveles de KAT8, UBF, POLR1E y el 45S rRNA. El silenciamiento de KANSL2, al contrario, produjo una reducción de los niveles de expresión de los genes evaluados con la excepción, una vez más, del 45S rRNA que reportó el mismo perfil que los ensayos de sobreexpresión.



**Figura 36.** Análisis por qRT-PCR de expresión relativa de KANSL2, KAT8, UBF, POLR1E y el 45S rRNA en líneas celulares derivadas de pacientes G03 y G08 con sobreexpresión de KANSL2-RFP y silenciamiento de KANSL2 mediante siRNA. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

## **Conclusiones**

-Se observó una correlación positiva y regulación recíproca entre los niveles de KANSL2 y KAT8.

-Los niveles KAT8 mostraron el mismo perfil de modulación de los genes asociados a la biogénesis ribosomal que los ensayos de sobreexpresión y silenciamiento de KANSL2. Estos datos sugieren una acción en conjunto de KANSL2 y KAT8 en la regulación del rRNA. Esto propone que la regulación de KANSL2 en la biogénesis de RNA ribosomal es a través del complejo NSL junto con KAT8.

-Los ensayos de sobreexpresión y silenciamiento de KANSL2 en las líneas derivadas de pacientes confirman los perfiles de expresión de los genes evaluado reportados anteriormente en la línea comercial de GBM.

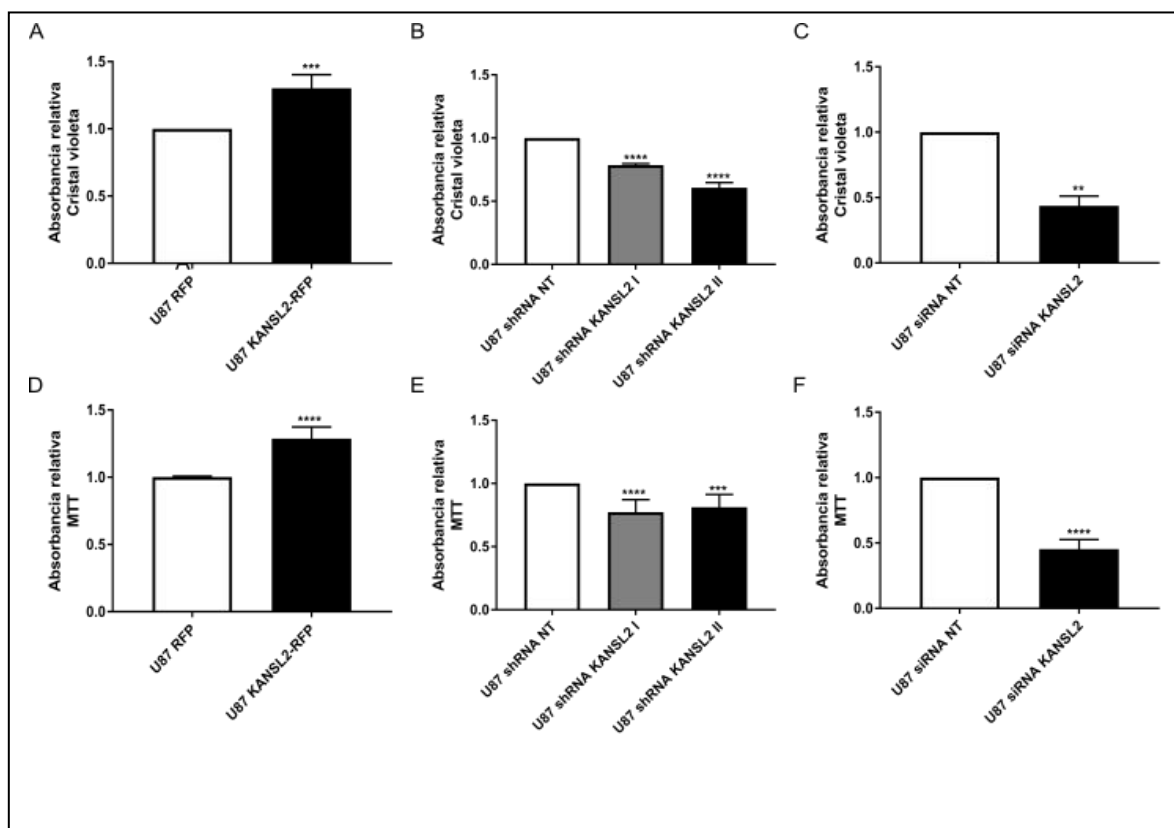
## **6. KANSL2 y KAT8 como reguladoras de la proliferación**

Nuestros resultados sugieren que KANSL2 posee un rol tumorigénico en GBM (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016) y que tanto KANSL2 como KAT8, posiblemente en conjunto, estarían modulando los niveles de rRNA. Debido a la interconexión entre estos procesos y la proliferación celular, decidimos evaluar el efecto de KANSL2 y KAT8 sobre la proliferación.

Para evaluar esto realizamos ensayos de tinción con cristal violeta, cuya señal colorimétrica, determinada con un espectrofotómetro, correlaciona con el número de células teñidas adheridas a una placa *multiwell*.

Empleamos además, una segunda técnica: la determinación de la proliferación/viabilidad celular por el método de MTT en cual mide la actividad metabólica celular. En este ensayo, el compuesto MTT es reducido por enzimas oxidoreductasas y dicha reacción es proporcional a una mayor tasa proliferativa que se relaciona a una mayor actividad mitocondrial. Dado que se reportó durante el transcurso de esta tesis que el complejo NSL regularía funciones mitocondriales (Sheikh, B. N. *et. al.* 2019), en particular la fosforilación oxidativa controlando la expresión de genes respiratorios tanto del DNAm como del nuclear, decidimos comparar este método con el de cristal violeta en ensayos de sobreexpresión y silenciamiento estable y transitorio de KANSL2.

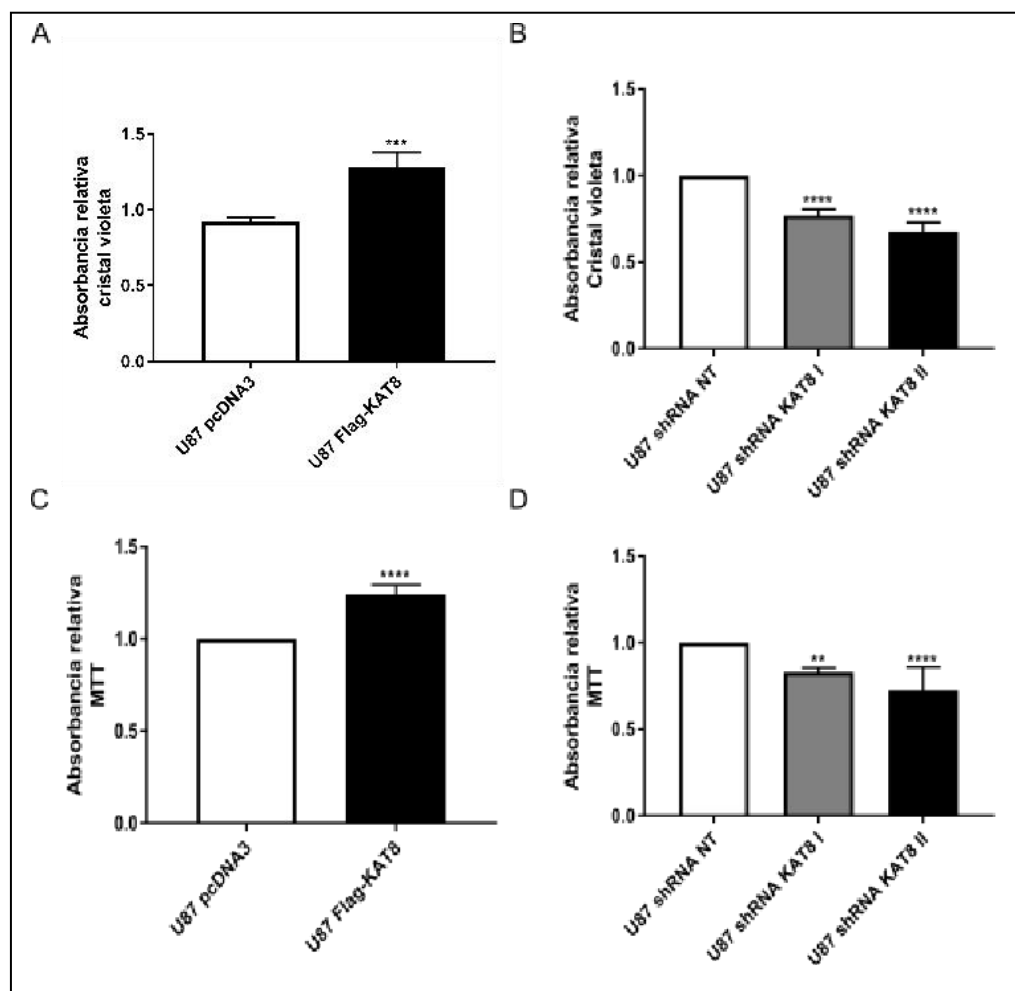
Como muestra la figura 37, los resultados fueron consistentes en ambas metodologías: la sobreexpresión de KANSL2 produjo un aumento (aproximadamente 25% más) en la tasa proliferativa, mientras que el silenciamiento (tanto transitorio como estable) la disminuyó (aproximadamente 25% – 50%). Estos resultados indicarían entonces que los niveles de KANSL2 serían claves para modular la capacidad proliferante de las células y podría relacionarse con la modulación de la biogénesis ribosomal de KANSL2.



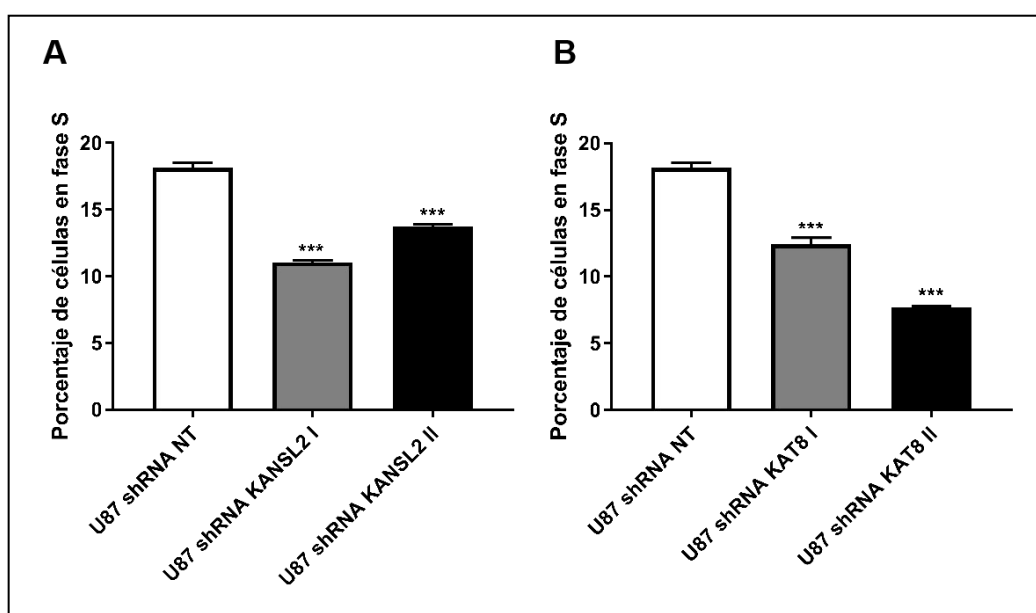
**Figura 37.** Ensayo de proliferación en células U87MG frente a la modulación de los niveles de expresión de KANSL2. Panel superior, ensayo de cristal violeta en A) sobreexpresión de KANSL2-RFP, B) silenciamiento estable de KANSL2 y C) silenciamiento transitorio de KANSL2 en U87MG. Panel inferior, ensayo de MTT en D) sobreexpresión de KANSL2-RFP, E) silenciamiento estable de KANSL2 y F) silenciamiento transitorio de KANSL2 en U87. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

Adicionalmente, se realizó en mismo tipo de ensayos, esta vez, en células con distintos niveles de KAT8. La proliferación de las células de GBM también fue afectado por los niveles de expresión de KAT8, nuevamente siguiendo el mismo perfil reportado para los ensayos de KANSL2 (Figura 38).

Para confirmar estos resultados, se analizaron las células con silenciamiento estable de KANSL2 y KAT8 por tinción con ioduro de propidio mediante un citómetro (Figura 39). Se detectó una menor proporción de células en fase S en el caso de las silenciadas con respecto al control, lo cual sustenta los resultados previos de una menor capacidad proliferativa reportada para estas células.



**Figura 38.** Ensayo de proliferación en células U87MG bajo la modulación de la expresión de KAT8. Panel superior, ensayo de cristal violeta en A) sobreexpresión de Flag-KAT8 y B) silenciamiento estable de KAT8 en U87MG. Panel inferior, ensayo de MTT en C) sobreexpresión de Flag-KAT8 y D) silenciamiento estable de KAT8 en U87. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .



**Figura 39.** Porcentaje de células en fase S en A) silenciamiento estable de KANSL2 y B) silenciamiento estable de KAT8 en células U87MG determinado mediante ioduro de propidio y citometría de flujo. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

La disminución de subpoblación de células en la fase S en las células con silenciamiento estable de KANSL2 y KAT8 concuerda con los resultados de los ensayos de cristal violeta y MTT. KANSL2 y KAT8 tendrían así un rol promotor de la proliferación celular en GBM. En efecto, recientemente se publicó en células de monocito humano que tanto la expresión de KANSL2 como KAT8 son necesarias para la progresión del ciclo celular (Radzisheuskaya, A. *et. al.* 2021), lo cual valida nuestros resultados.

## **Conclusiones**

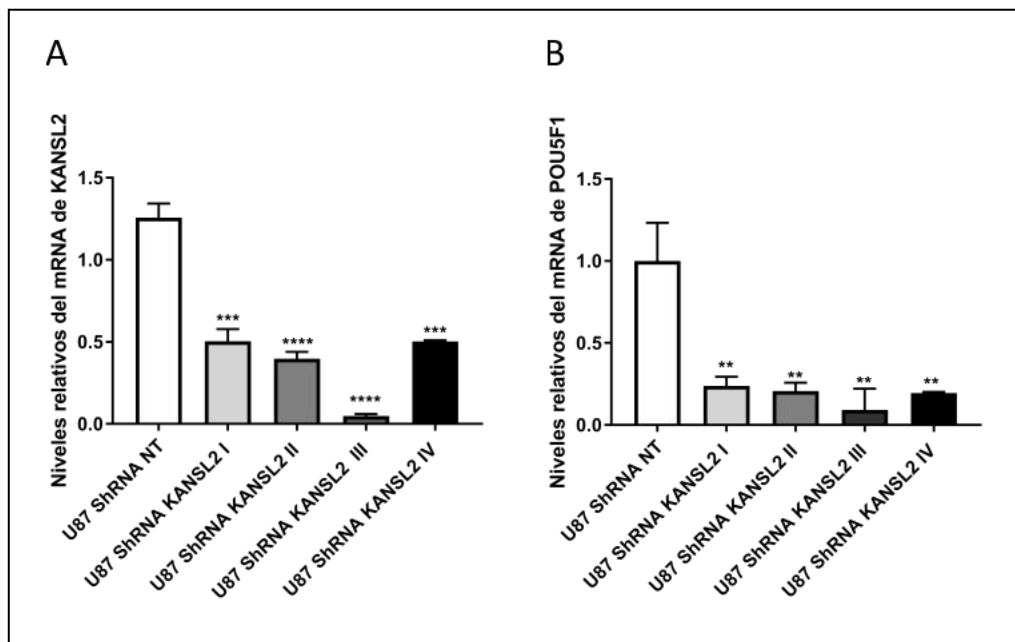
-La sobreexpresión de KANSL2-RFP posee un efecto positivo sobre la proliferación mientras que su silenciamiento inhibe la proliferación celular.

-KAT8 mostró el mismo perfil que KANSL2 con respecto a su efecto en la proliferación, sugiriendo nuevamente la modulación en conjunto de ambas proteínas.

## 7. Análisis de la transcriptómica de células silenciadas de KANSL2

Durante la última etapa de caracterización de KANSL2, nos propusimos identificar nuevas vías y genes blanco bajo modulación transcripcional de KANSL2. Para tal fin, se realizó un estudio de transcriptómica mediante un RNAseq de células con la expresión de KANSL2 silenciadas, en colaboración con el laboratorio del Dr. Joaquín Espinosa, en la Universidad de Colorado.

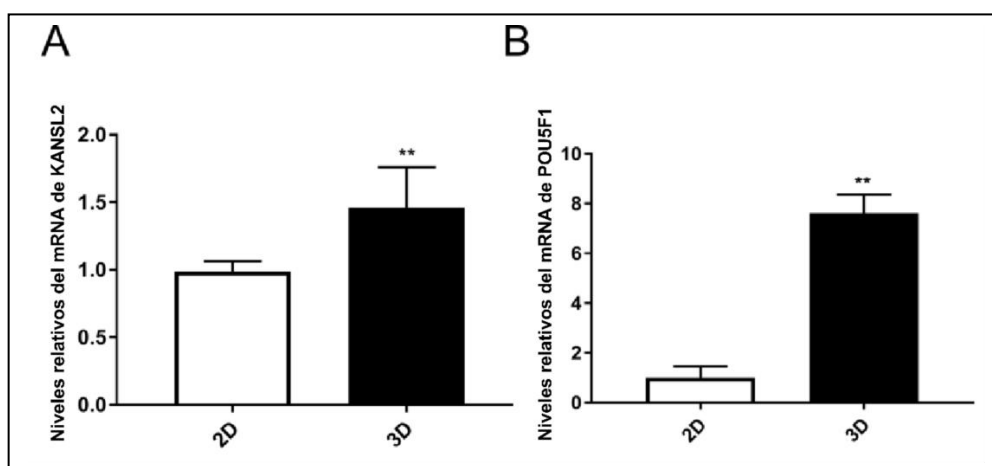
En primer lugar, se buscó elegir aquellos shRNAs específicos de KANSL2 capaces de inducir un mayor nivel de silenciamiento estable. Se evaluaron los dos shRNAs (I y II) que se habían empleado previamente así como otros dos adicionales (III y IV) en la línea U87MG, por su facilidad de manipulación técnica. Se eligieron los shRNAs KANSL2 II y III, la primera por haber sido ya caracterizado en el trabajo previo, y el segundo, por presentar un mayor nivel de silenciamiento. En todos los casos, se cuantificaron los niveles de expresión de POU5F1 como control funcional de la eficiencia del silenciamiento de KANSL2, por ser un blanco transcripcional conocido de regulación (Solari, N. E. *et. al.* 2016).



**Figura 40.** qRT-PCR de los niveles relativos de expresión de (A) KANSL2 y (B) POU5F1 en células U87MG con silenciamiento estable de KANSL2 mediante el tratamiento con distintos shRNAs (SIGMA Library). \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

A diferencia de los cultivos 2D, los cultivos celulares 3D se usan hoy en día como modelos tumoral *in vitro*, ya que se considera que se asemejan más a un tumor en comparación a los cultivos clásico 2D. Los cultivos 3D presentan, por sí, un alto grado de heterogeneidad celular en cuanto a su estado de diferenciación y se permite una mayor interacción célula-célula. Estas condiciones (3D) logran simular algunas de las complejidades que ocurren *in vivo* como, por ejemplo, la necesidad de difusión de oxígeno, metabolitos, nutrientes y moléculas de señalización que se da al aumentar el contacto célula-célula. La generación de gradientes químicos tiene efectos sobre estas interacciones célula-célula de formas que no ocurren en un cultivo en monocapa (Bahmad, H. F. *et. al.* 2018).

Las condiciones de *stemness* que se utilizan para crecer estos cultivos se realizan en ausencia de suero y con el agregado de factores como EGF, FGF y B27. Una particularidad de las células tumorales es que en su mayoría, poseen la capacidad de crecer en suspensión en placas no adherentes, es decir libre de anclaje, propiedad que comparten con las células embrionarias (Janiszewska, M. *et. al.* 2020). Estas células proliferan en forma de esferas y se estima que las mismas provienen de una célula. Este tipo de ensayos son utilizados porque permite enriquecer los cultivos de células con propiedades de células madre (Chen, K. G. *et. al.* 2018; Solari, N. E. F. *et. al.* 2016). Las células de GBM U87 así como las líneas derivadas de pacientes poseen una alta eficiencia para formar esferas en estas condiciones, lo que indica que están enriquecidas en células con características de *stem* (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016 y Da Hora, C. C. *et. al.* 2019). Como muestra la figura 41, tanto la expresión de KANSL2 como POU5F1 están incrementados en células U87MG cultivadas en estas condiciones siguiendo los resultados publicados (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016). Además, el silenciamiento de KANSL2 disminuye la potencial de formar esferoides indicando su participación en la adquisición y/o sostenimiento del estado *stem* (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016).



**Figura 41.** qRT-PCR de los niveles relativos de expresión de KANSL2 y POU5F1 en cultivos 2D y 3D de células U87MG. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , y \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

La necesidad de estudiar la red transcripcional a través de la cual KANSL2 opera en el GBM en contexto o condición aproximado de un tumor in vivo, donde cumpliría un rol modulador de la plasticidad celular, reforzó la elección de elegir un formato 3D para el estudio de la transcriptómica respecto a un cultivo 2D.

Las líneas celulares derivadas de pacientes fueron infectadas con partículas virales capaces de expresar los shRNAs seleccionados, para luego realizar la selección con el antibiótico de selección, puromicina. Una vez seleccionadas y conformado el silenciamiento de KANSL2 así como la modulación sobre POU5F1, se pasó de un formato 2D al cultivo 3D. En ese momento se finalizó el cultivo y se extrajeron los RNAs de cada línea. Las líneas seleccionadas fueron aquellas que presentaron consistentemente un mayor nivel de silenciamiento de KANSL2.

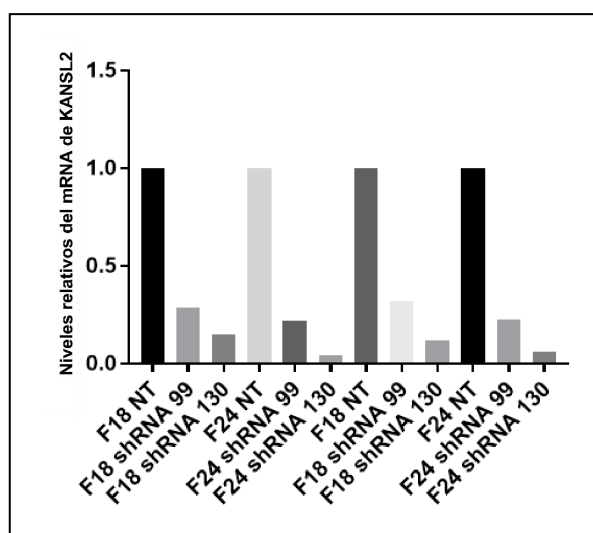
La figura 42 muestra el diseño experimental que se utilizó.



**Figura 42.** Esquema experimental de la toma de muestra para el RNAseq. Las líneas celulares derivadas de pacientes fueron infectadas con partículas virales con shRNAs específicos para KANSL2 y seleccionadas con puromicina. Una vez muerto el control negativo, se levantaron las monocapas y se formaron cultivos 3D, a partir de los cuales se purificó el RNA empleado en el ensayo de transcriptómica.

Se enviaron a analizar los RNA purificados en duplicados para cada línea, F18 y F24, donde cada duplicado o réplica era un evento independiente de silenciamiento con partículas virales generadas también independientemente.

En la figura 43 se muestra, la cuantificación del silenciamiento de KANSL2 en los dos eventos de infección independientes para las células F18 y F24. Se observa que para ambas líneas se obtuvo un grado de silenciamiento mayor al 50% para ambos shRNAs de KANSL2, siendo en todos los casos más efectiva la construcción shKANSL2 III (#130).



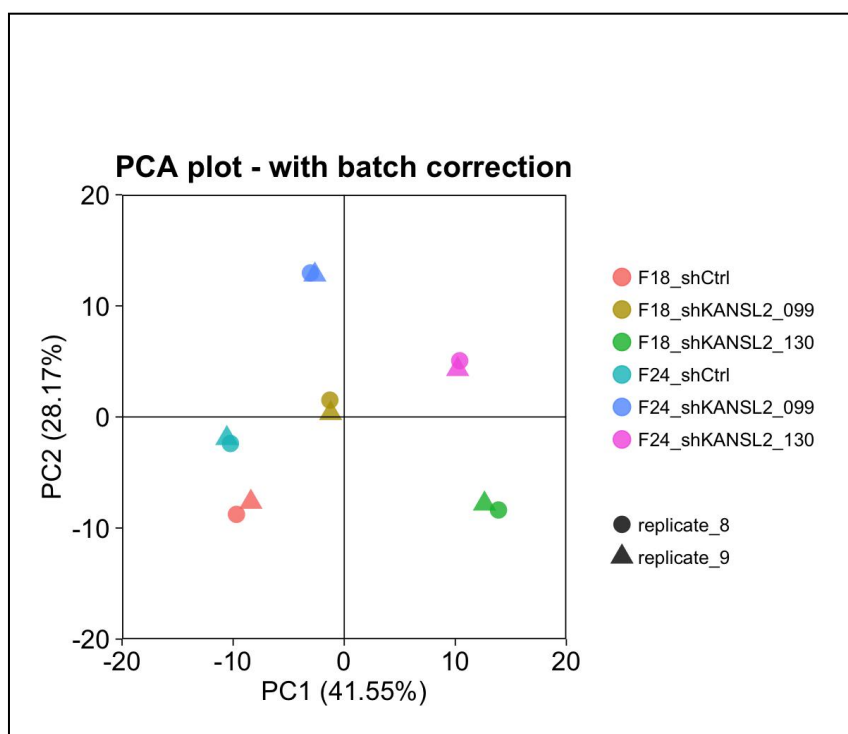
**Figura 43.** Niveles de KANSL2 (qRT-PCR) de 2 eventos independientes de silenciamiento de KANSL2 en cultivos 3D de las líneas celulares derivadas de pacientes F18 y F24.

Un punto importante a destacar es que estas células F18 y F24 fueron capaces de formar esferas en 2-3 días, tanto células NT como shKANSL2. Si bien se evidenció estrés en estas células, el efecto inhibitorio sobre su capacidad de formar esferas no fue tan evidente como lo reportado para las células U87MG y la línea G03 (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016), pudiendo obtener suficiente material para el ensayo de RNAseq.

El RNAseq fue realizado por la empresa Novogene a partir del total de mRNA de las células. Es importante tener en cuenta que KANSL2 podría estar regulando otro tipo RNAs que no son seleccionados para la secuenciación como rRNA o tRNA o y RNAs no codificantes, los cuales cada vez son más relevantes en el desarrollo de diversas patologías.

Para el análisis de los datos de secuenciación se contó con la ayuda de la plataforma bioinformática del grupo del Dr. Espinosa y la colaboración del estudiante de doctorado del grupo, el licenciado Nicolás Budnik.

Inicialmente, un análisis de componentes principales (PCs) de los perfiles transcripcionales de las líneas generadas nos permitió ver los perfiles transcripcionales de las mismas y cómo fueron modulados con ambos shRNAs para KANSL2 (Figura 44). En este análisis se puede observar que, si bien existe una dispersión grande entre ambas líneas silenciadas respecto de su control NT, estas respetan un patrón donde las líneas con mayor grado de silenciamiento (#130), están más desplazadas hacia valores positivos en el eje PC1, mientras que aquellas con un menor grado de silenciamiento (#99), se encuentran mas cercanas a los controles NT.



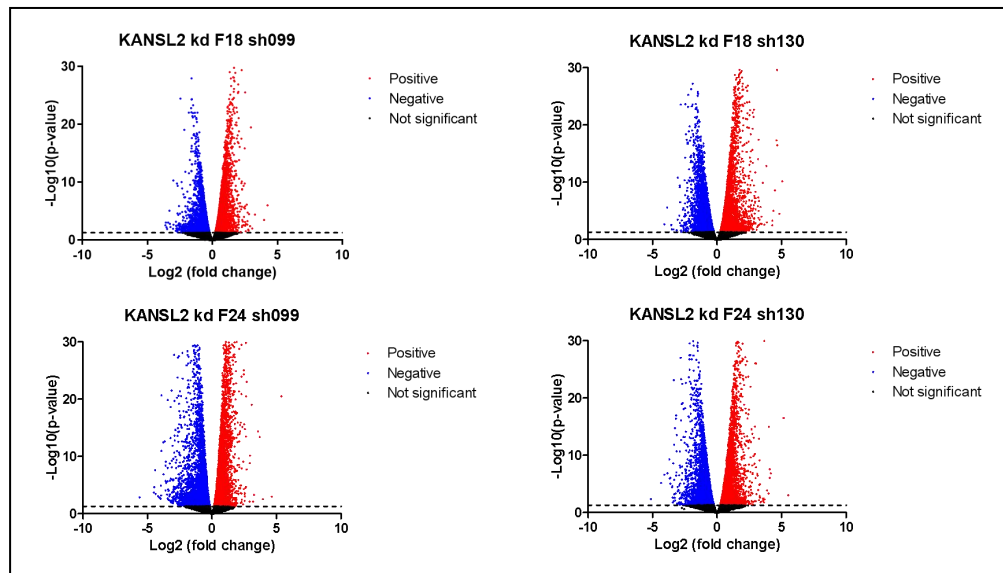
**Figura 44.** Análisis de componentes principales obtenido a partir de los datos de secuenciación de RNA de las 6 líneas generadas con sus respectivas réplicas. Los diferentes colores indican las células utilizadas y los diferentes tratamientos (NT, shKANSL2\_099 y shKANSL2\_130). El círculo y el triángulo indican las réplicas independientes.

Este estudio transcriptómico nos permitió obtener una lista de genes con expresión aumentada y disminuida de manera estadísticamente significativa con respecto al control para cada condición: es decir, cada uno de los shRNA de KANSL2 (#99 y #130) en cada una de las líneas evaluadas (F18 y F24).

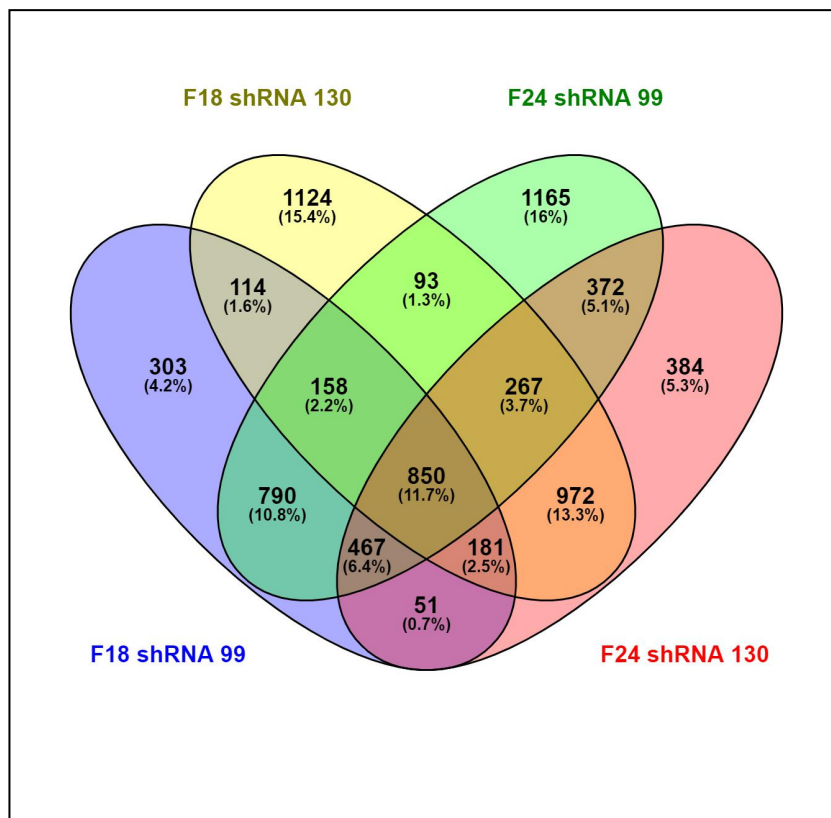
La figura 45 representa los dos perfiles de genes, con aquellos de expresión aumentada en punto rojo y los de expresión disminuida en punto azul. Mientras mayor haya sido el nivel de modulación de un gen, más arriba del gráfico se ubica el dato. En todos los análisis que siguen sólo se tuvieron en cuenta genes con modulación estadísticamente significativa.

Al analizar las distintas listas de genes modulados para cada shRNA y en cada línea celular en un gráfico de Venn (Figuras 46 y 47) se pueden observar similitudes y diferencias entre cada una de las condiciones.

En el caso de los genes disminuidos en el RNAseq, se observa sólo un 11.7% de los genes totales presentes en todas las condiciones. Este porcentaje correspondía a un total de 850 genes. Entre los genes con expresión disminuida con respecto al control, se encontraba KANSL2, actuando como un control interno del experimento de silenciamiento.

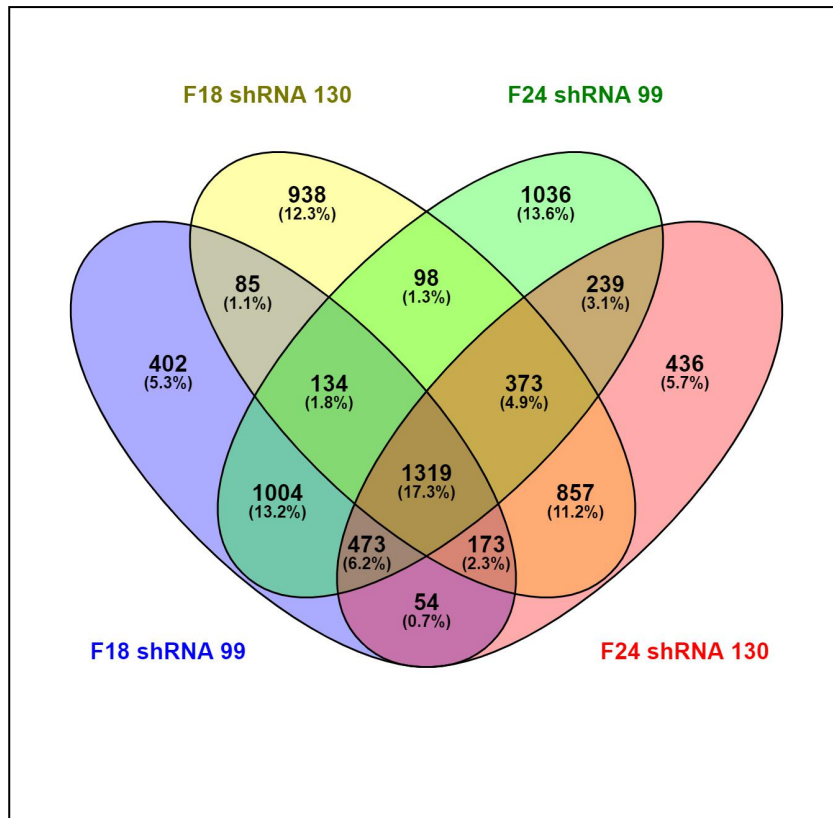


**Figura 45.** Volcano plot de los genes con expresión aumentada (rojo) y disminuida (azul) en el RNAseq para cada línea con cada shRNA. La línea punteada de corte corresponde con un valor de  $-\log_{10}(\text{p value})$  de 1,30 (equivalente a un pvalue de 0,05) Todos los valores por encima de la línea de corte son significativos.



**Figura 46.** Gráfico de Venn de los genes con expresión disminuida en las 2 líneas celulares derivadas de pacientes (F18 y F24) con los shRNAs KANSL2 II (#99) y III (#130)

En el caso de los genes que aumentaron su expresión en el silenciamiento de KANSL2, el total de genes encontrados en las condiciones más estrictas (es decir, ambos shRNAs y ambas líneas celulares) fue 1319 (17.3%).



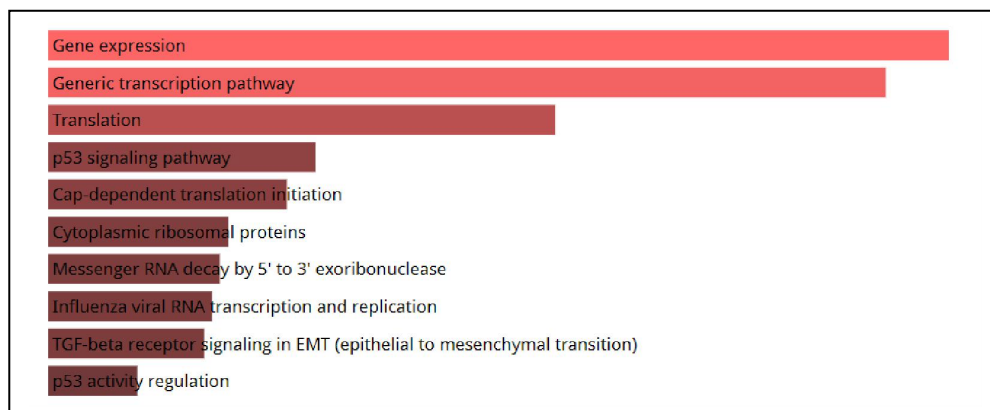
**Figura 47.** Gráfico de Venn de los genes con expresión aumentada en las 2 líneas celulares derivadas de pacientes (F18 y F24) con los shRNAs KANSL2 II (#99) y III (#130)

Como puede observarse, existe gran variabilidad en el número de genes con modulación estadísticamente significativa, tanto con expresión aumentada como disminuida, entre los distintos shRNAs y las dos líneas. Esto es de esperarse dado que se trata de secuencias de horquilla independientes y se sabe que las células de GBM presentan una gran variabilidad, tanto intra como inter tumoral. Para reducir potenciales efectos *off target* así como efectos propios de la muestra que puedan afectar la selección de potenciales genes (como una baja reproducibilidad), se decidió trabajar con aquellos genes fueron modulados en ambas líneas y con ambas *hairpins* shKANSL2. Es decir, los 850 y 1319 genes disminuidos y aumentados, respectivamente. Si bien esta decisión redujo considerablemente el número total de genes evaluados como potenciales genes candidatos, el aumento de astringencia en el criterio de la selección frente a las variables experimentales permite una mayor robustez.

La gran cantidad de datos disponibles presentó un desafío metodológico a la hora de llegar a conclusiones. Se evaluaron las posibles vías de señalización bajo regulación de KANSL2 mediante la herramienta bioinformática Enrichr.

#### Genes con expresión disminuida en el RNAseq

La lista de genes disminuidos contenía genes involucrados en expresión génica tanto al nivel de la transcripción como la traducción. Ambos procesos mostraron modulación a distintos niveles. Por ejemplo, se encontraron disminuidos genes relacionados al proceso de la traducción, algunos de los cuales forman parte de los ribosomas y otros son factores involucrados en el inicio de la traducción dependiente de la Cap (Figura 48).



**Figura 48.** *Pathways* involucrados en la lista de genes con expresión disminuida. Datos obtenidos mediante la herramienta Enrich y a partir de la base de datos Bioplanet

Resulta interesante, por ejemplo, que la vía de p53 se vea afectada. Los datos previos sugieren que cierto estrés celular es provocado por el silenciamiento de KANSL2, lo cual podría explicar la posible activación de la respuesta de p53. Se conoce que KAT8 se encuentra también involucrado en esta vía (Zhang, S. *et. al.* 2013), pero para KANSL2, no había sido asociado en este proceso. Sería interesante explorar una acción conjunta de ambas proteínas, KAT8 y KANSL2, en la reparación al daño al DNA y la respuesta al estrés celular.

También identificamos genes involucrados con la vía de TGF- $\beta$  relacionada al proceso de EMT. Hasta la fecha no se ha asociado a ningún miembro del complejo NSL con este proceso.

Con el fin de aumentar la rigurosidad en el criterio de selección de los genes, se evaluaron aquellos que presentaban una expresión disminuida de un *fold* menor a 0,5x, es decir más de un 50% de disminución. Se evaluaron en total 72 genes que cumplen con este criterio y se empleó la herramienta *Toppclustal*, obteniéndose resultados acordes a los anteriores. Nuevamente encontramos varias vías involucradas en el proceso de la traducción, entre ellos una gran cantidad de proteínas ribosomales y factores involucrados en la interacción del ribosoma con los mRNAs maduros (Figura 49).

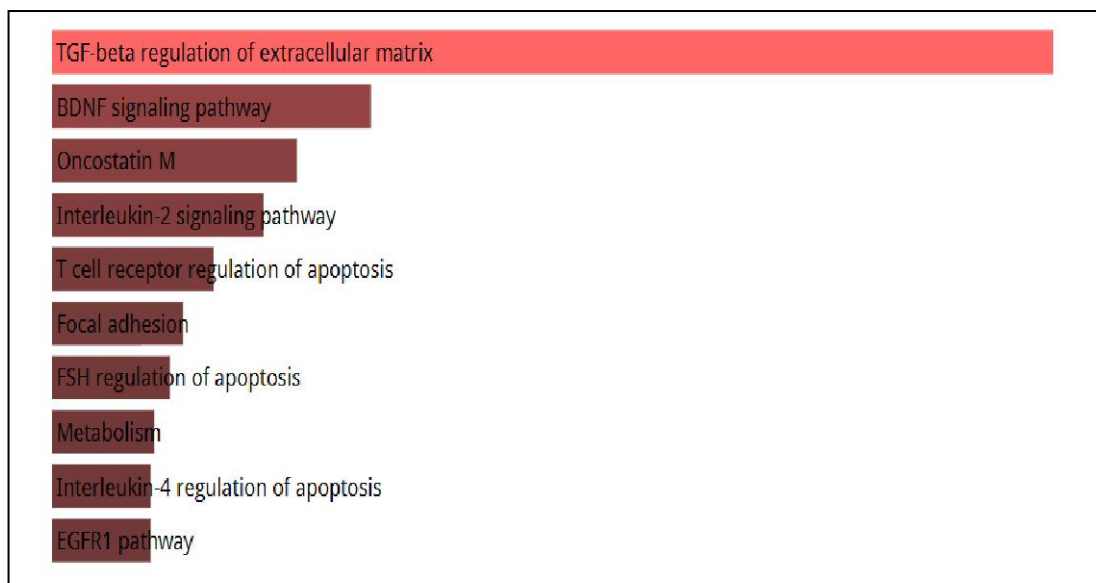
Category	ID	Title (or Source)
Pathway		
Pathway	1268678	Translation
Pathway	1268686	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit
Pathway	1268679	Eukaryotic Translation Initiation
Pathway	1268689	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
Pathway	1268680	Cap-dependent Translation Initiation
Pathway	1269650	Generic Transcription Pathway
Pathway	1268688	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression
Pathway	1268681	Formation of a pool of free 40S subunits
Pathway	M145	Direct p53 effectors
Pathway	137939	Direct p53 effectors
Pathway	1269717	Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)
Pathway	1269716	Nonsense-Mediated Decay (NMD)
Pathway	1339156	Selenocysteine synthesis
Pathway	M189	Ribosome

**Figura 49.** Vías involucradas en la lista de genes con expresión disminuida con un fold menor a 0,5x. Datos obtenidos mediante la herramienta Toppclusterl.

Si bien, no es posible determinar con este tipo de análisis, si una actividad celular se encuentra aumentada o disminuida, la alteración de los niveles de genes involucrados en la traducción apoyarían los resultados observados sobre la biogénesis de ribosomal por parte de KANSL2. También, podrían sugerir que KANSL2 podría estar involucrado en pasos adicionales durante la biogénesis ribosomal, además de la transcripción y procesamiento del rRNA.

#### Genes con expresión aumentada en el RNAseq

En el caso de los genes con expresión aumentada en el RNAseq, se encontraron genes involucrados en una gran variedad de procesos, entre ellos genes involucrados en el re-arreglo de la matriz extracelular por la vía de TGF- $\beta$ , interacciones célula-célula mediante adhesiones focales y la señalización por citoquinas de la familia gp130 como Oncostatin M y las interleuquinas 2 y 4 (Figura 50).



**Figura 50.** Vías involucradas en la lista de genes con expresión aumentada. Datos obtenidos mediante la herramienta Enrich y a partir de la base de datos Bioplanet.

Si bien la actividad de la vía de TGF- $\beta$  aparece también en relación a genes de expresión reducida, hay muchos más en el grupo de genes aumentados. La vía de TGF- $\beta$  ha sido vinculada a diversos procesos como el crecimiento celular, la embriogénesis, la diferenciación, el re-arreglo de la matriz extracelular, la inmunidad y la apoptosis. Debido a sus efectos pleiotrópicos, se la ha descrito como una supresora y una promotora de la tumorigénesis (Derynck, R. & Zhang, Y. E. 2003; Liu, S. *et. al.* 2018). En GBM, se sabe que TGF- $\beta$  es un factor fundamental en la transición epitelial-mesenquimal (EMT), proceso fundamental en la metástasis. Durante el EMT, las células epiteliales pierden su polaridad, y las uniones célula-célula se transdiferencian hacia un perfil móvil mesenquimal (Kalluri, R. 2009).

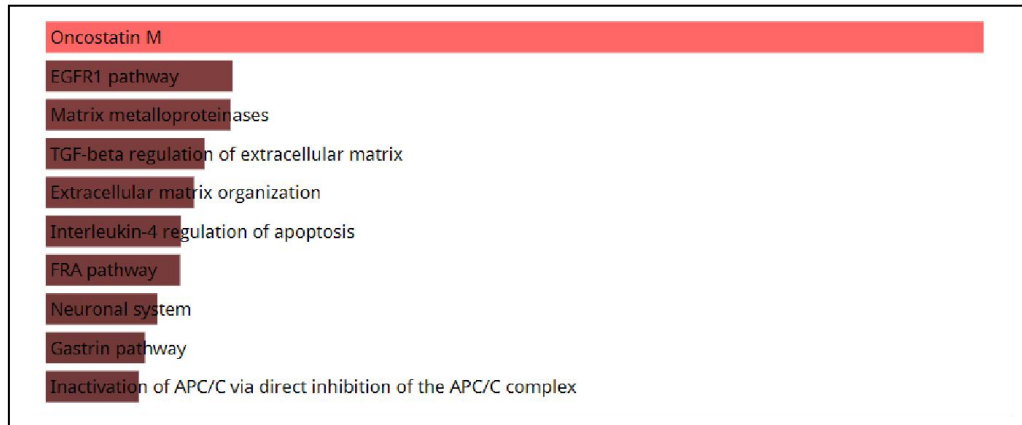
Sería interesante, entonces, continuar la caracterización de KANSL2 evaluando su potencial impacto sobre el EMT y la migración celular dado que diferentes componentes de esta vía aparece modulada como consecuencia de modificar los niveles endógenos de KANSL2 en GBM.

Decidimos repetir el análisis de los genes que tuvieran una diferencia de expresión de un fold mayor a 2x, es decir que duplicaron su expresión, en el RNAseq. Se identificaron en total 216 genes y mediante un análisis similar observamos, nuevamente, vías relacionadas con la regulación de la matriz extracelular, como aquella mediada por TGF- $\beta$ , pero también se identificó genes de diversas metaloproteasas (Figura 51).

Las metaloproteasas degradan la matriz extracelular en varios procesos fisiológicos y patológicos y resultan indispensables para el proceso de la metástasis y se encuentran frecuentemente sobreexpresadas en gliomas (Nakada, M. *et. al.* 2003). Las metaloproteasas han sido relacionadas también a la angiogénesis, proceso en el que se forman vasos sanguíneos nuevos a partir de los preexistentes. Se conoce que la angiogénesis juega un rol vital en el suministro de nutrientes a medida que el tumor crece y, también, en la dispersión de células malignas a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo (De Palma, M. *et. al.* 2017).

Oncostatin M es una citoquina de la familia de las interleuquinas 6/gp130, y aparece como una de las vías más representadas en este nuevo análisis. En GBM esta vía representa un uso potencial en la clínica ya que se ha visto que promueve la angiogénesis y la invasión perivascular. Además, la identificación

de esta modulación por KANSL2 es interesante dado que datos publicados por el grupo muestran expresión de KANSL2 en regiones perivasculares en muestras de pacientes (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016).



**Figura 51.** Vías involucradas en la lista de genes con expresión aumentada y un fold mayor a 2x. Datos obtenidos mediante la herramienta Enrich y a partir de la base de datos Bioplanet.

El análisis mediante la herramienta Toppcluster mostró un marcado perfil relacionado al desarrollo, la morfogénesis y la regeneración celular (Figura 52).

Category	ID	Title (or Source)
GO: Biological Process	GO:0048666	neuron development
GO: Biological Process	GO:0031175	neuron projection development
GO: Biological Process	GO:0000902	cell morphogenesis
GO: Biological Process	GO:0002009	morphogenesis of an epithelium
GO: Biological Process	GO:0009611	response to wounding
GO: Biological Process	GO:0060560	developmental growth involved in morphogenesis
GO: Biological Process	GO:0014012	peripheral nervous system axon regeneration
GO: Biological Process	GO:0071887	leukocyte apoptotic process
GO: Biological Process	GO:0048729	tissue morphogenesis
GO: Biological Process	GO:0060429	epithelium development
GO: Biological Process	GO:0060562	epithelial tube morphogenesis
GO: Biological Process	GO:0048589	developmental growth
GO: Biological Process	GO:0048675	axon extension
GO: Biological Process	GO:0032989	cellular component morphogenesis
GO: Biological Process	GO:0009725	response to hormone
GO: Biological Process	GO:0061564	axon development
GO: Biological Process	GO:0061326	renal tubule development
GO: Biological Process	GO:0060441	epithelial tube branching involved in lung morphogenesis
GO: Biological Process	GO:0031099	regeneration
GO: Biological Process	GO:0048754	branching morphogenesis of an epithelial tube
GO: Biological Process	GO:0040007	growth
GO: Biological Process	GO:1990138	neuron projection extension
GO: Biological Process	GO:0070661	leukocyte proliferation
GO: Biological Process	GO:0009887	animal organ morphogenesis
GO: Biological Process	GO:0060284	regulation of cell development

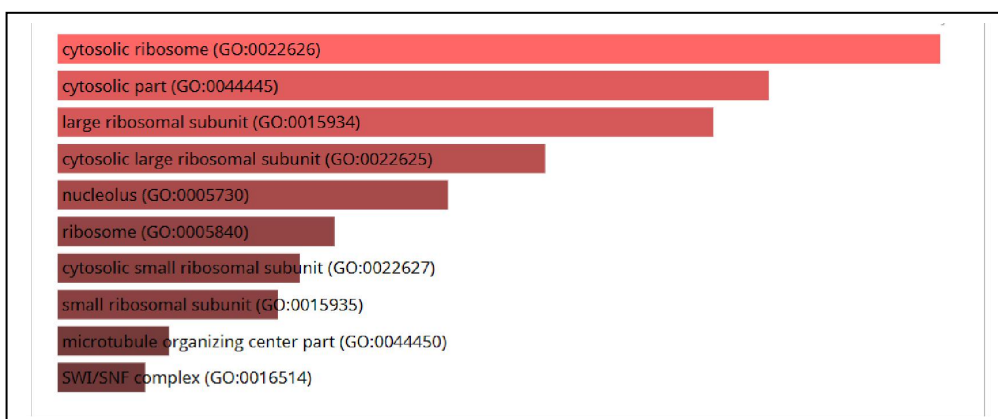
**Figura 52.** Vías involucradas en la lista de genes con expresión aumentada con un fold mayor a 2x. Datos obtenidos mediante la herramienta Toppclustal.

## Comparación de los datos de RNAseq con la base de datos de TCGA de glioblastoma

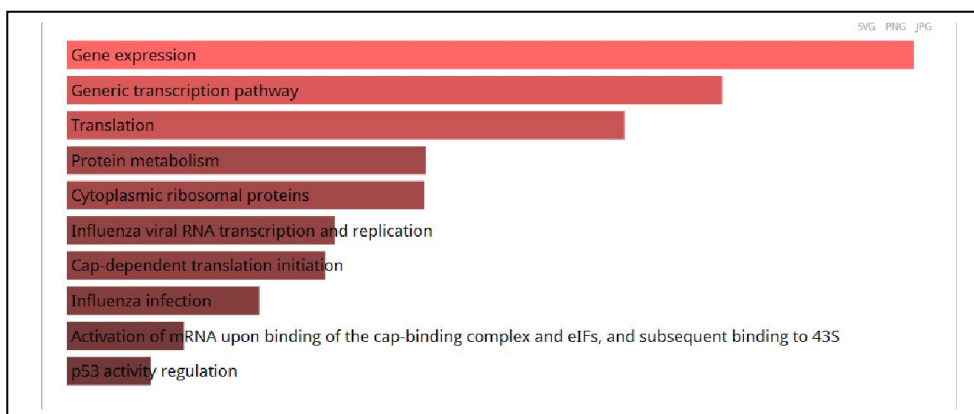
Por último, se decidió complementar nuestro análisis del RNAseq con los datos de los 160 tumores de GBM reportados en la base pública de *The cancer Genome Atlas* (TCGA). Se tomó como partida a la lista genes que mostraban modulación positiva o negativa en el RNAseq y se los comparó con los datos de TCGA-GBM obtenidos mediante la herramienta cBioPortal cancer. Se restringieron las listas nuevamente, eligiendo sólo aquellos genes que mostrasen en TCGA-GBM una correlación similar a la encontrada en el RNAseq. Es decir, genes con expresión disminuida en nuestro RNAseq y que son los que presentan una correlación directa con el nivel de expresión de KANSL2. Luego evaluamos si dichos genes presentaban en TCGA-GBM una correlación con el nivel de expresión de KANSL2. Del mismo modo, se analizaron aquellos genes de correlación inversa con KANSL2.

De esta manera se intentó identificar aquellos genes que replicaran el perfil de correlación con KANSL2 en un modelo más cercano a la clínica. Con estos criterios se logró reducir significativamente la cantidad de genes candidatos. Particularmente, en el caso de los genes de correlación positiva se obtuvieron 180 genes finales, los cuales fueron analizados mediante la herramienta Enrich.

Al evaluar el componente celular asociado a estos genes, se identificó que muchos de ellos formaban parte de los ribosomas, el nucleolo o el citoplasma (Figuras 53 y 54), lo cual resultó de particular interés teniendo en cuenta los datos previos.

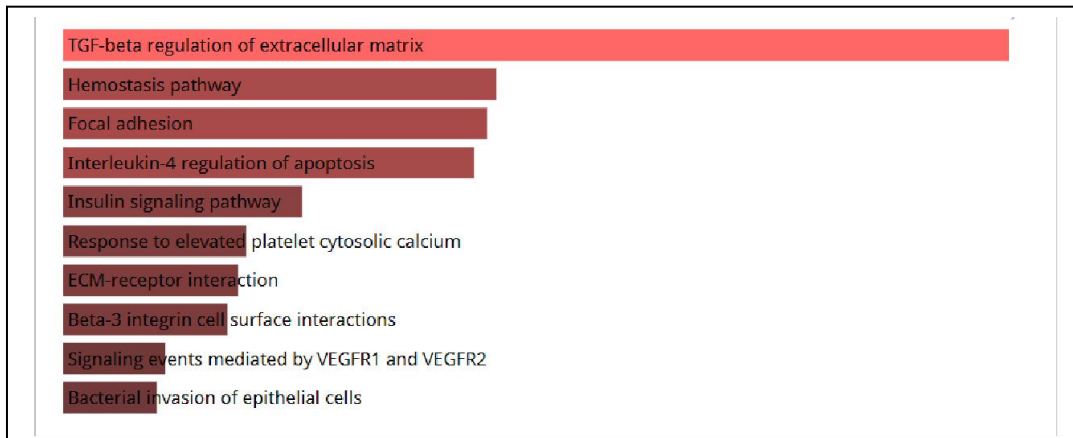


**Figura 53.** Componentes subcelulares involucrados en la lista de genes con expresión disminuida y correlación positiva en la base de datos GBM de TCGA. Datos obtenidos mediante la herramienta Enrich y a partir de la base de datos Bioplanet.



**Figura 54.** Vías involucradas en la lista de genes con expresión disminuida y correlación positiva en la base de datos GBM de TCGA. Datos obtenidos mediante la herramienta Enrich y a partir de la base de datos Bioplanet.

Los genes con expresión aumentada en el RNAseq y similar perfil de expresión en TCGA, es decir, correlación inversa con respecto a KANSL2, fueron 293. Los mismos correspondían a las vías de regulación de la matriz extracelular mediante TGF- $\beta$ , adhesiones focales, hemostasis y sistema inmune, entre otros (Figura 55).



**Figura 55.** Vías involucradas en la lista de genes con expresión aumentada y con correlación negativa de la base de datos GBM de TCGA. Datos obtenidos mediante la herramienta Enrich y a partir de la base de datos Reactome.

Este estudio de transcriptómica nos ha permitido conocer algunas de las vías en las cuales KANSL2 podría cumplir un rol. Si bien no es posible afirmar de qué manera KANSL2 estaría modulando estos procesos, estos datos permiten plantear a futuro diversos rumbos de investigación para nuestro

laboratorio. Será necesario, por supuesto, validar estos datos con ensayos *in vitro* como primer paso en la caracterización de las potenciales nuevas funciones de KANSL2. Es importante también recordar el contexto en el cual este RNAseq fue realizado ya que se trató de un ensayo en cultivos 3D y en condiciones de *stemness*. Sería interesante, en primera instancia, comparar los resultados obtenidos entre los diversos formatos de cultivo celular para poder comprender de qué manera el tipo de cultivo afecta el rol de KANSL2

•

## **Conclusiones**

- KANSL2 modula la expresión de genes involucrados en procesos celulares básicos relacionados con homeostasis celular en muestras de pacientes. En particular:

a) Los genes que disminuyen su expresión en shRNA KANSL2 en cultivos 3D se relacionan con las vías de transcripción y traducción, la respuesta al daño al DNA y la síntesis de biomoléculas.

b) Los genes que aumentan su expresión en shRNA KANSL2 en cultivos 3D se relacionan mayoritariamente con la vía de TGF- $\beta$ , comunicación celular y reorganización de la matriz extracelular.

## **DISCUSIÓN**

KANSL2 es un gen que no ha sido caracterizado en detalle, por lo que la bibliografía disponible es escasa. Sin embargo en los dos últimos años han aparecido algunos reportes que indican que KANSL2 es parte del complejo NSL que regula funciones celulares básicas (Sheikh, B. N. *et. al.* 2019), pero poco se sabe de su potencial rol en tumores.

En base de datos públicos de expresión, KANSL2 pareciera tener tanto un rol promotor como inhibidor (o protector) en diferentes tipos de tumores, como en los casos de cáncer urotelial y de hígado, respectivamente. En cambio, KAT8 cuenta con mayor cantidad de bibliografía disponible, y es considerado tanto como un gen protector como oncogénico, según el tipo de cáncer estudiado. Estas observaciones indican que mas allá de las funciones celulares básicas que son reguladas por estas proteínas, cumplirían un papel diferencial en enfermedades como el cáncer dependiendo del tejido.

Nuestro grupo de trabajo demostró que KANSL2 es un gen crítico para GBM. En particular, KANSL2 modula la población con propiedades de células madre en GBM y tiene un rol esencial en la tumorigénesis. Si bien determinamos que es capaz de modular y ser modulada por el gen embrionario POU5F1 (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016), aun se desconocen los mecanismos involucrados en estos procesos, así como los genes blanco de regulación por KANSL2 en esta enfermedad.

En particular, el hecho de que los niveles de KAT8 y H4k16ac se encuentren bajos en algunos tumores podría estar relacionado con algunas subunidades del complejo NSL, como KANSL2, puedan estar desreguladas en esos tumores (Sheikh, B. N. *et. al.* 2019). Si esto se llegara a demostrar, resaltaría la importancia de un balance estequiométrico entre los distintos componentes para sostener la homeostasis tisular normal.

También es relevante resaltar que, a diferencia de la marca epigenética H4k16ac, no hay estudios realizados para las otras marcas como H4K5, K8, K12 dependientes del NSL en tumores. Como se mencionó en la tesis, una reciente publicación describe mediante RNAseq los distintos escenarios celulares bajo silenciamiento de componentes individuales del NSL, incluyendo

KANSL2, explorando una potencial relación entre los componentes del complejo, sus genes blanco y asociaciones con enfermedades (Radziskeuskaya, A. *et. al.* 2021; Rodrigues, C. P. *et. al.* 2020).

Dado que parece existir un efecto tejido dependiente que estaría asociado a la expresión y función de las proteínas que componen los complejos en donde actúa KAT8, tanto en el NSL como en el MSL, se remarca la necesidad de contextualizar el estudio de estos genes dentro de cada patología específica.

Los órganos con mayor expresión de KANSL2 son aquellos correspondientes al sistema respiratorio, genital y endócrino. El cerebro presenta una expresión moderada de KANSL2 en condiciones normales. Sin embargo, los tumores de GBM presentan elevados niveles de KANSL2 con respecto al tejido sano adyacente (Solari, N. E. F. *et. al.* 2016). En la base de datos pública de TCGA, los gliomas y en especial los GBM, correlacionan con una elevada expresión de KANSL2.

A pesar de la correlación de elevados niveles de KANSL2 en distintos tumores, la cantidad de mutaciones reportadas para este gen son bajas. Sólo se han reportado mutaciones puntuales de tipo mosaico (mutaciones que generalmente ocurren al azar durante el desarrollo embrionario) para KANSL2 que podrían asociarse a un fenotipo de discapacidad intelectual grave, sin embargo las variantes de KANSL2 asociadas como potenciales causantes de la enfermedad no se ha caracterizado (Gilissen, C. *et. al.* 2014).

Estos datos sumados a las recientes publicaciones y datos de expresión obtenidos en esta tesis, sugieren que KANSL2, así como otros miembros del complejo NSL, estaría involucrado en varias funciones celulares esenciales, lo cual explicaría el alto grado de similitud de secuencia con otros organismos.

### **La localización subcelular de KANSL2**

Los análisis *in silico* realizados a partir de la secuencia de KANSL2 predijeron la localización subcelular mitocondrial, nuclear y citoplasmática. Recientemente, un reporte ha vinculado algunos miembros del complejo NSL a la regulación de la respiración mitocondrial. KANSL1, KANSL3 y KAT8 han sido evidenciadas dentro de esta organela, si bien se desconoce de qué forma se regularía dicha localización. En el caso de KANSL2, se confirmó su presencia

dentro de la organela por análisis bioquímicos, pero no se caracterizó como los otros miembros del complejo (Chatterjee, A. *et. al.* 2016).

Durante este trabajo no se pudo corroborar la predicción/localización mitocondrial de KANSL2. En cambio, en ensayos de inmunofluorescencia contra KANSL2 endógeno mostraron su localización nuclear y citoplasmática, con una novedosa acumulación en los nucleolos.

Los nucleolos son los compartimentos nucleares más prominentes, donde tiene lugar la transcripción y procesamiento de RNAs ribosomales, así como el ensamblado de las subunidades mayor y menor de los ribosomas. La transcripción del rRNA constituye la mayor parte de la transcripción total en células eucariotas y es el paso limitante en la biogénesis ribosomal.

Células con alta proliferación presentan una demanda ribosomal mayor. Por tal motivo, se ha considerado el aumento de la transcripción de los rRNAs ribosomales como un paso necesario en la transformación tumoral (Nguyen, L. X. T *et. al.* 2015).

Los nucleolos han sido vinculados a diversos procesos como la tumorigénesis, el mantenimiento de la plasticidad y el envejecimiento (Takada, H. & Kurisaki, A. 2015; Ruggero, D. 2012). Actualmente, se estudia el rol causal de la biogénesis ribosomal sobre estos procesos, lo cual representa un cambio de paradigma con respecto a la forma histórica de considerarla una actividad *housekeeping*.

En gliomas, se ha determinado que existe una correlación entre la actividad nucleolar y la capacidad proliferativa de las células, y la tumorigénesis, pero los mecanismos involucrados han sido poco explorados (Hara, A. *et. al.* 1990). Recientemente se ha reportado que la IMP deshidrogenasa-2 (IMPDH2), la enzima limitante en la velocidad para la biosíntesis de novo de nucleótidos de guanina esta sobreexpresada e impulsa una actividad nucleolar aberrante promoviendo la tumorigénesis en el glioblastoma (Kofuji, S. *et. al.* 2019).

La tinción endógena de KANSL2 presentó heterogeneidad. Como pudo observarse en ensayos de *western blot* de extracto total y de fraccionamiento celular, la heterogeneidad de la marca subcelular de KANSL2 podría deberse a una localización diferencial entre las distintas isoformas.

En los últimos años la comunidad científica ha empezado a cuestionar el uso de líneas celulares comerciales como modelos de distintas enfermedades.

Es por esto que, cada vez más, se promueve el empleo de líneas derivadas de pacientes. Éstas últimas, se cree, representan mejor la realidad de la patología y reflejan mejor la complejidad genotípica y fenotípica de la enfermedad que las líneas comerciales. Las líneas derivadas de pacientes poseen mayor grado de plasticidad celular y son modelos celulares más próximos a la clínica. Sin embargo, el cultivo de estas líneas suele ser complejo y costoso ya que deben agregarse reactivos especiales al medio de cultivo y, muchas veces, es necesario realizar un *coating* proteico sobre las superficies de las placas para permitir la adhesión celular. El tiempo que pueden cultivarse estas líneas es también menor ya que es especialmente importante evitar la acumulación de mutaciones así como la disminución de su capacidad de diferenciación celular y/o plasticidad.

Las líneas comerciales, en cambio, son fáciles de cultivar y se conoce muy detalladamente su *background* genético debido a la enorme cantidad de bibliografía disponible para cada línea. Sus principales críticas se relacionan al tratamiento llevado a cabo para inmortalizarlas el cual, necesariamente, termina generando diferencias con respecto al origen de la línea.

Es importante siempre conocer las limitaciones de ambos modelos e, idealmente, complementar la investigación con ambos sacando provecho de las ventajas de cada uno.

Empleamos entonces las líneas de GBM humano derivadas de pacientes G03 y G08 para evaluar si reproducían los patrones determinados en la línea comercial U87MG. Encontramos que en estas líneas derivadas de pacientes, KANSL2 endógena presenta una marca heterogénea similar a la reportada para las líneas comerciales, con presencia de marca en los nucleolos. Es importante mencionar que las células U87MG fueron cultivadas en formato 2D en medio de crecimiento mientras que las células derivadas de pacientes dentro del mismo formato fueron cultivadas en medio *stem*. Lo cual indica que independientemente del medio, KANSL2 se encuentra en el nucleolo de células proliferantes.

Un dato interesante es que tanto la señal endógena de KANSL2 como la obtenida en los ensayos de sobreexpresión muestran que la señal nucleolar de KANSL2 no es homogénea entre los nucleolos de una misma célula, a diferencia de otros marcadores nucleolares como UBF y FBL. Dentro de una

misma célula no todos los nucleolos muestran tinción y no todos las señales son de la misma intensidad.

Además, el tratamiento con Actinomicina D desplazó a la marca de KANSL2 de manera diferencial a UBF, sugiriendo un factor dinámico el cual depende de la actividad transcripcional de la RNA polimerasa I.

Hemos determinado que la localización nucleolar de KANSL2 endógena tendría una regulación ciclo celular dependiente en cultivos 2D. Particularmente, se observó una significativa disminución en la marca de KANSL2 dentro de los nucleolos durante la fase S en ensayos de sincronización del ciclo celular.

Durante el trabajo preliminar de mi tesis de licenciatura, se había generado la construcción KANSL2-RFP, la cual presentó una ubicación exclusivamente nuclear con colocalización parcial con marcadores nucleolares. KANSL2-RFP se comporta como KANSL2 endógeno en tanto posee localización dinámica en la fase S del ciclo celular, modula positivamente la expresión de los rRNA (ver mas abajo) y además regula positivamente la expresión de los genes endógenos de pluripotencia (resultados publicados en Solari, N. E. F. *et. al.* 2016 y en esta tesis). En la fase S, cuando el DNA se replica previo a la división celular, se verificó en ensayos de sobreexpresión de KANSL2-RFP y la proteína PCNA, que KANSL2-RFP es excluida de los nucleolos durante esta fase replicativa. Es decir, KANSL2-RFP reproduce lo observado para la marca endógena.

Es importante tener en cuenta que los niveles de expresión del rRNA no son constantes a largo del ciclo celular sino que aumentan progresivamente, comenzando con la formación de los nucleolos durante el final de la mitosis (Zaidi, S. K. *et. al.* 2016; Klein, J. & Grummt, I. 1999). Dicha transcripción es alta durante la fase S, momento en el cual KANSL2 estaría excluido de los nucleolos. Esto último podría representar una contradicción con nuestras hipótesis de que KANSL2 promueve la transcripción del rRNA. Sin embargo, la caracterización de KANSL2 mas profunda nos permitirá proponer varias alternativas, las cuales deberemos estudiar en detalles en el futuro, para comprender mejor el rol de KANSL2 en la biogénesis de rRNA.

Una posibilidad es que KANSL2 tenga distintos roles a lo largo del ciclo celular. Podría tener un rol activador en los nucleolos durante G1/S temprana, por ejemplo participando de un *priming* epigenético (Brown, S. E. & Szyf, M.

2008) a nivel del promotor de rDNA junto a KAT8 como parte del complejo NSL, mientras que su cambio de localización durante la fase S tardía podría implicar, por ejemplo, el secuestro de algún factor inhibitorio hacia afuera de los nucleolos. El mecanismo por el cual KANSL2 regula la actividad nucleolar durante el ciclo celular requiere mayor caracterización.

Por último, KANSL2 no sólo disminuyó su localización nucleolar durante la fase S sino que también aumentó su marca citoplasmática. Hasta la fecha se desconocen las funciones que esta proteína pudiera estar desempeñando fuera del núcleo. Si bien miembros del complejo NSL han sido vinculados a la regulación de funciones mitocondriales asociadas también al sostenimiento del estado *stem*, esta caracterización es aún escasa (Iranmanesh, Y. *et. al.* 2021). Por estos motivos, la localización citoplasmática de KANSL2 abre un nuevo escenario en relación con el complejo NSL y su potencial rol en la modulación de la plasticidad celular.

### **Estudiar la regulación de KANSL2 sobre el rRNA y la proliferación**

Debido a la localización de KANSL2 en los nucleolos y el rol vital que cumplen estos en la transformación celular, decidimos explorar la participación de KANSL2 en la transcripción de rDNA. Evaluamos diversos genes como los factores UBF y POLR1E, ambos indispensables para la actividad de la RNA polimerasa I. También cuantificamos el nivel de 18S, uno de los rRNAs maduros que conforman los ribosomas.

En el caso de la sobreexpresión de KANSL2, todos estos genes aumentaron su expresión significativamente. El efecto contrario pudo detectarse tanto en el silenciamiento estable como transitorio de KANSL2. Curiosamente, al cuantificar al precursor de rRNA, el 45S, se detectaron niveles elevados en las tres condiciones experimentales (esto es sobreexpresión, y silenciamiento tanto estable como transitorio). Consideramos que el hecho de que los niveles del 45S se encuentren elevados en el silenciamiento de KANSL2 no implicaría necesariamente que su tasa transcripcional sea mayor. Una posibilidad sería que alguno de los pasos posteriores, como el procesamiento y clivaje del 45S en los 3 finales rRNAs, se encuentren inhibidos/retrasados. En efecto, los niveles del 18S se encontraban disminuidos solamente en los silenciamientos y aumentados en la

sobreexpresión de KANSL2. Esto sugiere que las causas del aumento en los niveles del 45S serían distintas en los ensayos de sobreexpresión y silenciamiento.

Para estudiar este punto, se obtuvo un plásmido reportero que contenía la secuencia promotora de rDNA río arriba del gen de la luciferasa. En este caso se observaron efectos opuestos a distintos niveles de KANSL2, indicando un aumento en la transcripción para el caso de la sobreexpresión y una disminución de la misma en los ensayos de silenciamiento. Es decir que, si en el silenciamiento de KANSL2 se encuentra inhibida la transcripción del rDNA, el aumento del 45S podría deberse a fallas en su procesamiento. Esto explicaría por qué se observó también una disminución en los niveles del 18S.

Estas mismas mediciones fueron realizadas para el silenciamiento transitorio de KANSL2 mediante siRNA en las líneas derivadas de pacientes G03 y G08 enriquecidas en CSC (*cancer stem cells*), encontrándose que tanto el silenciamiento de la expresión de KANSL2 regula los niveles de rRNA en células de GBM humano. La sobreexpresión de KANSL2 en las líneas derivadas de pacientes también reprodujo lo observado en las líneas comerciales.

La regulación de rRNA por parte de KANSL2 resulta interesante al tener en cuenta que tanto la síntesis del rRNA, como la localización de KANSL2 son dinámicas en el ciclo celular.

Se sabe que cambios en la transcripción del rDNA afectan el crecimiento y la proliferación celular y que a su vez la transcripción del rDNA responde a diversas condiciones como altas tasas de proliferación así como condiciones de crecimiento restringido bajo agotamiento de nutrientes, el desarrollo embrionario temprano hasta las etapas de senescencia celular (Tanaka, Y. & Tsuneoka, M. 2018; Kresoja-Rakic, J.; & Santoro, R. 2019; Machwe, A. *et. al.* 2000).

También se ha descrito la asociación de una alta actividad transcripcional del rDNA y la malignidad celular (Gaviraghi, M. *et. al.* 2019). El aumento de los niveles en la síntesis del rRNA inducido por la sobreexpresión de KANSL2 apoyaría la hipótesis de que KANSL2 tiene un rol oncogénico en GBM. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación en los

cuales la tasa proliferativa se encontraba aumentada en células que sobreexpresan KANSL2.

De igual manera, la disminución en los niveles de rRNA podría estar implicado en la disminución de la tasa proliferativa que presentan células de GBM estables para el silenciamiento de expresión de KANSL2.

Dado que KANSL2 fue caracterizado como un regulador de *stemness* en GBM, comprender como esta proteína así como otras factores asociados regulan la proliferación celular en distintos escenarios es de critica importancia. Particularmente en lo que respecta al ciclo celular, si bien se han asociado fases específicas del ciclo celular con la toma de decisiones celulares como autorenovación o diferenciación, los mecanismos que vinculan la maquinaria del ciclo celular con el compromiso del destino celular siguen siendo una incógnita (Dalton, S. 2015).

La suma de estos resultados indicaría que KANSL2 modula la biogénesis ribosomal a nivel transcripcional y podría estar también involucrada en regular la expresión de proteínas asociadas al procesamiento del precursor o de otras proteínas involucradas durante la biogénesis ribosomal. Futuras determinaciones serán necesarias para explorar si efectivamente KANSL2 (o el complejo NSL) regulan el procesamiento del rRNA.

### **Estudiar la potencial regulación de KANSL2 sobre KAT8**

Los reportes previos han vinculado a KAT8 con la regulación epigenética del rRNA, sin embargo, no existen datos que describan al complejo NSL como regulador de la biogénesis ribosomal. En particular, KAT8 no ha sido explorado en detalle como un modulador de la transcripción si bien el hecho de ser capaz de acetilar al promotor de rDNA lo convierta en un gran candidato como modulador de la biogénesis ribosomal.

En la presente tesis se estudió la regulación de KANSL2 sobre KAT8 y encontramos que los niveles de KANSL2 modulan positivamente los niveles de expresion de KAT8. A su vez, KAT8 mostró el mismo efecto sobre KANSL2. Es decir, existe una retroalimentación positiva entre ambas proteínas lo cual podría sugerir una actividad en conjunto de ambas proteínas, muy probablemente como complejo NSL.

Al analizar la maquinaria de síntesis de rRNA en la sobreexpresión de KAT8, encontramos el mismo patrón que en la sobreexpresión de KANSL2: Observamos un aumento en los niveles de UBF y POLR1E, el 45S pre-rRNA y el 18S rRNA.

Estas mismas mediciones fueron realizadas para el silenciamiento estable de KAT8 mediante dos shRNAs diferentes en células de GBM. El perfil de expresión observado fue el opuesto al de la sobreexpresión para todos los genes evaluados con la excepción del 45S pre-rRNA.

El hecho de que tanto en la sobreexpresión como en el silenciamiento de KAT8, se produzca una acumulación en los niveles del 45S pre-rRNA, no fue una sorpresa ya que lo mismo ocurrió al alterar los niveles de KANSL2. Coincidiendo con lo reportado para KANSL2 en el ensayo de luciferasa, se observó una inducción de la transcripción de rRNA durante la sobreexpresión de KAT8 y una inhibición de la síntesis en su silenciamiento. Concluimos, entonces, que el dato de acumulación de los niveles del 45S pre-rRNA en el silenciamiento indicaría una acumulación de este precursor debido a potenciales fallas su posterior procesamiento.

Teniendo en cuenta los datos acerca de la localización dinámica de KANSL2 en el ciclo, podría ocurrir que su potencial regulación de KAT8 tenga también un componente ciclo celular dependiente. Esta posibilidad resulta muy interesante ya que, como se mencionó en la introducción, la regulación de KAT8 sobre el rDNA es dependiente del ciclo celular (Zhou et al. 2009). Particularmente, se describió un rol dual de KAT8 durante la fase S, momento en el cual KANSL2 disminuye su marca nucleolar. KAT8 ha sido implicada en el proceso de la replicación del rDNA mediante la acetilación de la H4, así como en la acetilación de proteínas no histonas, como es la subunidad del complejo NoRC, el cual regula la heterocromatinización de las copias inactivas de rDNA. KAT8 ejercería entonces un rol dual en los nucleolos, promoviendo e inhibiendo la actividad del remodelador de cromatina NoRC. Se ha visto que la actividad de KAT8 es crítica durante la fase S para relajar la cromatina lo suficiente para que las copias silenciadas de rRNA se copien y luego volver a reclutar metiltransferasas y deacetilasas a la región (Zhou, Y. et al. 2009). La salida de KANSL2 del nucleolo en el momento preciso en el que KAT8 cambia su función

sobre el complejo NoRC, resulta interesante y amerita una mayor caracterización.

Si bien el rol de KAT8 en la replicación del rDNA en la fase S fue caracterizado, todavía no ha sido relacionado con eventos tumorigenicidad. Estas evidencias nos permiten hipotetizar acerca de una potencial función en conjunto entre KANSL2 y KAT8 en GBM.

La memoria epigenética de las copias silenciadas del rDNA es crítica para la reorganización de la arquitectura nuclear y la viabilidad celular. Es posible que estos mecanismos sirvan para explicar las aberraciones cromosómicas detectadas en ensayos de silenciamiento de KAT8 (Thomas, T. *et. al.* 2008). A pesar de estos antecedentes, aún se desconoce como ocurre el sostenimiento de la acetilación de las diferentes histonas en el promotor del rDNA, su localización a lo largo del ciclo celular y como las proteínas asociadas influyen en su actividad, entre otras.

Al parecer, KANSL2, también es un gen vital ya que no se ha podido obtener un *knock out*. Como se mencionó, hemos intentado hacer estables de sobreexpresión lo cual fue imposible ya que las células tienden a perder la expresión del transgén.

Es importante resaltar nuevamente que los trabajos que vinculan a KAT8 a la epigenética del rDNA tienen su foco en la replicación del DNA y la integridad genómica por lo cual el rol de KAT8 como modulador de la biogénesis ribosomal queda todavía por ser explorado en detalle, así como la participación de las proteínas de los complejos NSL y MSL.

También, recientemente se han publicado evidencias que muestran que una distorsión en la síntesis coordinada de los componentes ribosomales no sólo afecta la formación de los ribosomas, sino que también impacta sobre el destino celular (Sharma, E. & Blencowe, B. J. 2018). Sin embargo, la conexión entre la biogénesis de ribosomas y la toma de decisiones en el destino celular aún no se comprende bien. Dado que KANSL2 y KAT8 se encuentran altamente expresados en células embrionarias, y en células tumorales con propiedades de célula madre, sería interesante evaluar entonces si existe, por ejemplo, una correlación en el número y tamaño de los nucleolos frente a distintos niveles de expresión de KANSL2 y/o KAT8 y su impacto en el ciclo celular.

El hecho de que KANSL2 posee potenciales dominios de unión al DNA y que se sepa que KAT8 interactúa con el promotor de rDNA, nos permite hipotetizar que KANSL2 podría estar dirigiendo al complejo NSL hacia los nucleolos o interaccionando ella misma. Sería interesante entonces abolir estos potenciales sitios putativos o alguno de los dominios en la secuencia de KANSL2 y evaluar si se pierde el efecto sobre la regulación del rDNA. También sería interesante evaluar mediante un ensayo de ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*) la posible interacción de KANSL2 con el promotor de rDNA o, determinar si los niveles de KANSL2 pueden afectar la interacción de KAT8 con el gen ribosomal.

Dado que evidenciamos una regulación mutua entre KANSL2 y KAT8, no queda claro si los efectos en el silenciamiento de KANSL2 se deben a la disminución en los niveles de KAT8 o viceversa. Futuros experimentos de complementación serán necesarios para evidenciar si existe una prevalencia funcional de alguna de las proteínas.

En relación al mecanismo de activación transcripcional del rRNA, el hecho que aumenta la actividad luciferasa del reportero del rDNA, podría deberse en parte al aumento reportado de los niveles de UBF y POLR1E, actores claves del complejo de iniciación de la RNA POLI (Goodfellow, S. J., & Zomerdijk, J. C. 2013) y no a una regulación epigenética sobre el rDNA, ya que en el caso del plásmido no hay un contexto cromosómico.

Alternativamente, KAT8 (solo o asociado a proteínas del NSL o del MSL) podría estar regulando la acetilación de factores y de esta manera modular el tiempo o la afinidad de unión de los mismos al promotor del rDNA. Este punto sería muy interesante para explorar ya que, por ejemplo, para el caso de UBF se sabe que el estado de acetilación regula la asociación al promotor del rDNA. UBF acetilado se une a factores del complejo de la RNA POL I, durante las fases S y G2, en el pico de síntesis del rRNA, indicando la importancia de la acetilación de UBF para la regulación dependiente del ciclo celular de la síntesis de rRNA (Meraner, J. *et. al.* 2006). Dado que KANSL2 varía su localización subcelular durante las fases del ciclo y KAT8 aumenta su expresión en fase S (Zhou, Y. *et. al.* 2009) sería relevante evaluar si KANSL2 o KAT8 pueden modular epigenéticamente a estos factores.

## **Explorar los potenciales *pathways* regulados por KANSL2**

Por último, se realizó un análisis transcriptómico en células derivadas de pacientes de GBM con silenciamiento estable de KANSL2 y crecidas en formato de cultivo 3D.

El análisis preliminar de datos de RNAseq muestra una disminución en la expresión de genes involucrados en la maquinaria basal de transcripción y traducción y reparación del DNA, entre otros. Muchas de estas funciones han sido vinculadas a distintos miembros del complejo NSL, validando nuestros resultados (Sheikh, B. N *et. al.* 2019).

En el contexto del silenciamiento de KANSL2, se encontraron alteradas vías de respuesta a estrés celular. Las líneas silenciadas de manera estable tienden a perder el silenciamiento del gen, lo cual apoya la hipótesis de que los niveles de KANSL2 son críticos para la viabilidad celular. Hasta la fecha no hemos podido generar una línea estable para la sobreexpresión ya que, al poco tiempo e independientemente de la presión de selección a las que las sometemos, las células transfectadas con el vector de expresión de KANSL2, tienden a reprimir sus niveles. Resulta posible que, al ser parte de un complejo epigenético, alteraciones en las concentraciones de una subunidad como KANSL2 puedan afectar la estequiometría del complejo NSL con consecuencias negativas para la estabilidad celular. Esta idea apoya el hecho que KANSL2 y KAT8 se regulen mutuamente.

Entre los genes con expresión disminuidas encontramos también varios que pertenecen a las vías de transcripción y traducción, entre ellas varias proteínas ribosomales. Si bien podría estar relacionado al rol propuesto para KANSL2 como regulador de la biogénesis ribosomal; también estos efectos podrían deberse al contexto de estrés asociado al silenciamiento de un gen clave para la viabilidad celular. Estos resultados concuerdan con las bajas tasas proliferativas que presentan las células con bajos niveles de KANSL2. Luego de comparar la lista de genes cuya expresión esta disminuida en el silenciamiento de KANSL2 con la expresión en muestras de pacientes dentro de la base de datos de TCGA, determinamos que los genes seleccionados estaban asociados, en gran medida, a los ribosomas y el citoplasma. Se encontraban nuevamente implicados mayormente en el proceso de la traducción proteica. Es decir que tumores donde la expresión de KANSL2 era

menor presentaban también menor expresión de genes vinculados a estos procesos. Sería esencial validar la regulación de KANSL2 sobre los niveles de expresión de estos genes candidatos *in vitro* para poder comprender mejor los mecanismos mediante los cuales KANSL2 estaría regulando la epigenética, transcripción y procesamiento de rRNA. Dentro de los genes con expresión disminuida en el silenciamiento de KANSL2, se encuentra el gen TAF1, que es factor que regula la expresión de genes dependientes de la RNA POLII relacionados a la progresión del ciclo, genes relacionados al crecimiento, así como el sostenimiento de la homeostasis celular. Se ha reportado anteriormente que TAF1 localiza en el nucleoplasma, pero también en los nucleolos y coordinaría la actividad transcripcional de la RNA POL1, en parte, a través de su interacción con la proteína UBF (Lin, C. Y. *et. al.* 2002). TAF1 es reclutado también por KAT8 y KANSL2 como parte del complejo NSL (Radzisheuskaya, A. *et. al.* 2021) validando parte de nuestro ensayo de RNAseq y reforzando la idea de que tanto KANSL2 como KAT8 regulen la expresión coordinada de genes transcritos por Pol I y Pol II necesarios para la biosíntesis de proteínas y la progresión del ciclo celular.

Por otro lado, el perfil de los genes con expresión aumentada en el silenciamiento de KANSL2 corresponde fuertemente a las vías de remodelado de la matriz extracelular, comunicación celular y sistema inmune.

Muchos de estos genes presentaron correlación negativa también en las bases de datos de TCGA-GBM. Es decir, que tanto en el RNAseq como en las muestras de pacientes de GBM de TCGA, los bajos niveles de KANSL2 correlacionan con elevados niveles de estos genes candidatos. Esto último no significa que todas estas vías se encuentran activadas, sino que existe una modulación positiva de genes de estas vías en el silenciamiento de KANSL2. El estudio de la modulación por KANSL2 sobre estos genes, su participación en estas vías y su impacto en el comportamiento celular, permitirá comprender mejor el rol de KANSL2 en estos procesos pato/fisiológicos.

Las listas de genes candidatos representan una gran fuente de información que, sin duda, contribuirá al desarrollo de nuevas líneas de investigación dentro de nuestro grupo de trabajo. Por ejemplo, uno de los genes modulados en el silenciamiento de KANSL2 es CD44, relacionado a la invasión, migración y angiogénesis en GBM (Mooney, K. L. *et. al.* 2016). Este dato es de particular

interés para nuestro grupo ya que refuerza datos preliminares de ensayos de *sorting* celular en los la expresión de KANSL2 se encuentra disminuida en las células CD44 + dentro de los cultivos 3D. Es decir, que existiría una correlación inversa entre ambos genes, y KANSL2 podría ser un regulador de los niveles de CD44.

Una de las principales complejidades del GBM es su perfil infiltrante y altamente invasivo. Se ha visto que esto depende, en gran medida, a alteraciones en la matriz extracelular y las comunicaciones entre células. Actualmente, se están desarrollando terapias específicas de componentes de la matriz extracelular (Belousov, A. Titov, S. *et. al.* 2019) por lo cual, el hecho de KANSL2 sea un modulador de varios componentes claves, podría aumentar su potencial como blanco terapéutico.

KANSL2 regularía, además de CD44, a varias proteínas metaloproteasas, las cuales resultan actores claves en la invasión tumoral. Dado que la expresion de KANSL2 es significativamente mayor en GBM que en gliomas de bajo grado, y siendo los primeros tumores mas agresivos, es de crítica importancia poder validar la modulación de estos genes por KANSL2 y por el complejo NSL y analizar su impacto en el comportamiento celular así como en la dinámica de poblaciones que componen estos tumores.

Los datos obtenidos en este RNAseq deberán ser validados por ensayos *in vitro* en otras líneas celulares, tanto en cultivos 2D como 3D. Las distintas vías moduladas cumplen roles esenciales en GBM. Este ensayo ha permitido ampliar los posibles rumbos de investigación en la función de KANSL2, los cuales se encuentran siendo explorados actualmente dentro de nuestro grupo de trabajo.

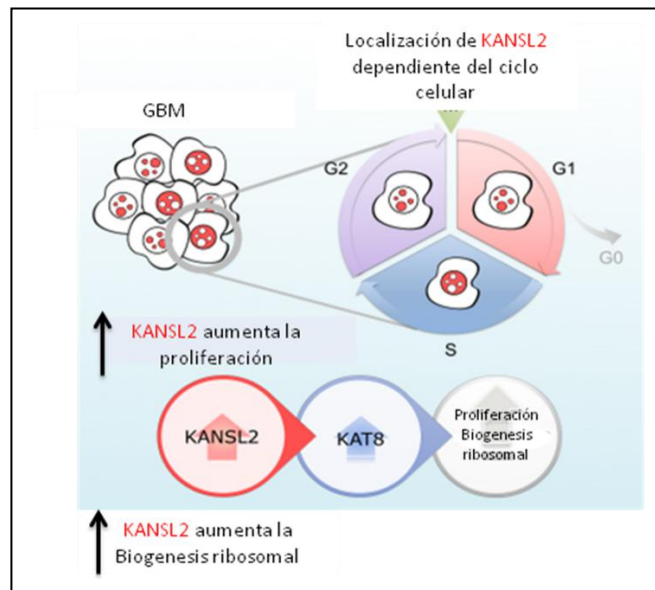
## **CONCLUSIONES**

Durante esta Tesis logramos estudiar la localización subcelular de KANSL2, describiendo y confirmando su localización parcial dentro de los nucleolos. Dicha localización es dinámica en el ciclo y resulto ser dependiente de la isoforma de la proteína.

Además, logramos describir el rol de KANSL2 como promotor de la transcripción de rRNA y la proliferación celular. El silenciamiento de KANSL2 no sólo disminuyó la proliferación y la síntesis de rRNA sino que llevó a un aumento del 45S que planteamos podría deberse a fallas en el procesamiento del pre-rRNA. Esto sugiere que KANSL2 podría regular la síntesis de rRNA en varios niveles.

KANSL2 y KAT8 parecen actuar de manera coordinada en sus efectos sobre el rRNA y la proliferación, lo cual sugeriría que las actividades de ambas estén vinculadas a su identidad como subunidades del complejo NSL. Teniendo en cuenta la predicción de dominios de unión al DNA de KANSL2, una posibilidad muy interesante sería que esté cumpliendo un rol direccionando al complejo NSL hacia los blancos de acetilación de KAT8.

Estos resultados posicionan a KANSL2 no sólo como un modulador de KAT8, sino como un actor novedoso en la biogénesis ribosomal con consecuencias en la tumorigénesis y complementaria al sostenimiento del estado *stem* (Figura 56).



**Figura 56.** Resumen modelo para un nuevo rol de KANSL2 como modulador de la proliferación celular y la biogénesis del rRNA en células tumorigénicas. KANSL2 se localiza en el nucleolo de forma dinámica durante el ciclo celular. KANSL2 está involucrado en la transcripción y procesamiento del rRNA. KANSL2 modula la expresión de KAT8 / MOF, enfocando un vínculo potencial entre KANSL2 y el control epigenético de la transcripción de rRNA por KAT8.

Finalmente, hemos determinado cuáles vías estarían bajo modulación de los niveles de KANSL2, en un contexto de cultivo 3D en células derivadas de pacientes de GBM.

Estos resultados deberán ser validados *in vitro* y la función de KANSL2 en cada uno de los procesos detectados deberá ser caracterizada mediante ensayos bioquímicos y funcionales.

Sin duda, las vías de señalización moduladas según el estudio de transcriptómica abren muchas interrogantes con respecto a nuevas funciones de KANSL2 en el GBM como, por ejemplo, el remodelado de la matrix extracelular y la migración celular.

Muchas de las preguntas que surgen de este trabajo exceden la patología en estudio ya que se refieren a funciones básicas de un gen que se expresa en distintos tejidos y con variables niveles de expresión en distintos tipos de tumores. Es posible estudiar a KANSL2 no sólo desde el proceso de metástasis

sino también como un actor en procesos fisiológicos como, por ejemplo, la reparación tisular.

El desarrollo de terapias efectivas para el GBM necesita de una mayor comprensión e integración de muchos de los procesos mencionados en este trabajo. Entender de qué manera se modula la plasticidad, la biogénesis ribosomal y la comunicación entre células y con su entorno, resulta entonces fundamental. En este contexto, KANSL2 es un gen con gran potencial en la oncología clínica.

## **REFERENCIAS**

- Agnihotri, S. Burrell, K. Buczkowicz, P. Remke, M. Golbourn, B. Chornenkyy, Y. & Hawkins, C. (2014). ATM regulates 3-methylpurine-DNA glycosylase and promotes therapeutic resistance to alkylating agents. *Cancer discovery*, 4(10), 1198-1213.
- Allis, C. D. & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 487-500.
- Alvarado, A. G. Thiagarajan, P. S. Mulkearns-Hubert, E. E. Silver, D. J. Hale, J. S. Alban, T. J. ... & Lathia, J. D. (2017). Glioblastoma cancer stem cells evade innate immune suppression of self-renewal through reduced TLR4 expression. *Cell stem cell*, 20(4), 450-461.
- Amin, M. A. Matsunaga, S. Ma, N. Takata, H. Yokoyama, M. Uchiyama, S. & Fukui, K. (2007). Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 360(2), 320-326.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online. Retrieved May, 17, 2018.
- Annibali, D. Whitfield, J. R. Favuzzi, E. Jauset, T. Serrano, E. Cuartas, I. ... & Soucek, L. (2014). Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. *Nature communications*, 5(1), 1-11.
- Aubert, M. O'Donohue, M. F. Lebaron, S. & Gleizes, P. E. (2018). Pre-ribosomal RNA processing in human cells: from mechanisms to congenital diseases. *Biomolecules*, 8(4), 123.
- Bahmad, H. F. Cheaito, K. Chalhoub, R. M. Hadadeh, O. Monzer, A. Ballout, F. ... & Abou-Kheir, W. (2018). Sphere-formation assay: three-dimensional in vitro culturing of prostate cancer stem/progenitor sphere-forming cells. *Frontiers in oncology*, 8, 347.
- Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381-395.
- Batash, R. Asna, N. Schaffer, P. Francis, N. & Schaffer, M. (2017). Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review. *Current medicinal chemistry*, 24(27), 3002-3009.

- Belousov, A. Titov, S. Shved, N. Garbuz, M. Malykin, G. Gulaia, V. ... & Kumeiko, V. (2019). The extracellular matrix and biocompatible materials in glioblastoma treatment. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 341.
- Bersaglieri, C. & Santoro, R. (2019). Genome organization in and around the nucleolus. *Cells*, 8(6), 579.
- Bradshaw, A. R. Wickremesekera, A. C. Brasch, H. D. Chibnall, A. M. Davis, P. F. Tan, S. T. & Itinteang, T. (2016). Glioblastoma multiforme cancer stem cells express components of the renin–angiotensin system. *Frontiers in surgery*, 3, 51.
- Brown, S. E. & Szyf, M. (2008). Dynamic epigenetic states of ribosomal RNA promoters during the cell cycle. *Cell Cycle*, 7(3), 382-390.
- Cai, Y. Jin, J. Swanson, S. K. Cole, M. D. Choi, S. H. Florens, L. ... & Conaway, R. C. (2010). Subunit composition and substrate specificity of a MOF-containing histone acetyltransferase distinct from the male-specific lethal (MSL) complex. *Journal of Biological Chemistry*, 285(7), 4268-4272.
- Cerqueira, A. V. & Lemos, B. (2019). Ribosomal DNA and the nucleolus as keystones of nuclear architecture, organization, and function. *Trends in Genetics*, 35(10), 710-723.
- Chan, J. C. Hannan, K. M. Riddell, K. Ng, P. Y. Peck, A. Lee, R. S. ... & Pearson, R. B. (2011). AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Science signaling*, 4(188), ra56-ra56.
- Chatterjee, A. Seyfferth, J. Lucci, J. Gilsbach, R. Preissl, S. Böttinger, L. ... & Akhtar, A. (2016). MOF acetyl transferase regulates transcription and respiration in mitochondria. *Cell*, 167(3), 722-738.
- Chen, E. Y. Tan, C. M. Kou, Y. Duan, Q. Wang, Z. Meirelles, G. V. ... & Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1-14.
- Chen, G. & Deng, X. (2018). Cell synchronization by double thymidine block. *Bio-protocol*, 8(17).
- Chen, K. G. Mallon, B. S. Park, K. Robey, P. G. McKay, R. D. Gottesman, M. M. & Zheng, W. (2018). Pluripotent stem cell platforms for drug discovery. *Trends in molecular medicine*, 24(9), 805-820.

- Clarke, M. F. & Fuller, M. (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, 124(6), 1111-1115.
- Conrad, T. Cavalli, F. M. Holz, H. Hallacli, E. Kind, J. Ilik, I. ... & Akhtar, A. (2012). The MOF chromobarrel domain controls genome-wide H4K16 acetylation and spreading of the MSL complex. *Developmental cell*, 22(3), 610-624.
- Cutter, A. R. & Hayes, J. J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS letters*, 589(20), 2914-2922.
- Da Hora, C. C. Schweiger, M. W. Wurdinger, T. & Tannous, B. A. (2019). Patient-derived glioma models: from patients to dish to animals. *Cells*, 8(10), 1177.
- Dalton, S. (2015). Linking the cell cycle to cell fate decisions. *Trends in cell biology*, 25(10), 592-600.
- De Palma, M. Biziato, D. & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews cancer*, 17(8), 457-474.
- DeCordova, S. Shastri, A. Tsolaki, A. G. Yasmin, H. Klein, L. Singh, S. K. & Kishore, U. (2020). Molecular heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in glioblastoma. *Frontiers in Immunology*, 11, 1402.
- Derynck, R. & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature*, 425(6958), 577-584.
- Dong, Z. Zou, J. Li, J. Pang, Y. Liu, Y. Deng, C. ... & Cui, H. (2019). MYST1/KAT8 contributes to tumor progression by activating EGFR signaling in glioblastoma cells. *cancer medicine*, 8(18), 7793-7808.
- Eriksson, M. Kahari, J. Vestman, A. Hallmans, M. Johansson, M. Bergenheim, A. T. & Sandström, M. (2019). Improved treatment of glioblastoma—changes in survival over two decades at a single regional Centre. *Acta Oncologica*, 58(3), 334-341.
- Fatyor, K. & Szalay, A. A. (2001). The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and inhibits HIF-1-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28421-28429.
- Feller, C. Prestel, M. Hartmann, H. Straub, T. Söding, J. & Becker, P. B. (2012). The MOF-containing NSL complex associates globally with housekeeping

genes, but activates only a defined subset. *Nucleic acids research*, 40(4), 1509-1522.

French, S. L. Osheim, Y. N. Cioci, F. Nomura, M. & Beyer, A. L. (2003). In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Molecular and cellular biology*, 23(5), 1558-1568.

Gabut, M. Bourdelais, F. & Durand, S. (2020). Ribosome and translational control in stem cells. *Cells*, 9(2), 497.

Gaviraghi, M. Vivori, C. & Tonon, G. (2019). How cancer Exploits Ribosomal RNA Biogenesis: A Journey beyond the Boundaries of rRNA Transcription. *Cells*, 8(9), 1098.

Gentilella, A. Kozma, S. C. & Thomas, G. (2015). A liaison between mTOR signaling, ribosome biogenesis and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 812-820.

Georgiev, P. Chlamydas, S. & Akhtar, A. (2011). *Drosophila* dosage compensation: males are from Mars, females are from Venus. *Fly*, 5(2), 147-154.

Ghaye, J. Kamat, M. A. Corbino-Giunta, L. Silacci, P. Vergeres, G. De Micheli, G. & Carrara, S. (2013). Image thresholding techniques for localization of sub-resolution fluorescent biomarkers. *Cytometry part a*, 83(11), 1001-1016.

Ghoshal, K. Majumder, S. Datta, J. Motiwala, T. Bai, S. Sharma, S. M. ... & Jacob, S. T. (2004). Role of human ribosomal RNA (rRNA) promoter methylation and of methyl-CpG-binding protein MBD2 in the suppression of rRNA gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6783-6793.

Gilissen, C. Hehir-Kwa, J. Y. Thung, D. T. van de Vorst, M. van Bon, B. W. Willemsen, M. H. ... & Veltman, J. A. (2014). Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*, 511(7509), 344-347.

Goodfellow, S. J. & Zomerdijs, J. C. (2013). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Epigenetics: Development and Disease*, 211-236.

Grummt, I. (2013). The nucleolus—guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma*, 122(6), 487-497.

- Guettg, C. & Santoro, R. (2012). Formation of nuclear heterochromatin: the nucleolar point of view. *Epigenetics*, 7(8), 811-814.
- Guettg, C. Scheifele, F. Rosenthal, F. Hottiger, M. O. & Santoro, R. (2012). Inheritance of silent rDNA chromatin is mediated by PARP1 via noncoding RNA. *Molecular cell*, 45(6), 790-800.
- Gupta, A. Hunt, C. R. Hegde, M. L. Chakraborty, S. Udayakumar, D. Horikoshi, N. ... & Pandita, T. K. (2014). MOF phosphorylation by ATM regulates 53BP1-mediated double-strand break repair pathway choice. *Cell reports*, 8(1), 177-189.
- Gupta, A. Sharma, G. G. Young, C. S. Agarwal, M. Smith, E. R. Paull, T. T. ... & Pandita, T. K. (2005). Involvement of human MOF in ATM function. *Molecular and cellular biology*, 25(12), 5292-5305.
- Gupta, S. & Santoro, R. (2020). Regulation and roles of the nucleolus in embryonic stem cells: from ribosome biogenesis to genome organization. *Stem Cell Reports*.
- Hambardzumyan, D. & Bergers, G. (2015). Glioblastoma: defining tumor niches. *Trends in cancer*, 1(4), 252-265.
- Hara, A. Hirayama, H. Sakai, N. Yamada, H. Tanaka, T. & Mori, H. (1990). Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas. *Surgical neurology*, 33(5), 320-324.
- Hayashi, Y. Kuroda, T. Kishimoto, H. Wang, C. Iwama, A. & Kimura, K. (2014). Downregulation of rRNA transcription triggers cell differentiation. *PloS one*, 9(5), e98586.
- Heinz, K. S. Rapp, A. Casas-Delucchi, C. S. Lehmkuhl, A. Romero-Fernández, I. Sánchez, A. ... & Cardoso, M. C. (2019). DNA replication dynamics of vole genome and its epigenetic regulation. *Epigenetics & chromatin*, 12(1), 1-21.
- Hernandez-Verdun, D. (2006). Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochemistry and cell biology*, 125(1), 127-137.
- Hesham, H. M. Lasheen, D. S. & Abouzid, K. A. (2018). Chimeric HDAC inhibitors: Comprehensive review on the HDAC-based strategies developed to combat cancer. *Medicinal research reviews*, 38(6), 2058-2109.

Iranmanesh, Y. Jiang, B. Favour, O. C. Dou, Z. Wu, J. Li, J. & Sun, C. (2021). Mitochondria's role in the maintenance of cancer stem cells in glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 11, 101.

Janiszewska, M. Primi, M. C. & Izard, T. (2020). Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *Journal of Biological Chemistry*, 295(8), 2495-2505.

Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1417-1419.

Karoutas, A. Szymanski, W. Rausch, T. Guhathakurta, S. Rog-Zielinska, E. A. Peyronnet, R. ... & Akhtar, A. (2019). The NSL complex maintains nuclear architecture stability via lamin A/C acetylation. *Nature cell biology*, 21(10), 1248-1260.

Klein, J. & Grummt, I. (1999). Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6096-6101.

Klemm, S. L. Shipony, Z. & Greenleaf, W. J. (2019). Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature Reviews Genetics*, 20(4), 207-220.

Kobayashi, T. (2008). A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus—rDNA instability maintains genome integrity. *Bioessays*, 30(3), 267-272.

Kofler, L. Prattes, M. & Bergler, H. (2020). From snapshots to flipbook—Resolving the dynamics of ribosome biogenesis with chemical probes. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2998.

Kofuji, S. Hirayama, A. Eberhardt, A. O. Kawaguchi, R. Sugiura, Y. Sampetrean, O. ... & Sasaki, A. T. (2019). IMP dehydrogenase-2 drives aberrant nucleolar activity and promotes tumorigenesis in glioblastoma. *Nature cell biology*, 21(8), 1003-1014.

Kresoja-Rakic, J. & Santoro, R. (2019). Nucleolus and rRNA gene chromatin in early embryo development. *Trends in Genetics*, 35(11), 868-879.

Kuleshov, M. V. Jones, M. R. Rouillard, A. D. Fernandez, N. F. Duan, Q. Wang, Z. ... & Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research*, 44(W1), W90-W97.

- Kunadis, E. Lakiotaki, E. Korkolopoulou, P. & Piperi, C. (2020). Targeting post-translational histone modifying enzymes in glioblastoma. *Pharmacology & Therapeutics*, 107721.
- Lah, T. T. Novak, M. & Breznik, B. (2020, February). Brain malignancies: glioblastoma and brain metastases. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 60, pp. 262-273). Academic Press.
- Leung, A. K. & Lamond, A. I. (2003). The dynamics of the nucleolus. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 13(1).
- Li, C. Chen, M. Zhao, P. Ayana, D. A. Wang, L. & Jiang, Y. (2016). Expression of MCRS1 and MCRS2 and their correlation with serum carcinoembryonic antigen in colorectal cancer. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(2), 589-596.
- Li, Y. & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(10), a026831.
- Li, X. Corsa, C. A. S. Pan, P. W. Wu, L. Ferguson, D. Yu, X. ... & Dou, Y. (2010). MOF and H4 K16 acetylation play important roles in DNA damage repair by modulating recruitment of DNA damage repair protein Mdc1. *Molecular and cellular biology*, 30(22), 5335-5347.
- Li, Z. F. & Lam, Y. W. (2015). A new rapid method for isolating nucleoli. In *The Nucleus* (pp. 35-42). Humana Press, New York, NY.
- Liang, J. Wen, J. Huang, Z. Chen, X. P. Zhang, B. X. & Chu, L. (2019). Small nucleolar RNAs: insight into their function in cancer. *Frontiers in oncology*, 9, 587.
- Liao, W. T. Ye, Y. P. Deng, Y. J. Bian, X. W. & Ding, Y. Q. (2014). Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics. *American journal of stem cells*, 3(2), 46.
- Lin, C. Y. Tuan, J. Scalia, P. Bui, T. & Comai, L. (2002). The cell cycle regulatory factor TAF1 stimulates ribosomal DNA transcription by binding to the activator UBF. *Current Biology*, 12(24), 2142-2146.
- Liu, N. Zhang, R. Zhao, X. Su, J. Bian, X. Ni, J. ... & Jin, J. (2013). A potential diagnostic marker for ovarian cancer: involvement of the histone acetyltransferase, human males absent on the first. *Oncology letters*, 6(2), 393-400.

- Liu, S. Chen, S. & Zeng, J. (2018). TGF- $\beta$  signaling: A complex role in tumorigenesis. *Molecular medicine reports*, 17(1), 699-704.
- Louis, D. N. Perry, A. Reifenberger, G. Von Deimling, A. Figarella-Branger, D. Cavenee, W. K. ... & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803-820.
- Ma, Q. Long, W. Xing, C. Jiang, C. Su, J. Wang, H. Y. ... & Wang, R. F. (2020). PHF20 promotes glioblastoma cell malignancies through a WISP1/BGN-dependent pathway. *Frontiers in oncology*, 10, 2055.
- Machwe, A. Orren, D. K. & Bohr, V. A. (2000). Accelerated methylation of ribosomal RNA genes during the cellular senescence of Werner syndrome fibroblasts. *The FASEB Journal*, 14(12), 1715-1724.
- McSwiggen, D. T. Mir, M. Darzacq, X. & Tjian, R. (2019). Evaluating phase separation in live cells: diagnosis, caveats, and functional consequences. *Genes & development*, 33(23-24), 1619-1634.
- Mellert, H. S. Stanek, T. J. Sykes, S. M. Rauscher, F. J. Schultz, D. C. & McMahon, S. B. (2011). Deacetylation of the DNA-binding domain regulates p53-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4264-4270.
- Meraner, J. Lechner, M. Loidl, A. Goralik-Schramel, M. Voit, R. Grummt, I. & Loidl, P. (2006). Acetylation of UBF changes during the cell cycle and regulates the interaction of UBF with RNA polymerase I. *Nucleic acids research*, 34(6), 1798-1806.
- Meshorer, E. & Misteli, T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(7), 540-546.
- Minea, R. O. Duc, T. C. Swenson, S. D. Cho, H. Y. Huang, M. Hartman, H. ... & Chen, T. C. (2020). Developing a clinically relevant radiosensitizer for temozolomide-resistant gliomas. *PloS one*, 15(9), e0238238.
- Molinaro, A. M. Taylor, J. W. Wiencke, J. K. & Wrensch, M. R. (2019). Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology*, 15(7), 405-417.
- Montanaro, L. Treré, D. & Derenzini, M. (2008). Nucleolus, ribosomes, and cancer. *The American journal of pathology*, 173(2), 301-310.

- Mooney, K. L. Choy, W. Sidhu, S. Pelargos, P. Bui, T. T. Voth, B. ... & Yang, I. (2016). The role of CD44 in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience*, 34, 1-5.
- Nadkarni, A. Shrivastav, M. Mladek, A. C. Schwingler, P. M. Grogan, P. T. Chen, J. & Sarkaria, J. N. (2012). ATM inhibitor KU-55933 increases the TMZ responsiveness of only inherently TMZ sensitive GBM cells. *Journal of neuro-oncology*, 110(3), 349-357.
- Nakada, M. Okada, Y. & Yamashita, J. (2003). The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci*, 8(1).
- Nemeth, A. & Längst, G. (2011). Genome organization in and around the nucleolus. *Trends in genetics*, 27(4), 149-156.
- Nguyen, L. X. T. Raval, A. Garcia, J. S. & Mitchell, B. S. (2015). Regulation of ribosomal gene expression in cancer. *Journal of cellular physiology*, 230(6), 1181-1188.
- Ogawa, L. M. & Baserga, S. J. (2017). Crosstalk between the nucleolus and the DNA damage response. *Molecular bioSystems*, 13(3), 443-455.
- Padeken, J. & Heun, P. (2014). Nucleolus and nuclear periphery: velcro for heterochromatin. *Current opinion in cell biology*, 28, 54-60.
- Papale, M. Buccarelli, M. Mollinari, C. Russo, M. A. Pallini, R. Ricci-Vitiani, L. & Tafani, M. (2020). Hypoxia, inflammation and necrosis as determinants of glioblastoma cancer stem cells progression. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2660.
- Park, H. Han, S. S. Sako, Y. & Pack, C. G. (2015). Dynamic and unique nucleolar microenvironment revealed by fluorescence correlation spectroscopy. *The FASEB Journal*, 29(3), 837-848.
- Paule, M. R. & White, R. J. (2000). Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic acids research*, 28(6), 1283-1298.
- Phair, R. D. & Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 404(6778), 604-609.
- Pistoni, M. Verrecchia, A. Doni, M. Guccione, E. & Amati, B. (2010). Chromatin association and regulation of rDNA transcription by the Ras-family protein RasL11a. *The EMBO journal*, 29(7), 1215-1224.

Pontvianne, F. Carpentier, M. C. Durut, N. Pavlišťová, V. Jaške, K. Schořová, Š. ... & Sáez-Vásquez, J. (2016). Identification of nucleolus-associated chromatin domains reveals a role for the nucleolus in 3D organization of the *A. thaliana* genome. *Cell reports*, 16(6), 1574-1587.

Prager, B. C. Bhargava, S. Mahadev, V. Hubert, C. G. & Rich, J. N. (2020). Glioblastoma stem cells: driving resilience through chaos. *Trends in cancer*, 6(3), 223-235.

Prieto-Vila, M. Takahashi, R. U. Usuba, W. Kohama, I. & Ochiya, T. (2017). Drug resistance driven by cancer stem cells and their niche. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2574.

Radzishenskaya, A. Shliaha, P. V. Grinev, V. V. Shlyueva, D. Damhofer, H. Koche, R. ... & Helin, K. (2021). Complex-dependent histone acetyltransferase activity of KAT8 determines its role in transcription and cellular homeostasis. *Molecular cell*, 81(8), 1749-1765.

Rodrigues, C. P. Herman, J. S. Herquel, B. Valsecchi, C. I. K. Stehle, T. Grün, D. & Akhtar, A. (2020). Temporal expression of MOF acetyltransferase primes transcription factor networks for erythroid fate. *Science advances*, 6(21), eaaz4815.

Rohr, C. O. Parra, R. G. Yankilevich, P. & Perez-Castro, C. (2013). INSECT: IN-silico SEarch for Co-occurring Transcription factors. *Bioinformatics*, 29(22), 2852-2858.

Ruggero, D. (2012). Revisiting the nucleolus: from marker to dynamic integrator of cancer signaling. *Science signaling*, 5(241), pe38-pe38.

Santoro, R. (2011). The epigenetics of the nucleolus: structure and function of active and silent ribosomal RNA genes. *The Nucleolus*, 57-82.

Santoro, R. Li, J. & Grummt, I. (2002). The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nature genetics*, 32(3), 393-396.

Savić, N. Bär, D. Leone, S. Frommel, S. C. Weber, F. A. Vollenweider, E. ... & Santoro, R. (2014). lncRNA maturation to initiate heterochromatin formation in the nucleolus is required for exit from pluripotency in ESCs. *Cell stem cell*, 15(6), 720-734.

- Schönenberger, F. Deutzmann, A. Ferrando-May, E. & Merhof, D. (2015). Discrimination of cell cycle phases in PCNA-immunolabeled cells. *BMC bioinformatics*, 16(1), 1-10.
- Sharma, E. & Blencowe, B. J. (2018). Orchestrating Ribosomal Subunit Coordination to Control Stem Cell Fate. *Cell stem cell*, 22(4), 471-473.
- Shav-Tal, Y. Blechman, J. Darzacq, X. Montagna, C. Dye, B. T. Patton, J. G. ... & Zipori, D. (2005). Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Molecular biology of the cell*, 16(5), 2395-2413.
- Sheikh, B. N. Guhathakurta, S. & Akhtar, A. (2019). The non-specific lethal (NSL) complex at the crossroads of transcriptional control and cellular homeostasis. *EMBO reports*, 20(7), e47630.
- Sheikh, B. N. Guhathakurta, S. Tsang, T. H. Schwabenland, M. Renschler, G. Herquel, B. ... & Akhtar, A. (2020). Neural metabolic imbalance induced by MOF dysfunction triggers pericyte activation and breakdown of vasculature. *Nature Cell Biology*, 22(7), 828-841.
- Shubina, M. Y. Musinova, Y. R. & Sheval, E. V. (2016). Nucleolar methyltransferase fibrillarin: evolution of structure and functions. *Biochemistry (Moscow)*, 81(9), 941-950.
- Sirri, V. Urcuqui-Inchima, S. Roussel, P. & Hernandez-Verdun, D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochemistry and cell biology*, 129(1), 13-31.
- Sobol, M. Yildirim, S. Philimonenko, V. V. Marášek, P. Castaño, E. & Hozák, P. (2013). UBF complexes with phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity. *Nucleus*, 4(6), 478-486.
- Solari, N. E. F. Belforte, F. S. Canedo, L. Videla-Richardson, G. A. Espinosa, J. M. Rossi, M. ... & Perez-Castro, C. (2016). The NSL Chromatin-Modifying Complex Subunit KANSL2 Regulates cancer Stem-like Properties in Glioblastoma That Contribute to Tumorigenesis. *cancer research*, 76(18), 5383-5394.
- Stenström, L. Mahdessian, D. Gnann, C. Cesnik, A. J. Ouyang, W. Leonetti, M. D. ... & Lundberg, E. (2020). Mapping the nucleolar proteome reveals a

spatiotemporal organization related to intrinsic protein disorder. *Molecular systems biology*, 16(8), e9469.

Stępiński, D. (2018). The nucleolus, an ally, and an enemy of cancer cells. *Histochemistry and cell biology*, 150(6), 607-629.

Strohner, R. Nemeth, A. Jansa, P. Hofmann-Rohrer, U. Santoro, R. Längst, G. & Grummt, I. (2001). NoRC—a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *The EMBO journal*, 20(17), 4892-4900.

Strzalka, W. & Ziemienowicz, A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of botany*, 107(7), 1127-1140.

Su, J. Wang, F. Cai, Y. & Jin, J. (2016). The functional analysis of histone acetyltransferase MOF in tumorigenesis. *International journal of molecular sciences*, 17(1), 99.

Suvà, M. L. Rheinbay, E. Gillespie, S. M. Patel, A. P. Wakimoto, H. Rabkin, S. D. ... & Bernstein, B. E. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, 157(3), 580-594.

Taha, M. S. Nouri, K. Milroy, L. G. Moll, J. M. Herrmann, C. Brunsveld, L. ... & Ahmadian, M. R. (2014). Subcellular fractionation and localization studies reveal a direct interaction of the fragile X mental retardation protein (FMRP) with nucleolin. *PloS one*, 9(3), e91465.

Takada, H. & Kurisaki, A. (2015). Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(21), 4015-4025.

Tan, A. C. Ashley, D. M. López, G. Y. Malinzak, M. Friedman, H. S. & Khasraw, M. (2020). Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(4), 299-312.

Tanaka, Y. & Tsuneoka, M. (2018). Control of Ribosomal RNA Transcription by Nutrients. *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells—Transcription Toward the Establishment of Novel Therapeutics*.

Thomas, T. Dixon, M. P. Kueh, A. J. & Voss, A. K. (2008). Mof (MYST1 or KAT8) is essential for progression of embryonic development past the blastocyst stage and required for normal chromatin architecture. *Molecular and cellular biology*, 28(16), 5093-5105.

Thon, N. Tonn, J. C. & Kreth, F. W. (2019). The surgical perspective in precision treatment of diffuse gliomas. *OncoTargets and therapy*, 12, 1497.

Treré, D. Ceccarelli, C. Montanaro, L. Tosti, E. & Derenzini, M. (2004). Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(12), 1601-1607.

Tsai, C. Y. Ko, H. J. Chiou, S. J. Lai, Y. L. Hou, C. C. Javaria, T. ... & Hong, Y. R. (2021). NBM-BMX, an HDAC8 Inhibitor, Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme by Downregulating the  $\beta$ -Catenin/c-Myc/SOX2 Pathway and Upregulating p53-Mediated MGMT Inhibition. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5907.

Verhoeff, J. J. C. Lavini, C. Van Linde, M. E. Stalpers, L. J. A. Majoie, C. B. L. M. Reijneveld, J. C. ... & Richel, D. J. (2010). Bevacizumab and dose-intense temozolomide in recurrent high-grade glioma. *Annals of oncology*, 21(8), 1723-1727.

Videla Richardson, G. A. Garcia, C. P. Roisman, A. Slavutsky, I. Fernandez Espinosa, D. D. Romorini, L. & Sevelever, G. E. (2016). Specific preferences in lineage choice and phenotypic plasticity of glioma stem cells under BMP4 and Noggin influence. *Brain Pathology*, 26(1), 43-61.

Von Walden, F. (2019). Ribosome biogenesis in skeletal muscle: coordination of transcription and translation. *Journal of Applied Physiology*, 127(2), 591-598.

Wang, Q. E. (2015). DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies. *World journal of biological chemistry*, 6(3), 57.

Watanabe-Susaki, K. Takada, H. Enomoto, K. Miwata, K. Ishimine, H. Intoh, A. ... & Kurisaki, A. (2014). Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells. *Stem cells*, 32(12), 3099-3111.

Weeks, S. E. Metge, B. J. & Samant, R. S. (2019). The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(22), 4511-4524.

Weiswald, L. B. Bellet, D. & Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*, 17(1), 1-15.

Woolnough, J. L. Atwood, B. L. Liu, Z. Zhao, R. & Giles, K. E. (2016). The regulation of rRNA gene transcription during directed differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One*, 11(6), e0157276.

Xie, N., Ma, L., Zhu, F., Zhao, W., Tian, F., Yuan, F., ... & Tong, T. (2016). Regulation of the MDM2-p53 pathway by the nucleolar protein CSIG in response to nucleolar stress. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.

Xie, Z. Bailey, A. Kuleshov, M. V. Clarke, D. J. Evangelista, J. E. Jenkins, S. L. ... & Ma'ayan, A. (2021). Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Current protocols*, 1(3), e90.

Yan, Q. Zhu, C. Guang, S. & Feng, X. (2019). The functions of non-coding RNAs in rRNA regulation. *Frontiers in genetics*, 10, 290.

Yang, H. Salz, T. Zajac-Kaye, M. Liao, D. Huang, S. & Qiu, Y. (2014). Overexpression of histone deacetylases in cancer cells is controlled by interplay of transcription factors and epigenetic modulators. *The FASEB Journal*, 28(10), 4265-4279.

Zaidi, S. K. Boyd, J. R. Grandy, R. A. Medina, R. Lian, J. B. Stein, G. S. & Stein, J. L. (2016). Expression of ribosomal RNA and protein genes in human embryonic stem cells is associated with the activating H3K4me3 histone mark. *Journal of cellular physiology*, 231(9), 2007-2013.

Zentner, G. E. Balow, S. A. & Scacheri, P. C. (2014). Genomic characterization of the mouse ribosomal DNA locus. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(2), 243-254.

Zhang, S. Liu, X. Zhang, Y. Cheng, Y. & Li, Y. (2013). RNAi screening identifies KAT8 as a key molecule important for cancer cell survival. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(5), 870.

Zhao, L. Wang, D. L. Liu, Y. Chen, S. & Sun, F. L. (2013). Histone acetyltransferase hMOF promotes S phase entry and tumorigenesis in lung cancer. *Cellular signalling*, 25(8), 1689-1698.

Zhao, X. Su, J. Wang, F. Liu, D. Ding, J. Yang, Y. ... & Jin, J. (2013). Crosstalk between NSL histone acetyltransferase and MLL/SET complexes: NSL complex functions in promoting histone H3K4 di-methylation activity by MLL/SET complexes. *PLoS genetics*, 9(11), e1003940.

Zhao, Y. Dong, Q. Li, J. Zhang, K. Qin, J. Zhao, J. ... & Bruns, C. (2018, December). Targeting cancer stem cells and their niche: perspectives for future

therapeutic targets and strategies. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 53, pp. 139-155). Academic Press.

Zhou, Y. Schmitz, K. M. Mayer, C. Yuan, X. Akhtar, A. & Grummt, I. (2009). Reversible acetylation of the chromatin remodelling complex NoRC is required for non-coding RNA-dependent silencing. *Nature cell biology*, 11(8), 1010-1016.

Zhu, L. I. N. Yang, J. Zhao, L. Yu, X. Wang, L. Wang, F. ... & Jin, J. (2015). Expression of hMOF, but not HDAC4, is responsible for the global histone H4K16 acetylation in gastric carcinoma. *International journal of oncology*, 46(6), 2535-2545.

Zink, D. Fischer, A. H. & Nickerson, J. A. (2004). Nuclear structure in cancer cells. *Nature reviews cancer*, 4(9), 677-687.