



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE *RUNX1* Y DE SU GEN
BLANCO *BLK* EN CÉLULAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA
AGUDA LINFOBLÁSTICA**

T E S I S

que para obtener el grado de Doctora en Biología Experimental

PRESENTA:

M. en B.E. ORETH MONTERO RUÍZ

Comité Tutorial

Dr. José Miguel Betancourt Rule (Co-Director)

Dra. Silvia Patricia Pérez Vera (Co- Directora)

Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza (Asesor)

Dr. Humberto González Márquez (Asesor)

México, D.F.

Septiembre de 2012

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por el CONACYT: 198503.

Este proyecto se realizó parcialmente con el “Apoyo complementario a investigadores en proceso de consolidación” num. 52536.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Expresión de las isoformas de *RUNX1* y de su gen blanco *BLK* en células de pacientes con leucemia aguda linfoblástica”, que presentó

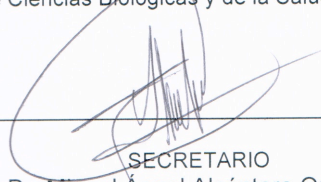
Oreth Montero Ruíz

El día 05 de septiembre del año 2012.



PRESIDENTE

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa



SECRETARIO

Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza
Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Inv. en
Genética Humana. Instituto Nacional de Pediatría.



VOCAL

Dra. María Cristina González Torres
Área de Biología Celular y Molecular.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Iztapalapa.



VOCAL

Dr. Humberto González Márquez
Área de Biología Celular y Molecular.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Iztapalapa.

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTORES

- Dr. José Miguel Betancourt Rule.

Laboratorio de Biología Celular. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Iztapalapa.

- Dra. Silvia Patricia Pérez Vera

Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Departamento de Inv. en Genética Humana. Instituto Nacional de Pediatría.

ASESORES

- Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza

Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Inv. en Genética Humana. Instituto Nacional de Pediatría.

- Dr. Humberto González Márquez

Laboratorio de Biología Celular. Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Iztapalapa.

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi cariño les agradezco a mi comité tutorial por todos estos años de enseñanza y paciencia para lograr que este proyecto se concluyera. En especial a mis tutores (Paty y Miguel) por el apoyo durante 12 años que participamos juntos en varios proyectos.

Agradezco a toda mi familia (mis padres Silvia y Vicente, Carlos, Aldo y bebé, Edson, Samadhi, Bruno y Diego, abuelita, tíos, primos, suegros, sobrinos) que me impulsaron para que lograra mi meta. Gracias por brindarme el apoyo necesario en momentos difíciles. Gracias por el amor y por estar en todas mis alegrías.

A todos mis amigos del DF y Veracruz, que me brindaron su amistad.

Gracias a todos mis amigos del Instituto Nacional de Pediatría de los laboratorios de Cultivo de tejidos, Biología Molecular, Citogenética por toda su ayuda y amistad durante mi estancia.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	1
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
1.- INTRODUCCIÓN.....	6
1.1.- La leucemia aguda linfoblástica (LAL).....	6
1.2.- Epidemiología.....	6
1.3.- Alteraciones cromosómicas presentes en LAL.....	7
1.4.- El gen <i>RUNX1</i> : Estructura y función.....	9
1.5.- Alteraciones que involucran a <i>RUNX1</i> en leucemias.....	12
1.6.- Contribución de <i>RUNX1</i> al proceso de carcinogénesis.....	15
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
3.- OBJETIVO GENERAL.....	18
4.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
5.- HIPÓTESIS.....	18
6- DISEÑO DEL ESTUDIO.....	18
7.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
7.1.- Población de estudio.....	19
7.2.- Criterios de inclusión.....	19
7.3.- Criterios de eliminación.....	19
7.4.- Consideraciones éticas.....	20
7.5.- Obtención y procesamiento de las muestras de medula ósea.....	20
7.6.- Grupo de referencia.....	20

7.7.- Cuantificación relativa de la expresión de las isoformas de <i>RUNX1</i> y el gen <i>BLK</i> por PCR cuantitativa (q-PCR) (método $\Delta\Delta Ct$).....	21
7.8.- Identificación de las isoformas de la proteína RUNX1 por Inmunodetección en hibridación tipo Western blot.....	22
7.9.- Análisis estadístico.....	23
8.- RESULTADOS.....	24
8.1.- Población de estudio.....	24
8.2.- Isoformas de RUNX1 en células CD19+ de individuos sanos.....	27
8.3.- Análisis de Western-blot de la proteína RUNX1, en células leucémicas.....	27
8.4.- Cuantificación de expresión de las isoformas RUNX1a y RUNX1 _{C196} y de aquellas que contienen el dominio RUNT.	29
8.5.- Cuantificación de la expresión del gen <i>BLK</i>	30
8.6.- Expresión de las isoformas de RUNX1 y el gen <i>BLK</i> en las muestras de sangre periférica de individuos sanos.....	32
9.- DISCUSIÓN.....	34
10.- CONCLUSIONES.....	42
11.- PERSPECTIVAS.....	44
12.- ANEXOS.....	45
ANEXO 1.- Carta de consentimiento informado.....	45
ANEXO 2.- Oligonucleótidos usados para amplificar las isoformas de RUNX1.....	46
ANEXO 3.- Western-blot.....	47
ANEXO 4.- Características clínicas, de laboratorio y resultados de citogenética convencional y molecular de los pacientes con LAL.....	52

ANEXO 5.- Resultados de los análisis citogenético, de FISH y de expresión génica.....	53
ANEXO 6.- Características de las isoformas de RUNX1 detectadas por RT-PCR.....	56
14.- REFERENCIAS.....	57
Artículo publicado.....	63

RESUMEN

En este estudio se analizó la expresión de los transcritos de las tres isoformas conocidas de RUNX1 (RUNX1a, RUNX1b y RUNX1c) y de las proteínas que presentan el dominio de RUNT, en muestras de médula ósea de niños con LAL. Los patrones de expresión de RUNX1 se asociaron con las alteraciones genéticas de los pacientes y con la expresión de su gen blanco *BLK*. Los resultados revelaron que una variante de la isoforma RUNX1c estuvo presente en todos los pacientes y las isoformas RUNX1a/b se encontraron con menor frecuencia. Entre las isoformas obtenidas se observó una variante de RUNX1a no descrita previamente. En particular, los pacientes con la $t(4;11)(q21;q23)$ presentaron sobre-expresión de las isoformas que contienen el dominio RUNT. También se determinó correlación positiva entre la expresión de las isoformas que contienen el dominio RUNT y la expresión de *BLK*. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la participación de RUNX1 en el desarrollo de la leucemia es más compleja que la propuesta previa, acerca del antagonismo entre las isoformas. Los resultados sugieren que los subtipos genéticos en la LAL pueden influir en la expresión de RUNX1.

ABSTRACT

Bone marrow samples from children with acute lymphoblastic leukemia were analyzed for the expression of RUNX1a, RUNX1b and RUNX1c isoforms. Obtained patterns were associated with genetic abnormalities and the expression of the RUNX1 regulated gene BLK. RUNX1c was present in all patients, but the expected overexpression of RUNX1a was not observed. Over-expression of total RUNT domain isoforms was detected in patients with extra RUNX1 copies, and unexpectedly, in those with t(4;11). Only expression of the total RUNT domain-containing isoforms and BLK presented positive correlation. Results suggest a more complex role of RUNX1 in leukemogenesis than the proposed antagonism between the isoforms.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- La Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL)

Las leucemias son un grupo heterogéneo de padecimientos que se caracterizan por la proliferación desordenada de células hematopoyéticas inmaduras, las cuales se acumulan en la médula ósea y en la sangre, lo que desplaza a los elementos celulares normales. La falla de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a una sobreproducción de células incapaces de madurar y funcionar normalmente. También pueden ocurrir alteraciones en los mecanismos de apoptosis, que causan la supervivencia anormal de las células y también conllevan al incremento en el número de los blastos leucémicos (Head y Pui, 1999; Ruíz-Argüelles y McArthur, 2003).

1.2.- Epidemiología

Las leucemias agudas se presentan principalmente en niños, el subtipo más común es la LAL, también llamada linfocítica o linfoide, que se presenta del 75% al 80% en este grupo de edad. Por otro lado, la leucemia aguda mieloblástica (LAM), también llamada mielocítica, mielógena o no linfoblástica, comprende aproximadamente el 20% y, por último, la leucemia mieloide crónica se presenta en el 2% de los casos (Head y Pui, 1999).

En México el cáncer es la segunda causa de muerte entre los 5 y 14 años de edad. Dentro de este grupo diverso de enfermedades, la LAL es el padecimiento maligno más común, su incidencia es de 5 casos por 100,000 habitantes, y representa el 80%

de todos los tipos de cáncer diagnosticados en edad pediátrica. Por estas razones, en nuestro país la LAL es una prioridad de atención en investigación en salud (Rivera-Luna, 2006).

1.3.- Alteraciones cromosómicas presentes en LAL

La caracterización de la LAL desde el punto de vista genético ha aportado avances importantes en el conocimiento de la biología de la enfermedad (Pérez-Vera y Montero-Ruiz, 2006). Estos estudios han tenido aplicación en la clínica, debido a que se han identificado alteraciones específicas con significado en el pronóstico de los pacientes y en el planteamiento de nuevos esquemas terapéuticos. Por ejemplo, la $t(9;22)(BCR/ABL)$ y las alteraciones que involucran a la banda 11q23(*MLL*) se consideran de mal pronóstico, los pacientes que las portan requieren de tratamientos intensivos e incluso de trasplante de médula ósea en aquellos con $t(9;22)$. En contraste, la $t(12;21)(ETV6/RUNX1)$ y la hiperdiploidía mayor a 50 cromosomas confieren mejor pronóstico y los pacientes que las presentan tienen buena respuesta al tratamiento con menor probabilidad de presentar recaídas (Pérez-Vera *et al.*, 2004; Pérez-Vera y Montero-Ruiz, 2006). Un gen que se altera con frecuencia en diferentes tipos de leucemia es *RUNX1* (del inglés “Runt-related protein 1”), también llamado *AML1* (del inglés “acute myeloid leukemia 1”), *CBF α* (del inglés “core-binding factor α ”) o *PEBP2 $\alpha\beta$* (del inglés “polyoma virus enhancer-binding protein 2 $\alpha\beta$ ”). Este gen se involucra en translocaciones cromosómicas que originan fusiones génicas, las cuales a su vez producen proteínas quiméricas con funciones diferentes a su

contraparte original. Algunas de estas fusiones son *RUNX1/ETO* de la t(8;21), *RUNX1/EVI1*, *RUNX1/MDS1* y *RUNX1/EAP* producidas en la t(3;21) y *ETV6/RUNX1* originada a través de la t(12;21) (Penther *et al*, 2002).

RUNX1 presenta amplificaciones génicas, lo que genera un incremento en el número de copias; también se altera por mutaciones puntuales que originan productos no funcionales en diversas leucemias. En particular, el incremento en el número de copias de *RUNX1* se ha identificado en LAL, y con menor frecuencia en LAM. El incremento de las copias de *RUNX1* se puede generar a través de diversos eventos como las duplicaciones en tandem, el isocromosoma 21q, los anillos del cromosoma 21, las translocaciones desbalanceadas en las que participa la banda 21q22.12 y que producen trisomías parciales o por alteraciones numéricas como las polisomías del cromosoma 21, que son frecuentes en la LAL. En el 25% de los pacientes con LAL se han presentado hiperdiploidías, donde el cromosoma 21 es el más involucrado en esta alteración. En cuanto a las mutaciones puntuales en el gen, éstas se han observado en LAM, pero no en LAL. (Raimondi *et al*, 1991; Berger, 1997; Rowley, 1999; Roumier *et al*, 2003).

1.4.- El gen *RUNX1*: Estructura y función

El gen *RUNX1* tiene un papel importante en la formación del sistema hematopoyético; en el modelo de ratón se ha observado que las mutaciones nulas de este gen son letales y dan como resultado embriones que mueren por ausencia del desarrollo de las células precursoras de la hematopoyesis hepática definitiva (Okuda *et al.*, 1996). El gen *RUNX1*, se localiza en la banda cromosómica 21q22.12 y codifica para un factor de transcripción específico que regula la expresión de una gran cantidad de genes que participan en la hematopoyesis como el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), la mieloperoxidasa (MPO), la interleucina 3 (IL3) y la integrina CD11a/CD18, entre otros (Roumier *et al.*, 2003). *RUNX1* presenta 10 exones (1-6, 7A, 7B, 7C y 8) y dos promotores localizados en los exones 1 y 3, a partir de los cuales se pueden producir 4 isoformas (Figura 1). *RUNX1* codifica una proteína que consta de: a) un dominio de inhibición de la transcripción en la región N-terminal (residuos 1-49 aa.), b) un dominio de unión al DNA denominado RUNT (residuos 50-177 aa.), c) en la región C-terminal posee un dominio de represión de la transcripción (residuos 178-290 aa.) y d) un dominio de activación de la transcripción (residuos 291-453 aa.) (Figura 2) (Ito, 1999).

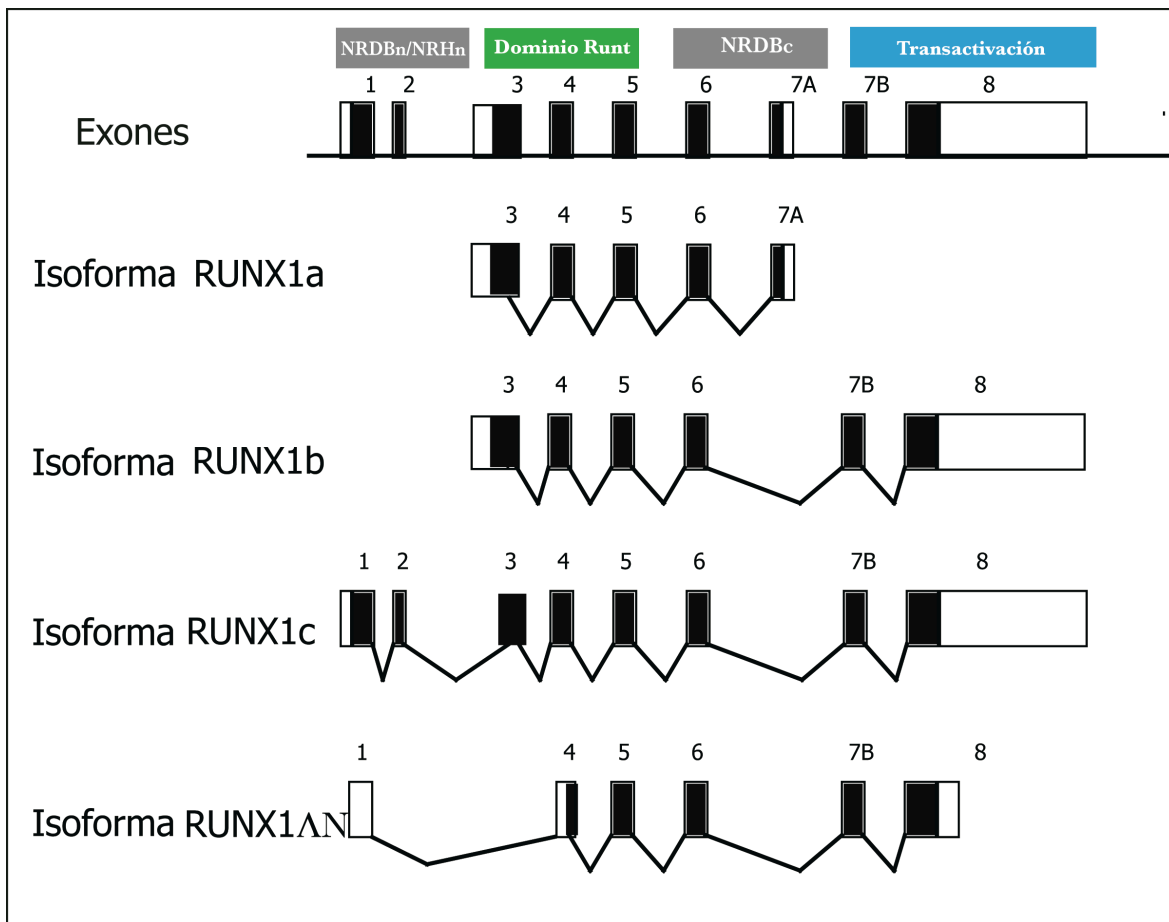


Figura 1. Estructura e isoformas de *RUNX1* (Imagen modificada de Zhang *et al*, 1997).

RUNX1 codifica para un factor de transcripción que posee la capacidad de unirse al DNA a través del dominio RUNT, el cual también le permite ensamblarse al CBF β incrementando la afinidad de *RUNX1* por el DNA; el heterodímero formado por estas proteínas es crítico en la regulación de la transcripción de genes específicos de hematopoyesis y de control del ciclo celular, como el factor estimulador de colonias de granulocitos, la mieloperoxidasa, la tirosina cinasa de los linfocitos B (BLK), el inhibidor de la cinasa 1A dependiente de ciclina (CDKN1A o p21) y p14ARF entre otros (Okuda *et al.*, 1996; Kurokawa y Hirai, 2003). Además del dominio RUNT,

RUNX1 también utiliza otros sitios de unión para factores de transcripción específicos de tejido, como el dominio de transactivación de la región carboxilo terminal (Okuda *et al.*, 1996) y el dominio de inhibición o represión (Reed-Inderbitzin *et al.*, 2006).

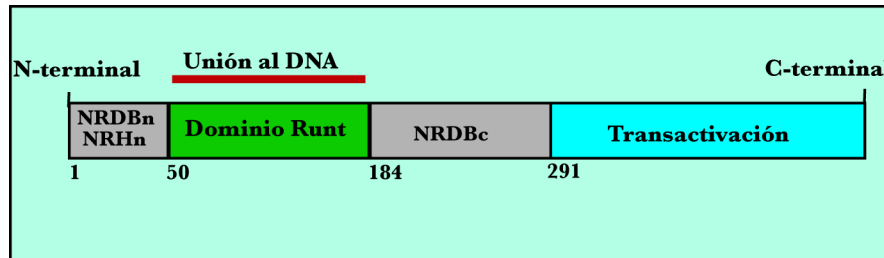


Figura 2.- Dominios funcionales de la proteína RUNX1

Se ha descrito que a través de remoción (“splicing”) alternativa de intrones, el gen *RUNX1* codifica para tres isoformas proteicas RUNX1a, RUNX1b y RUNX1c (Figura 1), de las cuales la isoforma RUNX1b funciona como activador de la transcripción (Zhang *et al.*, 1997). Dependiendo de los dominios que presentan las isoformas, pueden competir por el sitio de unión al DNA o por los cofactores necesarios para que se lleve a cabo la transcripción de los genes regulados por RUNX1. Las isoformas RUNX1a y RUNX1b se traducen a partir del exón 3, ambas presentan el dominio de RUNT intacto y se distinguen debido a que la isoforma RUNX1a carece de la región carboxilo terminal. La isoforma RUNX1c inicia en el exón 1 y su región carboxilo terminal es esencialmente la misma que en la isoforma RUNX1b. Se ha encontrado que la isoforma RUNX1a regula negativamente la transcripción y que puede competir con la RUNX1b por la unión al DNA y al CBF β , ya que posee el dominio RUNT (Zhang *et al.*, 1997). Las diferentes isoformas de RUNX1 presentan una función similar de unión al DNA y son capaces de interactuar sinérgicamente con

el factor de transcripción PAX5 en la activación del promotor del gen *BLK*; este gen se expresa a lo largo del desarrollo de las células B y en las células T inmaduras (Libermann *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1995).

1.5.- Alteraciones que involucran a *RUNX1* en leucemias

RUNX1 participa en dos tipos de alteraciones: a) Las translocaciones que originan fusiones génicas y modifican la actividad original de los genes (Pérez-Vera y Montero-Ruíz, 2006, Okuda *et al.*, 1996) y b) Alteraciones en el número de copias del gen, en los niveles de expresión o ambas, lo cual es relevante ya que la expresión de *RUNX1* es crítica en la diferenciación hematopoyética y su sobre-expresión o haploinsuficiencia contribuyen al origen de la leucemia (Osato *et al.*, 1999; Roumier *et al.*, 2003).

Se ha determinado que translocaciones como la t(8;21) y la t(12;21) dan como resultado proteínas quiméricas que reclutan anormalmente a moléculas co-represoras como la desacetilasa de histona (HDAC) y mSin3A. El complejo co-represor contribuye al enrollamiento de la cromatina e impide la unión con los factores de transcripción, en consecuencia *RUNX1* pierde su función como activador de la transcripción y pasa a ser un represor constitutivo capaz de bloquear la hematopoyesis normal (Osato *et al.*, 1999; Fenrick *et al.*, 1999; Guidez *et al.*, 2000).

Por otra parte, se han descrito varias enfermedades asociadas a las variaciones en la dosis génica de *RUNX1*. En LAM se han detectado mutaciones en el dominio RUNT, en algunos casos en forma homocigota y en otros en un sólo alelo que actúa como dominante negativo sobre la función del alelo normal; estas mutaciones se

presentan con mayor frecuencia en pacientes con cariotipos con trisomía 21 adquirida (somática) (Osato, *et al.* 1999; Roumier *et al.*, 2003). La haploinsuficiencia de *RUNX1* a nivel germinal produce la enfermedad de plaquetas familiar, que se ha asociado con predisposición a desarrollar LAM (Song *et al.*, 1999). En cuanto a la trisomía 21, se ha sugerido que el hecho de tener una copia extra de *RUNX1* puede contribuir junto con otros genes contiguos a que los pacientes con síndrome de Down presenten un riesgo mayor para desarrollar leucemia (Gurbuxani *et al.*, 2004). En contraste con los pacientes con LAM, en LAL no se han encontrado mutaciones en el dominio RUNT del gen *RUNX1* (Penther *et al.*, 2002; Roumier *et al.*, 2003).

En el Instituto Nacional de Pediatría de México, se analizaron 71 pacientes pediátricos con LAL por citogenética convencional e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Se detectó la presencia de alteraciones como la t(12;21) en un 8.5%; se observó incremento en el número de copias del gen *RUNX1* en el 29.5% de los pacientes, el 19.7% de los casos mostraron polisomias 21 no constitutivas y 9.8% se asociaron con duplicaciones en tandem de *RUNX1*. (Pérez-Vera *et al.*, 2005). Por otro lado, Mikhail, *et al.* (2002), detectaron que el incremento en el número de copias de *RUNX1* se asocia con aumento en su expresión; sin embargo, también determinaron que éste puede presentarse aún sin evidencia de copias extra del gen. Las alteraciones en el número de copias y en la expresión de *RUNX1* aparecen con frecuencia en LAL, lo cual indica que son importantes tanto en el inicio como en la progresión de esta enfermedad.

En LAM y en síndromes mielodisplásicos se han determinado algunos de los efectos biológicos que tienen las translocaciones y las mutaciones puntuales que involucran

a *RUNX1*; se ha observado que inducen cambios en la expresión de sus genes subordinados en el resto del genoma. En LAM incide sobre la regulación del gen supresor de tumor *p14ARF*, que participa en el punto de control que permite el paso de la fase G1 a S del ciclo celular y es un blanco de transactivación de *RUNX1*; cuando ocurre la t(8;21) (*ETO/RUNX1*), *RUNX1* recluta moléculas co-represoras e inhibe la transcripción de *p14ARF* (Linggi *et al.*, 2002). En síndromes mielodisplásicos se ha demostrado que las mutaciones puntuales de *RUNX1* inducen la hiperactivación de la vía de señalización de RAS (Nimmi *et al.*, 2006).

En cuanto a la LAL, poco se conoce del efecto que produce el incremento en la expresión de *RUNX1* (Roumier *et al.*, 2003; Harewood *et al.*, 2003), su papel puede ser distinto cuando se presentan polisomías 21 o duplicaciones en tándem. Por aneuploidía, generalmente se ganan 1 ó 2 cromosomas 21 y en consecuencia se tiene un total de 3 ó 4 copias de *RUNX1*; en contraste, en las duplicaciones en tándem se pueden presentar desde 3 hasta más de 10 copias de este gen en el mismo cromosoma (Roumier *et al.*, 2003). En la LAL no se han detectado mutaciones en el dominio de RUNT que inactiven la unión al DNA o al CBF β , lo cual sugiere que la clave del mecanismo de leucemogénesis en esta enfermedad puede estar en la modulación de la transcripción de los genes que regula *RUNX1*, que puede modificarse por: a) El tipo de mensajeros de *RUNX1* que se obtienen por remoción alternativa de intrones, a través del cual se producen las diversas isoformas con diferentes características y funciones; o b) De la asociación de *RUNX1* con moléculas co-represoras que empaquetan la cromatina.

1.6.- Contribución de *RUNX1* al proceso de carcinogénesis

Se ha demostrado que las isoformas inducen selectivamente la expresión de moléculas que participan en la progresión tumoral, por ejemplo la isoforma RUNX1a es un inductor específico del gen que codifica para la MIP1a (“macrophage inflammatory protein” 1a), que es una citocina promotora de la proliferación celular y confiere pronóstico adverso a los pacientes con esta enfermedad (Choi *et al.*, 2003). Se ha referido que las células de mieloma múltiple expresan preferentemente la isoforma RUNX1a, mientras que su contraparte normal expresa la isoforma RUNX1b. Las alteraciones del cromosoma 21 pueden favorecer la expresión de alguna isoforma de *RUNX1*, y a través de este mecanismo bloquean o inducen la transcripción de genes que promueven el desarrollo de la LAL. Esta hipótesis se ha explorado por tres grupos de trabajo independientes, uno de ellos analizó conjuntamente los transcritos de las isoformas RUNX1b y RUNX1c utilizando PCR-tiempo real y observó incremento en la expresión de estas isoformas en el 44% de los pacientes con LAL; este resultado se asoció con el incremento en el número de copias del gen (Mikhail *et al.*, 2002). En los otros dos estudios se analizó específicamente el RNAm de la isoforma RUNX1a comparado con el RNAm total de RUNX1 mediante la técnica de RT-PCR semi-cuantitativo, en muestras de médula ósea y/o sangre; en contraste con el estudio previo, se determinó incremento en la expresión de la isoforma RUNX1a (Gutiérrez-Angulo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). Los estudios fueron realizados con diseños experimentales diferentes y no permiten conocer el componente global de las isoformas de RUNX1 en LAL, por lo que aún no

se resuelve si este mecanismo influye en la transcripción de los genes regulados por RUNX1.

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Instituto Nacional de Pediatría de México se han detectado, en pacientes con LAL, más del 29% de alteraciones asociadas al gen *RUNX1*. Actualmente no existen estudios que analicen, en linfoblastos de pacientes, el efecto que pueden tener estas alteraciones en la generación de isoformas de *RUNX1*, por lo cual en el presente estudio se planteó: a) Analizar la expresión diferencial de las tres isoformas de *RUNX1*, a nivel de su RNAm y proteína; b) Evaluar la expresión del gen *BLK*, cuya función está asociada a la hematopoyesis, es regulado por *RUNX1* y se expresa en diversas etapas del desarrollo de las células B.

Las alteraciones numéricas y estructurales del gen *RUNX1* de la población de estudio del presente trabajo se caracterizaron previamente mediante citogenética convencional con bandas GTG y FISH. De igual manera, las isoformas A, B y C de *RUNX1* se analizaron anteriormente mediante RT-PCR de punto final (Montero-Ruíz, 2008).

3.- OBJETIVO GENERAL

Correlacionar las alteraciones del gen *RUNX1* con la expresión de sus isoformas y la expresión del gen *BLK*.

4.- OBJETIVOS PARTICULARES

En blastos obtenidos de aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos con LAL:

1. Determinar la presencia de las isoformas proteínicas de *RUNX1* por Western-blot.
2. Cuantificar la expresión de los RNAm de las isoformas *RUNX1* por PCR en tiempo real.
3. Analizar cambios en la expresión del gen *BLK* por PCR en tiempo real.

5.- HIPÓTESIS

Las alteraciones del gen *RUNX1* presentes en pacientes con LAL influyen en la expresión de sus isoformas y de su gen blanco *BLK*.

6.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Observacional, prospectivo, transversal, descriptivo.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.1- Población de estudio

Se procesaron 30 muestras de médula ósea criopreservadas de pacientes pediátricos con LAL, colectadas en el período de enero a diciembre del 2006 en el servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría de México. Los pacientes cumplieron con los siguientes criterios:

7.2.- Criterios de inclusión

- a) Pacientes pediátricos de 0 a 16 años, con diagnóstico de LAL basado en criterios clínicos, citomorfológicos e inmunológicos.
- b) Cualquier género.
- c) Sin tratamiento previo.
- d) Que aceptaron participar en el proyecto.

7.3.- Criterios de Eliminación

- a) Pacientes que se diagnosticaron posteriormente con una enfermedad distinta a LAL.
- b) Baja cantidad de células obtenidas o tejidos degradados.

7.4.- Consideraciones éticas

Se solicitó a los padres o tutores de los pacientes que conforman la población de estudio, la firma de la “Carta de consentimiento informado” (Anexo 1) en la que manifiestan su aceptación de participar en el proyecto. De igual forma, se solicitó el consentimiento a los integrantes del grupo de referencia.

Cabe señalar que las muestras de médula ósea de los pacientes se obtuvieron de los aspirados que se realizan para estudios de diagnóstico de LAL y bajo ninguna circunstancia se solicitó muestra extra para cubrir las necesidades de este proyecto.

7.5.- Obtención y procesamiento de las muestras de médula ósea

Los aspirados de médula ósea con heparina se separaron en dos fracciones, una se utilizó para realizar el análisis citogenético convencional con bandas GTG y el análisis de alteraciones de *RUNX1* con FISH. A partir de la segunda parte de la muestra, se separaron las células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque; se hicieron alícuotas que se congelaron en nitrógeno líquido a -196°C en las soluciones adecuadas para preservar ácidos nucleicos con isotiocianato de guanidina y células en dimetilsulfóxido (DMSO).

7.6.- Grupo de referencia

Se colectaron muestras de sangre periférica heparinizada de 10 donadores adultos sanos. Se separaron las células CD19+ (linfocitos B) y las células CD3+ (linfocitos T). Las muestras se purificaron con el uso de perlas magnéticas (Macs Miltenyi, Bergish-Gladbach, Germany) y se criopreservaron de la misma manera que las células leucémicas. Aunque estas células no son una referencia óptima, se emplearon

debido a que corresponden al mismo tipo celular que la leucemia en estudio y se pueden obtener en cantidad mayor que en médula ósea normal (Mikhail, 2002).

7.7.- Cuantificación relativa de la expresión de las isoformas de RUNX1 y el gen *BLK* por PCR cuantitativa (q-PCR) (método $\Delta\Delta Ct$)

En la primera parte de este trabajo se determinó por RT-PCR la isoforma más frecuente presente en los pacientes, ésta se seleccionó para ser analizada por q-PCR y corresponde a la isoforma RUNX1_{c196} (Montero-Ruíz, 2008). También se cuantificó RUNX1a, a la cual se atribuye un papel antagónico a las otras isoformas; de igual forma se analizó el dominio RUNT para cuantificar el total de isoformas que contienen dicho dominio, así como el gen blanco *BLK*. Los oligonucleótidos y los exones amplificados se muestran en el Anexo 2.

A partir del RNA total se sintetizó cDNA por el método de oligo(dT), con el kit Transcriptor first strand cDNA synthesis (Roche, Germany). La amplificación se realizó con el kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem Life Technologies Carlsbad, CA, USA) y con las sondas para detectar RUNX1a, RUNX1_{c196}, el dominio RUNT y el gen *BLK*. Se utilizó un equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los datos obtenidos (ct) se analizaron de acuerdo al método de la $\Delta\Delta Ct$ (Livak, 2001) de la siguiente manera:

$\Delta\text{ct muestras problema} = \text{ct del gen problema} - \text{ct del gen endógeno (GAPDH)}$

$\Delta\text{ct calibrador (línea celular)} = \text{ct del gen problema} - \text{ct del gen endógeno (GAPDH)}$

$\Delta\Delta\text{ct} = \Delta\text{ct problema} - \Delta\text{ct calibrador}$

Como calibrador se utilizó una línea linfoblastoide de células B obtenida de un adulto sano.

7.8.- Identificación de las isoformas de la proteína RUNX1 por Inmunodetección en hibridación tipo Western-blot

Debido a la baja cantidad de células obtenidas de las muestras de médula ósea, sólo 17 muestras de pacientes fueron adecuadas para el análisis de proteínas por Western-blot. Las muestras de médula ósea congeladas en DMSO se centrifugaron y se resuspendieron con amortiguador RIPA (Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA), con inhibidores de proteasas (Complete Mini Roche Diagnosis, Alemania) y se sonicaron para lisar las células. La cuantificación de proteínas se determinó por el método Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), usando albúmina sérica bovina como estándar. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Anexo 3). Se realizó la inmunolocalización con un anticuerpo policlonal primario anti-dominio RUNT de RUNX1 producido en conejo (Oncogene Research Products, Boston, MA, USA), a una dilución de 1:1000. Como anticuerpo secundario se utilizó suero anti-conejo, elaborado en cabra y marcado con HRP (Horseradish peroxidase) (SantaCruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA) en dilución 1:5000. Para visualizar la unión

de los anticuerpos se empleó el kit SuperSignal chemiluminiscent (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Se hizo un análisis semi-cuantitativo de la expresión de RUNX1 con el software ImageJ (Rasband, 1997-2009), los datos obtenidos se normalizaron con la proteína β -actina (dilución del anticuerpo 1:500). Las proteínas de RUNX1 que contienen el dominio RUNT se identificaron por diferencias en la masa molecular y se calculó con el programa CLC Protein Workbench versión 5.2 para Mac.

7.9.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con una prueba de coeficiente de correlación de Pearson. Las variables utilizadas fueron la expresión de: RUNX1a, RUNX1c₁₉₆, las isoformas que contienen el dominio RUNT y la expresión de BLK.

8.- RESULTADOS

8.1.- Población de estudio

Los datos clínicos y de laboratorio de los 30 pacientes incluidos en este estudio se presentan en el Anexo 4. Veintiocho pacientes mostraron inmunofenotipo precursor de células B y dos de células T.

En el Anexo 5 se muestran los resultados de los estudio citogenéticos y de FISH, sólo tres pacientes mostraron resultados normales, los otros 27 presentaron al menos una anomalía cromosómica o génica. Se observaron las alteraciones recurrentes más frecuentes asociadas con la enfermedad.

Mediante RT-PCR y usando los oligonucleótidos descritos por Miyoshi, (1995) y Choi, (2003) (Anexo 2), se obtuvieron los 3 productos esperados para los transcritos de las isoformas a, b y c: RUNX1a=465 pb, RUNX1b=293 pb, y RUNX1c=404 pb (Anexo 6). Además se detectaron 5 productos extra, 2 para la isoforma a y 3 para la c: RUNX1a, 400 pb (RUNX1a₄₀₀), 263 pb (RUNX1a₂₆₃), RUNX1c, 450 pb (RUNX1c₄₅₀), 350 pb (RUNX1c₃₅₀) y 196 pb (RUNX1c₁₉₆). La identidad de los productos detectados se caracterizó por secuenciación. Se corroboró la presencia de las isoformas RUNX1a, RUNX1b y RUNX1c. En cuanto a las 5 variantes detectadas (Figura 3 y Anexo 6) se puede señalar que: a) la variante RUNX1a₄₀₀ presenta la pérdida de 65 pb (51pb que corresponden al exón 6 y 14pb del exón 7A); b) la variante RUNX1a₂₆₃ muestra la pérdida del exón 6 completo; c) La variante RUNX1c₁₉₆ es un producto que presenta la pérdida de 208pb dentro del exón 1. Los productos RUNX1a₂₆₃ (conocido como $\Delta 6$) y RUNX1c₁₉₆ (conocido como variante 1,

Anexo 6) ya han sido reportados por Miyoshi y colaboradores (1995), empleando líneas celulares de origen mieloide. Los 2 productos restantes de la isoforma de RUNX1c (350 y 450) no se lograron purificar debido a la baja concentración de la muestra.

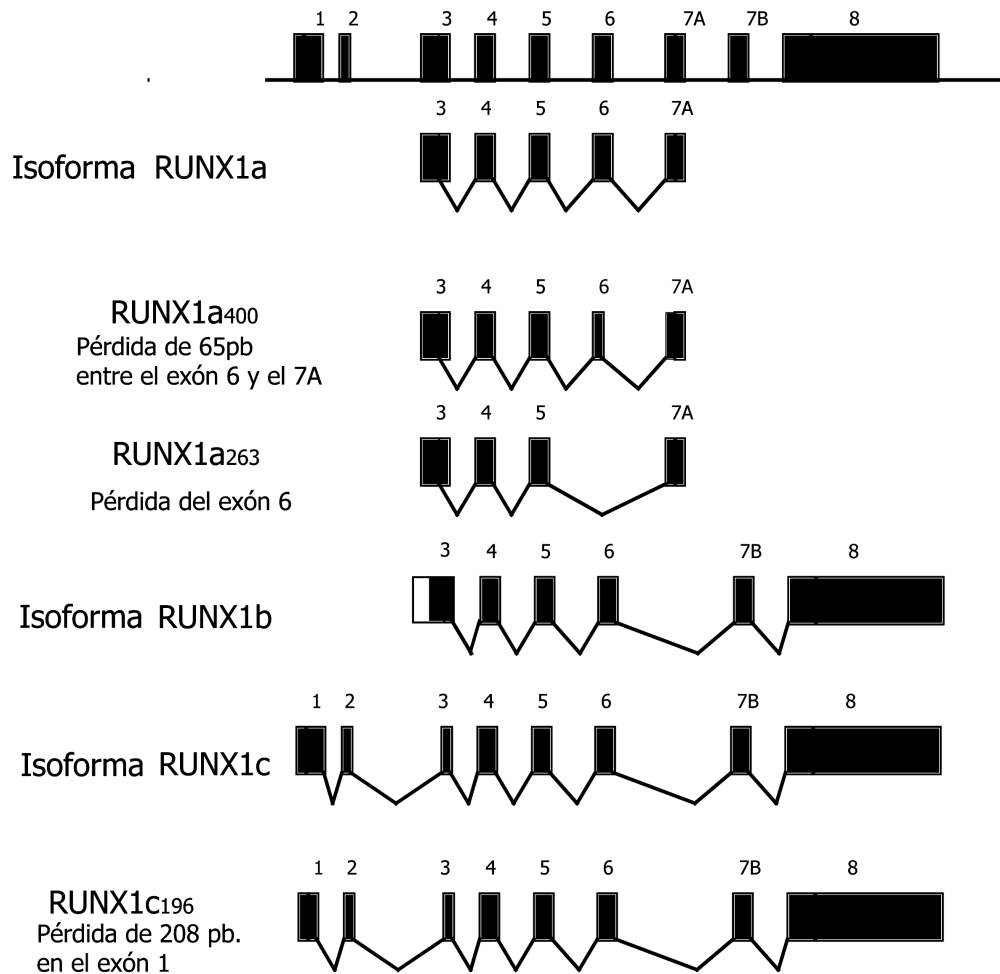


Figura 3. Representación esquemática de las isoformas de RUNX1 obtenidas y sus variantes, señalando los exones o parte de ellos que están presentes en cada una, en comparación con el gen silvestre (superior).

En la figura 4 se muestra el porcentaje de individuos con LAL en el que se detectó la expresión cualitativa de los transcritos de RUNX1 con respecto al grupo de referencia (CD19+); en particular la isoforma RUNX1_{c196} se detectó en todos los pacientes. Los transcritos detectados se presentaron en diversas combinaciones (tabla 1).

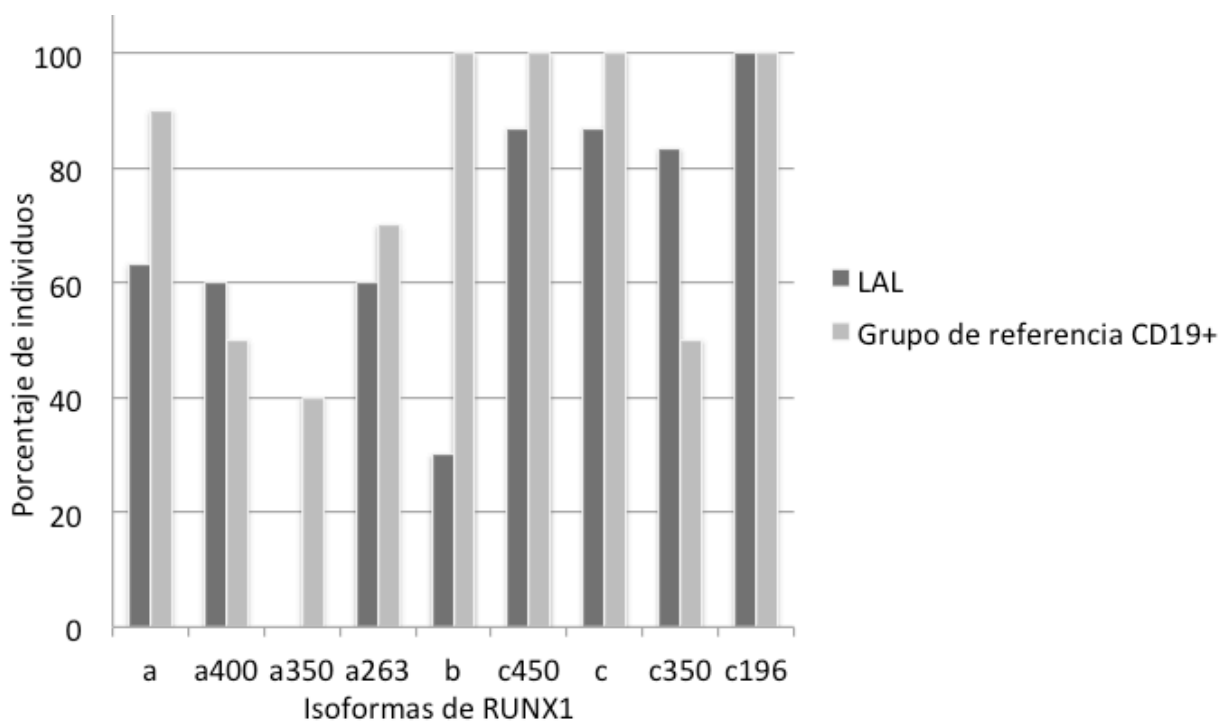


Figura 4.- Porcentaje de pacientes con LAL en los que se presentan la expresión de las isoformas de RUNX1 con respecto al grupo de referencia.

8.2.- Isoformas de RUNX1 en células CD19+ de individuos sanos

En el grupo de 10 individuos sanos se presentaron las isoformas RUNX1a, RUNX1b, RUNX1c y las variantes RUNX1a₄₀₀, RUNX1a₂₆₃, RUNX1c₄₅₀, RUNX1c₃₅₀ y RUNX1c₁₉₆. Además se observó otra variante de RUNX1a de ~350pb no detectada en los pacientes con LAL, no se logró confirmar su identidad a través de secuenciación automatizada debido a su baja concentración (Figura 4). La isoforma RUNX1c, las variantes RUNX1c₄₅₀, RUNX1c₃₅₀ y RUNX1c₁₉₆ y RUNX1b se observaron en el total de las muestras; la isoforma RUNX1a se encontró en el 90%, la variante RUNX1a₂₆₃ en el 70%, y la variante RUNX1a₄₀₀ se presentó en el 50%. La variante de RUNX1a de ~350pb, se detectó en el 30% de los casos.

8.3.- Análisis por Western-blot de la proteína RUNX1 en células leucémicas

Con este estudio se determinó la presencia de las isoformas proteínicas de RUNX1 en las células de 17 pacientes con LAL. Se detectó el dominio Runt de la proteína Runx1 y se identificaron siete isoformas con diferente peso molecular que contienen dicho dominio (Figura 5, Anexo 6). Las masas moleculares de las proteínas son: RUNX1a de 27.372 kDa; RUNX1b de 48.736 kDa; y RUNX1c de 51.818 kDa; la variante RUNX1a₄₀₀ de 28.6 kDa; la variante RUNX1a₂₆₃ de 20.117 kDa; Además se observaron 2 bandas adicionales que no corresponden a las masas moleculares calculadas, una banda de ~36kDa y otra de ~50kDa (Figura 5). Al igual que los resultados de los transcritos de RUNX1, el Western blot reveló que la isoforma más

frecuente fue RUNX1c y que existen combinaciones de isoformas que contienen el dominio RUNT (Tabla 1).

Tabla 1. Combinaciones de transcritos y proteínas de RUNX1 presentes en los pacientes con LAL

No. Pacientes	mRNA (30 pacientes)
10	C,C450,C350,C196
7	a,a400,a263,b, C,C450,C350,C196
6	a,a400,a263, C,C450,C350,C196
2	a,a400,C,C450,C350,C196
2	a,a400,a263,b, C196
1	a,a400,a263, C350,C196
1	a,C,C450,C196
1	a400,C350,C196
Proteína (17 pacientes)	
9	c
3	a, a400,a263,36 KDa*,b, 50 KDa*,c
1	a, a400,36 KDa*,b,50 KDa*,c
1	a,a263,36 KDa*,c
1	a,a263,50 KDa*,c
1	a, a400,C
1	a,b,c

*Bandas no identificadas

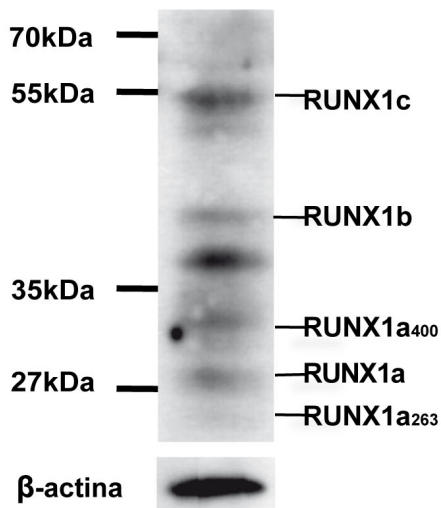


Figura 5.- Isoformas proteínicas de RUNX1. A la izquierda se muestra la masa molecular, a la derecha se señalan las isoformas detectadas y abajo como control interno β -actina.

8.4.- Cuantificación de la expresión de las isoformas RUNX1a, RUNX1c₁₉₆ y de aquellas que contienen el dominio RUNT

Se analizaron 22 muestras de pacientes por q-PCR, de los cuales 21 mostraron inmunofenotipo de células B y tuvieron mayor expresión de la isoforma RUNX1c₁₉₆ con respecto a RUNX1a. Al analizar la expresión de las isoformas y las alteraciones cromosómicas (Anexo 5), sólo la expresión de las isoformas totales que contienen el dominio de RUNT presentaron asociación con la t(4;11) y con la ganancia del gen *RUNX1*, ya sea por amplificación del cromosoma 21 (iAMP21) o por hiperdiploidía (Figura 6). Los 2 pacientes con t(4;11) mostraron los mayores niveles de expresión 635-656 veces (valores obtenidos de la $\Delta\Delta ct$ con respecto a un gen endógeno y un calibrador) de todos los pacientes analizados, seguido del grupo de 8 pacientes con

el mayor número de copias de *RUNX1* (62-466 veces). Los 3 pacientes con la fusión génica *ETV6/RUNX1* presentaron el siguiente nivel de expresión (147-242 veces). El análisis de las proteínas apoyó los resultados en cuanto al aumento en expresión de las proteínas con dominio RUNT en el grupo de pacientes con número de copias de *RUNX1* incrementado y reveló la ausencia de la isoforma *RUNX1b* en los pacientes con la fusión *ETV6/RUNX1* (Figura 7).

8.5.- Cuantificación de la expresión del gen *BLK*

La expresión del gen *BLK* en los pacientes con LAL fue diversa. No se encontró correlación entre la expresión de la isoforma *RUNX1a* vs *BLK* ($r^2=0.03$; $p>0.05$) o entre *RUNX1*_{C196} vs *BLK* ($r^2=0.13$; $p>0.05$). Sin embargo se presentó correlación positiva entre el total de las isoformas que contienen dominio RUNT y *BLK* ($r^2=0.43$; $p<0.05$).

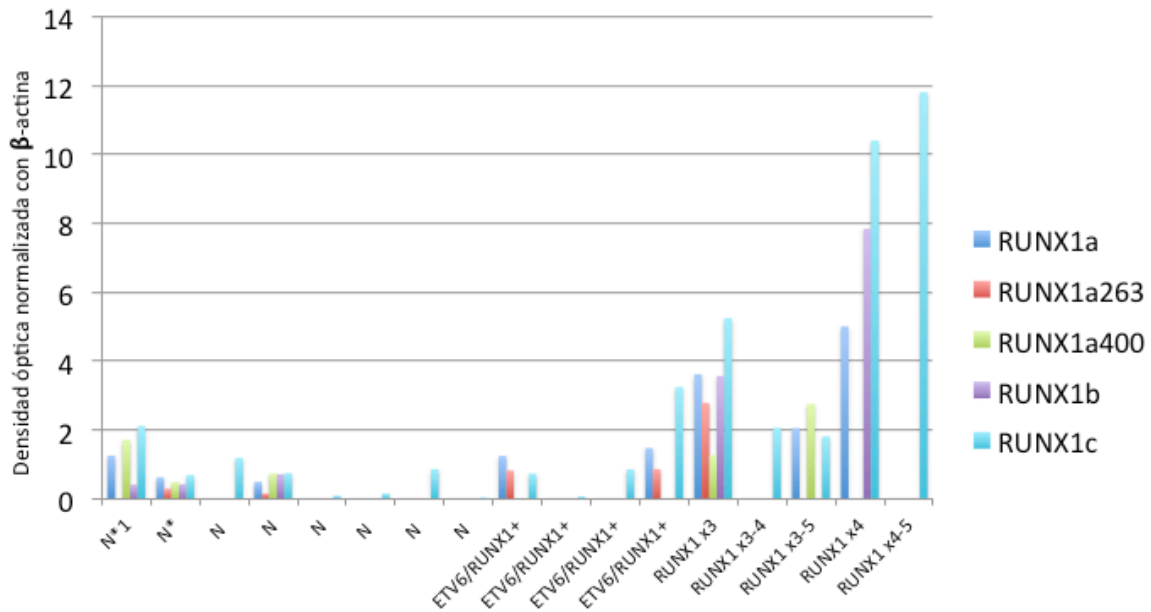


Figura 7.- Expresión de las isoformas proteínicas de RUNX1 detectadas por Western-blot con respecto a las alteraciones del gen *RUNX1* por FISH. N= Gen *RUNX1* normal; * Paciente con LAL de células T; 1= Paciente hiperdiploide.

8.6.- Expresión de las isoformas de *RUNX1* y el gen *BLK* en las muestras de sangre periférica de individuos sanos

La expresión de las isoformas de *RUNX1* obtenida por RT-PCR en las células mononucleares de los donadores sanos, mostró la combinación RUNX1a/RUNX1a₄₀₀/RUNX1a₂₆₃/RUNX1c/RUNX1c₄₅₀/RUNX1c₃₅₀/RUNX1c₁₉₆. Las células CD19+ aisladas presentaron la misma combinación, pero adicionalmente se detectó la isoforma RUNX1b. El estudio cuantitativo en las células CD19+ reveló la presencia de las isoformas que contienen el dominio RUNT en niveles de 168-1348 veces y para *BLK* de 30 a 227 veces; la expresión detectada en estas muestras fue

mayor para ambas determinaciones con respecto a lo encontrado en los pacientes con LAL. Las células CD3⁺ mostraron valores bajos para las isoformas que contienen el dominio de RUNT (4-18 veces), así como para la isoforma RUNX1_{C196} (5-68 veces) y para RUNX1a (0-3veces). En cuanto al gen *BLK*, la expresión también fue disminuida (0-11 veces).

9.- DISCUSIÓN

La expresión aberrante del gen *RUNX1* se ha relacionado con padecimientos malignos, como cáncer de ovario, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple y leucemias agudas. (Choi *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 2009, Chimienti *et al.*, 2000, Nanjunda *et al.*, 2007). Se ha involucrado en alteraciones como translocaciones, mutaciones puntuales, deleciones, incremento en el número de copias originadas por polisomías del cromosoma 21 o por amplificaciones. La proteína RUNX1 tiene un papel relevante en el establecimiento de la hematopoyesis y se altera con frecuencia en leucemias agudas, sin embargo, aún no se conoce con precisión su participación en el desarrollo de la LAL.

En estudios previos en los que se analizaron las isoformas RUNX1a y RUNX1b, en muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes con LAL, con respecto a muestras de individuos sanos, se detectaron niveles de expresión de RUNX1a significativamente mayores en los pacientes (Gutiérrez-Angulo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). En estudios realizados en la línea celular CV.1, fueron transfectados plásmidos que expresaban *RUNX1a* o *RUNX1b* y se ha demostrado que la sobre-expresión de RUNX1a interfiere con la transactivación de RUNX1b de manera dosis dependiente. Este efecto inhibitorio es reversible cuando se induce la sobre-expresión de RUNX1b, lo cual sugiere que existe competencia entre las isoformas (Liu *et al.*, 2009). A partir de estos resultados se concluyó que RUNX1a regula negativamente a las demás isoformas de RUNX1, por competencia por el sitio de unión al DNA (Gutiérrez-Angulo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009); el resultado es la disminución en la actividad transcripcional del receptor del factor estimulante de

colonias de macrófagos, gen blanco de RUNX1b (Liu *et al.*, 2009). En otro estudio, también se analizaron pacientes con LAL, pero se detectaron isoformas de RUNX1 que contienen el dominio de transactivación que corresponden a RUNX1b y RUNX1c. Los resultados mostraron alta expresión de dichas isoformas en los pacientes con mayor número de copias del cromosoma 21 y en los casos con amplificación de RUNX1; en este trabajo, las estimaciones se hicieron en muestras de médula ósea de los pacientes y no se compararon ni normalizaron los resultados respecto a muestras de individuos sanos.

Las observaciones de estos 3 estudios sugieren que la composición de isoformas de RUNX1 en LAL puede ser más compleja (Mikhail *et al.*, 2002). Con base en esta evidencia, el objetivo principal del trabajo fue determinar la composición de los transcritos de las isoformas de RUNX1 individualmente y determinar si la presencia de alteraciones cromosómicas afecta su expresión. Adicionalmente, los resultados de expresión de las isoformas, a nivel de transcritos, se corroboraron con los estudios de detección de proteínas; también se cuantificaron los transcritos de la isoforma RUNX1a así como de la isoforma más frecuentemente detectada en los pacientes, que fue RUNX1c₁₉₆.

A diferencia de los estudios que indican que RUNX1a es la isoforma más abundante en LAL (Mikhail *et al.*, 2002), en este trabajo la expresión de cada isoforma se estimó sólo en médula ósea sin comparar con la sangre periférica o médula ósea de individuos sanos; se realizó de esta manera debido al alto contenido de células mieloides en las muestras sanas, lo cual no es representativo de la estirpe linfóide que es la involucrada en la leucemia en estudio. Como es esperado, los diversos

linajes y tipos celulares hematopoyéticos pueden tener distinto componente de isoformas, por esta razón las comparaciones se llevaron a cabo sólo entre los pacientes con LAL; sin embargo se analizó la sangre periférica de individuos sanos para tener una referencia. A diferencia de los resultados obtenidos de la médula ósea leucémica, se detectó la expresión de RUNX1b en las células CD19+ de sangre periférica de todo el grupo de individuos sanos. Una diferencia más con uno de los estudios previamente realizados (Gutiérrez-Angulo *et al.*, 2004), consistió en no utilizar muestras de sangre de los pacientes, ya que éstas pueden contener un número escaso de blastos leucémicos; como se muestra en los resultados obtenidos del grupo de referencia, la expresión de las diferentes isoformas del gen estudiado depende de los tipos celulares presentes en la muestra.

Con base en los resultados que sustentan el modelo antagónico de RUNX1, se esperaba que la isoforma RUNX1a estuviera presente en la mayoría de los pacientes y que su expresión fuera la más alta con respecto a otras isoformas (Gutiérrez-Angulo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). Sin embargo, los estudios cualitativos de los transcritos detectaron a la isoforma RUNX1c presente en todos los pacientes, seguida en frecuencia de las isoformas RUNX1a y RUNX1b. Se identificó una variada combinación de isoformas y sólo en 10 pacientes la isoforma RUNX1c se presentó como isoforma única (Tabla 1), esto refleja su importancia en la LAL. Estos resultados se corroboraron con el análisis de las proteínas por Western-blot, en donde 9 de 17 pacientes sólo expresaron la isoforma RUNX1c. El análisis cuantitativo de isoformas realizado por q-PCR, también confirmó que RUNX1c₁₉₆ presenta mayor nivel de expresión en comparación con RUNX1a. Los resultados de los 3 análisis

realizados coinciden en que RUNX1c es la isoforma más frecuentemente expresada en el grupo de pacientes con LAL estudiados; estos datos contrastan con lo referido previamente por Gutiérrez-Angulo (2004) y Liu (2009), aunque concuerdan con las observaciones de Mikhail (2002). Los resultados obtenidos también son similares a los encontrados en análisis realizados en líneas de celulares de células leucémicas B y T, en donde se ha observado que sólo se expresa la isoforma proteica RUNX1c (Telfer y Rothenberg, 2001).

En los resultados de este estudio también destaca la diversidad de variantes detectadas por RT-PCR, que fue posible observar por el diseño del análisis de isoformas que se planteó. Dos de las variantes detectadas por RT-PCR ya habían sido previamente identificadas por Miyoshi (1995), RUNX1a₂₆₃ (conocida como $\Delta 6$), y RUNX1c₁₉₆ la cual recientemente se refiere en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, EUA) como variante 1 (Anexo 6). Con respecto a la isoforma RUNX1a₄₀₀ que también se detectó, el análisis de secuenciación mostró que pierde 65 pb, que incluyen una porción del exón 6 y del 7A. El mecanismo de formación de esta isoforma parece combinar 2 tipos de remoción de intrones: puede existir un sitio donador de corte alternativo en el lado 3' del exón 6 y un sitio aceptor de corte alternativo en la región 5' del exón 7A (Figura 3); esta eliminación produce un cambio del marco de lectura que resulta en una proteína de 28.5 kDa. Se comprobó que este transcrito se traduce y está presente en algunos de los pacientes (5 de 17), por lo que posiblemente participa con las otras isoformas en la regulación de la expresión de los genes blanco. Aunque no se determinó la función

de esta isoforma, por la posición de la delección se podría afectar el dominio de regulación negativa de unión al DNA, ubicado en la región C-terminal (NRDBc). La variante RUNX1a₄₀₀ recientemente ha sido reportada en la literatura, pero aún no se conocen sus implicaciones (Montero-Ruíz *et al.*, 2012). La isoforma RUNX1a₂₆₃ muestra la pérdida del exón 6 completo, el mecanismo por el cual se forma se considera uno de los principales eventos conservados de remoción alternativa de intrones en genomas de humano y ratón (Ast, 2004). Esta modificación provoca un cambio en el marco de lectura por el salto del exón 6 completo y la inserción del aminoácido lisina (K), que resulta en una proteína de 20.1 kDa. El transcrito de esta isoforma ya ha sido descrito en la línea celular Namalwa, proveniente de un paciente con linfoma de Burkitt (Miyoshi *et al.*, 1995).

La isoforma RUNX1c₁₉₆ está presente en todos los pacientes con LAL; ha sido descrita por Miyoshi y colaboradores (1995), también en la línea celular Namalwa y en pacientes con linfoma no-Hodgkin (Chimienti *et al.*, 2000). La variante RUNX1c₁₉₆ muestra una delección dentro del exón 1, lo que podría obedecer a la existencia de sitios críticos de remoción alternativa dentro de esta secuencia. La pérdida de 208pb de esta variante se encuentra en la región 5'UTR (región no codificante), por lo que no afecta el marco de lectura de la secuencia de la proteína; sin embargo, la presencia de este transcrito indica que puede existir otro mecanismo de formación, ya que las regiones UTR son importantes en la regulación de la expresión génica.

En este trabajo se detectó incremento en los niveles de expresión de los transcritos de *RUNX1* en los pacientes con copias extra del gen, originados por amplificación génica o por la presencia de cromosomas 21 adicionales; este resultado concuerda

con lo referido por Mikhail y colaboradores (2002), que observaron el mismo comportamiento. El incremento en la expresión no fue exclusivo de pacientes con esta alteración, también se observó en los casos positivos a la fusión de los genes *ETV6/RUNX1*; este dato coincide con estudios previos, en donde se encontró sobre-expresión de *RUNX1* en el 30 a 50% de un grupo de pacientes con LAL positivos a dicha fusión génica (Gandemer *et al.*, 2007). Actualmente, aún no se conoce el significado de este hallazgo.

Un resultado no esperado fue que los niveles más elevados de *RUNX1* se presentaron en los pacientes positivos a la translocación t(4;11) (fusión génica *MLL-AF4*), lo que sugiere que *RUNX1* tiene una importante contribución en este subtipo de leucemia. Este hallazgo se asocia con lo reportado por Guenther y colaboradores (2008), quienes determinaron que tanto *RUNX1* como *RUNX2* muestran sitios de unión en su región codificante para la proteína *MLL-AF4*. Basados en esta observación, y en la función de *MLL* como un regulador transcripcional que actúa a través de la remodelación de la cromatina, la proteína de fusión *MLL-AF4* podría modificar la estructura de la cromatina, estimulando la expresión de *RUNX1* a través de cambios epigenéticos.

Por otro lado, al revisar el grupo de niños con LAL estudiados por Mikhail y colaboradores (2002), se observó que 2 pacientes con la t(4;11) presentaron incremento en la expresión de *RUNX1*; estos resultados coinciden con los hallazgos obtenidos en el presente trabajo y conlleva a la necesidad de identificar la relación funcional entre la proteína de fusión y la sobre-expresión de *RUNX1*.

En cuanto a los niveles de expresión del gen *BLK*, en general fueron bajos; no obstante, en los pacientes con mayor expresión de las isoformas con dominio RUNT también se observó incremento en la expresión del gen blanco analizado. La relación inversa esperada, que se refiere al aumento de expresión de la isoforma RUNX1a y la disminución de niveles del gen blanco *BLK*, no se observó. Las células CD19+ de sangre periférica del grupo de referencia no expresaron la isoforma RUNX1a y, por consiguiente, presentaron mayor expresión de *BLK* que los pacientes con LAL, lo cual concuerda con la predicción del modelo antagónico previamente descrito.

Las razones por las cuales en los pacientes con LAL estudiados no se cumplen las predicciones del modelo basado en la inhibición por RUNX1a pueden ser diversas. Existen diferencias entre los estudios de la literatura y el presente trabajo, una de las más importantes es que fue factible detectar mayor número de isoformas que pueden ser funcionales y la estimación se llevó a cabo en células de la médula ósea. En cuanto a la expresión del gen blanco seleccionado, *BLK*, éste fue analizado directamente en las muestras de los pacientes, debido a que no se estudió en un sistema *in vitro*, pueden influir otros mecanismos reguladores de su expresión. Por ejemplo, para que ocurra la activación del promotor del gen *BLK* por RUNX1 se requiere que se una al factor de transcripción PAX5; sin embargo, éste se pierde por delección en el 35% de los niños con LAL, lo cual interfiere con la expresión del gen blanco (Kawamata *et al.*, 2008; Mullighan *et al.*, 2007). En este estudio, un paciente presentó la translocación t(9;20)(p11;q11) que, en la mayoría de los casos, resulta en la delección de PAX5 o en una fusión aberrante con regiones del cromosoma 20 (An *et al.*, 2008; Strefford, 2009). En estudios previos se ha demostrado, mediante q-

PCR, que la consecuencia biológica de ambos eventos es la pérdida de la función de PAX5, la cual lleva a la represión de BLK. En los análisis realizados directamente en células de pacientes, la expresión génica no es controlada y otros mecanismos de regulación pueden influir en los genes subordinados.

10.- CONCLUSIONES

- El papel de *RUNX1* en la leucemogénesis parece ser más complejo que el modelo propuesto, basado en la expresión de isoformas antagonistas. En este trabajo se encontró que algunas alteraciones específicas, que incluyen copias extra del gen *RUNX1* o translocaciones como la t(4;11) y la t(12;21), incrementan la expresión de las isoformas que contienen el dominio de RUNT. En particular, en los pacientes con la t(4;11) se detectó aumento en la expresión que involucra a las isoformas con dominio RUNT, incluyendo a la isoforma *RUNX1*_{C196}; sin embargo, existen otras isoformas que no se determinaron y son altamente expresadas en estos pacientes. Aunque ya se había descrito la presencia de sitios de unión de MLL-AF4 al promotor de *RUNX1*, éste es el primer reporte que muestra incremento en la expresión de este factor de transcripción en pacientes con dicha fusión. Se deben identificar las isoformas involucradas en este grupo de pacientes para conocer su participación en el proceso leucémico al presentarse esta fusión génica en particular.
- Estas observaciones pudieron llevarse a cabo debido que se hizo un diagnóstico preciso por citogenética convencional y molecular, lo que permitió clasificar a los pacientes y asociarlos con los niveles de expresión presentes en cada grupo. En contraste con trabajos previos, éste es el primer estudio en el que se muestra la relación entre alteraciones genéticas y niveles de expresión de *RUNX1*.
- Se detectó una nueva variante de la isoforma *RUNX1a* presente tanto en los pacientes con LAL como en el grupo de referencia, así como variantes no esperadas en los pacientes. El análisis de isoformas que contienen el dominio

RUNT muestra que existen aún más isoformas no detectadas, susceptibles a identificarse y caracterizarse. Cabe la posibilidad de que se presenten isoformas no funcionales con alta expresión que en este trabajo no se hayan determinado, aunque también podría haber variantes funcionales como las encontradas. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran en todos los pacientes alta frecuencia y mayor expresión de la isoforma funcional RUNX1_{C196}, con respecto a RUNX1a. Adicionalmente, se determinó que no existe sólo una isoforma presente en las células de pacientes con LAL. Estos hallazgos deben ser considerados en la interpretación del modelo antagónico, ya que la competencia se debe llevar a cabo entre diversas isoformas de RUNX1, cuyo componente varía en cada paciente.

- La expresión del gen *BLK* fue baja en los pacientes con LAL con respecto a las células CD19+ del grupo comparativo, sin embargo, se observó un incremento en su expresión en los pacientes en los que se determinaron mayormente isoformas con dominio RUNT. Además del componente de isoformas de RUNX1, se debe considerar que existen otras moléculas que influyen en la transcripción de los genes blanco; este es el caso de *BLK* que requiere a *PAX5* para su expresión. *PAX5* es uno de los genes que presenta mutaciones con mayor frecuencia (35%) en niños con LAL. Se deben analizar otros genes blanco, aunque es necesario tomar en cuenta que a diferencia de los modelos celulares que apoyan el modelo antagónico, en las células de pacientes leucémicos existen diversas lesiones génicas acompañando a las fusiones génicas y a las alteraciones numéricas, que influyen en la expresión de los genes regulados por RUNX1.

- La regulación de *RUNX1* es más compleja que el modelo antagónico propuesto, que sólo comprende a dos isoformas en competencia; como se ha discutido, existen diversos factores que afectan la actividad de *RUNX1* en las células de los pacientes con LAL.

11.- PERSPECTIVAS

Se deben realizar estudios para conocer la función del complejo de isoformas no consideradas anteriormente en el modelo antagónico de *RUNX1*, pero que se ha demostrado que existen en las células de los pacientes con LAL.

También se requiere analizar el papel de las proteínas de fusión ETV6-*RUNX1* y MLL-AF4 en la expresión de *RUNX1*, así como investigar otros genes blanco para entender su regulación y participación en esta leucemia.

12.- ANEXOS

ANEXO 1.- Carta de consentimiento informado.

México, D.F.

200

A través de la presente informo que estoy de acuerdo en que mi hijo (a) _____ con expediente _____, participe en el proyecto titulado **“EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE *RUNX1* Y DE SU GEN BLANCO *BLK* EN CÉLULAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA”** se me ha informado que la muestra que se utilizará para realizar dicho estudio será parte de la misma que se utiliza para llevar a cabo los análisis rutinarios que se requieren para el diagnóstico de su enfermedad, por lo que no se necesita que se tomen muestras extra. También he sido informado que este estudio puede contribuir al conocimiento de la enfermedad que presenta mi hijo y en un futuro los datos que se obtengan pueden ser útiles en el manejo de los pacientes que tengan la misma enfermedad. Por otro lado, sé que los datos que se generen de esta investigación serán confidenciales.

También se me ha explicado que si no deseo que mi hijo participe en el estudio, la atención que se le brinda no se verá alterada.

Acepto participar

Padre o tutor (nombre y firma)

Testigo

Testigo

Dirección

Dirección

ANEXO 2. Oligonucleótidos usados para amplificar las isoformas de RUNX1.

Isoforma	Oligonucleótidos usados en la RT-PCR	Exones amplificados	Tamaño (Referencia)
RUNX1a	(F) 5'-CTGGTCACTGTGATGGCTGG-3'	4	465 pb (Choi, 2003)
	(R) 5'-CTGCCTTAACATCTCCAGGG-3'	7A	
RUNX1b	(F) 5'-CACCGACAGCCCCAACTTCC-3'	3	293 pb (Choi, 2003)
	(R) 5'-AGGTGGCGACTTGCGGTGGG-3'	5	
RUNX1c	(F) 5'-CACAGAACCACAAGTTGGGTAGCC-3'	1	196 pb (Miyoshi, 1995)
	(R) 5'-GACTCAAATATGCTGTCTGAAGCC-3'	1	
RAR α (Receptor alfa del ácido retinóico)	(F) 5'-CCAGTACTGCCGACTGCA-3'	3	503 pb*
	(R) 5'-TGGCGAAGGCAAAGACCA-3'	7	
Isoforma	Sondas usadas en la qPCR	Exones amplificados	Tamaño (Diseñados por Applied Biosystems)
RUNX1a	(F) Hs04186042_m1_F	6	Marca registrada por Applied Biosystems
	(R) Hs04186042_m1_R	7A	
	FAM-CCTCAGAGTCAGATGCAGGAGGAAG-MGB		
RUNX1c ₁₉₆	(F) 5'-CGAATCACACTGAATGCAAACCA- 3'	1	90 pb
	(R) 5'-CTGAAAATGCACCCTCTTCTGAAG-3'	1	
	FAM-CAGCGTGGTAAAAGAAA-MGB		
RUNX1a,b y c (RUNT domain)	(F) 5'-CATGAAGAACCAGGTTGCAAGATTT-3'	4	85 pb
	(R) 5'-AGTGATGGTCAGAGTGAAGCTTTTC-3'	5	
	FAM-CCTCTTCCACTTCGACCGAC-MGB		
BLK	(F) 5'-GTCACAGGAAGAGAAGGCTATGT-3'	5	89 pb
	(R) 5'- CCCTGTGATCTAAAGAACCACCTTT-3'	6	
	FAM-TCGGGCCACAAAGTTA-MGB		

*Para su diseño se utilizó el paquete computacional "Gene Fisher- Software support for detection of postulated genes" R. Giegerich *et al*, 2007. Secuencia de referencia del NCBI: NM_00122607.1 (RUNX1a); NM_001001890.2 (RUNX1b); NM_001754.4 (RUNX1c); NM_000964.3 (RAR α); NM_001715.2 (BLK).

ANEXO 3.- Western-blot

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Preparación de geles de acrilamida.

GEL DE CORRIDA 12% (Para 2 geles)	
Amortiguador de corrida pH 8.8 (4x)	2.5 ml.
Agua	3.5 ml.
Acrilamida (30%)/0.8% bis	3.96 ml.
Persulfato de amonio	33.3 μ l
TEMED	6.7 μ l.
Total	10 ml.

Se polimeriza en 1 h.

GEL CONCENTRADOR 5% (para 2 geles)	
Amortiguador de corrida pH 6.8 (4x)	1.25 ml.
Agua	3.07 ml.
Acrilamida (30%)/0.8% bis	0.65 ml.
Persulfato de amonio (10%)	25 μ l.
TEMED	5 μ l.
Total	5 ml.

Se polimeriza en 20 min.

Las muestras se mezclaron con el amortiguador de muestra. Se colocaron 40 μ g de proteína.

Transferencia de proteínas

1.- Se recortó la membrana de nitrocelulosa y el papel filtro de la misma medida del gel. Se colocaron de la siguiente manera: Papel filtro-Membrana-Gel-Papel filtro, previa hidratación con amortiguador de transferencia. El tiempo de transferencia fue de 80 min. a 20V.

2.- Para verificar la transferencia a la membrana se tiñó con una solución de Rojo Ponceau.

Inmunodetección

1.- Se bloquearon los sitios no ocupados en la membrana en solución de leche descremada al 5%, en TBS-A por 1 hora a 37°C.

2.- Se incubó la membrana en el anticuerpo primario diluido en TBS-T, toda la noche (no más de 17 horas) a 4°C.

3.- El lavado de la membrana se realizó sobre una caja Petri de vidrio con 3 cambios de TBS-T (5 min, 10 min y 15 min.) en agitación.

4.- Se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario diluido en TBS-T.

5.- Se lavó la membrana sobre una caja Petri de vidrio con 3 cambios de TBS-T (5 min, 10 min y 15 min.) en agitación.

6.- Se colocó sobre la membrana en luminol recién preparado (1:2), por 10 min, protegido de la luz y del aire para evitar que se seque.

7.- Se preparó en el casete autorradiográfico y se protegió con una película plástica fina para alimentos, las placas autorradiográficas se expusieron sobre la membrana dentro del casete y, posteriormente, se revelaron y fijaron.

Diluciones requeridas para la inmunodetección:

	RUNX1 (DOMINIO Runt)	ACTINA
Ac. Primario	Producido en conejo (1:100)	Producido en ratón (1:500)
Ac. Secundario	Anti-conejo, producido en cabra (1:5000)	Anti-ratón, producido en cabra (1:5000)

Preparación de la membrana para una segunda inmunodetección

Método Tris pH2

A cada membrana, una vez usada, se le hizo un lavado por 30 min con la solución Tris HCl 50 mM pH2; posteriormente se lavó con TBS-T 10 min. Se bloqueó 1 hora a 37°C, con leche descremada al 5% en TBS. Mediante este proceso es posible aplicar a la membrana el siguiente anticuerpo primario.

Soluciones

- RIPA (Santa Cruz)

Por cada 1ml de RIPA colocaron: 10 μ l de PMS, 10 μ l de ortovanadato de sodio y 10-20 μ l del inhibidor de proteasas (o Mini complete de Roche, 1 tableta por cada 10 ml de RIPA).

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada.

- Amortiguador de corrida 4x (para el gel)

Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (91g en 300 ml de agua, ajustar pH con HCl)

0.4% de SDS (2g)

Para un volumen final de 500 ml. Guardar a 4°C.

- Amortiguador de concentración 4x (para el gel).

Tris-HCl 0.5M pH 6.8 (30.25 g en 300 ml de agua, ajustar pH con HCl).

- Amortiguador de corrida 5x

Tris 25mM

Glicina 192mM

SDS 0.1%

Para 2L de amortiguador de corrida: Mezclar 144g de glicina, 30.2g de Tris, 10g de SDS pH 8.3 y 200 ml de metanol). No ajustar pH.

- Amortiguador de transferencia

Glicina 39mM

Tris base 48mM

SDS 0.037%

Metanol 20%

Para 1L de amortiguador de transferencia pH 8.3: Mezclar 2.9g de glicina, 5.8g de Tris base, 0.37g de SDS y 200 ml de metanol).

- Persulfato de amonio al 10%.

Preparar 300 o 400 μ l. Esta solución es estable hasta 1 mes.

- TBS (Solución salina amortiguada con Tris)

Tris 10mM

NaCl 0.9%

Ajustar pH 7.4 con HCl

Para preparar 1 L: 5ml de Tris 1M,

- TBS-A (Tris buffered saline-azida)

TBS con la adición de azida de sodio a una concentración final de 0.02%.

- TBS-T (TBS-Tween 20)

TBS con la adición de Tween 20 a una concentración final de 0.1%.

- Amortiguador de muestra (colorante para cargar las proteínas en el gel)

Amortiguador de gel concentrador

Glicerol 3ml

SDS 1g

β -mercaptoetanol 700 μ l

Azul de bromofenol 1.2 mg

H₂O qsp 7 ml

ANEXO 4.- Características clínicas, de laboratorio y resultados de citogenética convencional y molecular de los pacientes con LAL

Características		Pacientes
Género	Masculino	15
	Femenino	15
Edad (años)	0-2	7
	3-5	9
	6-10	6
	>11	8
Cuenta de leucocitos($\times 10^9/L$)	<10	11
	10-25	7
	26-50	3
	>50	8
	no conocido	1
Inmunofenotipo	B	28
	T	2
Citogenética convencional/ FISH	Cariotipo y FISH normales	3
	Hiperdiploidía >50 cromosomas	4
	t(1;19)	3
	t(4;11)	3
	con fusión <i>ETV6-RUNX1</i>	4
	iAMP21	2
	Otras alteraciones	7
	Sin cariotipo y con estudio de <i>ETV6</i> y <i>RUNX1</i> normal	1
	Sin cariotipo y <i>RUNX1</i> x3~5	2
Cariotipo normal y <i>RUNX1</i> x3~4	1	

ANEXO 5.- Resultados de los análisis citogenético, de FISH y de expresión génica

PACIENTES CON LAL	ESTUDIO CITOGENETICO	ANÁLISIS DE FISH CON LA SONDA <i>ETV6-RUNX1</i>	ISOFORMAS CON DOMINIO RUNT	EXPRESIÓN RELATIVA RUNX1/GAPDH ANALIZADA POR q-PCR*		
				RUNX1a	RUNX1c ₁₉₆	BLK
1	56~57,XY,+8,+14,+18,+21[cp5]/46,XY[6]	RUNX1x3~5	62.42	0.08	59.47	1.38
2	46,XX[20]	Normal	75.45	1.53	43.03	1.54
3**	46,XY[cp7]	Normal	NO	NO	NO	NO
4	44,XY,der(1)t(1;?8)(p22;q21),- 7,der(9)t(1;9)(p32;p13),- 16[11]/44,idem,del(17)(p13)[3]/45,idem,+mar[3]	Normal	NO	NO	NO	NO
5	56~58,XX,+4,+6,+18,+21[cp12]/46,XX[1]	RUNX1x3~4	67.00	0	24.72	1.14
6	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[4]/46,XX[9]	Normal	656.18	2.56	127.81	12.50
7	45,XY,der(9)t(9;20)(p11;q11),-20[4]/46,XY[16]	Normal	15.36	4.16	6.58	0.09
8	46,XY,add(4)(q31),add(21)(q22)[21]	RUNX1x3~6	123.53	28.74	135.12	1.15

9	46,XY,t(4;11)(q21;q23)[9]	Normal	NO	NO	NO	NO
10 ⁺	NO	RUNX1x3 D21Z1/D13Z1x5	126.96	0.59	94.22	4.61
11	46,XY,del(20)(q11)[15]	Normal	129.91	0.90	84.45	3.94
12	50~53,XY,dup(1)(q31q32),+del(6)(q?),+14,+21[18]/46,XY[4]	RUNX1x3~4	156.67	2.70	149.60	3.47
13	46,XX,add(22)(q13)[11]/46,XX[1]	Normal	24.68	0.50	14.21	0.39
14	45,XY,der(9)t(9;17)(p22;q21),-17,der(19)t(1;19)(q23;p13)[9]/46,XY[1]	Normal	NO	NO	NO	NO
15	46,XX,t(1;19)(q23;p13)[10]/46,XX[5]	Normal	NO	NO	NO	NO
16	46,XX[20]	Normal	157.41	7.83	51.68	0.53
17 ⁺	NO	RUNX1x4~5 D21Z1/D13Z1x6~7	465.87	1.10	110.95	24.20
18	46,XX,add(9)(q34)[3]/46,XX[8]	Normal	108.79	2.77	52.18	7.75
19	47,XX,der(7)t(7;12)(p22;q13),del(9)(p13),-12,+mar1,+mar2[13]	ETV6/RUNX1+,-ETV6	147.19	8.48	97.56	7.80
20	47,XX,del(7)(p?11.1),add(21)(q22),+mar[6]/46,XX[8]	RUNX1x4~6	467.47	2.82	287.76	6.07
21	46,XX[17] Sólo en una metafase se observaron 47 cromosomas.	ETV6/RUNX1+,-ETV6,+der(21)t(12;21)	242.40	10.55	67.55	1.03

22	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[10]/46,XX[2]	Normal	635.80	2.89	77.64	7.22
23	47,XY,i(7)(p10),+i(7)(q10),der(19)t(1;19)(q23;p13)[14]/46,XY[1]	Normal	57.47	4.59	38.46	1.87
24	46,XX,+10,add(12)(p13),-13[15]	ETV6/RUNX1+, -ETV6	NO	NO	NO	NO
25**	NO	Normal	1.19	4.28	0.83	2.91
26	46,XX,del(22)(q13)[9]/46,XX[4]	Normal	83.28	1.71	32.67	1.36
27	NO	ETV6/RUNX1+, -ETV6	215.15	1.27	81.28	3.47
28	50~54,XY,+X,+5,+6,+21,+mar[cp9]/46,XY[3]	RUNX1x3	142.62	3.23	39.41	0.91
29 ⁺	46,XX[20]	RUNX1x3~4 D21Z1/D13Z1x5~6	NO	NO	NO	NO
30	46,XY,inv(2)(p21q11.2),9qh+[4]/46,XY[11]	Normal	NO	NO	NO	NO

*Analizados por duplicado; **LAL-T; ⁺ pacientes analizados con la sonda D21Z1/D13Z1x5; NO=No obtenido

ANEXO 6.- Características de las isoformas de RUNX1 detectadas por RT-PCR

Nombre	Producto de RT-PCR (pb)	Proteína (kDa)	Secuencia de Referencia (NCBI)	Dominios					Función como factor de transcripción
				Promotor proximal	Promotor distal	Dominio RUNT	Dominio de transactivación	Otras características	
RUNX1a	465	27.3	NM_001122607.1	Presente	Ausente	Presente	Ausente	-	Represor
RUNX1b	293	48.7	NM_001001890.2	Presente	Ausente	Presente	Presente	-	Activador
RUNX1c	404	51.8	D43969	Ausente	Presente	Presente	Presente	-	Activador
RUNX1a ₄₀₀	400	28.6	No reportada previamente.	Presente	Ausente	Presente	Ausente	La pérdida de 65 pb, incluye una porción del exón 7 y del 7A.	Desconocida
RUNX1a ₂₆₃ o Δ6*	263	20.1	No reportada	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Pérdida del exón 6 y la inserción de Lisina.	Desconocida
RUNX1c ₁₉₆ o variante 1*	196	51.8	NM_001754.4	Ausente	Presente	Presente	Presente	Pérdida de 208 pb en la región 5'UTR del exón 1, no afecta el marco de lectura.	Desconocida

*Descrito por Miyoshi *et al* [7]

14.- REFERENCIAS

- An Q, Wright SL, Konn ZJ, Matheson E, Minto L, Moorman AV, Parker H, Griffiths M, Ross FM, Davies T, Hall AG, Harrison CJ, Inving JA, Strefford JC. 2008. Variable breakpoints target PAX5 in patients with dicentric chromosomes: a model for the basis of unbalanced translocations in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:17050-17054.
- Ast G. 2004. How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet*; 5: 773-782.
- Berger R. 1997. Acute lymphoblastic leukemia and chromosome 21. *Cancer Genet Cytogenet*, 1:8-12.
- Chimienti G, Alaibac M, Marzullo F, Carbone A, Pepe G. 2000. The expression pattern of the AML1 gene in Non-Hodgkin's B-cell lymphomas and normal B lymphocytes. *Blood Cell Mol Dis*, 26:186-192.
- Choi S, Oba T, Callander N, Jelinek D, Roodman D. 2003. AML1A and AML1B regulation of MIP-1a expression in multiple myeloma. *Blood*, 101:3778-3783.
- Fenrick R, Amann J, Lutterbach B, Wang L, Westendorf J, Downing J, Hiebert S. 1999. Both TEL and AML1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol*, 19:6566-6574.
- Gandemer V, Rio AG, de Tayrac M, Sibut V, Mottier S, Sunnaram B Henry C, Monnier A, Berthou C, Le Gall E, Le Treut A, Schmitt C. Le Gall JY, Mosser J, Galibert MD. 2007. Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia. *BMG Genomic*, 8:385.
- Guenther MG, Lawton LN, Rozovskaia T, Frampton GM, Levine SS, Volkert TL, Croce CM, Nakamura T, Canaani E, Young RA. 2008. Aberrant chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed-lineage leukemia. *Genes Dev*, 22:3403-3408.
- Guidez F, Petrie K, Ford A, Lu H, Bennet C, Mac Gregor A, Hannemann J, Ito Y, Ghysdael J, Greaves M, Wiedemann L, Zelent A 2000. Recruitment of the

nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood*, 96:2557-2561.

- Gurbuxani S, Vyas P, Crispino JD. 2004. Recent insights into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*, 103:399-406.
- Gutiérrez-Angulo M, González-García J, Meza-Espinoza J, Picos-Cárdenas V, Esparza-Flores M, López-Guido B, Rivera H. 2005. Increased expresión of AML1-a and acquired chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol*, 22:1-6.
- Harewood L, Robinson H, Harris R, Jabbar M, Obaidi A, Jalali LR, Martineau M, Moorman AV, Sumption N, Richards S, Mitchell C, Harrison CJ. 2003. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. *Leukemia*, 17:547-553.
- Head D, Pui C-H. 1999. Diagnoses and Classification. En: Pui C-H, editor. *Childhood leukemias*. Cambridge University Press. EUA: p 19-37.
- Ito Y. 1999. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the Runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells*, 4:685-696.
- Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, Sanada M, Hemminki K, Tamatomo G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koefler HP. 2008. Cloning of genes involve in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:11921-11926.
- Libermann TW, Pan Z, Akbarali Y, Hetherington CJ, Boltax J, Yergeau DA, Zhang DE. 1999. AML1 (CBF α 2) cooperates with B cell-specific activating protein (BSAP/PAX5) in activation of the B cell-specific BLK gene promoter. *J Biol Chem*, 274:24671-24676.
- Lin YH, Shin EJ, Campbell MJ, Niederhuber JE. 1995. Transcription of the blk gene in human B lymphocytes is controlled by two promoters. *J Biol Chem*, 270:25968-25975.

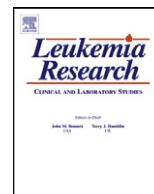
- Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, Hu M, Nip J, Serve H, Berdel W, van der Reijden B, Quelle D, Rowley J, Cleveland J, Janken J, Pandoffi P, Hiebert SW. 2002. The t(8;21) fusion protein, AML1-ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med*, 8:743-750.
- Liu X, Zhang Q, Zhang DE, Zhou C, Xing H, Tian Z, Rao Q, Wang M, Wang J. 2009. Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia*, 23:739-745.
- Livak KJ, Schmitgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25:402-408.
- Mikhail FM, Serry KA, Hatem N, Mourad ZI, Farawela HM, El Kaffash DM, Coignet L, Nucifora G. 2002. AML1 gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 16:658-668.
- Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Ojki M. 1995. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res*, 23:2762-2769.
- Montero-Ruíz O. Expresión de *RUNX1* en células de pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F. 2008.
- Montero-Ruíz O, Alcántara-Ortigoza MA, Betancourt M, Juárez-Velázquez R, González-Márquez H, Pérez-Vera P. 2012. Expression of RUNX1 isoforms and its target gene BLK in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. Article in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2012.05.019>.
- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. 2007. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Nat*, 446:758-764.
- Nanjundan M, Zhang F, Schmandt R, Smith-McCune K, Mills GB. 2007.

Identification of a novel splice variant of AML1b in ovarian cancer patients conferring loss of wild-type tumor suppressive functions. *Oncogene*, 26:2574-2584.

- Nimmi H, Harada H, Harada Y, Ding Y, Imagawa J, Inaba T, Kyo T, Kimura A. 2006. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia*, 20:635-644.
- Okuda T, Van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, 84: 321-330.
- Osato M, Asou N, Adballa E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, Suzushima H, Takatsuki K, Kanno T, Shigesada K, Ito Y. 1999. Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood*, 93:1817-1824.
- Penther D, Preudhomme C, Talmant P, Poumier C, Gordon A, Méchinaud F, Milpied N, Bataille R, Aviet-Loisseau H. 2002. Amplification of AML1 gene is present in childhood acute lymphoblastic leukemia but not in adult, and is not associated with AML1 gene mutation. *Leukemia*, 16:1131-1134.
- Pérez-Vera P, Frías S, Carnevale A, Betancourt M, Mújica M, Rivera-Luna R, Ortíz R. 2004. A strategy to detect chromosomal abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Ped Hem/Oncol*, 26:294-300.
- Pérez-Vera P, Montero-Ruíz O, Frías S, Ulloa-Avilés V, Cárdenas-Cardós R, Paredes-Aguilera R, Rivera-Luna R, Carnevale A. 2005. Detection of ETV6 and RUNX1 gene rearrangements using the FISH method in mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: Experience at a single institution. *Cancer Genet Cytogenet*, 162:140–145.
- Pérez-Vera P, Montero-Ruíz O. 2006. Citogenética en leucemias. En: Rivera-Luna R, editor. *Hemato-oncología pediátrica, principios generales*. Editores de Textos Mexicanos, México: p 179-191.
- Raimondi S, Pui C, Head D, Behm F, Privitera E, Roberson P, Rivera G, Williams D. 1991. Trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in

- children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 6:171-175.
- Redd-Inderbitzin E, Moreno-Miralles I, Vanden SK, Xie J, Luterbach B, Durst KL, Luce KS, Irvin BJ, Cleary ML, Brant SJ, Hiebert S. 2006. Runx1 associates with histone deacetylases and SUV39H1 to repress transcription. *Oncogene*, 25:5777-5786.
 - Rivera-Luna R. Conceptos epidemiológicos del cáncer infantil en México. En: Rivera-Luna R, ed. *Hemato-oncología Pediátrica. Principios Generales*. México, D.F.; 2006. 1-16.
 - Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Eclache V, Preudhomme. 2003. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia*, 17:9-16.
 - Rowley J. 1999. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin Hematol*, 36:59-72.
 - Ruíz-Argüelles G, McArthur J. 2003. Leucemias agudas. En: Ruíz-Argüelles G, editor. *Fundamentos de Hematología*. Editorial Médica Panamericana, México: p 225-245.
 - Song W, Sullivan M, Legare R, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende I, Haworth C, Hock R, Lou M, Felix C, Roy D, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz A, Speck N, Bushweller J, Li F, Gardiner K, Poncz M, Maris J, Gilliland D. 1999 Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*, 23:166-175.
 - Strefford JC. dic(9;20)(p11-13;q11). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. October 2009. [URL: http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/dic920ID1143.html](http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/dic920ID1143.html).
 - Telfer JC, Rothenberg EV. 2001. Expression and function of a stem cell promoter for the murine CBFalpha2 gene: distinct roles and regulation in natural killer and T cell development. *Dev Biol*, 299:363-382.
 - Uchida H, Zhang J, Nimer SD. 1997. AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 promoter. *J Immunol*, 158:2251-2258.

- Wang L, Huang G, Zhao X, Hatlen MA, Vu L, Liu F, Nimer SD. 2009. Post-translational modifications of Runx1 regulate its activity in the cell. *Blood Cells Mol Dis*, 43:30-34.
- Zhang Y, Bae S, Huang G, Fu Y, Lu J, Ahn M, Kanno Y, Kanno T, Ito Y. 1997. A novel transcript encoding an N-Terminally truncated AML1/PEBP2 α B protein interferes with transactivation and blocks granulocytic differentiation of 32Dcl3 myeloid cells. *Mol Cell Biol*, 17:4133-4145.



Expression of RUNX1 isoforms and its target gene *BLK* in childhood acute lymphoblastic leukemia

Oreth Montero-Ruíz^{a,c}, Miguel Angel Alcántara-Ortigoza^b, Miguel Betancourt^d, Rocío Juárez-Velázquez^a, Humberto González-Márquez^d, Patricia Pérez-Vera^{a,*}

^a Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Instituto Nacional de Pediatría, México, D.F., Mexico

^b Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Pediatría, México, D.F., Mexico

^c Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., Mexico

^d Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 February 2012

Received in revised form 16 May 2012

Accepted 22 May 2012

Available online 29 June 2012

Keywords:

RUNX1

Isoforms

Acute lymphoblastic leukemia

Childhood

ABSTRACT

Bone marrow samples from children with acute lymphoblastic leukemia were analyzed for the expression of RUNX1a/b/c isoforms. Obtained patterns were associated with genetic abnormalities and the expression of the RUNX1 regulated gene *BLK*. RUNX1c was present in all patients, but the expected over-expression of RUNX1a was not observed. Over-expression of total RUNT domain isoforms was detected in patients with extra *RUNX1* copies, and unexpectedly, in those with t(4;11). Only expression of the total RUNT domain-containing isoforms and *BLK* presented positive correlation. Results suggest a more complex role of RUNX1 in leukemogenesis than the proposed antagonism between the isoforms.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The RUNT-related transcription factor 1 (*RUNX1*), also named *AML1* (21q22), encodes a transcription factor with an important role in the hematopoiesis establishment [1,2]. *RUNX1* contains a N-terminus RUNT domain, which is essential for interaction with CBF β for the DNA binding affinity [3].

RUNX1 regulates the expression of many hematopoietic genes including IL-3, T cell receptors, myeloperoxidase and *BLK* [4,5]. Evidence demonstrates that *RUNX1* transcriptional processing has effects in normal hematopoietic and leukemic cells; however, this process is not well understood [2].

RUNX1 consists of 10 exons (1–6, 7A, 7B, 7C and 8) and two promoters, which are adjacent to exons 1 and 3. These promoters generate numerous alternatively spliced transcripts including isoforms *RUNX1a*, *RUNX1b* and *RUNX1c* [6,7]; all three isoforms contain the RUNT domain. The proximal promoter regulates *RUNX1a* and *RUNX1b*, the distal promoter regulates *RUNX1c*. *RUNX1b* and *RUNX1c* also contain a transactivation domain, consequently, both isoforms perform similar functions. In contrast,

RUNX1a lacks the transactivation domain, hence it has been suggested to play an antagonistic role [8,9].

RUNX1 abnormalities are associated with several malignant conditions [10,11]. *RUNX1* participates in translocations in acute lymphoblastic leukemia (ALL), and its copy number is increased by amplification and polysomy of chromosome 21 [2,12–17]. It has been shown that ALL patients with *RUNX1* and chromosome 21 amplifications over-express transactivation domain-containing isoforms, such as *RUNX1b* and *RUNX1c*, compared to patients with a normal number of *RUNX1* copies [17].

The expression of *RUNX1* isoforms in patients with ALL demonstrates higher *RUNX1a* levels in comparison to those found in bone marrow and peripheral blood from healthy donors, suggesting a potential role for this isoform in leukemogenesis [18,19].

Different *RUNX1* isoforms has been found in ALL patients [17,20]. Most studies have analyzed *RUNX1a/b* [18,19]; however, no studies have examined the expression of other isoforms in patients with ALL. Additionally, whether *RUNX1a* over-expression exerts depletion over its target genes remains unknown.

Different *RUNX1* isoforms display a similar DNA binding function being capable of interacting synergistically with *PAX5* in the *BLK* promoter activation. In addition, the *BLK* gene is expressed throughout B-cell development and in immature T cells [5,21].

The aim of this study was to analyze in bone marrow samples from ALL children: (a) the amount and expression profile of the three known *RUNX1* isoforms to determine the levels of the

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur No. 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, CP 04530 México, D.F., Mexico.
Tel.: +52 55 10840900x1471; fax: +52 55 10845533.

E-mail address: pperezv@pediatria.gob.mx (P. Pérez-Vera).

Table 1
Clinical and laboratory characteristics of patients with ALL.

Characteristics	Patients
Gender	
Male	15
Female	15
Age (years)	
0–2	7
3–5	9
6–10	6
>11	8
White blood cell count ($\times 10^9$ L)	
<10	11
10–25	7
26–50	3
>50	8
Unknown	1
Immunophenotype	
B	28
T	2
Conventional cytogenetics/FISH	
Normal karyotype & FISH	3
Hyperdiploidy >50 chromosomes	4
t(1;19)	3
t(4;11)	3
ETV6/RUNX1	4
iAMP(21) [*]	2
Other abnormalities	7
Without karyotype & normal ETV6/RUNX1	1
Without karyotype & RUNX1x3~5 ^{**}	2
Normal karyotype & RUNX1x3~4 ^{**}	1

^{*} Nomenclature of the iAMP(21) patients: 46,XY,add(4)(q31),add(21)(q22)[21].ish add(21)(q22)(RUNX1x3~5)[170/200] and 47,XX,del(7)(p?11.1),add(21)(q22),+mar[6]/46,XX[8].ish add(21)(q22)(RUNX1x3~5)[187/200].

^{**} Patients with extra signals by FISH analysis with 21/13 probe.

co-expressed transcripts/proteins; (b) the association of these patterns with the presence of several genetic abnormalities; and (c) the correlation of expression between RUNX1 isoforms and *BLK*, a RUNX1 target gene [4,5].

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

Bone marrow samples were obtained from 30 ALL children during 2007 at the Oncology Department of the Instituto Nacional de Pediatría in Mexico City (Table 1). Patients were selected based on the availability of samples to extract RNA/protein for performing expression analysis. This study was approved by the Institutional Research and Ethics Committee.

Bone marrow samples were divided into two fractions for cytogenetic analysis and expression studies. Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation (Lymphoprep/Nycomed, Oslo, Norway). Isolated cells were frozen to preserve RNA for RT-PCR and quantitative Real-Time PCR (q-PCR) analyses, or for Western blot. All samples were preserved in liquid nitrogen until used.

2.2. Analysis of RUNX1 gene abnormalities

Conventional cytogenetic and FISH analyses were performed using reported standard methods [22]. Karyotypes were interpreted based on ISCN (2009) criteria [23]. To detect copy number variations and RUNX1 abnormalities, FISH analysis was performed in nuclei/metaphases using the LSI ETV6/RUNX1 (extra-signal, dual color) probe (Abbot Molecular/Vysis, Downers Grove, IL, USA). Patients with additional RUNX1 signals in interphase nuclei were analyzed with a 21/13 α -satellite probe (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) to determine the origin of the extra copies (+21 or RUNX1 amplification). Cut-off values for each probe were based on previous calculations [15,22].

2.3. Expression and characterization of isoform transcripts by RT-PCR

Total RNA was extracted from leukemic and normal cells using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). RT-PCR was performed using 200–400 ng of total RNA, which was reverse-transcribed using the Superscript one-step RT-PCR with Platinum Taq Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The RUNX1 isoforms were amplified with previously described primers [11], and the *RAR α* gene was used as internal control (Table 2).

Qualitative analysis was performed by agarose gel electrophoresis and subsequent sequencing to identify the isoforms. All samples were analyzed in duplicate.

2.4. RUNX1 isoforms and *BLK* relative quantification by q-PCR using the $\Delta\Delta C_t$ method

Most frequent isoform detected (RUNX1_{c196}), RUNX1a, isoforms containing the RUNT domain and *BLK* were analyzed by q-PCR. Only 22 samples were suitable for q-PCR analysis. cDNA was prepared using the Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit (Roche, Germany) from total RNA. q-PCR was performed using TaqMan probes (Applied Biosystem Life Technologies Carlsbad, CA, USA). An ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used for these assays. Analyses were performed according to the $\Delta\Delta C_t$ method [24], and the mRNA levels were normalized against levels of GAPDH. A B-cell line obtained from a healthy adult was used as the calibrator. The primer design, reference sequences and the amplified exons for each assay are shown in Table 2 and Fig. 1B.

2.5. Blood samples from healthy donors for PCR analysis

As a reference for RUNX1 expression in lymphoid cells, normal peripheral blood B-cells (CD19+) and T-cells (CD3+) from 10 and 6 healthy donors respectively, were purified using magnetic beads (Macs Miltenyi Biotech, Bergish-Gladbach, Germany); purified cells were preserved as were the leukemic ones. Although these cells are not the optimal reference, but represent the best available option [17].

2.6. RUNX1 protein analysis

Only 17 samples were suitable for Western blot analysis. Cells were resuspended in RIPA buffer (Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) with protease inhibitors (Complete Mini Roche Diagnosis, Germany) and sonicated for thorough lysis. Forty micrograms of protein were used for immunoblot analysis, which was performed using a primary polyclonal antibody for the RUNT domain (Oncogene Research Products, Boston, MA, USA) at a 1:100 dilution. An HRP-conjugated secondary antibody (1:5000 dilution of anti-rabbit Ig, SantaCruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) was used with the SuperSignal chemiluminiscent substrate kit (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). RUNX1 expression was semi-quantitated using the ImageJ software (Rasband, 1997–2009). The protein data were normalized against a β -actin control (1:500 dilution). The molecular weight of RUNX1 isoforms was analyzed using the CLC Protein Workbench software, version 5.2.

3. Results

3.1. Clinical and laboratory characteristics of patients with ALL

Data from the 30 patients are presented in Table 1. Twenty-eight patients presented B-lineage phenotype and two were diagnosed with T-ALL. Only 3 patients were normal by cytogenetic analysis and FISH, while the other 27 presented at least one genetic/chromosomal abnormality. The most frequent and recurrent aberrations present in ALL were observed in our patients. Two patients without karyotype and one with normal karyotype showed extra RUNX1 and extra 21/13 signals; based on these results they were considered as hyperdiploid cases (Table 1, and patients 10, 17 and 29 in Supplementary table). The iAMP21 was detected in 2 patients by conventional cytogenetics and FISH studies (Table 1 and patients 8 and 20 in Supplementary table and Supplementary figure).

3.2. Characterization of RUNX1 isoforms

The RT-PCR assay identified the RUNX1 transcription profile in each patient. The expected products, RUNX1a, RUNX1b and RUNX1c (Table 3 and Fig. 1A), and 5 unexpected products were detected. The additional variants are included in Table 3, referred as RUNX1a₄₀₀, RUNX1a₂₆₃, RUNX1c₄₅₀, RUNX1c₃₅₀ and RUNX1c₁₉₆ (Fig. 1B). Sequencing analysis confirmed the identity of RUNX1a, b and c, and characterized only three of the additional products (Table 3 and Fig. 1C): RUNX1a₄₀₀, RUNX1a₂₆₃ and RUNX1c₁₉₆. We were unable to obtain sequences of the RUNX1c products of 350 bp and 450 bp lengths, as they were present at very low concentrations. The c isoform and its variants were the most frequently observed. Particularly, RUNX1c₁₉₆ was detected in all patients with

Table 2
Primers used to amplify RUNX1 isoforms and the internal control.

Isoform	Primers used for the RT-PCR assay	Amplified exons	Size (reference)
RUNX1a	(F) 5'-CTGGTCACTGTGATGGCTGG-3' (R) 5'-CTGCCCTTAACATCTCCAGGG-3'	4 7A	465 bp (Choi, 2003)
RUNX1b	(F) 5'-CACCGACAGCCCAACTTCC-3' (R) 5'-AGGTGGCGACTTGGCGTGGG-3'	3 5	293 bp (Choi, 2003)
RUNX1c	(F) 5'-CACAGAACCACAAGTTGGGTAGCC-3' (R) 5'-GACTCAAATATGCTGTCTGAAGCC-3'	1 1	196 bp (Miyoshi, 1995)
RAR α	(F) 5'-CCAGTACTGCCGACTGCA-3' (R) 5'-TGGCGAAGGCAAAGACCA-3'	3 7	503 bp ^a
Isoform	Probes used for the q-PCR assay	Amplified exons	Size (Designed by Applied Biosystems)
RUNX1a	(F) Hs04186042.m1.F (R) Hs04186042.m1.R FAM-CCTCAGAGTCAGATGCAGGAGGAAG-MGB	6 7A	Not available (trade mark)
RUNX1c ₁₉₆	(F) 5'-CGAATCACACTGAATGCAAACCA-3' (R) 5'-CTGAAAATGCACCTCTTCTGAAG-3' FAM-CAGCGTGGTAAAAGAAA-MGB	1 1	90 bp
RUNX1a,b and c (RUNT domain)	(F) 5'-CATGAAGAACCAGTTGCAAGATT-3' (R) 5'-AGTGATGGTCAGAGTGAAGCTTTTC-3' FAM-CCTCTCCACTTCGACCGAC-MGB	4 5	85 bp
BLK	(F) 5'-GTCACAGGAAGAGAGGCTATGT-3' (R) 5'-CCCTGTGATCTAAGAACCACCTTT-3' (FAM)-TCGGGCCCAAAGTTA-MGB	5 6	89 bp

^a Designed by the on line software "Gene Fisher- Software support for detection of postulated genes" R. Giegerich et al., 2007. NCBI Reference sequence: NM.00122607.1 (RUNX1a); NM.001001890.2 (RUNX1b); NM.001754.4 (RUNX1c); NM.000964.3 (RAR α); NM.001715.2 (BLK).

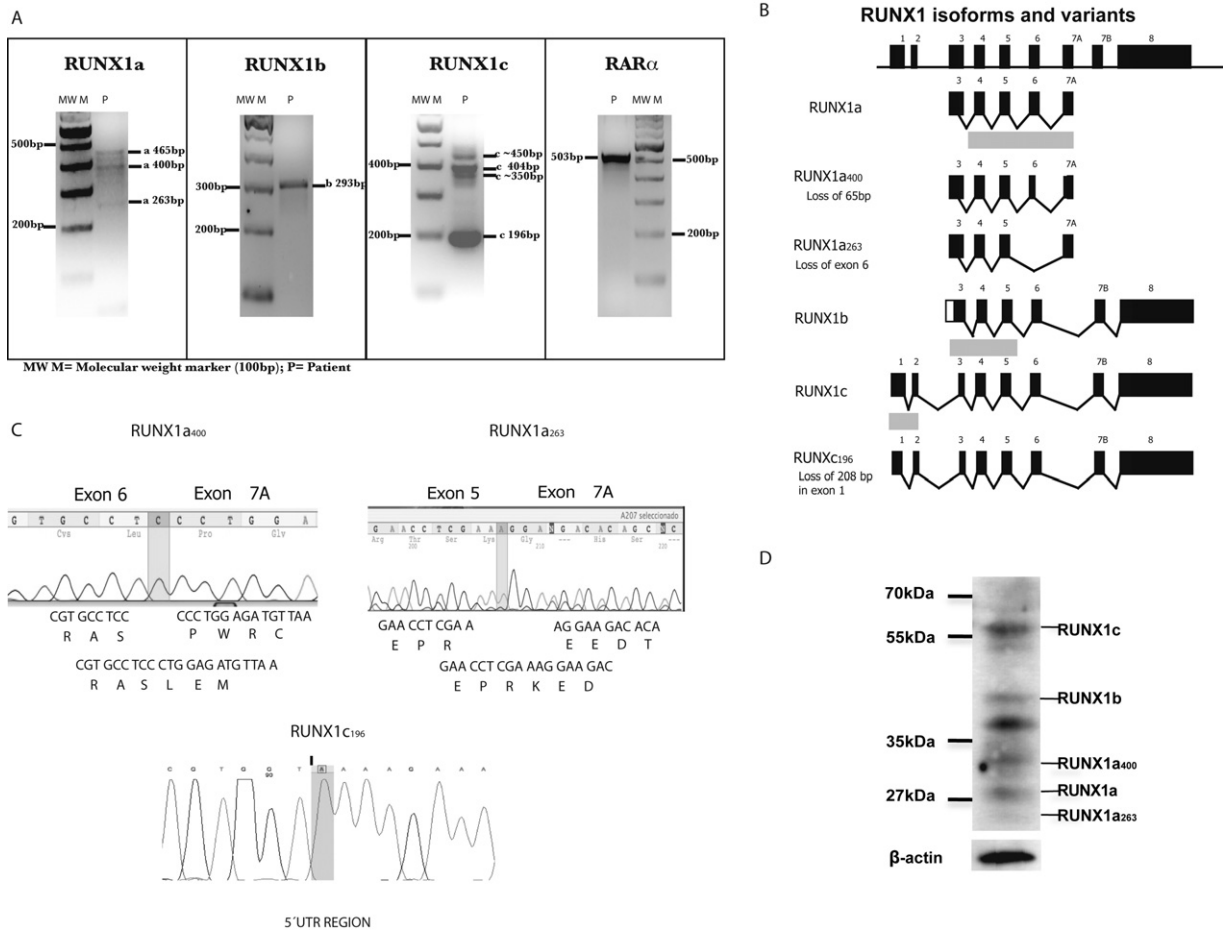


Fig. 1. RUNX1 isoform expression as detected by RT-PCR. (A) Expected RUNX1 transcripts (RUNX1a = 465 bp, RUNX1b = 293 bp and RUNX1c = 404 bp), and variants RUNX1a₄₀₀, RUNX1a₂₆₃, RUNX1c₄₅₀, RUNX1c₃₅₀ and RUNX1c₁₉₆. (B) Schematic representation of RUNX1 isoforms and variants. The gray bars show the fragment analyzed by RT-PCR. (C) RUNX1a₄₀₀, RUNX1a₂₆₃ and RUNX1c₁₉₆ sequencing analysis. (D) RUNX1 proteins and β -actin (positive control) detected by Western blot. The identified isoforms were as follows: RUNX1a (27.3 kDa), RUNX1b (48.7 kDa), RUNX1c (51.8 kDa), RUNX1a₄₀₀ variant (28.6 kDa) and RUNX1a₂₆₃ variant (20.1 kDa).

Table 3
Features of the detected RUNX1 isoforms.

Name	RT-PCR product (bp)	Protein (kDa)	Reference sequence (NCBI)	Domains			Other characteristics			Putative function as transcription factor
				Proximal promoter	Distal promoter	RUNT domain	Transactivation domain	Other characteristics		
RUNX1a	465	27.3	NM.001122607.1	Present	Absent	Present	Absent	-	-	Repressor
RUNX1b	293	48.7	NM.001001890.2	Present	Absent	Present	Present	-	-	Activator
RUNX1c	404	51.8	D43969	Absent	Present	Present	Present	-	-	Activator
RUNX1a ₄₀₀	400	28.6	No reported previously	Present	Absent	Present	Absent	Loss of 65 bp, including a portion of exons 6 and 7A	Loss of exon 6 and a lysine insertion	Unknown
RUNX1a ₂₆₃ or Δ6 ^a	263	20.1	No reported	Present	Absent	Present	Absent	Loss of 208 bp in the 5' UTR of exon 1. The reading frame is not affected.	Loss of exon 6 and a lysine insertion	Unknown
RUNX1c196 or variant 1 ^a	196	51.8	NM.001754.4	Absent	Present	Present	Present	-	-	Activator

^a Described by Miyoshi et al. [7].

Table 4

Isoform transcripts and protein expression of the RUNX1 gene identified by RT-PCR and Western blot.

Patients	mRNA (30 patients)
10	C,C ₄₅₀ ,C ₃₅₀ ,C ₁₉₆
7	a,a ₄₀₀ ,a ₂₆₃ ,b, C,C ₄₅₀ ,C ₃₅₀ ,C ₁₉₆
6	a,a ₄₀₀ ,a ₂₆₃ , C,C ₄₅₀ ,C ₃₅₀ ,C ₁₉₆
2	a,a ₄₀₀ ,C,C ₄₅₀ ,C ₃₅₀ ,C ₁₉₆
2	a,a ₄₀₀ ,a ₂₆₃ ,b, C ₁₉₆
1	a,a ₄₀₀ ,a ₂₆₃ , C ₃₅₀ ,C ₁₉₆
1	a,C,C ₄₅₀ ,C ₁₉₆
1	a ₄₀₀ ,C ₃₅₀ ,C ₁₉₆
Patients	Protein (17 patients)
9	c
3	a, a ₄₀₀ ,a ₂₆₃ ,36 kDa [*] ,b, 50 kDa [*] ,c
1	a, a ₄₀₀ ,36 kDa [*] ,b,50 kDa [*] ,c
1	a,a ₂₆₃ ,36 kDa [*] ,c
1	a,a ₂₆₃ ,50 kDa [*] ,c
1	a, a ₄₀₀ ,c
1	a,b,c

^{*} Non-identified proteins.

ALL (Table 4). The least frequently observed isoform was RUNX1b. Patients presented varied combinations of the isoforms (Table 4), the most common combination, c/c₄₅₀/c₃₅₀/c₁₉₆, was observed in 10 patients.

To confirm the presence of the different isoforms and the RUNX1 protein combinations in the patient samples, Western blot analysis was performed with a RUNT domain antibody (Fig. 1D and Table 4). Seven isoforms were detected, including a, b and c, based on the molecular weights reported in the literature (Table 3) and the predictions based on the RUNX1 transcripts (CLC Protein Workbench). The identified isoforms were: RUNX1a (27.3 kDa), RUNX1b (48.7 kDa), RUNX1c (51.8 kDa), RUNX1a₄₀₀ variant (28.6 kDa) and RUNX1a₂₆₃ variant (20.1 kDa). Two unexpected bands of ~36 kDa and ~50 kDa were also detected. In agreement with the RT-PCR results, the Western blot revealed combinations of the isoforms in the patient samples and demonstrated that all 17 patients expressed RUNX1c.

3.3. Quantitation of RUNX1a, RUNX1c₁₉₆ and RUNT domain-containing isoform expression

In all patients the RUNX1c₁₉₆ isoform was expressed at a higher level than RUNX1a except in one with T-ALL (patient 25 in Supplementary table and Fig. 2). Only the expression of RUNT domain-containing isoforms showed association with genetic abnormalities (Fig. 2). Patients with t(4;11) showed the highest expression level of RUNT domain-containing isoforms (635–656 fold difference), followed by some patients with a large number of RUNX1 copies (62–466 fold difference) and patients with the ETV6-RUNX1 fusion (147–242 fold difference) (Supplementary table). Western blot analysis supports the findings on increased RUNX1 copy number and reveals the absence of the RUNX1b isoform in patients with ETV6-RUNX1.

3.4. BLK gene expression quantification

BLK expression was detected in patients with ALL at different levels. No correlation was identified between expression of RUNX1a and BLK ($r^2 = 0.03$; $p > 0.05$) or between RUNX1c₁₉₆ and BLK ($r^2 = 0.13$; $p > 0.05$). However, we identified a positive correlation between the total expression of RUNT isoforms and BLK ($r^2 = 0.43$; $p < 0.05$).

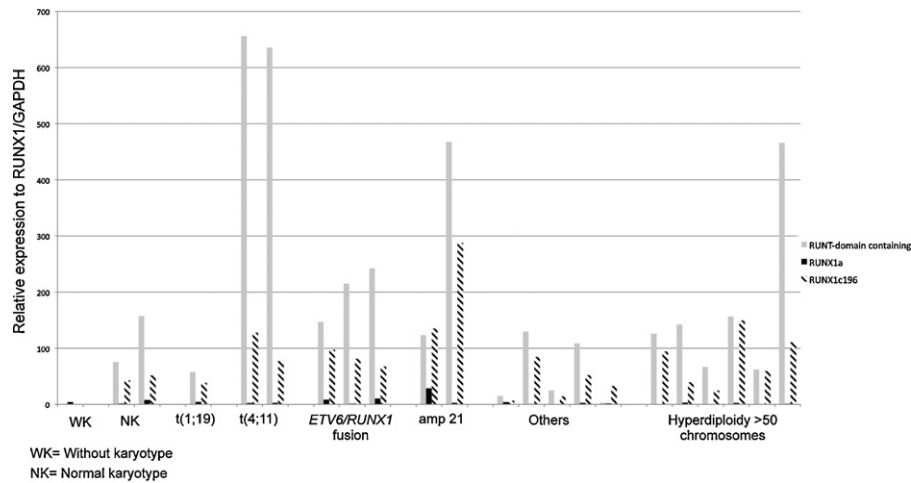


Fig. 2. Expression levels of RUNX1a, RUNX1_{c196} and RUNT-domain containing isoforms in patients with ALL.

3.5. RUNX1 isoform and BLK gene expression in peripheral blood of healthy donors

Mononuclear cells from healthy donors revealed the isoform combination a/a₄₀₀/a₂₆₃/c/c₄₅₀/c₃₅₀/c₁₉₆ by RT-PCR analysis. Purified CD19⁺ cells presented the same combination, in addition, expression of RUNX1b was also identified in all of the samples.

q-PCR analysis of CD19⁺ samples revealed higher expression levels of all RUNT isoforms (168–1348 fold difference) and BLK (30–227 fold difference) compared to the levels found in patients with ALL. CD3⁺ cells showed lower/undetectable levels of RUNT isoforms (4–18 fold difference), RUNX1_{c196} (5–68 fold difference) and RUNX1a (0–3 fold difference). Further, BLK (0–11 fold difference) expression presented similar behavior (data not shown).

4. Discussion

RUNX1 modulates cell differentiation through the expression of different isoforms, which have been implicated in malignant conditions including non-Hodgkin lymphoma and acute leukemias [11,19,20,25]. Analysis of bone marrow/peripheral blood from patients with ALL indicated that the RUNX1a expression levels were significantly higher than in healthy donors [18,19]. *In vitro* studies demonstrate that overexpression of this specific isoform interferes with RUNX1b transactivation in a dose-dependent manner. This inhibitory effect can be reversed by RUNX1b overexpression, suggesting competition between the isoforms [19]. Another study performed in ALL-patients demonstrated higher expression of RUNX1 isoforms containing the transactivation domain. This finding suggests a complex component of RUNX1 isoforms in ALL [17]. Based on this evidence, the main goal of this study was to determine the composition and quantity of individual RUNX1 isoform transcripts, including RUNX1a, in patients with ALL with different chromosomal aberrations.

In contrast to previous studies, the expression level of each isoform was not compared to peripheral blood/bone marrow from healthy individuals, because their high content of myeloid cells [17]. Comparisons were performed only between the patients; nevertheless, we analyzed peripheral blood in healthy volunteers for reference. In contrast to leukemic bone marrow, we detected RUNX1b expression in all CD19⁺ cells from peripheral blood samples.

The RUNX1a isoform was expected to be present in most patients [18,19]. However, qualitative results revealed that the RUNX1c isoforms were present in all patients. A varied combination of isoforms was identified and only the RUNX1c

isoform was detected alone, revealing its significance in ALL. These data were supported by Western blot and by q-PCR methods.

Two of the variants detected by RT-PCR were previously identified by Miyoshi [7]: RUNX1a₂₆₃, known as Δ6, and RUNX1_{c196}, which was recently referred as “variant 1” by NCBI (Table 3). To our knowledge, RUNX1a₄₀₀ represents an unreported isoform. This isoform lacks 65 bp including a portion of exons 6 and 7A; it could be generated by the combination of two types of alternative splicing, through a 3′ donor site in exon 6 and by an acceptor site in the 5′ region of exon 7A [26]. This splicing mechanism could result in a change of the reading frame (Fig. 1B), which would produce a predicted protein of 28.6 kDa, identified in 5 out of 17 patients. Its function is unknown; however, the deletion could affect the negative regulatory region for DNA binding in the C-terminus (NRDBc), by the partial loss of this domain. The RUNX1a₂₆₃ isoform modified its reading frame by the loss of exon 6 and a lysine insertion, resulting in a 20.1 kDa protein. This isoform has been previously described in the Burkitt’s lymphoma cell line Namalwa [7]. RUNX1_{c196} was present in all ALL-patients, and this variant has been previously detected by Miyoshi et al. also in the Namalwa cell line [7]. This isoform lacks 208 bp in the 5′ UTR of exon 1, and the reading frame of the protein-coding mRNA is not affected. The characteristics of this transcript suggest an important role of the UTR region in gene expression regulation [26].

The isoform diversity in patients with ALL, in addition to RUNX1a, is an expected result based on the previous analysis of B and T cell lines [27] and the increased expression of isoforms containing transactivation-domain, in patients with RUNX1 extra copies, referred by Mikhail et al. [17]. Confirming this observation, our quantitative results revealed higher RUNX1 transcript levels in patients with additional gene copies generated by iAMP21 or extra copies of chromosome 21. However, RUNX1 overexpression was also observed in patients with other cytogenetic abnormalities. Patients with *ETV6*-*RUNX1* fusion also presented high expression levels. This finding confirms previous results that demonstrate RUNX1 overexpression in 30–50% of these patients [28]. An unexpected result was the highest levels of RUNX1 isoform expression detected in patients with translocation t(4;11) (*MLL*-*AF4* fusion gene), suggesting an important contribution of RUNX1 to this leukemia subtype. This finding agrees with the prediction of Guenther et al. [29], who found that RUNX1 and RUNX2 display areas of *MLL*-*AF4* binding in their coding regions. Based on this observation and the function of *MLL* as a transcriptional regulator that acts through chromatin remodeling, it has been hypothesized that *MLL* fusion proteins might alter chromatin structure, stimulating RUNX1 expression through epigenetic modification [29]. In the ALL

children analyzed by Mikhail et al. [17], two patients with t(4;11) presented *RUNX1* over-expression, similar to our observations.

Although BLK expression was present at low levels in patients with ALL, those cases with increased expression levels of isoforms containing the RUNT domain also showed greater expression of this gene. However, the expected inverse relationship between *RUNX1a* and BLK expression was not observed. Even though a comparison could not be established, the CD19+ cells from peripheral blood did not express *RUNX1a* and showed higher BLK expression than the levels observed in ALL-patients. Other mechanisms besides *RUNX1* expression could influence the transcriptional control of this target gene. For instance, the transcription factor PAX5, which interferes with the expression of BLK, is lost in 32% of children with ALL [30,31]. In this study, one patient (7, Supplementary table) showed a translocation t(9;20)(p11;q11) that, in the majority of cases, results in PAX5 deletion or aberrant fusion with regions of chromosome 20 [32,33]. Previous q-PCR studies have demonstrated that the biological consequence of these events is the loss of PAX5 function, which leads to BLK repression [30,32]. Additional target genes must be studied to better understand the contribution of *RUNX1* to ALL.

Several factors affect *RUNX1* activity, including expression of *RUNX1* isoforms, the interaction with molecules such as transcription factors, and post-translational modifications [30,34,35]. Our results reveal that particular genetic abnormalities, including extra *RUNX1* copies and specific translocations, influence the expression of *RUNX1*. The role of *RUNX1* in leukemogenesis appears more complex than the proposed model based on the expression of antagonist isoforms. Further studies must be performed to clarify the role of this transcription factor in ALL.

Role of the funding source

The study sponsors were not involved in the decision to submit the manuscript for publication

Conflict of interest

The authors state that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

To CONACYT O.M.R. (fellowship number 130301), and P.P.V. (funding number 52536).

Contributions: O.M.R. and P.P.V.: provided the conception and design of the study, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting the article, revised it critically for important intellectual content, and final approval of the version to be submitted; M.A.A.O. and M.B.R.: provided the design of the study, analysis and interpretation of data, and revising it critically for important intellectual content; R.J.V. and H.G.M.: supplied the acquisition of data, analysis and interpretation of data.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2012.05.019>.

References

- Okuda T, Van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996;84:321–30.
- Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. New mechanisms of *AML1* gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia* 2003;17:9–16.
- Ito Y. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the Runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells* 1999;4:685–96.
- Dymecki SM, Niederhuber JE, Desiderio SV. Specific expression of a tyrosine kinase gene, *blk*, in B lymphoid cell. *Science* 1990;247(4940):332–6.
- Libermann TW, Pan Z, Akbarali Y, Hetherington CJ, Boltax J, Yergeau DA, et al. AML1 (CBF α 2) cooperates with B cell-specific activating protein (BSAP/PAX5) in activation of the B cell-specific BLK gene promoter. *J Biol Chem* 1999;274(35):24671–6.
- Levanon D, Glusman G, Bangsow T, Ben-Asher E, Male DA, Avidan N, et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor *RUNX1/AML1*. *Gene* 2001;262:23–33.
- Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, et al. Alternative splicing and genomic structure of the *AML1* gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* 1995;23:2762–9.
- Bae S, Ogawa E, Maruyama M, Oka H, Satake M, Shigesada K, et al. PEBP2 $\alpha\beta$ /mouse *AML1* consists of multiple isoforms that possess differential transactivational potentials. *Mol Cell Biol* 1994;14:3242–52.
- Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Nishida J, et al. An acute myeloid leukemia gene, *AML1*, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J* 1995;14:341–50.
- Tsuzuki S, Hong D, Gupta R, Matsuo K, Seto M, Enver T. Isoform-Specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by *AML1/RUNX1*. *PLoS Med* 2007;4(5):e172.
- Choi S, Oba T, Callander N, Jelinek D, Roodman D. AML1A and AML1B regulation of MIP-1 α expression in multiple myeloma. *Blood* 2003;101:3778–83.
- Lutterbach B, Hiebert SW. Role of the transcription factor AML1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene* 2000;245:223–35.
- Morel F, Herry A, Le Bris MJ, Douet Guilbert N, Le Calvez G, Marion V, et al. AML1 amplification in a case of the childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;137:142–5.
- Niini T, Kenerva J, Vettenranta K, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. AML1 gene amplification: a novel finding in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2000;85:362–6.
- Pérez-Vera P, Montero-Ruiz O, Frías S, Rivera-Luna R, Valladares A, Arenas D, et al. Multiple copies of *RUNX1*: description of 14 new patients, follow-up and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;180:129–34.
- Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, et al. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia: a UK Cancer cytogenetics group study. *Br J Haematol* 2005;129(4):520–30.
- Mikhail F, Serry K, Hatem N, Mourad Z, Farawela H, El Kaffash D, et al. *AML1* gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2002;16:658–68.
- Gutiérrez-Angulo M, González-García J, Meza-Espinoza J, Picos-Cárdenas V, Esparza-Flores M, López-Guido B, et al. Increased expression of AML1-a and acquired chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol* 2004;22(3):85–90.
- Liu X, Zhang D-E, Zhou C, Xing H, Tian Z, Rao Q, et al. Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia* 2009;23:739–45.
- Chimienti G, Alaibac M, Marzullo F. The expression pattern of the AML1 gene in Non-Hodgkin's B-cell lymphomas and normal B lymphocytes. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26(3):186–92.
- Lin YH, Shin EJ, Campbell MJ, Niederhuber JE. Transcription of the *blk* gene in human B lymphocytes is controlled by two promoters. *J Biol Chem* 1995;270(43):25968–75.
- Pérez-Vera P, Frías S, Carnevale A, Betancourt M, Mújica M, Rivera-Luna R, et al. A strategy to detect chromosomal abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26(5):294–300.
- Shaffer L, Tommerup N, editors. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Switzerland: Editorial Karger; 2005, 128 p.
- Livak KJ, Schmitgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Nanjundan M, Zhang F, Schmandt R, Smith-McCune K, Mills GB. Identification of a novel splice variant of AML1b in ovarian cancer patients conferring loss of wild-type tumor suppressive functions. *Oncogene* 2007;26:2574–84.
- Ast G. How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* 2004;5:773–82.
- Telfer JC, Rothenberg EV. Expression and function of a stem cell promoter for the murine CBF α 2 gene: distinct roles and regulation in natural killer and T cell development. *Dev Biol* 2001;299:363–82.
- Gandemer V, Rio AG, de Tayrac M, Sibut V, Mottier S, Sunnaram BL, et al. Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia. *BMG Genomics* 2007;8:385.
- Guenther MG, Lawton LN, Rozovskaia T, Frampton GM, Levine SS, Volkert TM, et al. Aberrant chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed-lineage leukemia. *Genes Dev* 2008;22:3403–8.
- Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, Sanada M, et al. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution

- single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:11921–6.
- [31] Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 2007;446:758–64.
- [32] An Q, Wright SL, Konn ZJ, Matheson E, Minto L, Moorman AV, et al. Variable breakpoints target PAX5 in patients with dicentric chromosomes: a model for the basis of unbalanced translocations in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(44):17050–4.
- [33] Strefford JC. dic(9;20)(p11-13;q11). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. October 2009. URL:<http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/dic920ID1143.html>.
- [34] Uchida H, Zhang J, Nimer SD. AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 promoter. *J Immunol* 1997;158(5):2251–8.
- [35] Wang L, Huang G, Zhao X, Hatlen MA, Vu L, Liu F, et al. Post-translational modifications of Runx1 regulate its activity in the cell. *Blood Cells Mol Dis* 2009;43(1):30–4.

Supplementary table. Cytogenetic, FISH and expression data.

ALL PATIENTS	CHROMOSOMAL ABNORMALITIES**	RUNX1 STATUS BY FISH	RELATIVE EXPRESSION RUNX1/GAPDH EVALUATED BY q-PCR*			
			ISOFORMS WITH RUNT DOMAIN	RUNX1a	RUNX1c ₁₉₆	BLK
1	56-57,XY,+8,+14,+18,+21[cp5]/46,XY[6]	RUNX1x3-5	62.42	0.08	59.47	1.38
2	46,XX[20]	Normal	75.45	1.53	43.03	1.54
3	46,XY[cp7]	Normal	NO	NO	NO	NO
4	44,XY,der(1)(1;?8)(p22;q21),-7,der(9)(1;9)(p32;p13),-16[11]/44,idem,del(17)(p13)[3]/45,idem,+mar[3]	Normal	NO	NO	NO	NO
5	56-58,XX,+4,+6,+18,+21[cp12]/46,XX[1]	RUNX1x3-4	67.00	0	24.72	1.14
6	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[4]/46,XX[9]	Normal	656.18	2.56	127.81	12.50
7	45,XY,der(9)t(9;20)(p11;q11),-20[4]/46,XY[16]	Normal	15.36	4.16	6.58	0.09
8	46,XY,add(4)(q31),add(21)(q22)[21]	RUNX1x4-6	123.53	28.74	135.12	1.15
9	46,XY,t(4;1)(q21;q23)[9]	Normal	NO	NO	NO	NO
10	NO	RUNX1x3 D21Z1/D13Z1 x5	126.96	0.59	94.22	4.61
11	46,XY,del(20)(q11)[15]	Normal	129.91	0.90	84.45	3.94

12	50-53,XY,dup(1)(q31q32),+del(6)(q?),+14,+21[18]/46,XY[4]	RUNX1x3-4	156.67	2.70	149.60	3.47
13	46,XX,add(22)(q13)[11]/46,XX[1]	Normal	24.68	0.50	14.21	0.39
14	45,XY,der(9)t(9;17)(p22,q21),-17,der(19)t(1;19)(q23;p13)[9]/46,XY[1]	Normal	NO	NO	NO	NO
15	46,XX,t(1;19)(q23;p13)[10]/46,XX[5]	Normal	NO	NO	NO	NO
16	46,XX[20]	Normal	157.41	7.83	51.68	0.53
17	NO	RUNX1x4-5 D21Z1/D13Z1 x6-7	465.87	1.10	110.95	24.20
18	46,XX,add(9)(q34)[3]/46,XX[8]	Normal	108.79	2.77	52.18	7.75
19	47,XX,der(7)t(7;12)(p22;q13),del(9)(p13),-12,+mar1,+mar2[13]	ETV6/RUNX1 +,-ETV6	147.19	8.48	97.56	7.80
20	47,XX,del(7)(p?11.1),add(21)(q22),+mat[6]/46,XX[8]	RUNX1x4-6	467.47	2.82	287.76	6.07
21	46,XX[17] in one metaphase 47 chromosomes were observed	ETV6/RUNX1 +,-ETV6, +der(21)t(12;21)	242.40	10.55	67.55	1.03
22	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[10]/46,XX[2]	Normal	635.80	2.89	77.64	7.22
23	47,XY,t(7)(p10),+t(7)(q10),der(19)t(1;19)(q23;p13)[14]/46,XY[1]	Normal	57.47	4.59	38.46	1.87
24	46,XX,+10,add(12)(p13),-13[15]	ETV6/RUNX1 +,-ETV6	NO	NO	NO	NO
25**	NO	Normal	1.19	4.28	0.83	2.91

26	46,XX,del(22)(q13)[9]/46,XX[4]	Normal	83.28	1.71	32.67	1.36
27	NO	ETV6/RUNX1 +, -ETV6	215.15	1.27	81.28	3.47
28	50~54,XY,+X,+5,+6,+21,+mar[cp9]/46,XY[3]	RUNX1x3	142.62	3.23	39.41	0.91
29	46,XX[20]	RUNX1x3~4 D21Z1/D13Z1 x5~6	NO	NO	NO	NO
30	46,XY,inv(2)(p21q11.2),9qh+[4]/46,XY[11]	Normal	NO	NO	NO	NO

*Average of 2 trials; **T-ALL; NO=Non-obtained

Supplementary Figure. Metaphases hybridized with *RUNX1* probe (red signals) from patients 8 (A) and 20 (B), showing the normal chromosome 21 (<) and the iAMP(21) (<<)

