

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MODELOS CELULARES ASOCIADOS A TRES GENOTIPOS DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA

---

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y del Medio Natural

Trabajo Final de Grado en Biotecnología

Curso Académico 2015/2016



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Autor:** Vanessa Fuster Martí

**Tutor:** José Gadea Vacas

**Tutor externo:** José Luis García Giménez

**Co-tutor externo:** José Santiago Ibáñez Cabellos

Valencia, Julio de 2016

## **Título**

Caracterización molecular de modelos celulares asociados a tres genotipos de Disqueratosis congénita.

## **Resumen**

La Disqueratosis congénita (DC) es una enfermedad heterogénea, considerado como una enfermedad rara. Sus rasgos fenotípicos más característicos son tres, relacionados con alteraciones mucocutáneas, sin embargo, es el fallo de médula ósea lo que provoca la muerte de los pacientes. A nivel genético, la heterogeneidad es muy elevada, habiendo sido descritas mutaciones en 7 genes distintos (*DKC1*, *NOP10*, *TINF2*, *TERC*, *TERT*, *TCAB*, y *NHP2*) y tres tipos de herencia distinta. La principal característica a nivel molecular, es un acortamiento telomérico pronunciado. Este acortamiento es debido a que los genes mutados en la enfermedad son codificantes para alguna de las proteínas del complejo de la telomerasa o del complejo telosoma. Sin embargo, se ha descrito también un aumento en los niveles de estrés oxidativo y de daño al ADN en las células de los pacientes afectados por la DC. Este estrés oxidativo se ha entendido previamente como un mecanismo secundario en la fisiopatología de la DC, no obstante, se han descrito funciones de la telomerasa ajenas al mantenimiento de los telómeros, relacionadas con la disminución de las condiciones oxidantes celulares. Por tanto, en el presente trabajo se pretende estudiar el estrés oxidativo como un mecanismo fisiopatológico primario. Para ello, se generaron 3 modelos celulares agudos mediante silenciamiento génico utilizando ARN de interferencia. En cada uno de estos modelos, se silenció un gen (*DKC1*, *NOP10* y *TINF2*). En estos modelos se midieron los niveles de expresión génica y los niveles de proteína de las principales enzimas antioxidantes celulares (catalasa, CuZnSOD, MnSOD y glutatión peroxidasa) así como distintos biomarcadores de estrés oxidativo (peroxirredoxina oxidada, ratio glutatión oxidado/glutatión reducido y p53). Por otro lado, se midieron dos marcadores de daño al ADN ( $\gamma$ H2AX y parsilación) así como los niveles de expresión génica de distintos genes codificantes para proteínas involucradas en las distintas rutas de reparación del ADN. Se observaron niveles de estrés celular elevados para los modelos con *DKC1* y *NOP10* silenciados, y niveles algo menos elevados para el modelo con *TINF2* silenciado. Se observaron también, marcas de daño al ADN. Los resultados obtenidos parecen indicar que el estrés oxidativo es el responsable del daño al ADN y que por tanto, actúa en los eventos más tempranos de la enfermedad y no aparece como consecuencia del acortamiento telomérico.

## **Abstract**

Dyskeratosis congenita (DC) is an heterogeneous disease, considered as a rare disease. Its most characteristic phenotypic traits are related with mucocutaneous abnormalities, however, bone marrow failure is the feature which produce the death of patients. The genetic heterogeneity is higher, so there have been described mutations in 7 different genes (*DKC1*, *NOP10*, *TINF2*, *TERC*, *TERT*, *TCAB* and *NHP2*) and three types of inheritance. At molecular level, the main characteristic is an acute telomere shortening. This shortening is caused by the mutated genes at proteins conforming telomerase and shelterin complex. More over, it has been described an increase in the oxidative stress levels and DNA damage in DC patients cells. This oxidative stress had been proposed to be a secondary pathophysiological mechanism in DC. However, it has been described telomere-independent functions of the telomerase complex, related with reducing the imbalance of oxidative cellular conditions. In this work we propose the oxidative stress as a primary pathophysiological mechanism in DC. It had been generated 3 cellular acute models using RNA interference technology to produce acute effects in DC. In each of these models, a gene have been silenced (*DKC1*, *NOP10* and *TINF2*). Gene expression and protein levels of main antioxidant cellular enzymes (catalase, CuZnSOD, MnSOD and Glutathione peroxidase) have been measured. In addition, some oxidative stress parameters (oxidized peroxiredoxin, oxidized glutathione /reduced ratio glutathione and p53) were measured. Furthermore, it has been measured DNA damage markers ( $\gamma$ H2AX and phosphorylation), as well as, expression levels of DNA repair genes. In the generated cellular models with silenced *DKC1* and silenced *NOP10*, high levels of oxidative stress were observed, and less somewhat higher levels have been observed in model with silenced *TINF2*. DNA damage marks were also observed in these cells. The results suggested that the oxidative stress is the responsible of DNA damage and, it acts as the earliest event of disease and it does not appear as a consequence of telomere shortening.

## **Palabras clave**

Estrés oxidativo, antioxidantes, daño al ADN, reparación daño ADN, Disqueratosis congénita, enfermedad rara.

## **Keywords**

Oxidative stress, antioxidants, DNA damage, DNA damage repair, Dyskeratosis congenita, rare disease.

## **Autor**

Vanessa Fuster Martí

## **Tutor**

José Gadea Vacas

## **Tutor externo**

José Luís García Giménez

## **Co-tutor externo**

José Santiago Ibáñez Cabellos

**Valencia, Julio de 2016**

# ÍNDICE

---

<b>I. ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	
1. Enfermedades raras.....	2
2. La Disqueratosis congénita.....	2
2.1. Rasgos fenotípicos.....	2
2.2. Rasgos genéticos.....	3
3. Telomerasa, shelterina y los telómeros.....	4
4. El estrés oxidativo y los sistemas antioxidantes.....	5
5. El daño al ADN y los mecanismos de reparación.....	7
6. Hipótesis planteada.....	8
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Cultivo celular y silenciamiento génico mediante ARNi.....	11
2. Obtención de extractos proteicos.....	13
3. Extracción de histonas.....	14
4. Cuantificación de proteínas por el método Bradford .....	14
5. Análisis de la expresión de proteínas por Western-Blot.....	15
6. Determinación del cociente glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH).....	16
7. Extracción de proteínas para su análisis mediante espectrometría de masas.....	17
8. Extracción de ARN.....	17
9. Análisis por RT- qPCR.....	18
10. Análisis estadístico.....	19
<b>V. RESULTADOS</b>	
1. Caracterización de los modelos celulares.....	20
2. Aumento del estrés oxidativo en las poblaciones celulares con genes silenciados.....	22
3. El silenciamiento génico produce una desregulación de las defensas antioxidantes.....	24
4. Aumento del daño al ADN en los diferentes subgrupos silenciados.....	26
5. Cambios en la expresión de las enzimas implicadas en las distintas rutas de reparación del ADN.....	28

## **VI. DISCUSIÓN**

1. Caracterización de los modelos celulares.....30
2. Evaluación de los parámetros de estrés oxidativo.....32
3. Caracterización de los enzimas antioxidantes.....33
4. Caracterización de las rutas implicadas en la reparación del ADN  
y los marcadores de daño al ADN.....34

## **VII. CONCLUSIONES.....36**

## **VIII. LIMITACIONES.....37**

## **IX. PERSPECTIVAS FUTURAS.....37**

## **X. BIBLIOGRAFÍA.....38**

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Tríada fenotípica.....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del complejo telomerasa y shelterina.....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Ciclo redox del glutatión.....	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Reacción catalizada por SOD.....	<b>6</b>
<b>Figura 5.</b> Reacción catalizada por la catalasa.....	<b>6</b>
<b>Figura 6.</b> Reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. ....	<b>7</b>
<b>Figura 7.</b> Reacción catalizada por la peroxirredoxina.....	<b>7</b>
<b>Figura 8.</b> Expresión génica relativa y expresión proteica de los genes silenciados.....	<b>20</b>
<b>Figura 9.</b> Ciclo celular y viabilidad celular.....	<b>21</b>
<b>Figura 10.</b> Expresión relativa de <i>TERC</i> y <i>TERT</i> y actividad telomerasa.....	<b>22</b>
<b>Figura 11.</b> Evaluación de los niveles de peroxirredoxina en los diferentes grupos de células HeLa.....	<b>23</b>
<b>Figura 12.</b> Expresión relativa de p53.....	<b>23</b>
<b>Figura 13.</b> Ratio GSSG/GSH.....	<b>24</b>
<b>Figura 14.</b> Expresión relativa de <i>SOD1</i> y <i>SOD2</i> en las distintas poblaciones celulares.....	<b>25</b>
<b>Figura 15.</b> Expresión relativa de <i>CAT</i> y <i>GPX1</i> en las distintas poblaciones celulares.....	<b>26</b>
<b>Figura 16.</b> Niveles de parsilación en las distintas poblaciones celulares.....	<b>27</b>
<b>Figura 17.</b> Niveles de $\gamma$ H2AX en las distintas poblaciones celulares.....	<b>27</b>
<b>Figura 18.</b> A. Reparación por escisión de bases. B. Reparación por escisión de nucleótidos.....	<b>28</b>
<b>Figura 19.</b> Recombinación homóloga.....	<b>29</b>
<b>Figura 20.</b> Unión de extremos no homólogos y ruta de <i>back-up</i> .....	<b>29</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Extracto de las rutas obtenidas por bioinformática.....	<b>9</b>
---	----------

## **I. ABREVIATURAS**

---

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ADNc:** ADN complementario
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ARNi:** ácido ribonucleico interferente
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **BSA:** Seroalbúmina bovina
- **CAT:** gen codificante de la catalasa
- **CuZnSOD:** Cobre Zinc superóxido dismutasa
- **DKC1:** gen que codifica para la proteína disquerina
- **DMEM:** Medio Mínimo Esencial de Eagle
- **ERO:** Especies Reactivas de Oxígeno
- **Gpx:** Glutación peoxidasa
- **GSH:** Glutación
- **GSSG:** Disulfuro de glutación
- **MnSOD:** Manganeso superóxido dismutasa
- **NOP10:** Gen que codifica para la proteína NOP10
- **PARP:** Poli (ADP-Ribosa) polimerasa
- **PBS:** Tampón fosfato salino
- **qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
- **RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
- **SDS:** Dodecilsulfato sódico
- **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
- **SFB:** Suero fetal bovino
- **siDKC1:** Población celular con el gen DKC1 silenciado
- **siNOP10:** Población celular con el gen NOP10 silenciado
- **siTINF2:** Población celular con el gen TINF2 silenciado
- **SOD 1:** Gen que codifica para la CuZnSOD
- **SOD2:** Gen que codifica para la MnSOD
- **TBS-Tween:** Tampón fosfato salino con Tween
- **TEMED:** Tetrametiletildiamina
- **TERC:** Gen que codifica para la proteína hTERC de la telomerasa
- **TERT:** Gen que codifica para la proteína hTERT de la telomerasa
- **TINF2:** Gen que codifica para la proteína TIN2
- **TRIS:** Hidroximetil aminoetano

## **II. INTRODUCCIÓN**

---

### **1. Enfermedades raras**

Una enfermedad, en Europa, se considera como rara cuando afecta a menos de 1 persona de cada 2000. El 80% de las enfermedades raras diagnosticadas, tienen origen genético, mientras que otras aparecen como resultado de una infección vírica o bacteriana, reacciones alérgicas o causas ambientales, e incluso son degenerativas y proliferativas. Además, el 50% de estas enfermedades, afectan a niños ("Rare Disease Day 2016 - 29 Feb," n.d.).

Se han descrito y caracterizado alrededor de 6000 enfermedades raras, que presentan una gran diversidad, no solo entre las distintas enfermedades sino, también entre pacientes afectados por la misma enfermedad. Esta diversidad tan elevada, conlleva dificultades asociadas al diagnóstico, puesto que muchas veces, la sintomatología no permite el diagnóstico de forma directa.

Estas enfermedades, disminuyen mucho la calidad de vida de los pacientes, provocando la pérdida de la autonomía, debido a que se trata de enfermedades crónicas y degenerativas. Además, el hecho de que no existan muchas veces, tratamientos eficaces para estas enfermedades, aumenta mucho el dolor y el sufrimiento de estos pacientes a lo largo de su vida.

Los medicamentos destinados al tratamiento de estas enfermedades, se denominan medicamentos huérfanos. Debido al escaso número de pacientes, el desarrollo de estos medicamentos, no permite la recuperación del capital invertido en las investigaciones pertinentes, por tanto, se pueden definir como medicamentos que no reciben excesiva financiación para su desarrollo, pero que responden a necesidades de salud pública.

### **2. La Disqueratosis congénita**

La enfermedad sobre la que se va a tratar en el presente trabajo es la Disqueratosis congénita (DC). Se trata de una enfermedad rara que cursa progeria, caracterizada por una heterogeneidad clínica y genética muy elevada, con una prevalencia estimada de 1/1.000.000. La esperanza de vida de se encuentra alrededor de los 50 años, y las principales causas de muerte son fallos en la medula ósea y la aparición de cáncer.

#### **2.1. Rasgos fenotípicos**

La DC está caracterizada por anormalidades mucocutáneas, encanecimiento y pérdida de pelo, fibrosis pulmonar, fallo de médula ósea y aparición de tumores. Las anormalidades mucocutáneas se conocen como tríada fenotípica e incluyen distrofia ungueal, cambios en la pigmentación (especialmente cuello y tórax) y leucoplasia oral, como se observa en la Figura 1.



**Figura 1. Tríada fenotípica.** A. Alteraciones en la pigmentación de la piel. B. Alteraciones ungueales. C. Leucoplasia oral.

Las manifestaciones clínicas de la DC, frecuentemente aparecen en la niñez. La pigmentación anormal de la piel, y los cambios en las uñas aparecen primero, alrededor de los 10 años, y el fallo de médula ósea se desarrolla frecuentemente sobre los 20 años, con alrededor de un 80% de pacientes que a los 30 años ya han manifestado estos fallos. Sin embargo, hay una variabilidad considerable entre los pacientes con respecto a la edad en que manifiestan la enfermedad y la severidad de la misma incluso en miembros de la misma familia (Dokal, 2011).

## 2.2. Rasgos genéticos

La DC presenta también elevada heterogeneidad genética, habiéndose identificado hasta el momento 7 genes responsables de su aparición, y que se distribuyen en tres tipos de herencia distintos.

El primer tipo de herencia identificado, fue la herencia **ligada al cromosoma X** con una prevalencia del 48%. En este caso, el gen mutado es el gen *DKC1* que codifica para una proteína conocida como disquerina. Esta proteína se une a la subunidad *TERT* de la telomerasa y ayuda en la estabilización del complejo. La mayoría de las mutaciones en el gen *DKC1* que causan la DC, son mutaciones que cambian un sólo aa y hay más de 40 mutaciones de este tipo descritas. (Dokal, 2011).

El siguiente tipo de herencia identificado fue la **autosómica dominante** con un 34% de prevalencia. En este caso se encontraron mutaciones en tres genes distintos.

El primer gen identificado fue el gen *TERC*, que codifica para el componente ARN, del complejo telomerasa.

El segundo gen sobre el que fueron identificadas las mutaciones fue *TERT*, que codifica para el componente enzimático de la telomerasa.

Por último fueron identificadas mutaciones en *TINF2*, un componente del complejo de la shelterina. Los pacientes con mutaciones en *TINF2*, tienen tendencia a presentar un fenotipo severo y presentan telómeros excesivamente cortos. (Dokal, 2011).

El tercer tipo de herencia descrito, fue la **autosómica recesiva** en la que se han identificado mutaciones en 3 genes distintos.

El primer gen identificado fue *NOP10* sobre el que las mutaciones homocigotas afectan un residuo altamente conservado. Más tarde se encontraron mutaciones bialélicas en el gen *NHP2* y finalmente se encontraron también mutaciones en el gen *TCAB1* en pacientes con este tipo de DC (Dokal, 2011).

### 3. Telomerasa, shelterina y los telómeros

Los orígenes genéticos de la DC tienen que ver con genes que están involucrados en la telomerasa y shelterina. La mutación de los cuales produce que los pacientes con esta enfermedad tengan una actividad telomerasa o del complejo shelterina deficiente y por tanto una longitud de los telómeros reducida (Dokal, 2011).

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas que protegen los extremos de los cromosomas de la erosión, degradación o de la adherencia con los extremos de otros cromosomas. Están constituidos por regiones de ADN altamente repetitivo, que forman nodos para estabilizar los telómeros y evitar que los extremos sean reconocidos como ADN dañado. (Witzany, 2008).

La telomerasa es una transcriptasa reversa, cuya principal función es mantener la longitud de los telómeros evitando el acortamiento de estos. Está formada por dos subunidades principales; la subunidad *TERC*, que actúa como molde de ARN y la subunidad *TERT* con actividad retrotranscriptasa. Además, el complejo de la telomerasa necesita de unas proteínas accesorias; disquerina, *NOP10*, *NHP2*, *GAR1* y *TCAB1* (Figura 2), cuya principal función es permitir que la telomerasa se ensamble formando un complejo y se dirija a los cuerpos de Cajal, donde iniciará su actividad de transcriptasa.

Por otra parte, se encuentra el complejo de la shelterina, también conocido como telosoma. Este segundo complejo está formado por seis proteínas (*TRF1*, *TRF2*, *TINF2*, *POT1*, *TPP1* y *Rap1*), y su principal función es determinar la estructura de los telómeros y controlar la síntesis del ADN telomérico por parte de la telomerasa. (Martínez and Blasco, 2011).

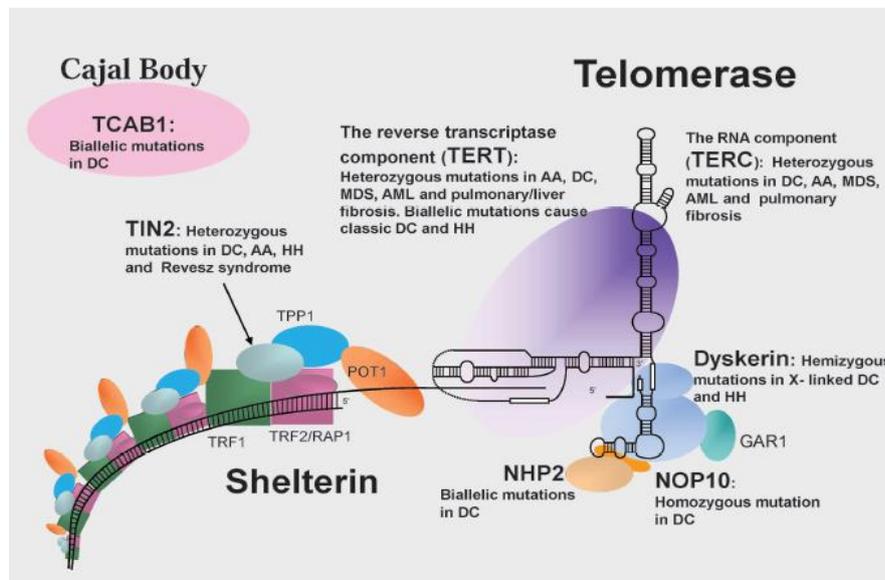


Figura 2. Representación esquemática del complejo telomerasa y shelterina

La principal función de los genes previamente descritos es la del mantenimiento de los telómeros, tanto de la telomerasa como de la shelterina, pero también participan en otras funciones celulares como es el mantenimiento del equilibrio redox celular. Está descrito

que cuando se produce un acortamiento telomérico se incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno, el daño al ADN y los marcadores de apoptosis mediados por la vía de p53 (Sahin and DePinho, 2012), causando una desregulación de las enzimas antioxidantes y un aumento de la apoptosis (Pereboeva et al., 2016; Pérez-Rivero et al., 2008; Westin et al., 2010). Además se han descrito para algunos de estos genes funciones extrateloméricas a nivel mitocondrial, principal orgánulo de producción de ERO, como son *TERT* que migra a la mitocondria para reducir el estrés oxidativo por regulación de ARNmi (Ahmed et al., 2008; Sullivan et al., 2012) y *TINF2* que regula el metabolismo intermediario y con ello la producción de ERO (Chen et al., 2012), importantes en el equilibrio redox celular.

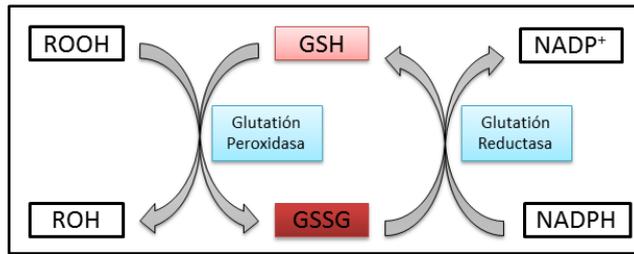
Es necesario puntualizar que aunque en la etiopatogenia de muchas telomeropatías se ha considerado al estrés oxidativo como un efecto secundario, cada vez se acumulan más evidencias de que el estrés oxidativo tiene un papel principal como consecuencia de una disfunción de estos genes, pudiendo contribuir primariamente al desarrollo de las telomeropatías.

#### **4. El estrés oxidativo y los sistemas antioxidantes**

El estrés oxidativo puede definirse como el desequilibrio entre la producción celular de especies oxidantes y la capacidad antioxidante. (Matés et al., 2008). Las especies reactivas de oxígeno (ERO), se producen continuamente en las células con metabolismo aerobio mediante reacciones químicas de óxido-reducción con oxígeno. Las principales fuentes de producción de ERO a nivel celular son la lipoxigenasa, la cicloxigenasa y la citocromo P-450 (Berlett and Stadtman, 1997). Las ERO, son moléculas implicadas en distintos procesos de señalización celular, sin embargo, también pueden causar daño oxidativo lesionando macromoléculas como ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y proteínas, y es por ello que aparecen implicadas en la fisiopatología de muchas enfermedades, como el cáncer, enfermedades del corazón, vasculares, diversas enfermedades raras y en la diabetes (Zhang et al., 2011). No obstante, los organismos han desarrollado una serie de moléculas que se oponen a estos procesos tóxicos provocados por las ERO, llamados sistemas antioxidantes, que puede ser enzimáticos y no enzimáticos.

Como se ha descrito previamente el estrés oxidativo juega un papel importante en las células y sobretudo en la DC, por lo que es importante caracterizar el estado del estrés oxidativo y de los sistemas antioxidantes. Los principales sistemas antioxidantes estudiados en nuestro trabajo han sido:

El **glutati6n (GSH)** es el antioxidante no enzimático más importante. Se trata de un tripéptido que actúa como donante de electrones, y reduce los enlaces disulfuro que se forman entre residuos de cisteína en las proteínas. Al oxidarse, se convierte en disulfuro de glutati6n (GSSG), sin embargo, en condiciones basales, el GSH se encuentra prácticamente en su mayoría en estado reducido (Figura 3).



**Figura 3. Ciclo redox del glutatión:** cuando aparece una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG mediante una reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa. A continuación, la glutatión reductasa, reduce el GSSG formado a GSH. La glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, se encarga de ceder el NADPH que la glutatión reductasa necesita como cofactor.

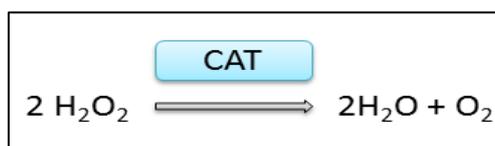
En cuanto a sistemas antioxidantes enzimáticos, encontramos entre otros la **superóxido dismutasa (SOD)**. Esta enzima cataliza la dismutación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en oxígeno y peróxido de hidrógeno, como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4. Reacción catalizada por SOD,** para transformar el anión superóxido en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno ( $O_2$ ).

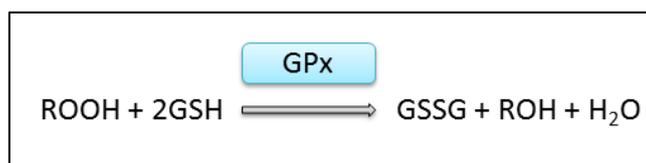
Existen varias isoformas de SOD, como la CuZnSOD (SOD1) que utiliza como cofactores el cobre y el zinc y se encuentra en el citosol; y la MnSOD (SOD2) que emplea el manganeso como cofactor y se encuentra en la mitocondria (Miller, 2012).

Otro ejemplo de antioxidante enzimático es la catalasa (CAT). Este enzima pertenece a la categoría de las oxidoreductasas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno molecular y agua. Se localiza principalmente en los peroxisomas, aunque también se encuentra en las mitocondrias y el citosol (Tolbert, 1971).



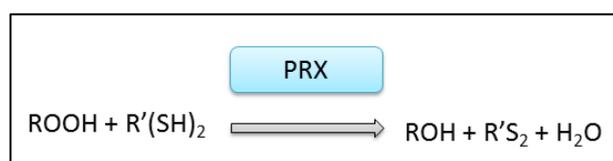
**Figura 5. Reacción catalizada por la catalasa** donde se transforma el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno.

La **glutatión peroxidasa (GPx)**, es otra enzima antioxidante que, como ya hemos visto anteriormente, cataliza la reacción de reducción de peróxidos generados en las células, siendo el glutatión el donador de electrones, y obteniendo glutatión reducido (GSSG) como se observa en la Figura 6 (Chance, 1979).



**Figura 6. Reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx)** donde un peróxido (ROOH) queda reducido a un grupo alcohol (ROH).

Por último, las **peroxirredoxinas (Prx)** son también enzimas antioxidantes, que contienen un residuo cisteína conservado que se somete a un ciclo de oxidación peróxido-dependiente y de reducción tiol-dependiente durante la catálisis de los peróxidos (Figura 7) (Rhee et al., 2005).



**Figura 7. Reacción catalizada por la peroxirredoxina (PRX)** en que un peróxido es reducido a su correspondiente alcohol, mientras el grupo tiol de una cisteína (R'(SH)<sub>2</sub>) del centro activo de la PRX se oxida (R'S<sub>2</sub>).

## 5. El daño al ADN y los mecanismos de reparación

El ADN es el repositorio de la información genética en cada célula viva de un organismo, por lo que su integridad es esencial para la vida. Sin embargo, no es una molécula inerte, sino que agentes ambientales, tales como las radiaciones UV, son capaces de alterar su estructura o producir mutaciones. Además, el ADN está también sometido al daño oxidativo que pueden producir los productos del metabolismo, como los radicales libres. De hecho, se estima que una sola célula puede sufrir más de un millón de cambios en el ADN por día (Clancy, 2008).

Debido a la gran importancia de esta biomolécula, existen procesos de reparación del ADN en organismos tanto procarióticos como eucarióticos, y muchas de las proteínas implicadas en estos mecanismos están altamente conservadas a lo largo de la evolución (Clancy, 2008).

Una de las rutas responsables de la reparación del daño en el ADN es la reparación por escisión de bases (REB). Esta ruta está muy bien caracterizada y se inicia por glicosilasas específicas que reconocen el daño y retiran la base afectada del esqueleto de azúcar-fosfato, de modo que aparece un sitioapurínico/apirimidínico que es retirado, y el hueco que queda correspondiente a un solo nucleótido, es rellenado por una polimerasa específica (ADN pol β) y finalmente sellado por ligación. De las diferentes glicosilasas que inician la ruta, la principal es la oGG1. (Menoni et al., 2012).

Otra ruta de reparación del daño en el ADN es la reparación por escisión de nucleótido (REN). Esta ruta de reparación es llevada a cabo por un total de 18 proteínas mediante 4 pasos: detección del daño, escisión de la sección de ADN que incluye el error, rellenado del hueco mediante una ADN polimerasa y ligado del nuevo ADN con el antiguo. Una de las proteínas más importante de esta ruta es la XPA, cuya función principal es permitir el ensamblaje del núcleo de proteínas alrededor del ADN dañado. (Fadda, 2016)

La recombinación homóloga (RH) reúne una serie de rutas interrelacionadas que actúan en la reparación de roturas de la doble hebra de ADN y en entrecruzamientos. Esta ruta la llevan a cabo un núcleo central de proteínas, siendo la más importante Rad51 y Rad53 (Li and Heyer, 2008).

Por último, la reparación del ADN mediante unión de extremos no homólogos, es otra de las rutas viables para subsanar los daños en la cadena de ADN. En esta ruta se unen extremos de cromosomas, o se reparan roturas de doble hebra, sin necesidad de encontrar homología en las secuencias que se unen. (Nussenzweig and Nussenzweig, 2007). La helicasa WRN presenta una función importante en la ruta, sin embargo, también juega un papel esencial la poli(ADP-ribosa)polimerasa PARP-1, que participa junto con la ADN ligasa III, en una vía alternativa de apoyo a la recombinación no homóloga. (Wang et al., 2006, p. 1)

Dentro de los biomarcadores de daño al ADN encontramos algunos como la detección de colas de ADP-ribosas, es decir, de la parsilación. La proteína PARP-1, actúa traduciendo las roturas en la hebra de DNA, en señales en forma de poli ADP-ribosas. PARP-1, detecta el daño en la cadena y con su dominio catalítico, añade una cola de ADP-ribosas en el sitio dañado (Dantzer et al., 2006).

Otra técnica que permite determinar el daño al ADN en una célula es la medida de la proteína  $\gamma$ -H2AX. Las roturas de doble cadena, van siempre seguidas de la fosforilación de la histona H2AX. Esta proteína es una variante de la familia de proteínas H2A y es un componente del octámero de histonas que forma parte del nucleosoma (Kuo and Yang, 2008). La nueva proteína formada,  $\gamma$ -H2AX, es el primer paso en el reclutamiento y la localización de las proteínas de reparación del ADN. Además, la formación de esta proteína fosforilada, se produce en relación 1:1 ( $\gamma$ -H2AX:DSB), lo que permite ser usado como un biomarcador para el daño al ADN (Kuo and Yang, 2008).

## 6. Hipótesis planteada

En el grupo donde este trabajo ha sido realizado, se había optimizado previamente un método de silenciamiento mediante ARN de interferencia, que permitió crear tres modelos celulares con los genes *DKC1*, *NOP10* y *TINF2* silenciados respectivamente, siendo cada uno de los modelos, representativo de un tipo de herencia.

Con estos modelos celulares se realizaron análisis genómicos mediante matrices de expresión (GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array, Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU), y posteriormente se realizó una búsqueda en la base de datos Gene Ontology (GO), donde

se determinaron todas las rutas celulares que podían estar afectadas en cada uno de los diferentes tipos de DC.

**Tabla 1. Extracto de las rutas obtenidas por bioinformática.** Las rutas más destacadas de entre todas las encontradas son aquellas relacionadas con el estrés oxidativo y las rutas de daño al ADN, además de aquellas rutas que intervienen en los procesos de maduración de ARN y la biogénesis ribosomal.

Identificador Gene Ontology	Descripción de la ruta afectada
GO:1902230	Regulación negativa de la ruta de señalización de la apoptosis intrínseca en respuesta al daño al ADN
GO:1902229	Regulación de la ruta de señalización de la apoptosis intrínseca en respuesta al daño al ADN
GO:2001021	Regulación negativa de la respuesta a estímulos de daño al ADN
GO:0051103	Ligación del ADN involucrada en reparación del ADN
GO:0006309	Fragmentación del ADN en apoptosis
GO:0072402	Respuesta a la señalización en los puntos de control de integridad del ADN
GO:0072423	Respuesta a la señalización en los puntos de control de daño del ADN
GO:0006288	Reparación por escisión de bases, ligación del ADN
GO:0072432	Respuesta al punto de control G1 en daño al ADN
GO:1902151	Regulación de la respuesta a la integridad del ADN en los puntos de control
GO:1902153	Regulación de la respuesta al daño del ADN en los puntos de control
GO:0090329	Regulación de la replicación del ADN ADN-dependiente
GO:0010835	Regulación de la ADP-ribosilación de proteínas
GO:0055114	Procesos de oxidación-reducción
GO:1901701	Respuesta celular a compuestos que contienen oxígeno
GO:0071447	Respuesta celular a los hidroperóxidos
GO:0006950	Respuesta al estrés
GO:1901699	Respuesta celular a los compuestos con nitrógeno
GO:0070482	Respuesta a los niveles de oxígeno
GO:1990261	Procesado catabólico del pre-ARNm
GO:0022613	Biogénesis de complejos ribonucleoproteicos
GO:0042254	Biogénesis ribosomal

Este resultado y las referencias previas sustentan que en la etiopatogenia de DC se considera el acortamiento telomérico como un mecanismo primario que conduce al estrés oxidativo, sin embargo considerando que los genes alterados pueden estar implicados en otras funciones celulares nosotros planteamos la hipótesis siguiente:

El estrés oxidativo es mecanismo subyacente en fases tempranas de DC.

Por ello nos planteamos hacer un modelo experimental en el que no haya un acortamiento telomérico importante y que nos permita estudiar el papel de estos genes del complejo telomerasa o shelterina sobre el estrés oxidativo en la patogenia de la DC.

### **III. OBJETIVOS**

---

El objetivo de este trabajo es la validación de los resultados obtenidos en el análisis de matrices de expresión de los modelos celulares generados de DC y observar si el estrés oxidativo tiene un papel principal en la DC. Para ello, se establecen los siguientes objetivos:

- Determinar las modificaciones oxidativas en proteínas.
- Analizar los niveles de expresión de las principales enzimas antioxidantes.
- Estudiar las marcas de daño al ADN mediante análisis de gamma-H2AX y parsilación de las histonas.
- Analizar los niveles de expresión de las principales enzimas de reparación de daño al ADN.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. Cultivo celular y silenciamiento génico mediante ARNi

La línea celular utilizada en este estudio son células pertenecientes a cáncer cérvico-uterino (HeLa). Estas células presentan una gran capacidad proliferativa, característica que facilita el trabajo; además se trata de una línea celular que se utiliza comúnmente en este tipo de investigaciones, siendo la razón principal de su uso en este trabajo que la telomerasa se encuentra activa.

Se dejó descongelar un vial, propio del grupo, en nitrógeno líquido en el termostato a 37°C. Una vez estuvieron listas y trabajando en condiciones de máxima esterilidad (campanas de flujo laminar), se resuspendieron en 2mL medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado (10% suero bovino fetal inactivado (SBF), y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina), y se homogeneizaron. Se centrifugaron durante 5 minutos a 25°C a una velocidad de 1.500rpm, se vertió el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 2mL de medio DMEM suplementado. Se cultivó toda la cantidad disponible de células en un frasco T75 con 15mL de medio DMEM y se dejó crecer a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>.

A lo largo de todo el trabajo se realizaron diferentes pases para mantener el cultivo celular, para conservar células disponibles para los diferentes experimentos. Los pases celulares se prepararon a razón de 15mL de medio de cultivo suplementado y una confluencia de 1.000.000 células.

#### Silenciamiento génico

El silenciamiento que se llevó a cabo en este trabajo utilizó la tecnología del ARN de interferencia (ARNi) y como agente transfectante se utilizó la Lipofectamina. La lipofectamina es un compuesto que contiene lípidos con cargas positivas (cationes) que forman liposomas. Puesto que el ARNi presenta cargas aniónicas, se une a los liposomas con carga positiva. Los liposomas con el ARNi se fusionan con las membranas plasmáticas de las células, permitiendo la entrada del ARNi en la célula. El complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) presente en el interior celular, está formado por proteínas Argonautas que al ensamblarse con el ARNi, es usado como guía para identificar al ARN mensajero complementario y catalizar el corte del mensajero en dos mitades que son degradadas por la maquinaria celular, bloqueando así la expresión del gen (Carthew and Sontheimer, 2009). En estudio se utilizó un método de silenciamiento secuencial, silenciando dos días consecutivos, de modo que el proceso completo tuvo una duración total de 4 días.

#### Día 1. Cultivos en placas de 6 pocillos

El silenciamiento se llevó a cabo en placas de 6 pocillos. Estas placas permiten alcanzar una elevada densidad celular en un tiempo corto, además que aumentan la superficie de contacto con el agente transfectante, debido al menor tamaño del pocillo, con lo que se obtiene un mayor porcentaje de silenciamiento.

Para realizar los cultivos, se realizaron dos lavados con 5mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS), en el frasco T75 donde estaban las células en mantenimiento. Posteriormente, se añadieron 3mL de tripsina y se incubó el frasco durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 5mL de medio DMEM con

10% SBF, con el fin de inactivar la tripsina. A continuación, se recuperó el contenido del frasco en un tubo de 15mL y se centrifugó durante 5 minutos, a 1500rpm y 25°C. Seguidamente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1mL de medio DMEM con 10% SBF. Se tomó una alícuota de la suspensión celular en un tubo de 1,5mL y se contó el número de células utilizando una cámara de Neubauer (BRAND, Wertheim, Germany). Tras conocer el número de células por mL presente en la suspensión celular, se realizaron los cálculos necesarios para preparar una suspensión madre de células con medio DMEM con 10% SBF, a una concentración de 100.000 células/mL, de esta forma se reduce el error de pipeteo. Posteriormente se añadieron 2mL de esta suspensión madre a cada pocillo de la placa, de forma que la densidad celular por pocillo fue de 200.000 células/pocillo.

## Día 2. 1º Silenciamiento génico

Transcurridas 24 horas desde la siembra inicial en las placas de 6 pocillos, se inició el protocolo de silenciamiento. En 12 tubos de 1,5mL distintos se añadieron 246µL de medio DMEM sin suplementar y 4µL de lipofectamina (Ref: 13778-150, *Lipofectamine RNAiMAX Reagent, Invitrogen*), que actuará como agente transfectante.

Paralelamente, se prepararon 9 tubos de 1,5mL distintos a los que se añadieron 238µL de medio DMEM sin suplementar y posteriormente se añadió en 3 de estos tubos 12,4µL de ARNi *DKC1* (ID: s4111, *DKC1 Silencer Select Pre-designed siRNA, Ambion*), en otros tres tubos, se añadieron 12,4µL de ARNi *NOP10* (ID: 215701, *NOP10 Silencer Pre-designed siRNA, Ambion*), y en los tres tubos restantes, se añadieron 12,4µL de ARNi *TINF2* (ID: s25355, *Silencer Select Pre-designed siRNA, Ambion*). Se añadió este volumen de ARNi de cada gen para tener una concentración final en el pocillo de 100nM.

Por último se preparó el control. En 3 tubos de 1,5mL distintos, se añadieron 244µL de medio DMEM sin suplementar y 6,2µL de ARNi control (Cat: AM4635, *Silencer Negative Control siRNA #1, Ambion*). Se añadió este volumen de ARNi control para tener una concentración final en el pocillo de 100nM.

Después de 5 minutos en reposo, con una pipeta se vertió el contenido de los tubos que contenían la lipofectamina sobre los tubos con los ARNi, agitando suavemente con la pipeta, y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente, permitiendo la formación de las vesículas conteniendo los ARNi.

Durante estos 20 minutos, se procedió al lavado de las placas de 6 pocillos. Se lavaron 2 veces, con 1mL de medio DMEM sin suplementar, y finalmente se añadieron a cada pocillo 2mL de medio DMEM sin suplementar.

Tras dejar reposar 20 minutos la mezcla de silenciamiento, con una pipeta se dejó caer gota a gota el contenido de cada tubo sobre su pocillo específico en la placa. Se incubaron las placas en el incubador (37°C y 5%CO<sub>2</sub>) durante 5 horas, y a continuación se retiró el medio (ya que si la lipofectamina está mucho tiempo en contacto con las

células puede resultar perjudicial para las mismas) y se cambió por medio DMEM con 10% SBF para estimular de nuevo el crecimiento celular.

### **Día 3. 2º Silenciamiento génico**

Pasadas 24h después de la primera transfección, se procedió a realizar el segundo silenciamiento. El protocolo seguido fue el mismo del día 2, a excepción que tras las 5 horas de incubación con la mezcla de silenciamiento (lipofectamina y ARNi), el medio que se añadió al final fue medio DMEM suplementado.

### **Día 4. Recogida de las células**

Una vez completadas las 24h, las células estuvieron lista para su extracción. Se lavaron los pocillos con 1mL de PBS, dos veces. Tras los lavados, se añadieron 200µl de tripsina y se dejaron reposar las placas 5 minutos en el incubador (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). A continuación, se añadieron 500µL de medio DMEM suplementado con el fin de inactivar la tripsina. El contenido de cada pocillo se trasladó a un tubo de 1,5mL, con la ayuda de una pipeta y seguidamente se centrifugaron a 1.500rpm y 25°C durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante, y se añadieron 500µL de PBS a cada tubo. Se realizó otra centrifugación con las mismas condiciones, para obtener un extracto libre de medio. Finalmente, se retiró el sobrenadante, y se congelaron los pellets a -80°C.

## **2. Obtención de extractos proteicos**

La obtención de extractos se realizó con la finalidad de obtener proteínas totales.

Para la obtención de proteínas totales se lisaron aproximadamente 10<sup>6</sup> células. Para ello se eliminó el medio de cultivo y se lavó cada pocillo con 1mL de PBS, dos veces. A continuación se añadieron 150µL de tripsina a cada pocillo, y se dejaron las placas 5 minutos a 37°C. Tras los 5 minutos de incubación, se inactivó la tripsina añadiendo 200µL de medio DMEM suplementado. El contenido de cada pocillo se trasladó a un tubo de 1,5mL distinto y se procedió a centrifugar durante 5 minutos a 1500rpm. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en PBS y se volvió a centrifugar de nuevo durante otros 5 minutos a 1500rpm. Tras la última centrifugación se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100µL de tampón de lisis total (Hepes pH 7.4, 20 mM; tritonX-100 1%; NaCl 100 mM; NaF 50 mM; β-glicerofosfato 10 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM; 10 µL/mL ortovanadato de sodio activado 1 mM e inhibidor de proteasas 2 µL/mL) y se dejó incubar 15 minutos en hielo, transcurridos los cuales se procedió a centrifugar a 13.000xg durante 10 minutos a 4°C. Una vez centrifugado, se recolectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se almacenó a -80°C.

### 3. Extracción de histonas

Mediante el protocolo de silenciamiento descrito, se obtuvieron los pellets celulares, correspondientes a las muestras.

Se añadió a cada tubo 1 mL de “tampón de lisis hipotónico” (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT, ortovonadato y inhibidor de proteinasas 2μl/mL), y se incubaron las muestras durante media hora en una noria, de forma que los tubos estuvieran continuamente agitados y a una temperatura de 4°C. Tras la incubación, se centrifugaron los tubos a 10.000xg y 4°C, durante 10 minutos. A continuación se descartó el sobrenadante, se resuspendieron los pellets en 400μL de ácido sulfúrico (NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,4N y se incubaron los tubos “overnight” a 4°C.

El siguiente día, se centrifugaron los tubos a 16.000xg, a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se trasladó el sobrenadante, conteniendo las histonas, a otro tubo. En estos tubos, se añadieron 132μL de TCA (Ref: T9159-100G, Sigma-Aldrich) 100%, invirtiendo los tubos repetidas veces. Posteriormente, se incubaron los tubos en hielo durante 30 minutos y después se centrifugaron durante 10 minutos, a 16.000xg y 4°C. Se retiró el sobrenadante, y se añadieron 0,5mL de acetona, con la finalidad de eliminar el ácido sulfúrico sin disolver el pellet proteico. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos, a 16.000xg y a 4°C, repitiendo el lavado dos veces.

Tras la segunda centrifugación, se retiró el sobrenadante con la pipeta y se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez se secaron los pellets, se disolvieron en 50μL de agua bidestilada.

### 4. Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La cantidad de proteínas presentes en las muestras a analizar se determinó mediante el método colorimétrico denominado método de Bradford. Para ello se prepararon en distintas microcubetas (Plastibrand standard disposable cuvettes, Sigma-Aldrich St. Louis, EE.UU.) 797μl de agua MiliQ, 200μl de reactivo de Bradford (Cat: #500-0006, Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad), y 3μl de cada una de las muestras de interés y de una serie de muestras de concentración conocida 10, 6, 4, 2, 1, 0.75, 0.5, 0.25 y 0 mg/mL de seroalbúmina bovina (BSA) para obtener la recta patrón. En una microcubeta de espectrofotometría se añadió 1 mL de agua bidestilada para obtener el blanco. Las microcubetas se incubaron durante 5 minutos en la oscuridad, y seguidamente se procedió a su lectura en el espectrofotómetro (SpectraMax plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EE.UU.) a una longitud de onda de 595nm.

Una vez obtenidos los datos de absorbancia de las muestras de concentración conocida se realizó una curva patrón relacionando absorbancia y concentración. A partir de la ecuación obtenida de esta curva patrón, se obtuvieron los valores de concentración de las muestras problema.

## 5. Análisis de la expresión de proteínas por Western-Blot

La detección específica de las proteínas presentes en los extractos se realizó mediante la técnica de Western-Blot. Esta técnica permite la identificación de proteínas específicas, gracias a la reacción antígeno anticuerpo, en extractos proteicos complejos procedentes de células, tejidos o fluidos biológicos.

Para la detección de las proteínas de interés se requiere la separación de éstas según su peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Cada una de las muestras fue preparada ajustando las cantidades de muestra y agua bidestilada que se debían añadir para tratar de conseguir una cantidad de muestra de 15µg por pocillo. Además, a cada una de las muestras se le añadieron 5µL de tampón de carga (Tris 40mM, EDTA, azul de bromofenol 0,01%, sacarosa 40%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%), obteniendo un volumen final de 25µL. Tras su preparación, se calentaron las muestras 5 minutos a 95°C y se procedió a la carga de las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida al 12% (agua MiliQ 4,3 mL, mix de acrilamida 3 mL, Tris 1.5M pH 8.8 2,5mL, SDS 10% 0,1mL, APS 10% 0,1mL y TEMED (tetrametiletildiamina) 0,004 mL) dentro una cubeta horizontal (BRAND, Wertheim, Germany) con el tampón tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 200mM, 0.1% SDS, pH 8.3), dejándose correr a un voltaje constante de 120V durante 1 hora.

En el caso de las muestras de histonas, las muestras para la electroforesis se prepararon para tener una cantidad final de histonas de 5µg, por otra parte el gel de poliacrilamida era del 15% (agua MiliQ 3,55 mL, mix de acrilamida 3,75mL, Tris 1.5M pH 8.8 2,5, SDS 10% 0,1mL, APS 10% 0,1mL y TEMED (tetrametiletildiamina) 0,004mL) y se dejó correr durante 50 minutos a un voltaje de 140V.

Transcurrida la electroforesis, se procedió a realizar la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Blotting Membrane 0.45µm, GE Healthcare Life Sciences) para llevar a cabo allí la detección específica utilizando anticuerpos. Para ello se empleó tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, metanol 20%) y un voltaje de 120V durante 1 hora a 4°C.

Tras la transferencia, el gel fue separado cuidadosamente de la membrana y se dejó teñir con solución azul Coomassie (Coomassie R-250 1.25 g, etanol 250mL, ácido acético 50mL y agua 1200mL), para luego desteñirlo con solución desteñidora (Etanol 100mL, ácido acético 100mL y agua bidestilada 800mL). Por otro lado la membrana se sumergió en tampón de bloqueo formado por 0.05 g/mL de leche desgrasada o 0.05 g/mL de BSA (según el anticuerpo) en TBS-Tween (Tris 20 mM, NaCl 137mM, pH 7.6, Tween 0.1%) durante una hora. El bloqueo evita la unión de proteínas a las impurezas de la membrana reduciendo así la detección de señales inespecíficas.

Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, se procedió a la detección de las proteínas mediante el uso de anticuerpos primarios contra anti-PARSilacion (1:1000, Santa Cruz BioTech. EE.UU.), anti-γH2AX (1:1000, abcam, Cambridge,UK), anti-catalasa (1:1000, Sigma, St. Louis, EE.UU.), anti-MnSOD (1:1000, Stressgen, Ann Arbor, MI, EE.UU.), anti-Gpx1 (1:1000, 1:1000, abcam, Cambridge,UK), anti-CuZnSOD (1:1000, Stressgen, Ann

Arbor, MI, EE.UU.) y  $\beta$ -actina (1:1000, Santa Cruz BioTech. EE.UU.), esta última como control de carga.

Los anticuerpos se diluyeron en TBS-Tween con 0.01 g/mL de leche en polvo desgrasada o 0.01 g/mL BSA, según el anticuerpo y se dejaron incubar durante toda la noche a una temperatura de 4°C en agitación suave.

Al día siguiente se lavaron las membranas tres veces con TBS-Tween para eliminar el exceso de anticuerpo que no se hubiera unido a la membrana. Tras los lavados, se incubó la membrana durante una hora en agitación suave con anticuerpo de cabra anti-ratón (1:7500, Calbiochem, USA) o de cabra anti-conejo (1:2500, Cell Signaling) ambos conjugados con el enzima peroxidasa de rábano. Tras la incubación, se realizaron de nuevo tres lavados con TBS-Tween y se procedió a la detección quimioluminiscente. Para ello, las membranas se incubaron en la oscuridad, con 2mL de la mezcla 1:1 de los reactivos del kit de revelado (ECLTM Western Blotting Detection Reagents, Amersham GE HealthcareBio-Science AB, Uppsala, Suecia) y tras 5 minutos de incubación se detectó la señal quimioluminiscente utilizando el escáner densitométrico (LAS-4000, General Electrics). Finalmente, los resultados se analizaron con el programa de análisis de imágenes Image software 4.0 Gauge.

## **6. Determinación del cociente glutatión oxidado (GSSG)/ glutatión reducido (GSH)**

Los niveles de GSSG/GSH se estudiaron utilizando el kit “The DetectX Glutathione kit” (Arbor Assays, Michigan, EE.UU.). Para ello se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se silenciaron mediante el procedimiento descrito anteriormente, de modo que el día 4 post-siembra, se procedió a la recuperación de las células. Se lavó cada pocillo dos veces con PBS, eliminándolo por completo en el último lavado. Seguidamente se añadieron 60 $\mu$ L de ácido 5-sulfosalicílico al 5% y se rascó con la ayuda de un “scraper” lo que permitió la rotura mecánica de las células y la agregación de las proteínas. Todo ello se realizó a una temperatura de 4°C. A continuación se recogieron las muestras en tubos de 1,5mL, y se incubaron a 4°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 14000rpm y una temperatura de 4°C. Tras la centrifugación se trasvasó el sobrenadante a un tubo nuevo diluyendo las muestras 1:5 con el tampón de ensayo proporcionado por el kit. A continuación, se preparó una placa de 96 pocillos en la que se añadieron 50 $\mu$ L de las muestras, los estándares y los controles.

En el pocillo correspondiente al cero se añadieron 50 $\mu$ L de diluyente de muestra, proporcionado por el kit. Al resto de pocillos se añadieron 25 $\mu$ L de ThioStar Reagent y se agitaron suavemente para conseguir una mezcla homogénea. Seguidamente se incubó la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se midió la señal de fluorescencia a una longitud de onda de 510nm excitando entre 370 y 410nm, obteniendo el valor de la concentración de GSH libre. Para la obtención de la concentración de GSH total se añadieron 25 $\mu$ L de una mezcla de reacción aportada por el kit, se mezclaron suavemente y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la señal de fluorescencia a

510nm con excitación 370-410nm. Por último, a partir de la recta patrón generada con los estándares, se obtuvieron los resultados de la concentración de GSH total y GSH libre.

La cantidad de GSSG se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$GSSG = \frac{GSH \text{ libre} - GSH \text{ total}}{2}$$

Para la obtención del ratio GSSG/GSH, se dividieron los valores correspondientes a ambas medidas, y se multiplicaron por 100.

## **7. Extracción de proteínas para su análisis mediante espectrometría de masas**

Se utilizaron los pellets celulares obtenidos mediante el protocolo de silenciamiento anteriormente descrito.

A cada una de las muestras, se le añadieron 150µL del tampón de extracción (Tris-HCL 20mM pH 7.5, EDTA 1mM, NaCl 150mM, SDS 0.1% w/v, Igepal 1% v/v, sodium pyrophosphate 30mM, sodium fluoride 50mM, sodium orthovanadate 50µM e inhibidor de proteinasas 4µL/mL) y se homogeneizó con la ayuda de una pipeta. A continuación se realizaron dos ciclos de sonicación con una amplitud del 30% durante 30 segundos con 5 segundos de descanso.

En el siguiente paso, se añadieron 75mL de TCA 10%, es decir en una proporción 2:1 (muestras:TCA), con el fin de precipitar las proteínas. Se centrifugaron las muestras a 5000rpm durante 5 minutos a 4°C, y se descartó el sobrenadante. Por último, se resuspendió el pellet con 30µL de hidróxido sódico 1N.

Una vez obtenidas las muestras se cuantificaron por el método de Bradford y se llevaron al servicio de masas de la Universitat de València en Burjassot para su análisis.

## **8. Extracción de ARN**

La extracción de ARN se realizó con el propósito de analizar la expresión génica de algunos genes de interés. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos y fueron tratadas mediante el protocolo de silenciamiento descrito.

Una vez pasadas 24h de la última transfección, se lavaron los pocillos 2 veces con 500µL PBS y se trataron con 150µL de tripsina para despegar las células de la superficie de la placa, incubándose a 37°C durante 5 minutos. Para inactivar la tripsina se añadieron 500µL medio DMEM suplementado y se recogió el contenido de cada placa en un tubo. Estas muestras se centrifugaron 5 minutos a 1500rpm a temperatura ambiente. Una vez centrifugadas se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron los pellets en PBS y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones.

A continuación, se empleó el kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein (Macherey-Nagel, Düren, Germany) para obtener el ARNm según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. A continuación se procedió a cuantificar la cantidad de ARNm presente en cada una de las muestras mediante utilizando el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para finalmente congelarlas a -80°C.

## 9. Análisis por RT-qPCR

La cuantificación de la expresión génica, se realizó utilizando una variante de la PCR que permite cuantificar la cantidad de ARNm a la vez que se amplifica la secuencia específica del gen que se desea cuantificar: RT-qPCR. Para llevar a cabo la cuantificación, es necesario en primer lugar obtener el ADN complementario (ADNc) al ARNm del gen de interés ya que la qPCR utiliza ADN. Por ello, se realizó una retrotranscripción (RT-PCR) que fue preparada en una placa de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 10µL de la muestra correspondiente de ARN (200ng de muestra, completando hasta los 10 µL con agua libre de ARNasas) y 10 µL de mix de PCR (10xRT buffer (2 µL), 25x dNTP Mix 100mM (2 µL), 10x Random primers (0.8 µL), multiscribe reverse transcriptasa (1 µL) y agua libre de nucleasas (4.2 µL)) (High-Capacity cADN Archive kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Se introdujeron en el Termociclador 9800 Fast Thermal Cycle (Applied Biosystems) y se dejaron en un primer paso de incubación a 25°C durante 10 minutos que permite la unión de los hexámeros aleatorios, seguido de un periodo de 120 minutos a 37°C que permite la síntesis del ADNc y una fase final de inactivación a 95°C durante 5 minutos.

Una vez obtenido el ADNc se procedió a la cuantificación mediante qPCR. En nuestros experimentos se utilizaron los ensayos prediseñados de Taqman Gene expression assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU) que emplean sondas fluorescentes que poseen en uno de sus extremos un fluoróforo y en el otro extremo un “quencher” que evita la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo del otro extremo. Sin embargo, una vez se han unido las sondas, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa elimina uno de los extremos, alejando al “quencher” del fluoróforo y permitiendo, por tanto, la emisión de fluorescencia por. Ambas fluorescencias (quencher y fluoróforo) son detectadas tras la excitación con el láser correspondiente.

Para llevar a cabo esta PCR se colocó 1µL de cada una de las muestras en los pocillos correspondientes de una placa de 384 pocillos y se añadieron 3.5µL de agua libre de ARNasas, 1µL TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Life Technologies) y 5 µL TaqManH Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, P/N 4304437, Foster City, CA. EE.UU.) obteniendo un volumen total por pocillo de 10 µL. formados por la mezcla de los cebadores específicos para SOD1 (Hs00533490\_m1, Life Technologies), SOD2 (Hs00167309\_m1, Life Technologies), Gpx-1 (Hs00829989\_m1, Life Technologies), CAT (Hs 00156308, Life Technologies), oGG1 (Hs 00213454\_m1, Life Technologies), XPA (Hs00166045\_m1, Life Technologies), WRN (Hs01087915\_m1, Life Technologies), RAD51 (Hs00947967\_m1, Life Technologies), RAD53 (Hs00200485\_m1, Life Technologies), PARP (Hs 00242302\_m1, Life Technologies), p53 (Hs01034249\_m1, Life Technologies) y glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Hs02758991\_g1, Applied

Biosystems),. Las muestras se colocaron por triplicado para cada uno de los genes y se cuantificó en el termociclador ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA. EE.UU.). Se mantuvo durante 10 minutos a 95°C para activar el enzima, seguido de 40 ciclos en los que se mantuvo la temperatura a 95°C durante 15 segundos para disminuirla a 60°C durante un minuto.

A partir de la señal de fluorescencia detectada, la cuantificación se puede hacer de manera absoluta, obteniendo la cantidad exacta de moléculas de ADN por comparación con una curva estándar, o de manera relativa empleando genes de referencia con expresión constitutiva para determinar las diferencias que existen entre ellos y los genes de interés.

En este caso se empleó la cuantificación relativa que utiliza el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001) para la obtención de estos datos relativos. Para ello se emplean valores de CT (*cycle threshold*), correspondiente al número de ciclo de PCR en el cual la fluorescencia detectada se diferencia del ruido de fondo. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial y es característico de cada una de las reacciones.

El método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  permite comparar la CT del gen problema con la CT del gen de referencia. En este caso se empleó GAPDH como gen de referencia, mediante la ecuación  $2^{-\Delta\Delta CT}$  dónde:

$$\Delta\Delta CT = (Ct_{gen\ interés} - Ct_{gen\ referencia})_{silenciado} - (Ct_{medio\ gen\ interés} - Ct_{medio\ gen\ referencia})_{Mock}$$

Para poder aplicar esta fórmula es necesario que la eficiencia de la reacción en ambos genes, el problema y el de referencia, sea aproximadamente igual. Para ello se compararon las curvas estándar de cantidades de ARN conocidas para cada uno de los dos genes. Conociendo las pendientes de las rectas obtenidas, a partir de representar el logaritmo de la concentración frente al CT, se comprobó que la eficiencia de reacción era similar en ambos genes.

## 10. Análisis estadístico

En el análisis estadístico de los resultados, fueron referenciados todos los grupos frente al MOCK, ya se centró el interés en ver las diferencias que existían dentro de cada subgrupo. Para ello se tomó la media aritmética como la medida de la tendencia principal de los datos mientras que la desviación estándar se utilizó como medida de la dispersión de los datos. Al tratarse de muestras independientes, y no presentar normalidad (no paramétrico) debido a que la n es muy baja, se aplicó el test de Mann-Whitney-Wilcoxon (Fay and Proschan, 2010). El tamaño de la muestra utilizado en cada subgrupo para la determinación analítica fue de n=3, y se empleó un nivel alfa de significación estadística de p<0.05.

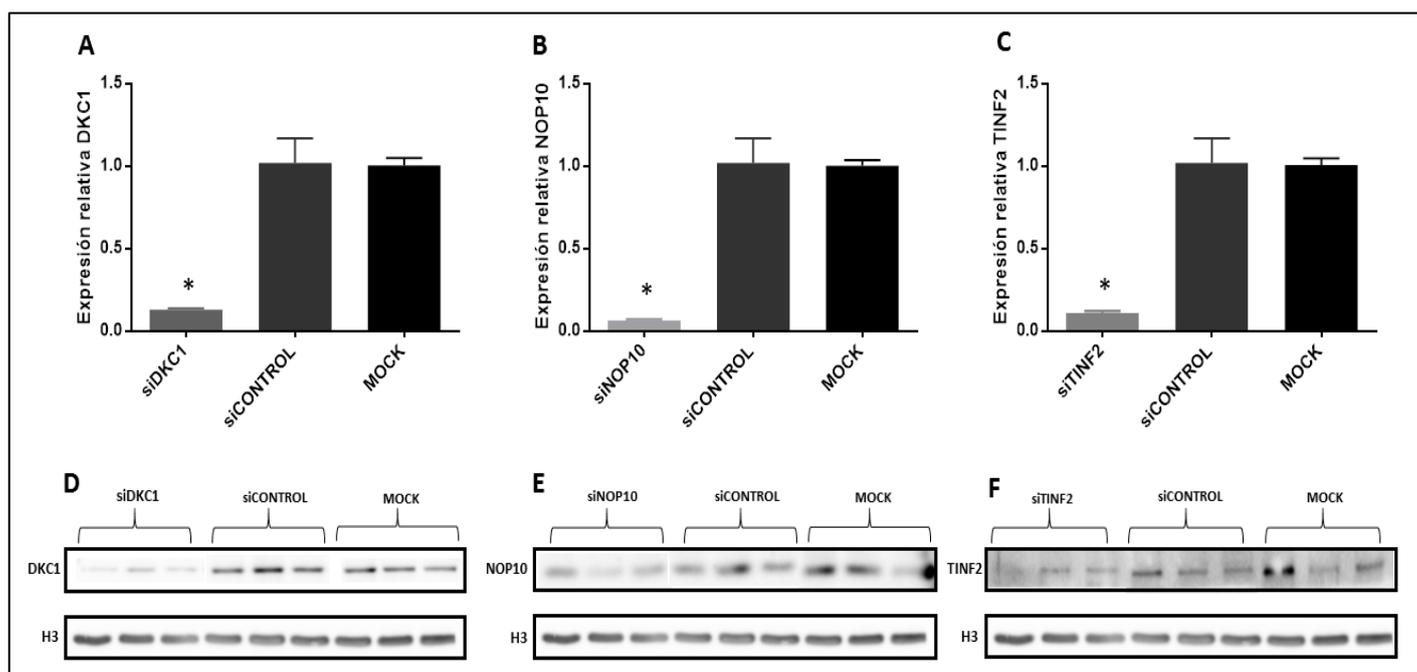
## V. RESULTADOS

### 1. Caracterización de los modelos celulares

Los resultados del silenciamiento muestran una reducción de la expresión génica hasta un 90% en los genes de interés.

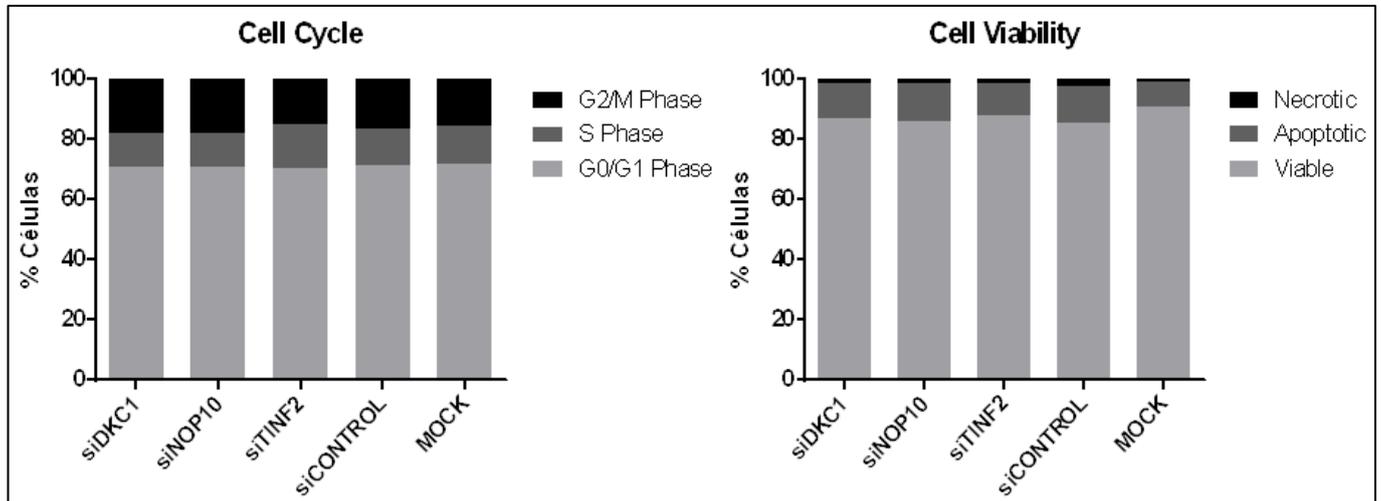
En la Figura 8, se muestran los resultados de una RT-qPCR llevada a cabo a las 48 horas tras la transfección, donde se observa que la expresión de los genes silenciados en las poblaciones celulares correspondientes es mucho menor a la expresión de estos mismos genes en las poblaciones control y MOCK.

Además, se muestran también los resultados del análisis mediante Western-Blot, de la cantidad de proteína silenciada, presente en cada una de las poblaciones, observándose una disminución en la concentración de proteína en las poblaciones tratadas con los ARNi correspondientes. En los resultados de silenciamiento proteico se observó una disminución hasta de un 50%. En estos casos la disminución es menor debido a que algunas proteínas presentan un tiempo de vida media mayor, no obstante, con tal porcentaje se considera que las proteínas están silenciadas.



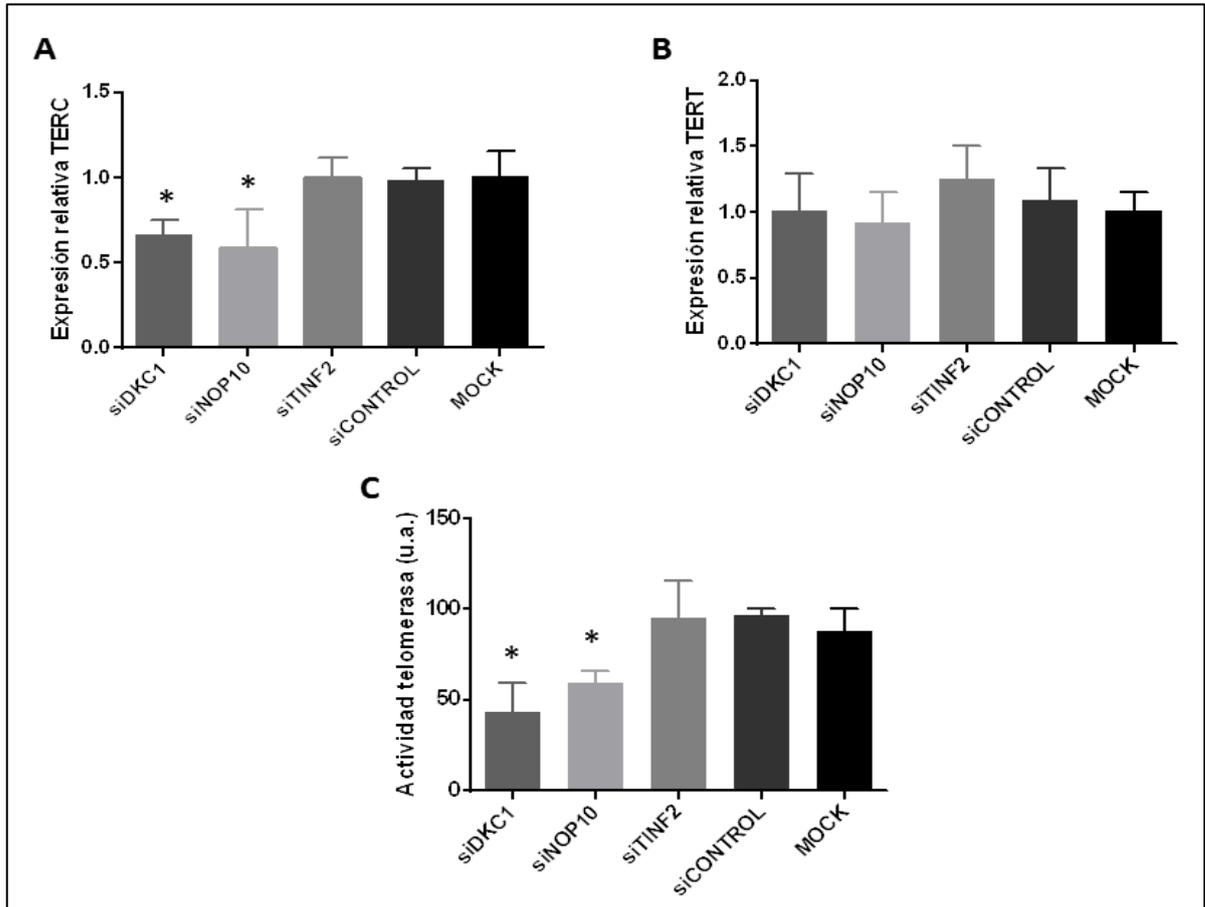
**Figura 8. Expresión génica relativa y expresión proteica de los genes silenciados.** A. Representación gráfica de la expresión relativa de *DKC1* en la población silenciada mediante el siDKC1, frente a las poblaciones control y MOCK. B. Representación gráfica de la expresión relativa de *NOP10* en la población silenciada mediante el siNOP10, frente a las poblaciones control y MOCK. C. Representación gráfica de la expresión relativa de *TINF2* en la población silenciada mediante el siTINF2, frente a las poblaciones control y MOCK. Los resultados están representados por la media y la SD de tres experimentos independientes. "\*" indica diferencias significativas respecto al MOCK. D. Imagen de Western-Blot para la proteína *DKC1* y H3 (control) para tres réplicas de la población tratada con siDKC1, con siCONTROL y para la población sin modificar, respectivamente. E. Imagen de Western-Blot para la proteína *NOP10* y H3 (control) para tres réplicas de la población tratada con siNOP10, con siCONTROL y para la población sin modificar, respectivamente. F. Imagen de Western-Blot para la proteína *TINF2* y H3 (control) para tres réplicas de la población tratada con siTINF2, con siCONTROL y para la población sin modificar, respectivamente.

Mediante citometría de flujo se determinó el estado del ciclo celular en cada una de las poblaciones, y se determinó también la viabilidad celular post-silenciamiento, con tal de determinar que el trabajo se estaba llevando a cabo con células vivas y que éstas no habían detenido su ciclo celular. Los resultados obtenidos de estos análisis se muestran en la Figura 9, donde se observa que la viabilidad celular es mayor al 80% en todas las poblaciones y además, no aparecen diferencias significativas en el ciclo celular.



**Figura 9. Ciclo celular y viabilidad celular.** A. Representación gráfica del porcentaje celular que se encuentra en cada uno de los estadios del ciclo celular 48h tras la transfección con el ARNi correspondiente a cada población. B. Representación gráfica del porcentaje de células viables, necróticas y apoptóticas en cada una de las poblaciones celulares, 48h post-transfección con el ARNi.

Por último se midieron los niveles de expresión génica de las dos subunidades del core de la telomerasa, y se determinó también la actividad telomerasa (Figura 10), mediante una RT-qPCR adaptada. Se observa una disminución significativa en la expresión de la subunidad *TERC* para las poblaciones siDKC1 y siNOP10 (Figura 10A), que correlaciona con una disminución de la actividad telomerasa en ambas poblaciones (Figura 10C).

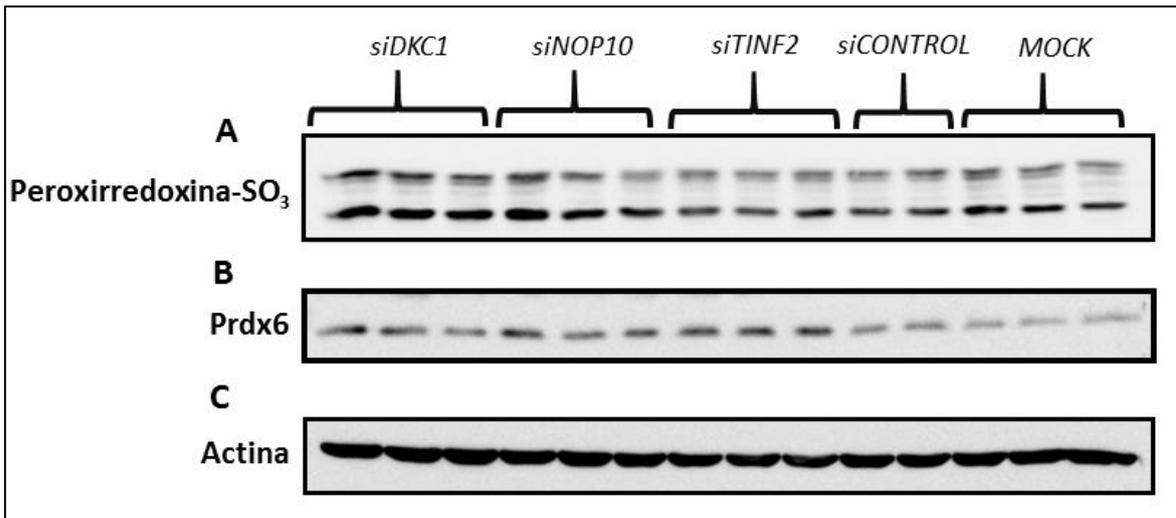


**Figura 10. Expresión relativa de *TERC* y *TERT* y actividad telomerasa.** A) Representación gráfica de la expresión relativa de la proteína *TERC* en las distintas poblaciones. B) Representación gráfica de la expresión relativa de la proteína *TERT* en las distintas poblaciones. C) Representación gráfica de la actividad telomerasa en las distintas poblaciones. Los resultados están representados por la media de tres experimentos independientes. “\*” indica una diferencia significativa entre los valores de esa población y la población MOCK.

## 2. Aumento del estrés oxidativo en las poblaciones celulares con genes silenciados

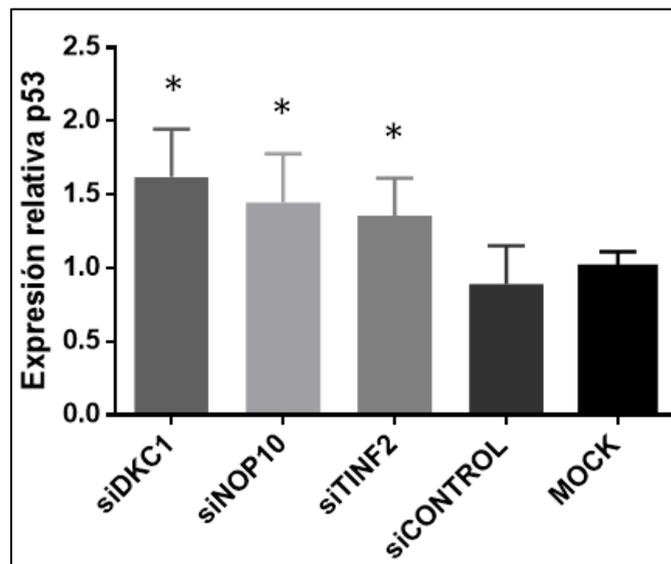
En el estudio de las marcas oxidativas, se estudiaron los niveles de peroxirredoxina y peroxirredoxina oxidada para determinar el perfil oxidativo de las distintas poblaciones celulares, la peroxirredoxina tienen capacidad antioxidantes además se oxida en condiciones de estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos mediante Western Blot muestran como los niveles de peroxirredoxina oxidada (Peroxirredoxina-SO<sub>3</sub>) son mayores en las poblaciones siDKC1 y siNOP10, mientras que no se observan diferencias para siTINF2 (Figura 11A). Por otro lado, los niveles de peroxirredoxina (Prdx6) están aumentados para las poblaciones siDKC1, siNOP10 y siTINF2 (Figura 11B). Ambos resultados nos sugieren la presencia de un estrés oxidativo.



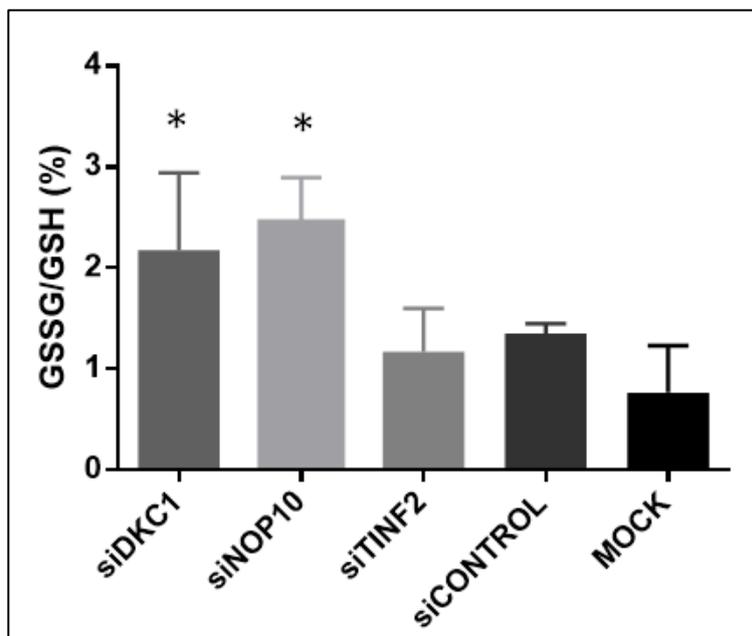
**Figura 11. Evaluación de los niveles de peroxirredoxina en los diferentes grupos de células HeLa.** A. Imagen de la membrana de Western Blot para la determinación de la peroxirredoxina oxidada en las diferentes poblaciones celulares. B. Imagen de la membrana de Western Blot para la determinación de la peroxirredoxina en las diferentes poblaciones celulares. C. Imagen de la membrana de Western Blot para la determinación de la actina (control) en las diferentes poblaciones celulares.

Se determinó también la expresión relativa de p53, se trata de un gen que su expresión se ve alterada por la presencia de estrés oxidativo, se realizó la medida mediante RT-qPCR, observándose un aumento significativo de la expresión en las poblaciones que presentan genes silenciados (siDKC1, siNOP10 y siTINF2), respecto a la población MOCK (Figura 12). Apuntando a que existe un estrés celular en las líneas silenciadas.



**Figura 12. Expresión relativa de p53.** Representación gráfica de la expresión relativa de p53 para las diferentes poblaciones silenciadas y sus controles. Resultados obtenidos por RT-qPCR y calculados mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los resultados de la expresión relativa están representados por la media y la SD de tres experimentos independientes. "\*" indica diferencias significativas respecto a MOCK.

Otro parámetro utilizado en el estudio del estrés fue el ratio entre el glutatión oxidado y el glutatión reducido (GSSG/GSH), utilizando el kit “The DetectX Glutathione kit”, para mostrar el perfil de estrés oxidativo de los cultivos celulares. En los resultados obtenidos el ratio GSSG/GSH aparece aumentado en la población siDKC1 y siNOP10, indicándonos que hay una mayor oxidación del GSH y por tanto la presencia de estrés oxidativo (Figura 13).



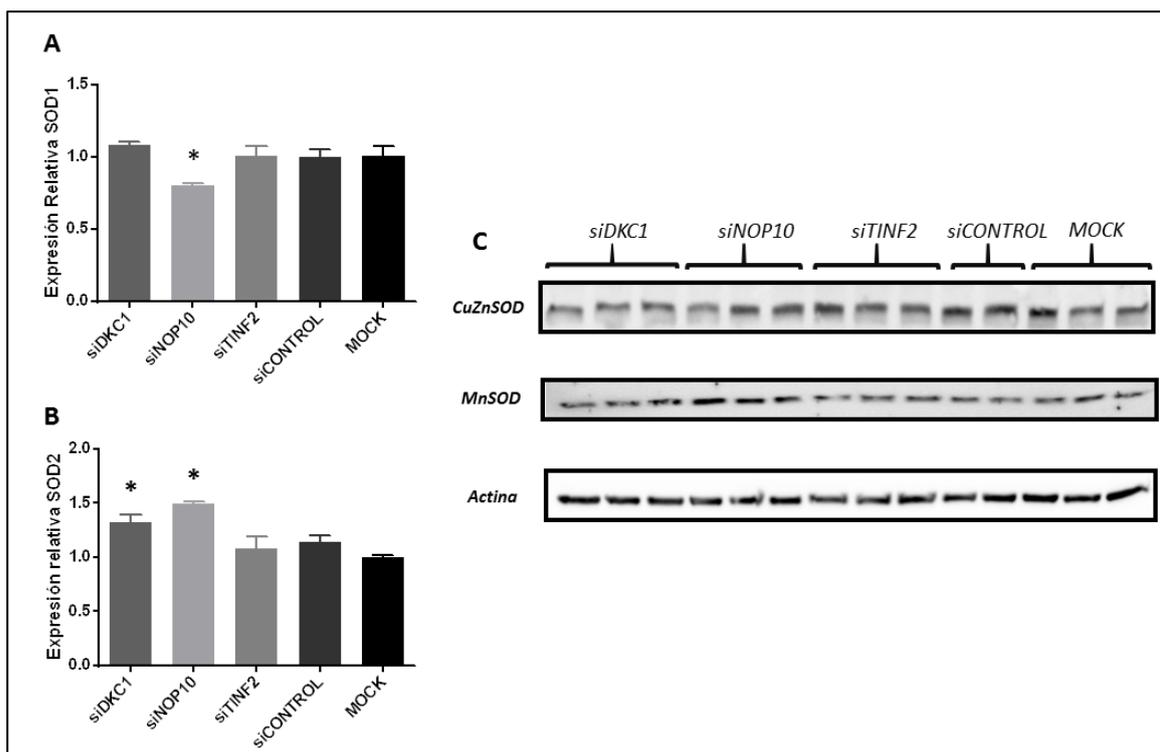
**Figura 13. Ratio GSSG/GSH.** Representación gráfica del ratio entre glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH). Los resultados están representados por la media y la SD de tres experimentos independientes por triplicado. “\*” indica diferencias significativas respecto a MOCK.

### 3. El silenciamiento génico produce una desregulación de las defensas antioxidantes

Tras la determinación del estado oxidativo de las distintas poblaciones celulares, se procedió a la caracterización de los principales sistemas antioxidantes celulares.

En primer lugar se cuantificaron los niveles de expresión de las enzimas superóxido dismutasa, SOD1 y SOD2, implicadas en la primera línea de defensa antioxidante encargadas de la reducción del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Los resultados, obtenidos mediante RT-qPCR muestran una disminución en la expresión de SOD1 cuando *NOP10* está silenciado, no observándose diferencias para siDKC1 y siTINF2 (Figura 14A). La expresión de SOD2 está aumentada en las poblaciones siDKC1 y siNOP10, mientras que no se observan diferencias significativas en siTINF2 (Figura 14B).

El estudio de los niveles de proteínas codificadas por estos genes, que se realizó mediante Western-Blot, permitió identificar un aumento en los niveles proteicos de MnSOD (proteína codificada por SOD2) para siNOP10 (Figura 14C), datos que correlación muy bien con los obtenidos para la expresión génica de SOD2 en el grupo de siNOP10 (Figura 14B), donde se observó también un aumento de la expresión.

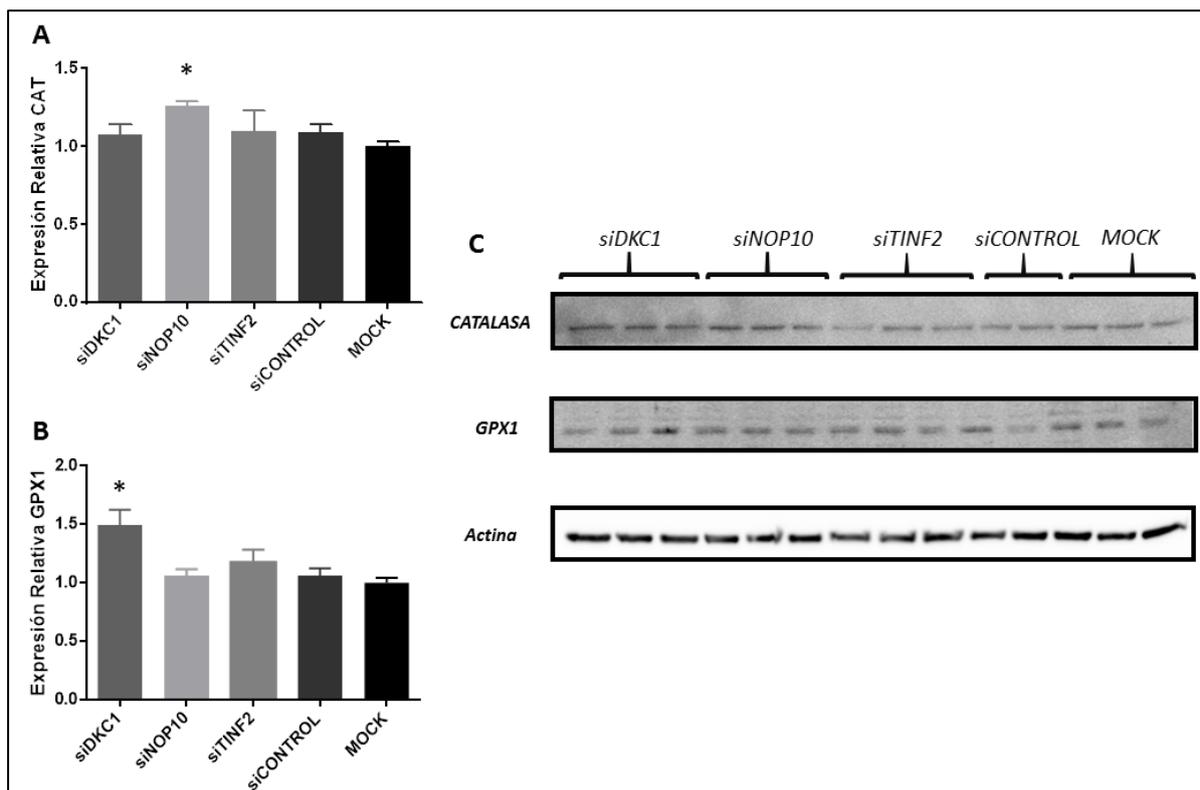


**Figura 14. Expresión relativa de SOD1 y SOD2 en las distintas poblaciones celulares.** **A.** Representación gráfica de la expresión relativa de SOD1 en cada una de las poblaciones celulares. **B.** Representación gráfica de la expresión relativa de SOD2 en cada una de las poblaciones celulares. Para la expresión relativa de SOD1 y SOD2 los resultados se obtuvieron por RT-qPCR, se calcularon mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y aparecen representados por la media y la SD de tres experimentos independientes. “\*” indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la población MOCK. **C.** Imagen de la membrana de WB para la determinación de CuZnSOD, MnSOD y actina (control) para las poblaciones silenciadas y los controles.

Estos resultados muestran que si se producen desregulaciones de las enzimas antioxidantes encargadas de la detoxificación del superóxido, aparecen cambios que se observan sobretodo a nivel de expresión génica.

Se determinaron también los niveles de expresión de los genes que codifican para la catalasa (*CAT*) y glutatión peroxidasa (*GPX1*) en las distintas poblaciones celulares, correspondientes a la segunda línea de defensa celular encargadas de la detoxificación del peróxido de hidrógeno, mediante RT-qPCR. Se observó un aumento en la expresión relativa de *CAT* en la población siNOP10 mientras que no se observaron diferencias significativas para el resto de poblaciones (Figura 15A). Además, se observó que la expresión de *GPX1* está aumentada en la población siDKC1, pero no aparecen diferencias para el resto de poblaciones (Figura 15B).

El estudio de las proteínas codificadas por estos genes, se realizó mediante Western Blot. En este caso, no se apreciaron diferencias significativas para los niveles de ambas proteínas en ninguna de las poblaciones (Figura 15C).



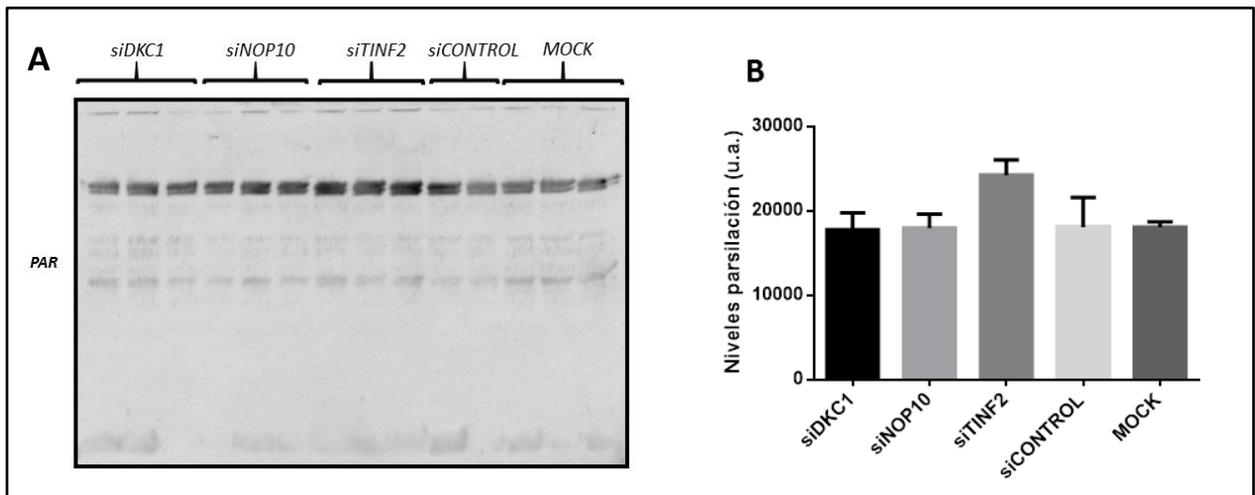
**Figura 15. Expresión relativa de CAT y GPX1 en las distintas poblaciones celulares.** **A.** Representación gráfica de la expresión relativa de catalasa (CAT) en cada una de las poblaciones celulares. **B.** Representación gráfica de la expresión relativa de glutatión peroxidasa (GPX1) en cada una de las poblaciones celulares. Para la expresión relativa de CAT y GPX1 los resultados se obtuvieron por RT-qPCR, se calcularon mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y aparecen representados por la media y la SD de tres experimentos independientes. “\*” indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la población MOCK. **C.** Imagen de la membrana de WB para la determinación de catalasa, glutatión peroxidasa (GPX1) y actina (control) para las poblaciones silenciadas y los controles.

#### 4. Aumento del daño al ADN en los diferentes subgrupos silenciados

Siguiendo los objetivos del trabajo, se analizaron diferentes parámetros para cuantificar el daño al ADN, como fueron la parsilación y los niveles de  $\gamma$ H2AX en extractos de histonas. Se realizaron los experimentos con histonas, porque son las más susceptibles de sufrir daño en procesos más agudos, como lo que ocurre en este trabajo.

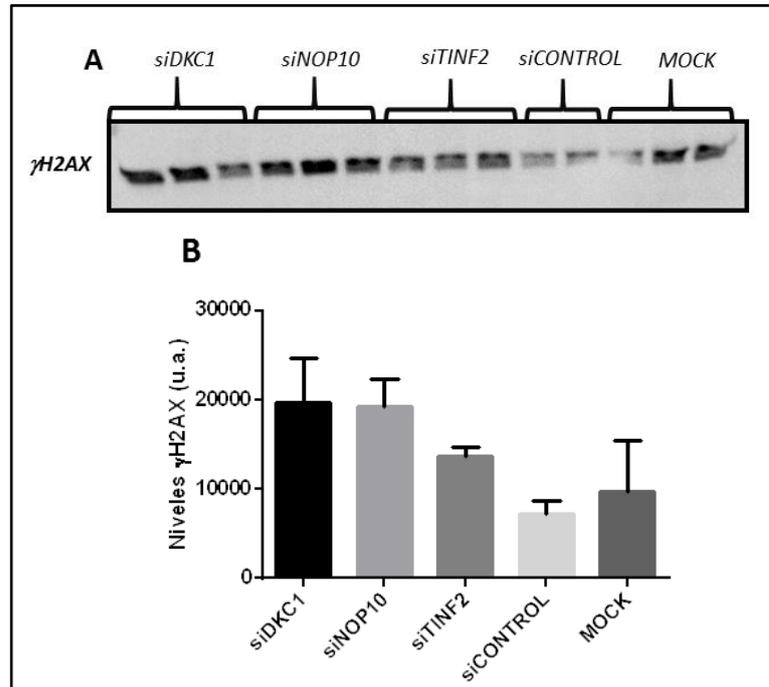
En primer lugar, se estudiaron los niveles de parsilación, mediante la detección por Western Blot de las cadenas de poli-ADP-ribosa (PAR) sobre las histonas, puesto que cuando la proteína PARP-1 detecta un daño en el ADN, inmediatamente añade la proteína PAR a las histonas H1 y H2B permitiendo la relajación de la cadena de cromatina y por tanto una mayor accesibilidad al ADN que facilitará el acceso de la maquinaria de reparación. (Dantzer et al., 2006)

Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las poblaciones, sí se observó un aumento en los niveles de parsilación para siTINF2 (Figura 16B). Estos datos sugieren la presencia de mayor daño al ADN cuando la subunidad *TINF2* está silenciada.



**Figura 16. Niveles de parsilación en las distintas poblaciones celulares.** **A.** Imagen de la membrana de Western Blot para la determinación de la proteína PAR (Poli-ADP-ribosa) para las distintas poblaciones celulares. **B.** Representación gráfica de los niveles de parsilación de las distintas poblaciones. Resultados obtenidos mediante densitometría y representados por la media aritmética y la SD de tres experimentos independiente

El otro parámetro analizado fueron los niveles de la proteína  $\gamma$ H2AX en las diferentes poblaciones. Igual que ocurrió con los niveles de parsilación, no se observaron diferencias significativas pero se observó un aumento en los niveles de  $\gamma$ H2AX en siDKC1 y siNOP10, como se muestra en la Figura 17. Estos resultados nos indican de nuevo que existe un daño al ADN, que probablemente tiene su origen en el estrés oxidativo.

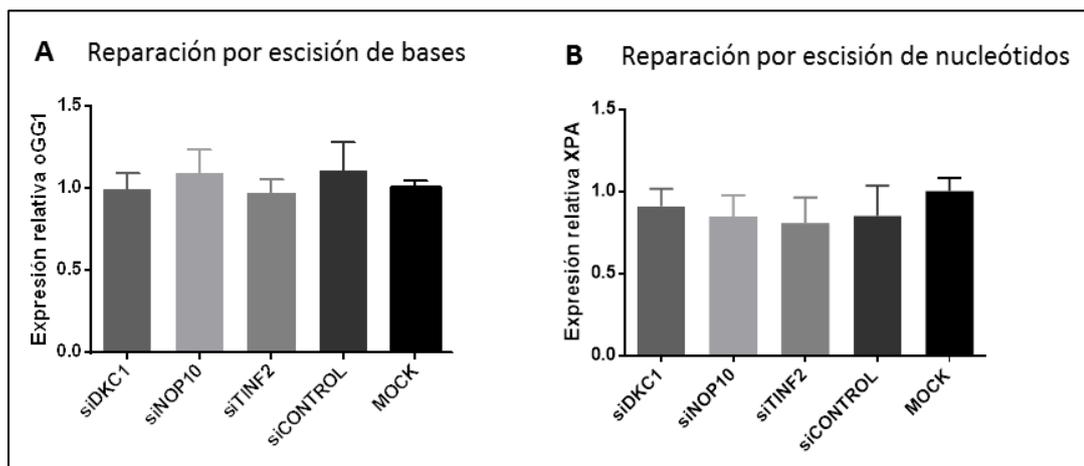


**Figura 17. Niveles de  $\gamma$ H2AX en las distintas poblaciones celulares.** **A.** Imagen de la membrana del Western Blot para la determinación de la proteína  $\gamma$ H2AX en las distintas poblaciones celulares. **B.** Representación gráfica de los niveles de  $\gamma$ H2AX de las distintas poblaciones. Resultados obtenidos mediante densitometría y representados por la media aritmética y la SD de tres experimentos independientes.

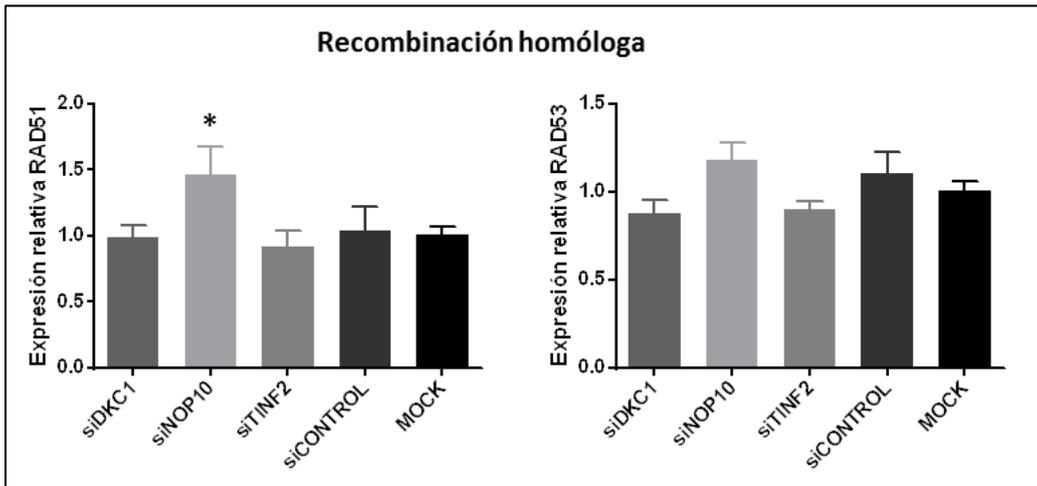
## 5. Cambios en la expresión de las enzimas implicadas en las distintas rutas de reparación del ADN

Con los resultados obtenidos previamente y con los del estudio de las matrices de expresión. Se decidió determinar los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas que se consideraron más representativas de cada una de las rutas de reparación del ADN. Este estudio nos permitió determinar si el daño al ADN no solo se producía por el estrés oxidativo, sino que también puede deberse a fallos en las enzimas de reparación.

En el análisis de la ruta de reparación del ADN por escisión de bases, se analizó la expresión relativa del gen *oGG1*, representativo de esta ruta. Se observó que no habían diferencias significativas entre las distintas poblaciones (Figura 18A). Se estudió también la ruta de reparación por escisión de nucleótidos, para ello se analizó la expresión relativa del gen XPA, representativo de esta ruta molecular. En los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas entre ninguna de las poblaciones respecto a MOCK (Figura 18B). Estos resultados nos hacen pensar que ante la falta de los genes del complejo o shelterina las rutas de reparación que se ven alteradas para reparar el daño al ADN implicarán mecanismos más complejos como los de recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos.

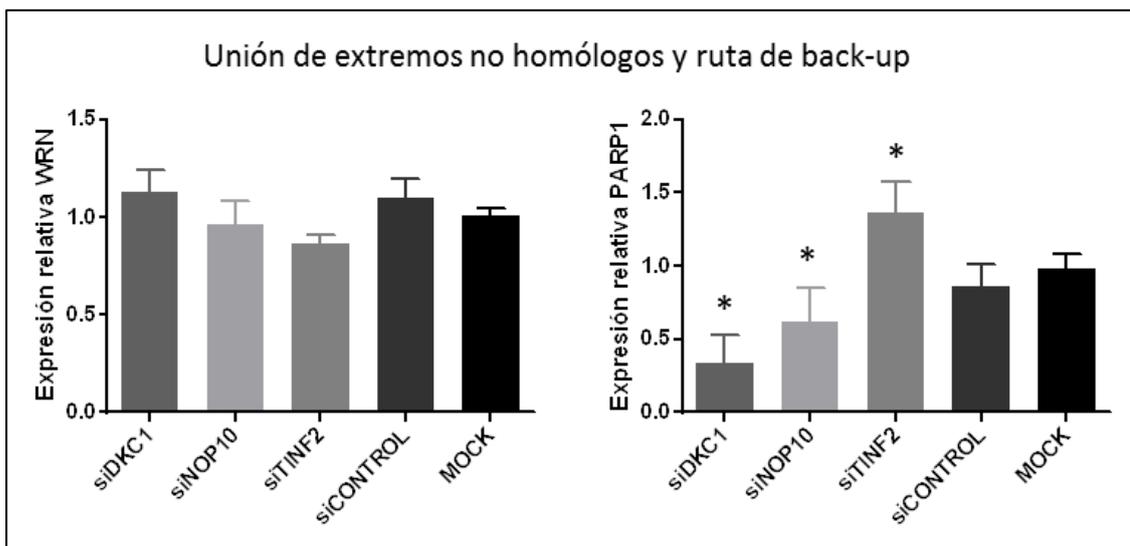


Para el estudio de la recombinación homóloga, se seleccionaron dos genes representativos de la ruta, *RAD51* y *RAD53*, detectándose un aumento en la expresión de *RAD51* para línea celular *siNOP10*, mientras que la expresión de ambos genes en el resto de poblaciones celulares no presenta diferencias significativas (Figura 19).



**Figura 19. Recombinación homóloga.** Representación gráfica de la expresión de los genes RAD51 y RAD53 para cada una de las poblaciones celulares. Los resultados se obtuvieron por RT-qPCR, se calcularon mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y aparecen representados por la media y la SD de tres experimentos independientes. "\*" indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la población MOCK.

Por último, en el estudio de la unión de extremos no homólogos, se determinó la expresión del gen WRN, una helicasa, no observándose diferencias significativas entre las distintas poblaciones respecto al MOCK. Además se analizó la expresión del gen PARP-1, representativo de la ruta de *back-up*, donde se observó disminuida la expresión de este en las poblaciones siDKC1 y siNOP10, mientras que estaba aumentada en siTINF2 (Figura 20), estos resultados concuerdan muy bien con lo obtenido en los westerns blots de daño al ADN en histonas, donde vemos un aumento de la parsilación cuando *TINF2* esta silenciada, datos que correlacionan muy bien con la literatura científica donde se conoce que *TINF2* es un modulador de la actividad de PARP1 y que cuando este esta inhibido la expresión de PARP1 aumenta.



**Figura 20. Unión de extremos no homólogos y ruta de back-up.** Representación gráfica de la expresión relativa de los genes WRN y PARP-1 en cada una de las poblaciones celulares. Los resultados se obtuvieron por RT-qPCR, se calcularon mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y aparecen representados por la media y la SD de tres experimentos independientes. "\*" indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la población MOCK.

## VI. DISCUSIÓN

---

La Disqueratosis congénita es una enfermedad heterogénea, cuya principal característica a nivel molecular es un acortamiento telomérico originado por una deficiencia en las proteínas del complejo telomerasa o del telosoma (Holohan et al., 2014). Además, numerosos estudios han detectado que en esta enfermedad se produce un incremento en el estrés oxidativo y en el daño al ADN en las células de estos pacientes (Pereboeva et al., 2014).

A su vez, el aumento del estrés oxidativo, provoca un acortamiento de los telómeros todavía mayor (Kawanishi and Oikawa, 2004), es decir, puede ser entendido como un mecanismo secundario responsable de la fisiopatología de la enfermedad, siendo el principal mecanismo responsable la deficiencia de actividad telomerasa. Sin embargo, el origen de este estrés oxidativo en los pacientes de DC, no es del todo conocido, aunque hay evidencias que relacionan un papel fundamental de la telomerasa en la regulación del estrés oxidativo, mediante mecanismos independientes al mantenimiento de los telómeros (Saretzki, 2009).

En el presente trabajo, se han utilizado tres modelos celulares distintos, obtenidos mediante silenciamiento génico. Puesto que la DC es una enfermedad crónica, el trabajo con modelos celulares se dificulta, ya que para reproducir un modelo celular que presente el acortamiento telomérico propio de los enfermos de DC, se requieren tiempos de cultivo muy largos, que permitan diversos ciclos de replicación celular de forma que la deficiencia de la actividad telomerasa se vea traducida en un acortamiento telomérico. No obstante, la tecnología de silenciamiento génico optimizada por los miembros de este grupo y empleada en este trabajo, permitió estudiar el efecto agudo producido por el silenciamiento en las líneas celulares modelo.

Por tanto, los modelos generados deben ser entendidos como modelos agudos de la enfermedad, que permitirán dilucidar los mecanismos moleculares que actúan en los eventos más tempranos.

### 1. Caracterización de los modelos celulares

El grupo de investigación donde se realizó este trabajo, había optimizado previamente un método de silenciamiento secuencial, que permitió obtener los modelos celulares para llevar a cabo los experimentos.

Se trabajó con 5 poblaciones celulares distintas:

- siDKC1
- siNOP10
- siTINF2
- siCONTROL
- MOCK

En las tres primeras se silenciaron los genes *DKC1*, *NOP10* y *TINF2* respectivamente, siendo estos genes representativos de cada uno de los tipos de herencia de la DC, además de ser elementos estructurales del complejo telomerasa (*DKC1* y *NOP10*) o shelterina (*TINF2*).

La cuarta población fue tratada con un ARNi control, que contiene secuencias aleatorias, con tal de determinar que ni la lipoafectamina ni la propia tecnología de silenciamiento no altera las células y por tanto las diferencias observadas no están siendo generadas por el silenciamiento.

Por último, la quinta población, son células sin tratamiento alguno (MOCK), siendo esta línea la que utilizó como población de referencia en todo el estudio.

En la caracterización de estos modelos, se observa que se consigue reducir la expresión relativa de los genes silenciados hasta un 90% y los niveles de proteína codificada por estos genes (Figura 8) un 50%, lo que indica que el silenciamiento génico está siendo correcto.

Por otra parte, los modelos celulares con los que se ha trabajado, no ven afectados sus ciclos celulares ni su viabilidad celular (Figura 9) como consecuencia de la tecnología de silenciamiento. Estos resultados indican que nuestro modelo celular es un buen modelo de estudio, ya que no se produce muerte celular, y sobre todo se evita el problema de la detención del ciclo celular, tan común en otros estudios donde se generan modelos silenciados estables, lo que permitió trabajar de forma rápida y sencilla.

En cuanto a los resultados relativos a la expresión de las subunidades del núcleo de la telomerasa, muestran como en las poblaciones con los genes *DKC1* y *NOP10* silenciados, la expresión relativa de la subunidad *TERC* disminuye (Figura 10A). Esta disminución puede ser debida a un mecanismo que presenta la célula para optimizar recursos, puesto que al ser *DKC1* y *NOP10* proteínas que forman parte de la telomerasa, su carencia provoca que no se ensamble el complejo, por tanto, la célula deja de sintetizar *TERC*, resultados que están de acuerdo con células madre que expresan la mutación A353V en el gen de la disquerina (He et al., 2009). Sin embargo, no ocurre lo mismo con las poblaciones que carecen de *TINF2*, puesto que esta no forma parte del complejo telomerasa y por tanto no condiciona su ensamblaje.

Por otra parte, la expresión relativa de *TERT* no se ve modificada en ninguna de las poblaciones (Figura 10B) lo que podría ser debido a que esta tiene funciones extra-teloméricas, es decir, tiene funciones que van más allá del mantenimiento de los telómeros (Martínez and Blasco, 2011). Por tanto aunque no se ensamble el complejo de la telomerasa, la proteína *TERT* sigue siendo útil para la célula en la realización de estas funciones ajenas al mantenimiento telomérico por lo que se sigue expresando.

Se observa también una correlación entre la disminución de la expresión de la subunidad *TERC* y una disminución en la actividad telomerasa (Figura 10C), tal y como se ha sido descrito previamente (Samper et al., 2001) y que sería acorde con la disminución del número de copias de *DKC1* y *TERC* en la célula.

## 2. Evaluación de los parámetros de estrés oxidativo

Para tratar de determinar si aparecía estrés oxidativo en un modelo agudo, se evaluaron distintos parámetros.

Los resultados obtenidos muestran como la peroxirredoxina, enzima encargada de eliminar peróxidos, se encuentra en cantidades superiores en las poblaciones que presentan los genes silenciados (Figura 11B), en comparación con las poblaciones control y MOCK. Este aumento de la expresión, puede deberse a un mecanismo de defensa de la célula, que ante condiciones de estrés oxidativo, aumenta la expresión de esta proteína encargada de contrarrestar estas condiciones adversas. En el caso concreto de la peroxirredoxina, se ha detectado una correlación entre el estrés oxidativo y el aumento de la expresión del gen codificante para la peroxirredoxina (Kim et al., 2003). Otro parámetro de estudio fue la cuantificación de la peroxirredoxina oxidada, mostrando los resultados que las tres poblaciones silenciadas no se comportan del mismo modo, observándose niveles más elevados de peroxirredoxina oxidada para las poblaciones siDKC1 y siNOP10, pero no para siTINF2 (Figura 11A).

La peroxirredoxina es una de las enzimas que primero se oxida en presencia de peróxidos (Poynton and Hampton, 2014), por ello, suponemos que lo que está ocurriendo es que las poblaciones siNOP10 y siDKC1, tienen mayores niveles de estrés oxidativo (Figura 10C), probablemente debido a que hay una disfuncionalidad en las rutas metabólicas o un mal funcionamiento mitocondrial (Pallardó et al., 2010).

Como hemos indicado, los niveles aumentados de peroxirredoxina oxidada indican que las líneas celulares estarían sometidas a un mayor estrés oxidativo. Para validar esta idea se midieron los niveles de GSH y GSSG, para calcular el ratio y establecer el balance redox celular en estas líneas (Grimes AJ., 1966). Los mismos resultados fueron observados al determinar el ratio entre el glutatión oxidado y el glutatión reducido, donde las poblaciones siDKC1 y siNOP10, presentan niveles más altos del ratio GSSG/GSH, lo que es indicativo de que las condiciones oxidantes son superiores en ambas poblaciones con respecto a siTINF2 y las líneas celulares control.

Otro biomarcador downstream de estrés celular estudiado fue p53. Esta proteína es conocida por sus efectos sobre la regulación del ciclo celular, y además juega un papel fundamental frente al estrés oxidativo. La proteína p53 actúa promoviendo la expresión de genes codificantes de rutas antioxidantes en casos en los que los niveles de estrés oxidativo son bajos, para tratar de paliar este estrés, pero cuando los niveles de estrés oxidativo son elevados, actúa como pro-oxidante, es decir, aumentando la expresión de enzimas pro-oxidantes, con el objetivo de provocar la apoptosis celular (Liu and Xu, 2011). Por tanto, el aumento observado en la expresión de p53 en las poblaciones con los genes silenciados (Figura 12) puede ser debido a una respuesta de la célula frente al estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos en la detección de biomarcadores de estrés oxidativo, permiten afirmar que hay un aumento significativo del estrés oxidativo en los modelos celulares

utilizados, siendo este más pronunciado en las poblaciones siDKC1 y siNOP10, y menos acentuado en siTINF2. Para tratar de conocer el origen de este estrés oxidativo, se procedió a analizar las principales enzimas antioxidantes, para determinar si la defensa antioxidante estaba disminuida.

Los resultados presentados con los modelos celulares generados por ARNi, concuerdan y validan los resultados obtenidos previamente por el grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo, con fibroblastos obtenidos de pacientes de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X. Así, recientemente se ha publicado como las líneas celulares de pacientes de *DKC1* (X-DC-1774-P) tendrían mayores niveles de especies reactivas de oxígeno que células control (X-DC-1787-C) (Manguan-Garcia et al., 2014).

### **3. Caracterización de los enzimas antioxidantes**

El estrés oxidativo puede producirse por una desregulación entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de las enzimas antioxidantes para eliminarlos. Es por ello que se estudiaron 4 sistemas antioxidantes distintos: CuZnSOD y MnSOD, responsables de la detoxificación del radical superóxido; y la Catalasa y Glutatión Peroxidasa 1, como enzimas antioxidantes detoxificadoras del peróxido de hidrógeno.

Cuando se analizó la expresión de los genes que codifican para estas enzimas y los niveles de expresión de las proteínas que codifican, se observaron cambios en el nivel de expresión de los genes codificantes para dichas proteínas, sin embargo, a nivel de proteína sólo se observó un aumento de la MnSOD para siNOP10 (Figura 15A). Estos resultados sugieren que si las células siRNA *DKC1* tienen un mayor estrés oxidativo como hemos descrito en el apartado anterior, este no se debe a una disminución de las defensas antioxidantes, sino más bien a un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Aunque esta es una hipótesis plausible, sería necesario evaluar la actividad enzimática de estas enzimas, sobre todo de la MnSOD, para ver si realmente también aumenta su actividad.

Los resultados obtenidos en esta sección contrastan con los resultados obtenidos en otros modelos de disqueratosis congénita realizados por el grupo de investigación. En este sentido, se ha observado como los fibroblastos provenientes de un paciente de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X tiene menores niveles de CuZnSOD, MnSOD y GPx1, que coincidieron con una menor actividad para estas enzimas (Manguan-Garcia et al., 2014). Sin embargo, tal y como hemos puntualizado anteriormente, nuestro modelo implica un silenciamiento de los genes diana de forma aguda, mientras que los fibroblastos obtenidos de biopsias de pacientes habrían estado sometidos a un efecto crónico de estrés debido a estas mutaciones.

#### 4. Caracterización de las rutas implicadas en la reparación del ADN y de los marcadores de daño al ADN

De las 4 rutas de reparación del ADN estudiadas, sólo se detectaron cambios significativos en la ruta de *back-up Non Homologous end Joining* o *ruta de unión de extremos no homologos alternativa*, en la que se observaron cambios en la expresión relativa de PARP-1. En este sentido, PARP-1 tenía aumentada su expresión en siTINF2, mientras que estaba disminuida en siDKC1 y siNOP10.

Este comportamiento puede ser debido a que la proteína TIN2, codificada por el gen *TINF2*, actúa como un regulador negativo de la actividad de PARP-1 (Kirwan and Dokal, 2009), de modo que al estar inhibida la expresión de *TINF2*, podría estar aumentada la expresión de PARP-1. Sin embargo, se ha postulado como la inhibición de la proteína PARP-1 tiene un efecto beneficioso en condiciones de estrés oxidativo crónico (Boesten et al., 2013). El grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo ha observado que en fibroblastos provenientes de pacientes con disqueratosis congénita ligada al cromosoma X (*DKC1*) existe un aumento de los niveles de PARP-1 (resultados no publicados). Se sabe que PARP está mediando mecanismos de reclutamiento de proteínas de reparación al sitio de daño del ADN (Masson et al., 1998).

Además, el aumento en la expresión de PARP-1 en siTINF2, se ve reflejado en un aumento de su actividad, puesto que aunque los resultados de parsilación que se muestran en la Figura 12 son estadísticamente significativos, sí se observa un aumento de la parsilación en esta población.

Nuestros resultados también han mostrado un aumento de la expresión de RAD51. La proteína RAD51 participa en el mecanismo de recombinación homóloga de reparación de las roturas de doble cadena del ADN. En condiciones de inestabilidad telomérica la hiperactividad de RAD51 podría contribuir a la formación de estructuras teloméricas aberrantes (Gauthier et al., 2012, p. 51) al igual que su defecto (Verdun and Karlseder, 2006), por lo tanto el control de RAD51 en cada una de las regiones cromosómicas es fundamental, hecho que no parece cumplirse en el modelo siNOP10.

Por último, la determinación de los niveles de  $\gamma$ H2AX tampoco permitió ver diferencias estadísticamente significativas (Figura 19). Sin embargo, se aprecia un incremento en los niveles de  $\gamma$ H2AX en siDKC1 y siNOP10, que igual que en el caso anterior, podrían ser significativos si se permitiera la acumulación de los mismos durante un periodo de tiempo un poco más largo. De hecho, resultados publicados por nuestro grupo de investigación han demostrado un aumento de los niveles de  $\gamma$ H2AX y macro-H2A en las líneas celulares provenientes de pacientes de X-DC (Manguan-Garcia et al., 2014). Además, resultados obtenidos por el grupo de investigación que todavía no han sido publicados demuestran que los niveles de  $\gamma$ H2AX eran elevados en una línea celular deficiente en el gen de *DKC1*, mientras que cuando se reestablece la actividad telomerasa, los niveles de  $\gamma$ H2AX disminuyen.

Este incremento en los niveles de fosforilación de H2AX, que indican niveles de daño en doble cadena, podría ser originado por dos mecanismos distintos. En primer lugar, el

estrés oxidativo es una de las causas de aparición de daño en el ADN (Barzilai and Yamamoto, 2004), y como se ha observado, el estrés oxidativo para las poblaciones siDKC1 y siNOP10 es significativamente superior al que se observa en siTINF2. Pero además, la inhibición de la actividad telomerasa también produce un aumento de las roturas de doble cadena en distintos modelos como *S. cerevisiae* (Meyer and Bailis, 2008) y también en el caso de telómeros disfuncionales en células de mamíferos (Takai et al., 2003).

Hay que indicar que nuestros modelos celulares suponen un efecto agudo en las líneas celulares modelo. Este hecho podría explicar el por qué no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a los niveles de  $\gamma$ H2AX, aunque sí una tendencia en el aumento en sus niveles en las líneas siDKC1 y siNOP10. Por supuesto, en una condición fisiológica en la que existe un aumento crónico del estrés oxidativo este podría dañar el ADN así como desregular los mecanismos de reparación del ADN produciendo un aumento significativo de las marcas de daño en el ADN, tal y como el grupo ha publicado recientemente en líneas celulares de pacientes de X-DC (Manguan-Garcia et al., 2014).

## VII. CONCLUSIONES

---

- El estrés oxidativo aparece en los primeros estadios de Disqueratosis congénita, por tanto juega un papel principal y no secundario como se le podría atribuir.
- Se ha observado una desregulación génica en las enzimas antioxidantes. Esto nos sugiere una interacción entre las subunidades de la telomerasa (DKC1 y NOP10) y las enzimas antioxidantes, posiblemente debido a fallos en la maduración del ARN. DKC1 y NOP10 forman parte del núcleo principal de las cajas H/ACA que se encargan de los procesos de maduración del ARN.
- El estrés oxidativo produce daños al ADN tanto de doble como de simple cadena. Se produce daño de simple cadena, parsilación, cuando la subunidad TIN2 está silenciada. Además, existe una tendencia a aumentar el daño de doble cadena,  $\gamma$ H2AX, cuando las subunidades DKC1 y NOP10 están silenciadas.
- Los mecanismos de reparación del ADN se ven afectados en las líneas celulares silenciadas. Se encuentran alteradas las rutas de unión de extremos no homólogos y ruta de *back-up*.

## **VIII. LIMITACIONES**

---

La principal limitación que tiene esta investigación ha sido el trabajar con una enfermedad rara, puesto que debido a su naturaleza poco frecuente, y al bajo número de muestras que se pueden encontrar no ha sido posible trabajar con muestras de pacientes teniendo que generar modelos celulares.

Otra limitación encontrada, ha sido la propia de la técnica de silenciamiento, ya que no se puede trabajar con largos tiempos debido a que el ARN de interferencia se degrada. Esto obliga a que se trabaje con tiempos cortos, y solo podemos estudiar efectos de forma aguda, además que en algunos resultados provoca que solo se observen tendencias, y no datos significativos como se podría obtener con un mayor tiempo de estudio.

## **IX. PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el estrés oxidativo si tendría un papel principal en la etiopatogenia de esta enfermedad. Con este resultado sería importante entender cuál es el origen de este estrés oxidativo, de los resultados obtenidos por el análisis de matrices de expresión también se observaron que estaban alteradas las rutas que tenían que ver con procesos de biosíntesis y maduración del ARN. Posiblemente los fallos en estas rutas, estén provocando fallos en la expresión génica de algunos genes que intervienen en rutas de reparación al ADN o regulación del estrés oxidativo, produciendo una desregulación del estado redox celular. Esto se podría comprobar mediante una variante de la qRT-PCR donde se cuantificara los procesos de pseudouridinación y ver si en los genes silenciados está disminuido indicativo que los mecanismos de maduración están fallando.

Además sería interesante observar si existe un proceso de migración de la subunidad *hTERT* del núcleo a la mitocondria, para reducir el estrés oxidativo observado, tal y como plantean hipótesis de otros autores. Esto se podría observar mediante estudios de co-localización utilizando microscopia confocal.

## **X. BIBLIOGRAFÍA**

---

- Ahmed, S., Passos, J.F., Birket, M.J., Beckmann, T., Brings, S., Peters, H., Birch-Machin, M., von Zglinicki, T., Saretzki, G., 2008. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J. Cell Sci.* 121, 1046–1053. doi:10.1242/jcs.019372
- Barzilai, A., Yamamoto, K.-I., 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 3, 1109–1115. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.002
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.
- Boesten, D., Jelle M.P.H., de Vos-Houben, J.M.J., Timmermans, L., den Hartog, G.J.M., Bast, A., Hageman, G.J., Boesten, D., Jelle M.P.H., de Vos-Houben, J.M.J., Timmermans, L., den Hartog, G.J.M., Bast, A., Hageman, G.J., 2013. Accelerated Aging during Chronic Oxidative Stress: A Role for PARP-1. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2013, 2013, e680414. doi:10.1155/2013/680414, 10.1155/2013/680414
- Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035
- Chen, L.-Y., Zhang, Y., Zhang, Q., Li, H., Luo, Z., Fang, H., Kim, S.H., Qin, L., Yotnda, P., Xu, J., Tu, B.P., Bai, Y., Songyang, Z., 2012. Mitochondrial Localization of Telomeric Protein TIN2 Links Telomere Regulation to Metabolic Control. *Mol. Cell.* doi:10.1016/j.molcel.2012.07.002
- Dantzer, F., Amé, J.-C., Schreiber, V., Nakamura, J., Ménissier-de Murcia, J., de Murcia, G., 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol.* 409, 493–510. doi:10.1016/S0076-6879(05)09029-4
- Dokal, I., 2011. Dyskeratosis congenita. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2011, 480–486. doi:10.1182/asheducation-2011.1.480
- Fadda, E., 2016. Role of the XPA protein in the NER pathway: A perspective on the function of structural disorder in macromolecular assembly. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 14, 78–85. doi:10.1016/j.csbj.2015.11.007
- Fay, M.P., Proschan, M.A., 2010. Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Stat. Surv.* 4, 1–39. doi:10.1214/09-SS051
- Gauthier, L.R., Granotier, C., Hoffschir, F., Etienne, O., Ayouaz, A., Desmaze, C., Mailliet, P., Biard, D.S., Boussin, F.D., 2012. Rad51 and DNA-PKcs are involved in the generation of specific telomere aberrations induced by the quadruplex ligand 360A that impair mitotic cell progression and lead to cell death. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 629–640. doi:10.1007/s00018-011-0767-6
- Grimes A.J., 1966. *Human red cell metabolism*. Oxford: Blackwell. 192–201
- He, J., Gu, B., Ge, J., Mochizuki, Y., Bessler, M., Mason, P.J., 2009. Variable expression of DKC1 mutations in mice. *Genes. N. Y. N* 2000 47, 366–373. doi:10.1002/dvg.20509
- Holohan, B., Wright, W.E., Shay, J.W., 2014. Telomeropathies: An emerging spectrum disorder. *J. Cell Biol.* 205, 289–299. doi:10.1083/jcb.201401012
- Kawanishi, S., Oikawa, S., 2004. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 278–284. doi:10.1196/annals.1297.047

- Kim, H.-S., Manevich, Y., Feinstein, S.I., Pak, J.H., Ho, Y.S., Fisher, A.B., 2003. Induction of 1-cys peroxiredoxin expression by oxidative stress in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L363-369. doi:10.1152/ajplung.00078.2003
- Kirwan, M., Dokal, I., 2009. Dyskeratosis congenita, stem cells and telomeres. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 371–379. doi:10.1016/j.bbadis.2009.01.010
- Kuo, L.J., Yang, L.-X., 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *Vivo Athens Greece* 22, 305–309.
- Li, X., Heyer, W.-D., 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 18, 99–113. doi:10.1038/cr.2008.1
- Liu, D., Xu, Y., 2011. p53, oxidative stress, and aging. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1669–1678. doi:10.1089/ars.2010.3644
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Manguan-Garcia, C., Pintado-Berninches, L., Carrillo, J., Machado-Pinilla, R., Sastre, L., Pérez-Quilis, C., Esmoris, I., Gimeno, A., García-Giménez, J.L., Pallardó, F.V., Perona, R., 2014. Expression of the Genetic Suppressor Element 24.2 (GSE24.2) Decreases DNA Damage and Oxidative Stress in X-Linked Dyskeratosis Congenita Cells. *PLOS ONE* 9, e101424. doi:10.1371/journal.pone.0101424
- Martínez, P., Blasco, M.A., 2011. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat. Rev. Cancer* 11, 161–176. doi:10.1038/nrc3025
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3563–3571.
- Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., Márquez, J., 2008. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch. Toxicol.* 82, 273–299. doi:10.1007/s00204-008-0304-z
- Menoni, H., Hoeijmakers, J.H.J., Vermeulen, W., 2012. Nucleotide excision repair–initiating proteins bind to oxidative DNA lesions in vivo. *J. Cell Biol.* 199, 1037–1046. doi:10.1083/jcb.201205149
- Meyer, D.H., Bailis, A.M., 2008. Telomerase deficiency affects the formation of chromosomal translocations by homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 3, e3318. doi:10.1371/journal.pone.0003318
- Miller, A.-F., 2012. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett., Electron/proton coupling in biological energy transduction* 586, 585–595. doi:10.1016/j.febslet.2011.10.048
- Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C., 2007. A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell* 131, 223–225. doi:10.1016/j.cell.2007.10.005
- Pallardó, F.V., Lloret, A., Lebel, M., d'Ischia, M., Cogger, V.C., Le Couteur, D.G., Gadaleta, M.N., Castello, G., Pagano, G., 2010. Mitochondrial dysfunction in some oxidative stress-related genetic diseases: Ataxia-Telangiectasia, Down Syndrome, Fanconi Anaemia and Werner Syndrome. *Biogerontology* 11, 401–419. doi:10.1007/s10522-010-9269-4
- Pereboeva, L., Hubbard, M., Goldman, F.D., Westin, E.R., 2016. Robust DNA Damage Response and Elevated Reactive Oxygen Species in TINF2 -Mutated Dyskeratosis Congenita Cells. *PLOS ONE* 11, e0148793. doi:10.1371/journal.pone.0148793

- Pereboeva, L., Westin, E., Hubbard, M., Goldman, F.D., 2014. Consistent Upregulation of Oxidative Stress and DNA Damage Amongst Dyskeratosis Congenita Genotypes: Ameliorative Effects of Antioxidants. *Blood* 124, 1603–1603.
- Pérez-Rivero, G., Ruiz-Torres, M.P., Díez-Marqués, M.L., Canela, A., López-Novoa, J.M., Rodríguez-Puyol, M., Blasco, M.A., Rodríguez-Puyol, D., 2008. Telomerase deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1243–1251. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.017
- Poynton, R.A., Hampton, M.B., 2014. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, Current methods to study reactive oxygen species - pros and cons 1840, 906–912. doi:10.1016/j.bbagen.2013.08.001
- Rare Disease Day 2016 - 29 Feb [WWW Document], n.d. . Rare Dis. Day - 29 Feb 2016. URL <http://www.rarediseaseday.org/> (accessed 6.20.16).
- Rhee, S.G., Chae, H.Z., Kim, K., 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1543–1552. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026
- Sahin, E., DePinho, R.A., 2012. Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 397–404. doi:10.1038/nrm3352
- Samper, E., Flores, J.M., Blasco, M.A., 2001. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*<sup>-/-</sup> mice with short telomeres. *EMBO Rep.* 2, 800–807. doi:10.1093/embo-reports/kve174
- Saretzki, G., 2009. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp. Gerontol.* 44, 485–492. doi:10.1016/j.exger.2009.05.004
- Sullivan, L.B., Santos, J.H., Chandel, N.S., 2012. Mitochondria and telomeres: the promiscuous roles of TIN2. *Mol. Cell* 47, 823–4.
- Takai, H., Smogorzewska, A., de Lange, T., 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol. CB* 13, 1549–1556.
- Tolbert, N.E., 1971. Microbodies-Peroxisomes and Glyoxysomes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 22, 45–74. doi:10.1146/annurev.pp.22.060171.000401
- Verdun, R.E., Karlseder, J., 2006. The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* 127, 709–720. doi:10.1016/j.cell.2006.09.034
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., Iliakis, G., 2006. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 34, 6170–6182. doi:10.1093/nar/gkl840
- Wang, R.C., Smogorzewska, A., de Lange, T., 2004. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 119, 355–368. doi:10.1016/j.cell.2004.10.011
- Westin, E.R., Aykin-Burns, N., Buckingham, E.M., Spitz, D.R., Goldman, F.D., Klingelutz, A.J., 2010. The p53/p21WAF/CIP Pathway Mediates Oxidative Stress and Senescence in Dyskeratosis Congenita Cells with Telomerase Insufficiency. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 985–997. doi:10.1089/ars.2010.3444
- Witzany, G., 2008. The Viral Origins of Telomeres and Telomerases and their Important Role in Eukaryogenesis and Genome Maintenance. *Biosemiotics* 1, 191–206. doi:10.1007/s12304-008-9018-0
- Zhang, Y., Du, Y., Le, W., Wang, K., Kieffer, N., Zhang, J., 2011. Redox control of the survival of healthy and diseased cells. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2867–2908. doi:10.1089/ars.2010.3685