

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio
Natural (ETSIAMN)

Departamento de Biotecnología



El Nucléolo como Sensor de Estrés Oxidativo. Implicaciones en Patologías Progeroides

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: Carmen M^a Picher Latorre

DIRECTOR/A: Gisselle Pérez Machado

TUTOR/A UPV: María Adelaida García Gimeno

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, 7 de julio de 2017

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Federico Pallardó y al grupo de investigación del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de enfermedades raras (CIBERER) de la Facultad de Medicina por haberme permitido participar en el Proyecto FIS (Fondo de investigación en Salud) sobre “Respuestas epigenéticas a cambios en el entorno redox nuclear. Posibles dianas terapéuticas en enfermedades raras”.

Sobre todo, quiero dar las gracias a mi directora del TFM, la Dra. Gisselle Pérez. Confió en mí y me ayudó a sacar adelante con creces este trabajo. Tuvo la paciencia suficiente para enseñarme cuando estaba perdida y a la hora de trabajar siempre consiguió transmitirme su buen humor y sus ganas de hacer las cosas bien. Porque contigo Gisselle, he aprendido mucho más de lo que se aprende leyendo un protocolo o un libro de texto. Gracias por confiar en mí y por ser tan meticulosa, porque las cosas o se hacen bien o no se hacen. Contigo no solo he ganado a una mentora y compañera de trabajo, sino también a una gran amiga. Por todo esto y más, millones de gracias, y aun así me quedo corta expresando toda mi gratitud.

A mi tutora de la UPV, la Dra. Ada García, gracias también por resolverme siempre las dudas que me iban surgiendo.

A los que han sido mis compañeros de laboratorio durante estos meses, a Ester por ayudarme en los primeros días, contigo también encontré una amiga; a Guillermin porque siempre logra sacarme una sonrisa y estuvo dispuesto a ayudar en todo momento; a Santi porque me ayudó en la aventura del silenciamiento, y he comprendido que “el camino a todas las cosas grandes pasa por el silencio” (Friedrich Nietzsche), Marta, a Carlos y a Pili, porque también me ayudaron cuando lo necesitaba, y a Jesús y Laura por hacer más divertida la estancia en el laboratorio. Espero que, aunque ya no esté rondando por ahí se sigan haciendo torradas y alguna que otra cena de celebración. Por cierto, tenemos pendiente una paella.

También quiero agradecer a Diana por haber tenido la paciencia y las ganas de enseñarme aun cuando estaba en la recta final de su doctorado. Gracias a ti he descubierto el mundo de la microscopia y confío en seguir formándome en él. Espero que disfrutes mucho esta nueva etapa de tu vida en Holanda.

Y por supuesto, de nuevo, al jefe de grupo, el Dr. Federico Pallardó que también confió en mí y me permitió realizar este trabajo poniendo a mi disposición los medios necesarios para llevarlo a cabo.

A todos, gracias.

El Nucléolo como Sensor de Estrés Oxidativo. Implicaciones en Patologías Progeroides

Resumen

El nucléolo es un compartimento muy especializado dentro del núcleo, cuya función principal es la biogénesis de ribosomas. Pero en los últimos años se ha observado que éste participa en otros procesos biológicos, destacándose su respuesta a distintos tipos de estrés celular. La disrupción de la integridad nucleolar se ha asociado con estrés oxidativo nucleolar y con la aparición de varias patologías, sin embargo, esta relación no ha sido muy explorada en las enfermedades raras progeroides. El objetivo del trabajo fue evaluar si, el silenciamiento de genes del complejo telomerasa (*DKC1* y *NOP10*) y telosoma (*TINF2*), mutados en disqueratosis congénita, producen un estrés oxidativo que sea detectable por cambios morfológicos, o en los niveles de expresión y distribución de proteínas nucleolares. Los modelos con *DKC1* y *NOP10* silenciados presentaron niveles bajos de expresión de las subunidades ribosomales 45s y 18s, co-localización de la proteína NPM1 con GSTP en el núcleo y translocación de NPM1 al nucleoplasma. No apreciamos estos eventos en células silenciadas para *TINF2*. Los resultados obtenidos parecen indicar que los genes *DKC1* y *NOP10* producen un estrés nucleolar por estrés oxidativo además de por fallos en la biogénesis ribosomal.

Abstract

The nucleolus is a very specialized compartment inside the nucleus which its main function is the ribosomal biogenesis. However, in recent years it has been observed to attend in other biological processes, highlighting the response to different types of cellular stress. Nucleolar disruption has been associated with nucleolar oxidative stress and with the appearance of several pathologies, nevertheless, this relationship has not been explored in rare progeroid diseases. This work aims to evaluate whether the silencing of genes of telomerase complex (*DKC1* and *NOP10*) and telosome (*TINF2*), mutated in dyskeratosis congenita, produce an oxidative stress detectable by nucleolar morphological changes and by alterations in the expression and distribution of its proteins. Models with silenced *DKC1* and *NOP10* showed low expression levels for the ribosomal subunits 45s and 18s, co-localization of NPM1 and GSTP in the nucleus and translocation of NPM1 to the nucleoplasm. These events were not appreciated in the *TINF2* depleted cells. The results suggested that *DKC1* and *NOP10* genes produce a nucleolar oxidative stress in addition to ribosomal biogenesis failures.

Palabras clave: nucléolo, NPM1, GSH, GSTP, disqueratosis congénita, ribosomopatía, progeroide

Keywords: nucleolus, NPM1, GSH, GSTP, dyskeratosis congenita, ribosomopathy, progeroid

Índice

1. Abreviaturas	5
2. Introducción	7
Nucléolo	7
Estructura nucleolar y transcripción de genes ribosómicos.....	8
Proteínas nucleolares.....	9
El nucléolo como sensor de estrés.....	10
Implicaciones en enfermedades.....	12
Disqueratosis congénita	12
Sistemas antioxidantes. Implicaciones del glutatión y GSTP	15
Glutatión (GSH).....	15
Glutatión S-transferasa pi (GSTP).....	16
Papel de los sistemas antioxidantes en el estrés nucleolar.....	17
3. Hipótesis	18
4. Objetivos	18
5. Materiales y Métodos	19
Cultivo celular.....	19
Silenciamiento génico mediante ARNi.....	19
Cuantificación de expresión génica.....	21
Tratamientos.....	23
Estudio de viabilidad celular (método de tinción por exclusión).....	24
Ensayo citotóxico. Sulforodamina B.....	24
Determinación de niveles de GSH y del cociente GSSG/GSH.....	25
Estudio de la morfología nucleolar.....	26
Inmunofluorescencia.....	27
Obtención de extractos proteicos.....	27
Cuantificación de proteínas por el método Bradford.....	28
Análisis de expresión de proteínas por Western-Blot.....	29
Análisis estadístico.....	30
6. Resultados	31
Caracterización de los modelos celulares	31
Estudio de los niveles de expresión de 45s y 18s en las células silenciadas.....	32
Estudio de la morfología nucleolar	32
Localización mediante microscopía confocal de GSTP y NPM1 en los modelos de silenciamiento	34
Estudio de viabilidad y citotoxicidad de Diamida y H₂O₂ en células HeLa	36
Evaluación de los niveles de GSH y del cociente GSSG/GSH en las células silenciadas tratadas con Diamida y H₂O₂	37
Estudio de la expresión proteica de GSTP y NPM1 en los extractos nucleolares	38
7. Discusión	41
8. Conclusiones	48
9. Limitaciones	49
10. Perspectivas futuras	49
11. Bibliografía	50

1. Abreviaturas

Act. D: actinomicina D
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADNr: ADN ribosomal
ARF: Alternative Reading frame protein
ARN: Ácido ribonucleico
ARNi: ácido ribonucleico interferente
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ARNr: ARN ribosomal
BSA: Seroalbúmina bovina
CF: centro fibrilar
CFD: componente fibrilar denso
CG: componente granular
CIBERER: Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras
CI50: concentración inhibitoria 50
CT: cycle threshold
DC: Disqueratosis congénita
DKC1: gen que codifica para la proteína disquerina
DMEM: Medio Mínimo Esencial de Eagle
EROs: Especies Reactivas de Oxígeno
FBL: fibrilarina
Gpx: Glutación peroxidasa
GR: glutación reductasa
GSH: Glutación
GST: glutación S-transferasas
GSTP: glutación S-transferasa pi
GSSG: Disulfuro de glutación
HPGS: Hutchinson-Gilford progeria syndrome
HeLa: línea celular de adenocarcinoma cérvico-uterino
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia
hTERC: componente de ARN de la telomerasa humana
hTERT: componente catalítico de la telomerasa humana
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
IFI: inmunofluorescencia indirecta
ITS2: segundo espaciador interno transcrito
MDM2: murine doble minute 2
NCL: nucleolina
NOP10: Gen que codifica para la proteína NOP10
NORs: regiones organizadoras nucleolares
NPM1: nucleofosmina
PBS: Tampón fosfato salino
PMSF: fenilmetilsulfonilo

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RISC: RNA-induced silencing complex
RNPs: ribonucleoproteínas
RT: retrotranscripción
RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RRMs: motivos de reconocimiento de ARN
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
siTIN2: Población celular con el gen *TIN2* silenciado
snARNs: ARNs pequeños nucleares
snoRNP: pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares
SRB: sulforodamina B
SSA: ácido 5-sulfosalicílico
TBS-Tween: Tampón fosfato salino con Tween
TCA: ácido tricloroacético
TEMED: Tetrametiletildiamina
TERC: Gen que codifica para la proteína hTERC de la telomerasa
TERT: Gen que codifica para la proteína hTERT de la telomerasa
TIN2: TRF1-interacting nuclear factor 2
TINF2: Gen que codifica para la proteína TIN2
TRIS: Hidroximetilaminoetano
UV: ultravioleta

2. Introducción

Las células están sometidas de forma continua a condiciones de estrés que desencadenan respuestas compensadoras. La naturaleza y gravedad del estrés celular determina que vías de señalización se activan y el tipo de respuesta (detención del ciclo celular, apoptosis o reorganización de la arquitectura nuclear, etc.).

El nucléolo es un orgánulo nuclear que destaca por su alto dinamismo estructural y funcional; lo que se traduce en un intercambio permanente con el nucleoplasma y con otros cuerpos nucleares en función de los diversos estados de la célula y los cambios extracelulares ¹⁻³. Es ese papel en la coordinación de la respuesta rápida al estrés celular el que lo reposiciona en el epicentro de atención de los estudios moleculares ⁴.

Nucléolo

El nucléolo es una estructura supramolecular densa no membranosa localizada en el núcleo de las células eucariotas. Esta estructura puede variar en tamaño, forma y número en diferentes tejidos dentro del mismo organismo. Su compleja arquitectura es una consecuencia de su participación en la síntesis de ARN ribosomal (ARNr), y en el procesamiento y ensamblaje de las subunidades ribosomales ^{1,2}. La biogénesis ribosomal es la principal función del nucléolo, pero no la única. Análisis proteómicos han permitido identificar muchas proteínas nucleolares que participan en diversos procesos celulares, tales como: replicación vírica, modificación de ARNs pequeños nucleares (snARN), ensamblaje de ribonucleoproteínas (RNPs) ⁴, apoptosis, actividad telomerasa, estabilidad de p53 ³, envejecimiento, regulación del ciclo celular, secuestro de moléculas reguladoras, y como sensor de estrés celular ⁵.

Se localiza alrededor de regiones cromosómicas que contienen repeticiones en tándem de genes de ADN ribosomal (ADNr), denominadas regiones organizadoras nucleolares (NORs) ^{1,3}. Estas regiones se encuentran en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (en humanos en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22) ¹ y codifican para el pre-ARNr 45s ⁶. Solo la mitad de las repeticiones de ADNr se transcriben activamente durante la interfase mientras que el resto se encuentra transcripcionalmente inactivo, pero todas residen dentro del nucléolo. Estas dos clases de clusters de ADNr difieren entre ellas por su organización de la cromatina, por las marcas epigenéticas y por las proteínas asociadas ¹.

Estructura nucleolar y transcripción de genes ribosómicos

El nucléolo humano en interfase presenta una estructura tripartita que refleja la compartimentación de las diferentes etapas de la biogénesis ribosomal (Fig. 1). Las partes que lo componen son: los centros fibrilares (CF), el componente fibrilar denso (CFD) y el componente granular (CG) ^{1,2}. Cada uno de estos compartimentos está relacionado con un paso específico de la biogénesis de las subunidades ribosomales. La transcripción del ADNr ocurre en *loci* activos de ADNr dentro de los CF o en el borde de la región CF/CFD en repeticiones en tándem de genes que surgen como bucles radiales de ADNr más condensado dentro de esta región, dando lugar al pre-ARNr 45s ⁷. Este pre-ARNr puede ser procesado y modificado de diferentes formas por las ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNPs) y por factores de procesamiento proteico en la región CFD, para generar las ARNr 28S, 18S y 5.8S ¹, que junto con el ARNr 5s constituyen el core catalítico de los ribosomas ⁶. Estas modificaciones mediadas por los snoRNPs incluyen la 2'-O-metilación de la ribosa y la pseudouridilación ¹.

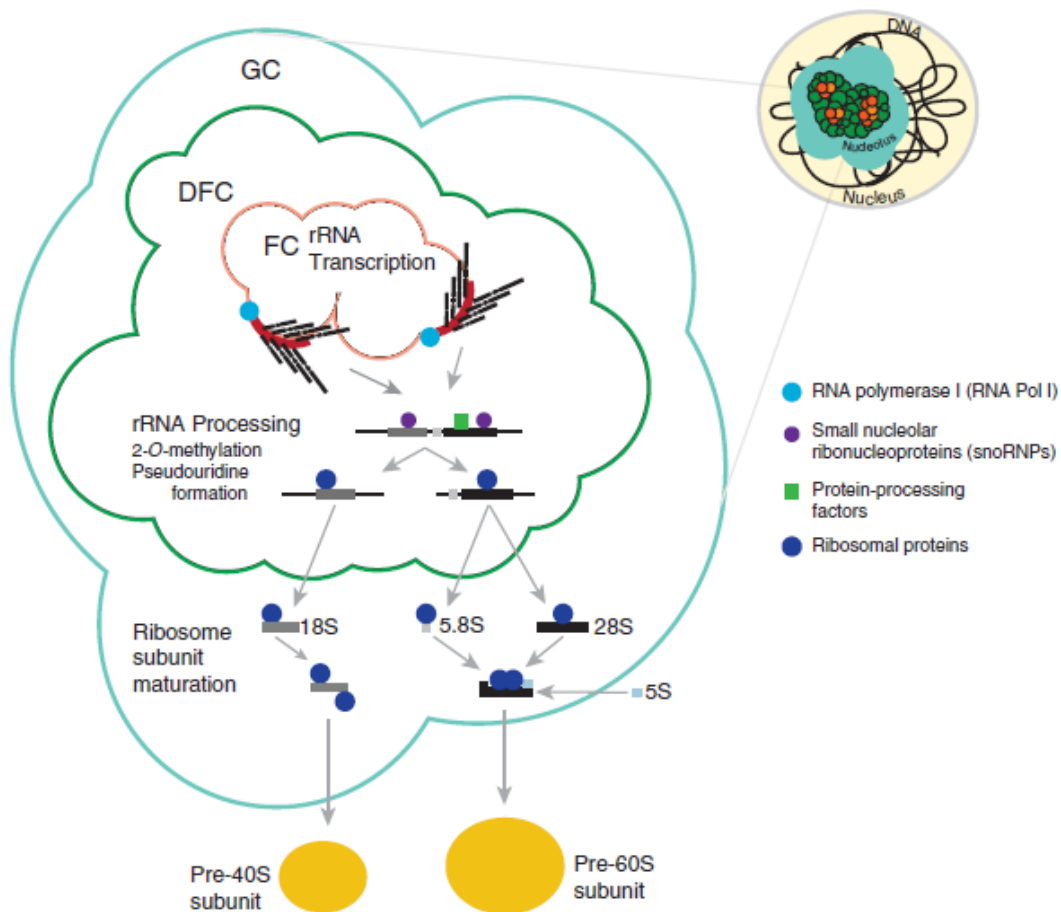


Figura 1. Ilustración de la biogénesis de las subunidades ribosomales en el nucléolo de mamíferos ¹.

Posteriormente, los ARNr 28S, 18S y 5,8S se ensamblan con RNPs para dar lugar a las subunidades ribosomales pre-40s (subunidad menor) y pre-60s (subunidad mayor) que maduran y se ensamblan en las regiones CFD y CG antes de ser liberadas del nucléolo. Los últimos pasos de la biogénesis ribosomal ocurren en el nucleoplasma antes de ser transportados al citoplasma ^{1,4}.

El nucléolo va sufriendo modificaciones a lo largo de toda la interfase. Durante la fase G1 es pequeño y presenta pocos CF y abundante CFD con una actividad moderada, mientras que en la fase G2 empiezan a aparecer múltiples y pequeños CF y abundante CG, lo que conlleva también un aumento en su tamaño y actividad. Pero, durante la transición G2/M, el nucléolo comienza a desensamblarse progresivamente hasta desaparecer cesando los procesos de transcripción y procesamiento ribosómico ⁵.

Proteínas nucleolares

Aproximadamente unas 250 proteínas nucleolares no ribosomales controlan las diferentes etapas de la biogénesis ribosomal actuando como factores de ensamblaje ribosomal, pero se encuentran ausentes en el ribosoma ya maduro. Específicamente, actúan como nucleasas, helicasas o chaperonas para mediar los numerosos eventos de ensamblaje y procesamiento ⁷. Además, actúan de diana de otros factores que participan en el control y regulación de la actividad celular ⁵.

Nucleolina (NCL)/C23

Es de las proteínas más abundantes dentro del nucléolo, puede llegar a representar hasta el 10% de las proteínas nucleolares^{3,8}. Es una fosfoproteína multifuncional codificada por el gen NCL humano, localizado en el cromosoma 2 ⁹. Contiene cuatro motivos de reconocimiento de ARN (RRMs) que permiten su unión a las estructuras de stem-loop dentro del pre-ARNr, actuando así como chaperona tanto para el correcto plegamiento del ARN como para el ensamblaje de los ribosomas ⁷. Por todo ello, la nucleolina está muy asociada con la proliferación y el crecimiento celular ¹⁰. Además, diversos estudios indican que se une a la cromatina nucleolar, participando en la transcripción de la ARN pol I, y que transporta al citoplasma las partículas ribosómicas ^{5,11}. La actividad de la nucleolina se regula normalmente por su localización intracelular y las modificaciones post-traduccionales, incluyendo la fosforilación, la metilación y la ADP-ribosilación ¹⁰. Se localiza principalmente en la región CFD del nucléolo. Aunque una pequeña porción también ha sido detectada en la región CG de los eucariotas ^{9,12}.

Fibrilarina (FBL)

Es una proteína nucleolar básica codificada por el gen humano FBL presente en el cromosoma 19. Tanto su estructura, su secuencia y su función se encuentra muy conservada entre los eucariotas. Es una metil-transferasa que participa en el procesamiento y modificación del pre-ARNr, en el ensamblaje ribosomal y se asocia a las snoARNs implicados en los procesos de metilación de ribosomas para formar el complejo box C/D snoRNP.^{5,7} También es una proteína esencial para el desarrollo embrionario temprano¹³. Se encuentra en las regiones de CFD durante la etapa de interfase. Sus niveles de expresión dependen de la actividad transcripcional del nucléolo y de la progresión del ciclo celular. Por tanto, sus niveles se incrementan conforme aumenta la proliferación celular⁵.

Nucleofosmina 1 (NPM1)/B23

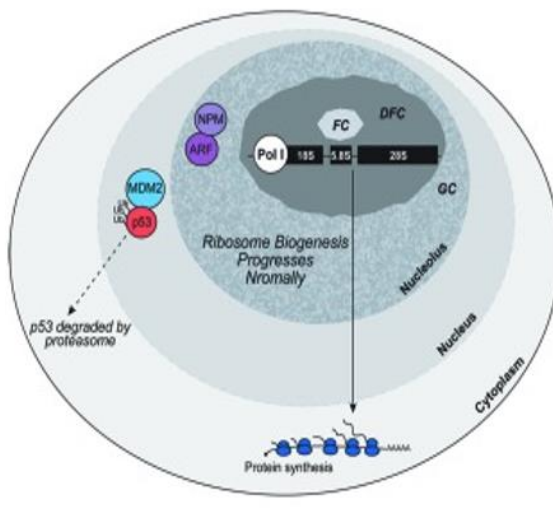
La nucleofosmina, conocida como numatrina en mamíferos, es una fosfoproteína muy abundante dentro del nucléolo, pero que puede translocarse al nucleoplasma o al citoplasma, reflejando la dinámica de las proteínas nucleolares y caracterizando la acción más relevante de la proteína: la respuesta al estrés nucleolar¹⁴. Está codificada por el gen humano *NPM1* presente en el cromosoma 5. Esta proteína interactúa con gran número de macromoléculas para llevar a cabo multitud de funciones entre las que se encuentra unirse a ácidos nucleicos, presentar actividad ARNasa, participar en la escisión del segundo espaciador interno transcrito (ITS2) dentro del pre-ARNr, lo que lo convierte claramente en un factor de ensamblaje ribosomal, y es capaz de regular la transcripción mediante su interacción con diversos factores como *Myc*, *NFκB*, *YY1* o *p53*. Actúa, además, como una chaperona de histonas que ayuda a mantener la estabilidad del genoma participando en la reparación de la rotura del ADN de doble cadena, bloqueando la apoptosis y participando en la duplicación del centrosoma en la profase y en la formación del uso mitótico en metafase^{7,15}. Su fosforilación ocurre durante ciertos eventos celulares. Los diversos patrones de fosforilación pueden estar correlacionados con la regulación de la localización de NPM1 en diversas condiciones¹⁴.

El nucléolo como sensor de estrés

Diferentes eventos, como por ejemplo el daño al ADN por la irradiación con ultravioleta (UV) y/o la inhibición de la transcripción por actinomicina D (Act.D) pueden ocasionar segregación nucleolar o redistribución de las proteínas nucleolares hacia el nucleoplasma o el citoplasma debido a la disrupción nucleolar². La segregación se caracteriza por la condensación y consecuente separación de la CF y del CG, junto con la formación de “caperuzas nucleolares”

alrededor de los restos nucleolares ⁴. Esto se traduce en fallos en la biogénesis ribosomal y función de los ribosomas (estrés nucleolar), que en última instancia conducen a la disrupción de la homeostasis celular, activando una respuesta de estrés celular ^{7,14}. El nucléolo es el mayor sensor de estrés de la célula, y cuando es perturbado inicia una detención del ciclo celular dependiente de p53. El principal mecanismo que une la disrupción nucleolar con la activación de p53 y la detención del ciclo celular en mamíferos es la proteína MDM2 (murine doble minute 2), la ubiquitin ligasa E3 que regula de forma negativa p53, marcándola para su degradación por el proteasoma mediada por ubiquitina (Fig. 2A) ⁷.

(A) Regulación de p53 bajo condiciones normales



(B) Regulación de p53 durante el estrés nucleolar

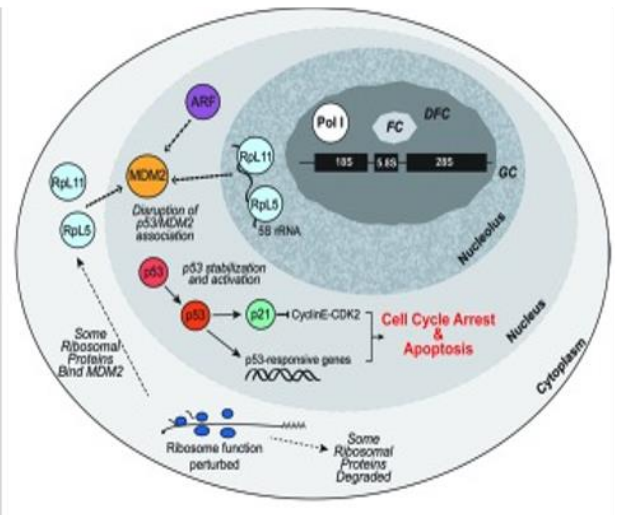


Figura 2. Regulación de p53 durante condiciones normales y de estrés nucleolar ⁷.

Bajo una situación de estrés nucleolar (Fig. 2B), varios factores de ensamblaje ribosomal, localizados en condiciones basales dentro del nucléolo, se redistribuyen por el nucleoplasma, mientras las proteínas ribosomales que pasan al núcleo son incapaces de ensamblarse en los ribosomas. Varias de estos factores de ensamblaje y proteínas ribosomales (Rpl5, Rpl11) se unen y bloquean la acción de MDM2, permitiendo que se establezca p53 y cese su degradación. Por otra parte, Arf (alternative Reading frame protein, p14^{Arf} en humanos) es una proteína supresora de tumores que en células no estresadas se localiza en el nucléolo, principalmente por su interacción con la NPM1 (Fig. 2A). Pero en condiciones de estrés nucleolar, esta es liberada al nucleoplasma donde se une y bloquea MDM2 inhibiendo la ubiquitinización y permitiendo que p53 se acumule y bloquee la progresión del ciclo celular e inicie la apoptosis ⁷.

Implicaciones en enfermedades

La actividad nucleolar alterada se ha asociado a varias patologías, incluyendo algunos cánceres, infecciones virales ¹, enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento ^{16,17} y de manera muy particular con las ribosomopatías ^{1,18}. Estas últimas comprenden un conjunto de síndromes en los que la biogénesis y/o la función ribosomal está alterada como consecuencia de mutaciones en genes que codifican para proteínas ribosomales o factores de ensamblaje ribosomal ⁷. Además, más recientemente, se ha ido proponiendo la disfunción nucleolar como uno de los mecanismos subyacentes en la etiopatogenia de un grupo de enfermedades catalogadas como raras (por definición son aquellas que presentan una prevalencia de menos de 5 casos por cada 10.000 habitantes ¹⁹. Entre estas se encuentran diversos síndromes como el síndrome de Werner, el de Bloom, el de Rothmund-Thomson, el de HGPS (Hutchinson–Gilford progeria syndrome), el de Treacher Collins, el de Shwachman Diamond y disqueratosis congénita (DC), entre otros ²⁰. En los tres primeros síndromes se producen mutaciones en genes que codifican para proteínas RECQ de la familia de las helicasas de ADN, enzimas que se almacenan en el nucléolo en condiciones de estrés oxidativo ²¹. En el caso de DC, objeto de nuestro estudio, existen mutaciones en genes que codifican snoRNPs y ribonucleoproteínas ²² importantes para la función ribosomal y la homeostasis telomérica, varias de ellas localizadas en el nucléolo.

Disqueratosis congénita

DC (ORPHA1775), es un desorden hereditario multisistémico de envejecimiento prematuro caracterizado por una elevada heterogeneidad clínica y genética. La variabilidad atañe al inicio de la enfermedad, a la progresión y a la severidad de los síntomas y signos clínicos. En la forma clásica de la enfermedad, el fenotipo se caracteriza por pigmentación anormal de la piel, distrofia ungueal y leucoplasia oral (tríada mucocutánea) (Fig. 3). La esperanza de vida de estos pacientes es aproximadamente de 50 años, y las principales causas de muerte son fallos en la médula ósea (60%-70%), enfermedad pulmonar (10%-15%) y aparición de cáncer (10%) ²².

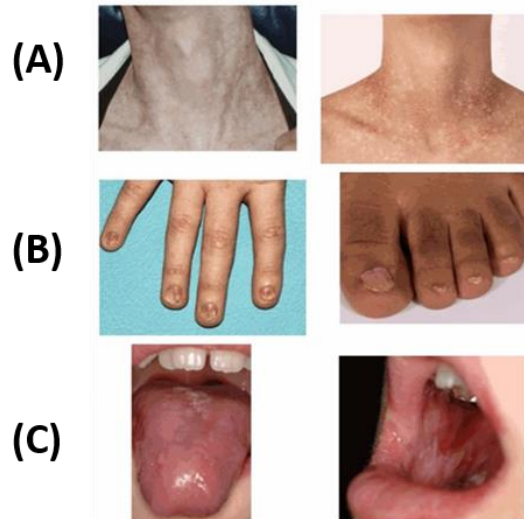


Figura 3. Tríada fenotípica. (A) Alteraciones en la pigmentación de la piel. (B) Alteraciones ungueales. (C) Leucoplasia oral ²³.

Genéticamente también es muy heterogénea, ya que se han identificado mutaciones en al menos 12 genes, que afectan a nivel molecular al procesamiento del ARNr y al mantenimiento de la longitud telomérica ⁷. El descubrimiento de estas mutaciones posibilitó establecer la relación entre DC y la telomerasa, y la clasificación de la enfermedad como ribosomopatía y telomeropatía primaria (Fig. 4B). Los genes mutados se han asociado a tres patrones de herencia: recesiva ligada al cromosoma X, autosómica dominante y autosómica recesiva ²².

La mutación del gen *DKC1* fue la que primero se describió como Síndrome de Zinsser-Engman-Cole o DC, y se asocia con un patrón recesivo ligado al cromosoma X. Este gen codifica la disquerina, una snoRNP de la caja H/ACA altamente conservada, para la que se han descrito dos funciones principales en el nucléolo: la pseudouridilación durante la maduración del ARNr y la estabilización del complejo telomerasa a través de la interacción con el componente de ARN de la telomerasa humana (TERC) ^{20,22}.

Mutaciones en los genes *TERC*, *TERT* y *TINF2* corresponden a formas autosómicas dominantes de la enfermedad. Las mutaciones tanto en el componente catalítico (TERT) como en la plantilla RNA (TERC) producen una haplo-insuficiencia en la telomerasa funcional ocasionando el acortamiento telomérico ^{22,24}. *TINF2* es el segundo gen más mutado en DC, y los pacientes portadores de estas mutaciones suelen presentar un fenotipo severo y telómeros excesivamente cortos ²⁵. *TINF2* codifica para un componente del complejo de la shelterina/telosoma, la proteína TIN2 (TRF1-interacting nuclear factor 2) ²⁵. Este complejo (Fig. 4A) está compuesto además por TRF1, TRF2, POT1, TPP1 y RAP1 ²⁴, cuya función es la protección

de los telómeros, probablemente inhibiendo la reparación del ADN, y la regulación de la longitud del telómero inhibiendo la telomerasa ²⁶.

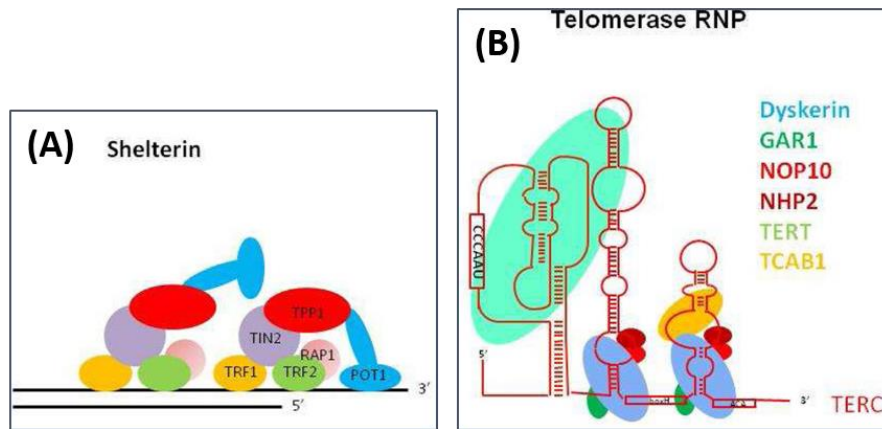


Figura 4. (A) Complejo shelterina. (B) Complejo telomerasa ²⁷.

Existen evidencias que sugieren que varias proteínas del núcleo del telómero presentan funciones extra-teloméricas. En particular, TERT se ha demostrado que también se localiza en la mitocondria para proteger contra el estrés oxidativo y la apoptosis. Más recientemente se ha observado que la proteína TIN2 también se encuentra en la mitocondria regulando la fosforilación oxidativa de esta, estableciendo un vínculo entre regulación telomérica y control metabólico ²⁸.

Finalmente mutaciones en *TCAB1*, *NHP2* y *NOP10* se describen en DC con herencia *autosómica recesiva* ²². *NOP10*, como *DKC1*, codifica para snoRNP de caja H/ACA, por lo que su mutación ocasiona un fallo en el procesamiento del ARNr 18s y un colapso de la subunidad ribosomal 40s acoplado a la estabilización de p53 a través de proteínas ribosómicas pequeñas que se unen a MDM2, por ende ocasionando un estrés nucleolar ⁷.

En este contexto cabe destacar que los linfocitos de pacientes con DC con diferentes mutaciones presentan un fenotipo estresado con elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) ^{29,30}. Con frecuencia este desequilibrio redox es interpretado como consecuencia del acortamiento telomérico y la respuesta al daño del ADN. El ADN telomérico es susceptible al estrés oxidativo dado que su cadena es monocatenaria y presenta gran cantidad de guaninas susceptibles de reaccionar con las EROs. Este exceso de sensibilidad al estrés oxidativo del ADN telomérico, junto con las mutaciones que afectan al complejo telomerasa, podría ser las razones de que la pérdida telomérica se vea incrementada en estos pacientes ¹⁹.

Sistemas antioxidantes. Implicaciones del Glutatión y GSTP

El estrés oxidativo puede definirse como un desequilibrio o desbalance redox entre la producción de EROs y la capacidad antioxidante de la célula ³¹. La célula emplea diferentes sistemas antioxidantes para mantener la homeostasis celular. Estos sistemas antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos. Entre los primeros se pueden encontrar: a) los antioxidantes enzimáticos en los que se incluye la superóxido dismutasa, las tioredoxinas-reductasas, las sulfoxi-metionina-reductasas o las glutatión S-transferasas; y b) los antioxidantes no-enzimáticos, como el glutatión (GSH), el ácido úrico, el ácido dihidro-lipóico, la metalotioneína, el ubiquinol (Co-enzima Q) o la melatonina. Ambos grupos son principalmente sintetizados por nuestro propio organismo, pero la dieta puede contener también estos antioxidantes ³².

Glutatión (GSH)

El gamma-glutamyl-cisteinil-glicina, también conocido como glutatión (GSH), es un tripéptido presente en la mayoría de tipos celulares, habitualmente a altas concentraciones entre 0.2-10 mM ³³. Es un antioxidante esencial para la supervivencia de las células eucariotas y su concentración intracelular es un indicador de estrés oxidativo ³⁴. Presenta un grupo -SH libre (tiol), que es el que le otorga las propiedades antioxidantes para proteger a las células frente a los radicales libres ³³.

En el interior celular se encuentra presente de dos formas: en la forma sulfhidrilo reducida (GSH), y la forma oxidada como disulfuro de glutatión (GSSG). El estrés oxidativo tiene grandes efectos en el balance del tiol celular y puede producir un descenso del ratio GSH/GSSG en numerosos órganos ³⁴. GSH/GSSG es la principal pareja redox ya que determina el estado oxidativo de las células ³³. Los EROs, xenobióticos y otros radicales orgánicos son neutralizados por GSH a través de una cascada de mecanismos de detoxificación en los que participan glutatión peroxidasas (GPx), glutatión-S-transferasas (GST) y glutatión reductasa (GR) ³⁴.

Entre sus capacidades de detoxificación se encuentra la de eliminar los radicales libres y otros EROs, tanto de forma directa como indirecta a través de reacciones enzimáticas. En estas reacciones se produce la oxidación del GSH a GSSG, el cual es posteriormente reducido por la glutatión reductasa dependiente de NADPH (Fig. 5A). Además, el glutatión es capaz de reaccionar con varios electrófilos, metabolitos fisiológicos y xenobióticos para formar mercapturatos. Estas reacciones se inician por las glutatión-S-transferasas, una familia de enzimas de detoxificación de fase II ³³.

El GSH no solo participa en la detoxificación de compuestos, también puede participar en las señales de transducción, en la maduración espermática, en la expresión génica o en la apoptosis, además de en otra plétora de reacciones celulares ³⁴.

Glutathión S-transferasa Pi (GSTP)

El glutathión S-transferasa Pi (GSTP) fue inicialmente aislado de la placenta, se encuentra en todos los mamíferos y se expresa en altos niveles especialmente en ciertos cánceres y en células tumorales resistentes a fármacos. En un principio se consideró a GSTP citosólica, pero también se ha descrito su presencia en el núcleo o la mitocondria ³⁵.

Se describió originalmente como una enzima de detoxificación de fase II, pero también presenta funciones de chaperona no catalíticas que regula varias quinasas. También puede actuar como una glutationilasa en la S-glutationilación post-traducciona de las proteínas. La reacción de S-glutationilación se produce en los residuos de cisteínas de las proteínas en ambientes de bajos pKa, formando un enlace disulfuro con el GSH, en un ciclo reversible y dinámico que actúa como un segundo nivel de regulación en varios procesos celulares (Fig. 5B). Cuando las células se ven expuestas a un estrés celular como el originado por los EROs, la S-glutationilación es capaz de proteger a las células contra el daño oxidativo irreversible, una posterior de-glutationilación puede restaurar la proteína a su estado nativo ³⁵.

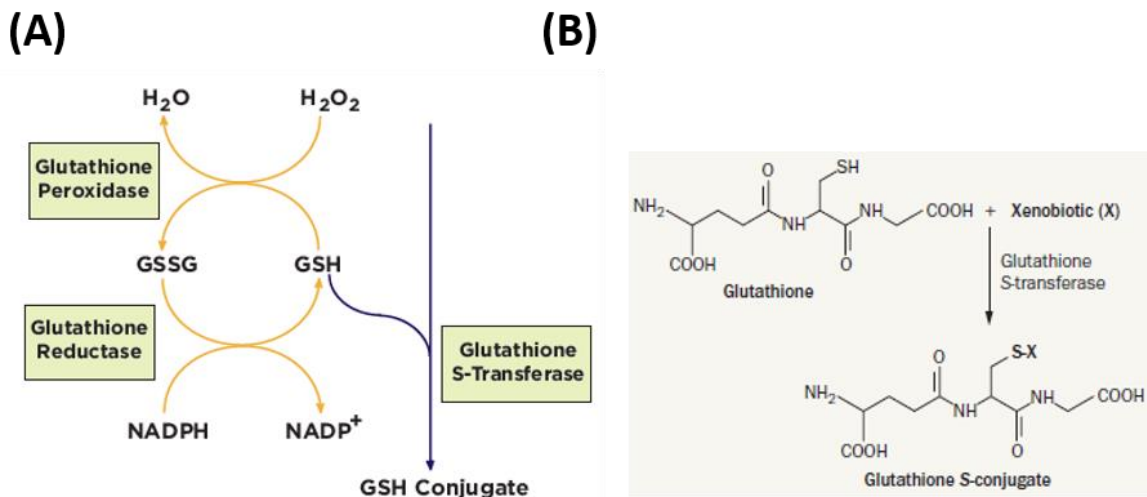


Figura 5. (A) Ciclo redox del glutathión. (B) Papel del glutathión S-transferasa en la s-glutationilación.

Papel de los sistemas antioxidantes en el estrés nucleolar

Se ha observado que en situaciones de estrés nucleolar se desencadena diferentes mecanismos redox en los que participa el GSH y la GSTP para compensar esta situación. En un estudio llevado a cabo en 2016 por investigadores de la escuela de medicina Shanghai Jiao Tong, se demostró que durante la oxidación nucleolar se produce la s-glutathionilación de la proteína nucleolar NPM1, y uno de los factores que podrían actuar como glutatiónilasa en esa reacción sería la GSTP (Fig. 6).

Estos datos permiten relacionar la oxidación nucleolar con enzimas detoxificadoras, haciendo patente también el papel que juega el GSH y el GSTP en los diferentes procesos de estrés nucleolar para mantener la homeostasis celular.

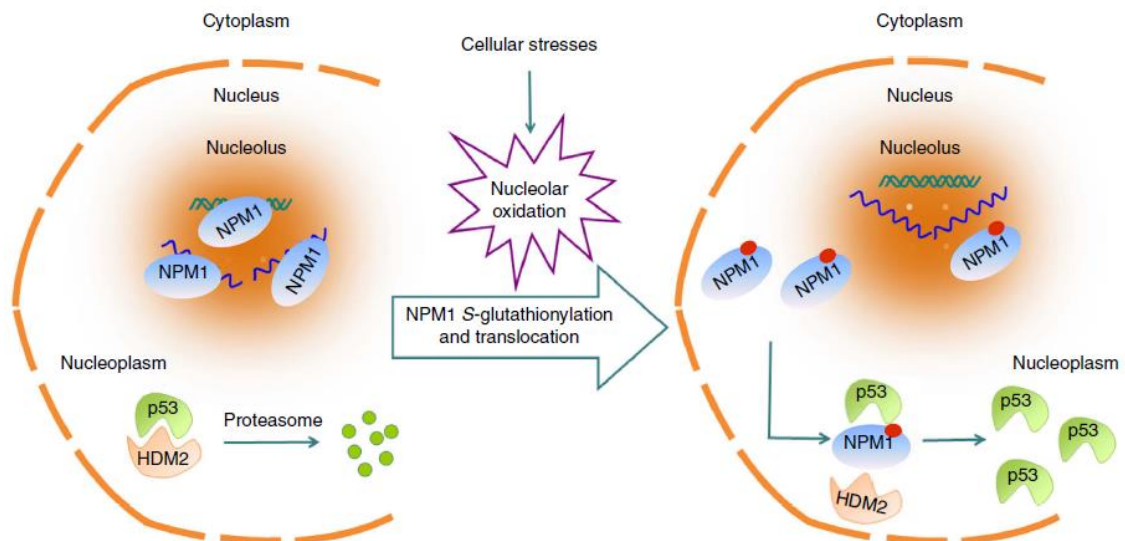


Figura 6. Detección del estrés nucleolar por NPM1. La oxidación nucleolar es una respuesta general a varios tipos de estrés celular. Durante la oxidación nucleolar, la NPM1 sufre una s-glutathionilación en la cisteína 275, provocando que esta se disocie de los ácidos nucleicos nucleolares. De esta forma, NPM1 permite la activación de p53 inducida por estrés nucleolar ¹⁴.

3. Hipótesis

La principal y más reconocida función del nucléolo es su papel en la biogénesis de ribosomas. Sin embargo, recientemente se ha aceptado que la oxidación nucleolar es una respuesta al estrés celular.

La disfunción nucleolar se posiciona en la fisiopatología de varias enfermedades, como es el caso de DC, no obstante, queda por dilucidar si mutaciones en genes nucleolares relevantes en DC también contribuyen al desequilibrio redox y si el nucléolo puede ser un sensor del estrés oxidativo en esta patología.

Por todo esto, nos planteamos la siguiente hipótesis: El estudio de parámetros nucleolares morfológicos y funcionales permite detectar la presencia de estrés oxidativo y dilucidar si los genes *DKC1*, *NOP10* y *TINF2* están asociados al desequilibrio redox.

4. Objetivos

En el grupo de investigación del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de enfermedades raras (CIBERER) se estudia la fisiopatología de enfermedades raras progeroides y en particular los eventos relacionados con el estrés oxidativo. DC figura entre las patologías de interés, por lo cual se han generado modelos celulares de silenciamiento transitorio para los genes *DKC1*, *NOP10* y *TINF2* (siDKC1, siNOP10 y siTIN2) implicados en DC.

Basándonos en estos precedentes, nos planteamos como **objetivo general**:

Evaluar varios parámetros nucleolares en los modelos celulares siDKC1, siNOP10 y siTIN2 en diferentes condiciones de estrés oxidativo.

De forma específica

- Optimizar el silenciamiento para los modelos siDKC1, siNOP10 y siTIN2 en varias escalas.
- Evaluar la morfología nucleolar en células NIH3T3, HeLa y en modelos siDKC1, siNOP10 y siTIN2 a través del kit “*CytoPainter Nucleolar Staining*”.
- Estudiar expresión de proteínas ribosomales y patrón de distribución de proteínas nucleolares no ribosomales en los modelos silenciados.
- Estudiar niveles de GSH en los modelos siDKC1, siNOP10 y siTIN2 tratados con Diamida y H₂O₂.
- Obtener extractos nucleolares para estudiar expresión proteica de GSTP y NPM1.

5. Materiales y Métodos

Cultivo celular

Las células utilizadas en este estudio corresponden a la línea celular de adenocarcinoma cérvico-uterino (HeLa) y a fibroblastos de ratón (NIH 3T3). Estas líneas estables de tipo adherente fueron cultivadas en frascos de 75 cm² (cultivo de mantenimiento) a una densidad de siembra de $2,1 \times 10^6$ o (28,000 células/cm²) en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Biowest, Riverside, MO, EE.UU.) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Biowest, Riverside, MO, EE.UU.), 1% de penicilina/estreptomicina (Biowest, Riverside, MO, EE.UU.) y 1% de L-Glutamina (Biowest, Riverside, MO, EE.UU.). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada (Incubadora NUAIRE, NU-4750E CO₂). Tanto la preparación de los medios como la manipulación de las células se realizaron en condiciones de asepsia utilizando cabinas de flujo laminar vertical de seguridad biológica tipo II (Telstar®). Se comprobó por técnica de PCR que las células estaban libres de contaminación por micoplasma. Las células se sembraron al alcanzar un 80-90% de confluencia, para ello la monocapa se despegó por tripsinización con 1,5 ml de tripsina (0,25 % tripsina - EDTA 1 mM en HBSS pH 8,0 con Rojo Fenol; Biowest, Riverside, MO, EE.UU.) 2 minutos a 37°C. Después se recogieron con 8 ml de DMEM completo (10% SBF, 1% glutamina, 1% P/S), se centrifugaron a 750 rpm durante 3 min y se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio de cultivo para su conteo en cámara de Neubauer. Todos los experimentos se realizaron en las instalaciones del Servicio de Cultivos Celulares del Laboratorio CIBER de la Universidad de Valencia.

Silenciamiento génico mediante ARNi

Para llevar a cabo el silenciamiento se empleó la tecnología del ARN de interferencia (ARNi), específicamente se realizó una transfección directa usando la lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, Ref: 13778-150), como agente transfectante. La lipofectamina es un reactivo que permite la formación de liposomas gracias a los lípidos catiónicos que se unen con el ARNi con cargas aniónicas. Los liposomas se fusionan con la membrana plasmática de la célula, permitiendo así la entrada del ARNi al interior celular. Las proteínas Argonautas del complejo RISC (siglas en inglés *RNA-induced silencing complex*) se ensamblan con el ARNi se usa como guía para identificar el ARN mensajero complementario y cataliza el corte del mensajero en dos mitades ocasionando su degradación nucleolítica, bloqueando la expresión génica.

Se diseñó el experimento con cinco grupos:

- **Grupos 1-3 (siGen interés):** siARN validados para los genes de interés *siDKC1* (ID: s4111, Ambion, CO), *siNOP10* (ID: 215701, Ambion, CO) y *siTIN2* (ID: s25355, Ambion, CO).
- **Grupo 4 (siCONTROL):** siARN no diana (Cat: AM4635, Silencer Negative Control siARN #1, Ambion). Como control del procedimiento de transfección.
- **Grupo 5 (MOCK):** lipofectamina, como control del agente de transfección.

Para conseguir el silenciamiento tanto a nivel génico como proteico se empleó un método de silenciamiento secuencial de dos días consecutivos.

Cultivo de las células

El silenciamiento se llevó a cabo en placas multipocillos de tres formatos (8, 6 y 12 pocillos), según la finalidad del experimento. La densidad celular de siembra fue de 50.000 en placas de 8 pocillos, 100.000 células en las placas de 12 pocillos y 200.000 en las de 6 pocillos.

Silenciamiento génico (24 h de cultivo)

Preparación de reactivos de transfección

Se preparó la lipofectamina y luego las soluciones stock siARN correspondientes a los grupos de tratamiento (concentración 20 μ M). De cada grupo se prepararon 2 réplicas.

Tabla 1: Preparación de los reactivos de transfección.

Formato de 12 pocillos			
	Grupo 1-3 siGen de interés	Grupo 4 siCONTROL	Grupo 5 MOCK
Lipofectamina	123 μ l DMEM s/ suplemento. y 2 μ l lipofectamina		
Tratamientos	118,75 μ l DMEM s/suplem. y 6,25 μ l de siDKC1 siNOP10 y siTIN2 (1 μ M)	122.5 μ l DMEM s/suplem. y 2,5 μ l de siCONTROL	125 μ l DMEM s/suplem.
Formato de 8 pocillos			
Lipofectamina	61,5 μ l DMEM s/ suplemento. y 1 μ l lipofectamina		
Tratamientos	178,13 μ l DMEM s/suplem. y 9,38 μ l de siDKC1 siNOP10 y siTIN2	183,75 μ l DMEM s/ suplem. y 3,75 μ l siCONTROL	187,5 μ l DMEM s/suplem.
Formato de 6 pocillos			
Lipofectamina	246 μ l DMEM s/ suplemento. y 4 μ l lipofectamina		
Tratamientos	238 μ l DMEM s/suplem. y 12,4 μ l de siDKC1 siNOP10 y siTIN2	244 μ l DMEM s/ suplemento. y 6,2 μ l siCONTROL	250 μ l DMEM s/suplem.

Tras 5 minutos de reposo la mezcla de silenciamiento se obtuvo vertiendo la lipofectamina, con ayuda de la micropipeta, sobre los tubos de soluciones stock de ARNi, y se resuspendió suavemente. La mezcla se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente para conseguir la formación de los liposomas (con ARNi a concentración de 0,5 μ M).

Silenciamiento

A las 24 h de cultivo los pocillos se lavaron dos veces con DMEM sin suplementar y finalmente se añadió 2 ml de medio DMEM sin suplementar por pocillo en la placa de 6, 1 ml para la de 12 pocillos y 500 μ l de DMEM sin suplementar en la placa de 8 pocillos.

Pasados los 20 minutos, se goteó el contenido de la mezcla de silenciamiento sobre su correspondiente pocillo (concentración final de ARNi en pocillo de 100 nM).

Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 horas. Posteriormente, se eliminó el medio y se añadió DMEM con 10% de SBF.

2º Silenciamiento génico (48 h cultivo)

Tras las 24h de la primera transfección, se llevó a cabo el segundo silenciamiento. Se siguió el mismo protocolo que el día anterior, a excepción de que, tras las 5 horas de incubación con la mezcla de silenciamiento, se añadió el medio DMEM suplementado con 10% de SBF y 1% de Penicilina/Estreptomina.

Cuantificación de expresión génica

La cuantificación de la expresión génica se realizó por reacción de PCR de transcripción inversa cuantitativa (siglas en inglés RT-qPCR), usando la técnica de sondas taqman (Taqman Gene expression assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU)) en unos casos y el método de SYBR Green para otros.

Para ambos casos se extrajo ARN empleando el kit NucleoSpin® ARN/Protein, (Macherey-Nagel, Düren) a partir de células cultivadas en placas de 12 pocillos y 24 h posteriores a la última transfección. Se procedió según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El ARN purificado se cuantificó con el Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se utilizó como blanco 1 μ L de agua libre de ARNsas, igual volumen se usó para medir la absorbancia a 260 nm. Las muestras fueron conservadas a -80°C. A partir de este ARN se obtuvo el ADN complementario (ADNc) por retrotranscripción (RT).

Técnica Taqman

La reacción se realizó en placa de 96 pocillos, y se añadió a cada uno 10 µL de la muestra de ARN (200 ng) y 10 µL de mezcla 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 programó en el Termociclador 9800 Fast Thermal Cycle (Applied Biosystems) un primer paso de incubación a 25°C durante 10 minutos, seguido de un periodo de 120 minutos a 37°C, y una fase final de inactivación a 95°C durante 5 minutos.

PCR cuantitativa (siglas en inglés q-PCR)

Las muestras (1 µL) se adicionaron a los pocillos de una placa de 384 pocillos y se añadieron 3,5 µL de agua libre de ARNasas, 1 µL TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies), 5 µL TaqManH Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, P/N 4304437, Foster City, CA, EE.UU.) y 0,5 µL la mezcla de los cebadores específicos (1,5X) para *DKC1* (Hs00154737_m1), *NOP10* (Hs00430282_m1), *TINF2* (Hs01554309_g1), *TERC* (Hs03454202_s1). 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.

Técnica SYBR Green

La reacción se realizó en placa de 96 pocillos, y se añadió a cada uno 17 µL de la muestra de ARN (200 ng) y 3 µL de mix de PCR (5x Reaction Mix (2 µL), Maxime Enzime Mix (3 µL), (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 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, seguido de un periodo de 15 minutos a 50°C y una fase final de inactivación a 85°C durante 5 minutos.

q-PCR

Una vez obtenido el ADNc se procedió a la cuantificación mediante qPCR empleando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Para llevar a cabo esta PCR se colocó 1 µL de cada una de las muestras de ADNc en los pocillos correspondientes de una placa de 384 pocillos y 9 µL del mix de qPCR (Master Mix (5 µL), Primers específicos para cada gen (0,5 µL para F y 0,5 µL para R), agua libre de ARNasas (3 µL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), obteniendo un volumen total por pocillo de 10 µL. Los primers empleados fueron 5'-CTCCGTTATGGTAGCGCTGC y 5'-GCGGAACCTCGCTTCTC para 45S

(Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.), 5'-CGACGACCCATTTCGAACGTCT y 5'-CTCTCCGGAATCGAACCTGA para 18S (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.), y 5'-GCTGGCTTCGGCAGCACATATAC y 5'-TATCGAACGCTTCACGAATTTGC para TERC DNA (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.). 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 2 minutos a 50°C, seguido de 40 ciclos en los que se mantuvo la temperatura a 95°C durante 10 minutos para disminuirla a 60°C durante un minuto.

Se empleó la cuantificación relativa según el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ ³⁶, usando los valores correspondiente al número de ciclos de PCR en el cual la fluorescencia detectada se diferencia del ruido de fondo (por siglas en inglés CT (cycle threshold)). Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial y es característico de cada una de las reacciones.

El método $2^{-\Delta\Delta CT}$ cuantifica en base a la CT de un gen de referencia. En este caso se empleó GAPDH como gen de referencia:

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

Para poder aplicar esta fórmula es necesario que la eficiencia de la reacción de PCR (E) en ambos genes sea aproximadamente igual. Para comprobarlo se construyó una curva para cada gen a partir de diluciones seriadas 1:10 de una muestra de ARN de concentración conocida obtenida de células HeLa. La E se calculó a partir de las pendientes obtenidas luego de representar el logaritmo de la concentración (eje x) frente al CT (eje y) y según la ecuación:

$$E = 10^{(-1/pendiente)} - 1 \times 100$$

donde E = 100 corresponde a 100% eficiencia. La eficiencia para genes ribosomales y TERC fue de 1,8 y 1,9, respectivamente.

Tratamientos

Para disminuir los niveles de GSH y generar estrés oxidativo se emplearon dos reactivos. La diamida (Sigma-Aldrich St. Louis, EE.UU.) es el agente oxidante de tioles que se empleó para reducir, de forma rápida los niveles de GSH al oxidarlo a GSSG. El rango de concentraciones empleadas de este reactivo para el tratamiento de células se encuentra en torno a 0,05-0,5 mM³⁷. También se empleó el H₂O₂ (Sigma-Aldrich St. Louis, EE.UU.), una ERO que produce daños en el ADN y otras alteraciones celulares que conducen a un estado de estrés oxidativo. En este caso el rango de concentraciones empleadas de este reactivo se encuentra alrededor de 0,001-0,5 mM.

- Se preparó una disolución stock de 20 mM de diamida en H₂O MQ. Se realizó un filtrado de 0,22 µm. Para los tratamientos se preparó en DMEM sin suplementar. La concentración a emplear del compuesto se determinó mediante el ensayo de sulforodamina B (SRB).
- Se preparó una disolución stock de 0,979 M de H₂O₂ en H₂O MQ. Para los tratamientos, el compuesto se preparó en DMEM sin suplementar a una concentración de 500 µM y se trató a las células durante 30 minutos, a 37°C y 5% de CO₂ como había descrito anteriormente Yang *et al.*, (2016).

Estudio de viabilidad celular (método de tinción por exclusión)

Se determinó la viabilidad celular para el tratamiento con H₂O₂ y diamida mediante el método de exclusión con azul tripán. Este es un colorante azoico que permite diferenciar las células vivas de las muertas. En las células que son viables, su membrana se encuentra intacta y por tanto no son capaces de incorporar el colorante. En cambio, las células muertas sí que presentan comprometida la integridad de la membrana, por lo que el azul tripán es capaz de atravesar la membrana y teñir las células. Se sembraron 200.000 células en placas de 6 pocillos, y tras 24 horas se trataron con los tratamientos anteriormente descritos. Se procedió a recoger las células a los 30 minutos del tratamiento y el pellet celular se resuspendió en 1 ml de medio sin SFB, de esta mezcla se tomaron 20 µL y se le adicionaron 20 µL de azul tripán; dejándose 3 min a temperatura ambiente. A continuación, se transfirieron 10 µL de la suspensión celular a la cámara de Neubauer y se procedió al conteo directo en el microscopio invertido (Leica Microsystems, DFC450 C). Se contaron el número de células teñidas (muertas) y las no teñidas (vivas) y se calculó el porcentaje viabilidad (número de células vivas/número de células totales multiplicado por 100).

Ensayo citotóxico. Sulforodamina B

Para determinar la inhibición del crecimiento celular producido por los distintos tratamientos, se empleó el ensayo de SRB. Es un ensayo colorimétrico basado en la tinción de proteínas para células que crecen tanto en monocapa como en suspensión. El SRB es un colorante minoxanteno brillante de color rosa con dos grupos sulfónicos que se unen a los residuos de los aminoácidos básicos de las proteínas celulares en condiciones acídicas suaves; y se disocia en condiciones básicas. Como la unión de SRB es estequiométrica, la cantidad de colorante extraído de las células teñidas es directamente proporcional a la masa celular ³⁸.

Este análisis fue realizado en placas de 96 pocillos sembrando 10.000 células HeLa por pocillo en 200 µl de DMEM completo. A las 24h post-siembr, se añadió el tratamiento a diferentes concentraciones (0,01 mM; 0,03 mM, 0,06 mM; 0,12 mM; 0,25 mM, 0,5 mM; 1 mM; 2 mM) disueltos en 200 µl de DMEM sin suplementar durante 24h. Se realizaron triplicados por cada condición. Pasado el tiempo del tratamiento, las células se fijaron con 50 µL ácido tricloroacético (TCA) al 10% (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU). Se incubó la placa durante 1 hora a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la placa 5 veces con agua y se dejaron secar. A continuación, se añadió 100 µL de SRB (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) al 0,4% (p/v) disuelto en ácido acético al 1% en cada pocillo y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se eliminó el exceso de tinción con lavados de ácido acético al 1%. El colorante fijado se solubilizó con 100 µl de tampón Trizma Base (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) a 10 mM y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, se realizó una medición de la absorbancia en el espectrofotómetro (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices) a longitudes de onda de 570 nm y se le restó el ruido de fondo medido a 620 nm para cada pocillo. Se calculó el porcentaje de viabilidad y de inhibición celular mediante las fórmulas:

$$\%supervivencia\ celular = \frac{OD_{muestra} - OD_{blanco}}{OD_{neg\ control} - OD_{blanco}} \times 100$$

$$\%inhibición\ celular = 100 - \%supervivencia\ celular$$

Estos valores se usaron para calcular la concentración que produce el 50% de inhibición del crecimiento celular (CI50). Se construyó la curva dosis respuesta ploteando el % de viabilidad celular en la ordenada y, el logaritmo de las concentraciones en la abscisa. La CI50 se determinó por regresión no lineal (modelo sigmoide) y con ayuda del programa GraphPad PRISM versión 6.0 y también se utilizó el programa Excel de Microsoft, linealizando los datos para obtener la siguiente representación y ecuación:

$$\% supervivencia = f(\log [\text{sustancia de ensayo}]) \text{ y } CI = 10^{(50 - \frac{b}{a})}$$

Donde:

a: es la pendiente de la recta resultante de la representación indicada anteriormente.

b: es el valor de la intersección de la recta con el eje de ordenadas (% de actividad).

Determinación de niveles de GSH y del cociente GSSG/GSH

Este experimento se realizó en formato de placa de 12 pocillos. A las 24 h post-transfección los niveles de GSSG/GSH se estudiaron utilizando el kit "The DetectX Glutathione kit" (Arbor Assays,

Michigan, EE.UU.). Después de lavados los pocillos con PBS, se añadieron 50 μ L de ácido 5-sulfosalicílico (SSA) 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. Pasado ese tiempo, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 14000 rpm 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. En una placa de 96 pocillos se añadieron 50 μ L de las muestras, los estándares y los controles. Se usó como blanco 50 μ L de diluyente. Al resto de pocillos se añadió 25 μ L de ThioStar Reagent, se agitaron suavemente y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se midió la señal de fluorescencia en fluorímetro spectraMAX GEMINI (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) a una longitud de onda de emisión de 510 nm, y con 390 nm de excitación. Este valor se corresponde con la concentración de GSH libre. Para la obtención de la concentración de GSH total se añadieron 25 μ L de una mezcla de reacción aportada por el kit, dejándose a temperatura ambiente durante 15 minutos y midiendo la fluorescencia a 510 nm con excitación de 370-410 nm.

La cantidad de GSSG se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

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

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

Estudio de la morfología nucleolar

Para este experimento se utilizó el kit *CytoPainter Nucleolar Staining Kit- Green Fluorescence* (Abcam, Cambridge, UK) y líneas celulares que suelen ser modelos empleados para estudiar el estrés oxidativo en el laboratorio CIBERER, fibroblastos embrionarios de ratón NIH 3T3 y la línea HeLa, así como los modelos de HeLa silenciados. Este experimento se desarrolló en cámaras de 8 pocillos de 2 cm² LAB-TEK II Chambered Coverglass (Nunc, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) a una densidad de 50.000 células por pocillo. Una vez pasadas 24 h de la última transfección se empleó el kit *CytoPainter Nucleolar Staining Kit- Green Fluorescence* (Abcam, Cambridge, UK) para el marcado del nucléolo, prosiguiéndose con el protocolo del kit. Se eliminó cuidadosamente el medio y se añadieron 250 μ L de *Green detection Reagent*, diluido 1:1000 en el tampón de ensayo 1x, y se incubó durante 20 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Los pocillos se lavaron dos veces con 250 μ L de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) sin Rojo fenol

(Biowest, Riverside, MO, EE.UU.) y se dejó con el último lavado para su visualización con el microscopio confocal con un filtro FITC estándar.

Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se utilizó para estudiar la localización subcelular de GSTP y la distribución de NPM1. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos haciéndolas crecer en cubreobjetos de 13 mm dispuestos en el fondo del pocillo y fueron transfectadas según protocolo descrito. A las 24 h de la última transfección se prosiguió con el protocolo IFI. Las células se lavaron una vez cuidadosamente con PBS. Después, se fijaron con paraformaldehído al 4% a 37°C y 5% CO₂ durante 15 minutos. Se eliminó el paraformaldehído y se hicieron nuevamente dos lavados con PBS frío. Se permeabilizó la membrana de las células con Tritón X-100 0,5% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se eliminó la solución de permeabilización y se bloqueó con BSA 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Esta primera parte del protocolo se realiza directamente en los pocillos por lo que se requiere un volumen suficiente de las soluciones para que cubran los cubreobjetos. Se eliminó la solución de bloqueo y se volvieron a hacer dos lavados con PBS frío. Tras finalizar esta primera parte, los cubreobjetos de vidrio se transfirieron a la cámara húmeda. Se adicionó el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo (90 µL por cubreobjeto). Los anticuerpos que se emplearon fueron GSTP (1:500 Rabbit, Novus Biologicals, USA) y NPM1 (1:500 Mouse, Novus Biologicals, USA). Se dejaron incubando overnight a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS frío dejando actuar 5 minutos cada lavado. Después, se adicionó el anticuerpo secundario diluido también en solución de bloqueo (90 µL por cubreobjeto). Se emplearon los anticuerpo anti-rabbit Alexa Fluor 488 y anti-mouse Alexa fluor 633. Se dejó incubando a temperatura ambiente dentro de la cámara húmeda durante 1 hora y luego se lavaron 3 veces con PBS frío, de 5 minutos cada uno. Se montaron los cubreobjetos en portas con 5 µL de DAPI-Fluoromont. Se sellaron las preparaciones y se dejaron secar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 min. Se guardaron hasta su visualización en microscopio confocal a 4°C en oscuridad durante al menos 24 horas.

Obtención de extractos proteicos

Se llevaron a cabo dos protocolos con la finalidad de obtener 1) extractos proteicos totales y 2) fracciones citoplasmática/nuclear y nucleolar.

Obtención de proteínas totales

Para obtener el extracto proteico total el botón celular se obtuvo a partir de células HeLa silenciadas en el formato de placa de 6 pocillos. Este botón se dejó con 100 μL 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 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ortovanadato de sodio activado 1 mM e inhibidor de proteasas 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) durante 15 minutos en hielo. La suspensión resultante se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos a 4°C, y los sobrenadantes se almacenaron a -80°C.

Obtención de extractos nucleolares

Para la obtención de extractos nucleolares se siguió el protocolo descrito por Li *et al.* (2015)³⁹. El botón celular se obtuvo a partir de células HeLa y NIH 3T3 cultivadas en frascos T75 a una densidad de $2,1 \times 10^6$ células. Este se resuspendió en 0,5 ml de la solución I (Sacarosa 0,5 M; MgCl_2 3 mM; e inhibidor de proteasas 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$). A continuación, se realizaron 10 ciclos de sonicación con una amplitud del 50% durante 10 segundos con 10 segundos de descanso. En el siguiente paso, se añadió por las paredes del eppendorf 0,5 ml de la solución II (Sacarosa 1 M; MgCl_2 3 mM; e inhibidor de proteasas 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$). En esta etapa era importante observar dos fases por la diferente concentración de sacarosa. Se centrifugó a 1800 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante (fracción citoplasmática/nuclear) se transfirió a un tubo nuevo cuidadosamente para no alterar las fases de sacarosa. Por otra parte, se transfirió el pellet a un tubo nuevo con 200 μL de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 8; NaCl 150 mM; SDS 0,1%; Na deoxiclorato 0,5%; Tritón X-100 1%; PMSF 1 mM; e inhibidor de proteasas 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y se volvió a realizar 5 ciclos de sonicación con una amplitud del 50% durante 10 segundos con 10 segundos de descanso. Se centrifugó a 1800 g durante 5 minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante que contenía los nucléolos.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El ensayo se desarrolló en una placa de 96 pocillos, disponiéndose tres pocillos (réplicas) por muestras y por punto de la recta patrón. Esta última se construyó a partir de una serie de soluciones de seroalbúmina bovina (BSA) con concentraciones conocidas (10; 6; 4; 2; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0 mg/ml). Para la recta, se añadieron 5 μl de la solución de cada concentración y 195 μl del reactivo Bradford diluido a 1/5. En el caso de las muestras, se añadieron 2 μl de muestra más 3 μl de agua MQ y 195 μl del reactivo Bradford diluido a 1/5. Después de incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos en total oscuridad se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Con los datos

de absorbancia y concentración se obtuvo la curva patrón, y a partir de la ecuación obtenida de esta recta se calcularon las concentraciones de las muestras problemas.

Análisis de expresión de proteínas por Western Blot

Las muestras se ajustaron para cargar 15 µg por pocillo. Se les añadió 5 µL de tampón de carga LDS (Tris 40mM, EDTA, azul de bromofenol 0,01%, sacarosa 40%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%) para un volumen final de 25 µl, y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. En función del tamaño de las proteínas de interés estas fueron resueltas en gel de proliacrilamida al 12% (resolving: agua MiliQ 3,23mL, acrilamida 40% 2,52mL, Solución II (Tris-HCl 2M pH 8,8, SDS 20%) 2,08 mL, APS 10% 160µl y TEMED (tetrametiletilendiamina) 9,6 µl. Stacking 4,5%: agua MiliQ 1,87 mL, acrilamida 40% 3337,5 mL, Solución III (Tris-HCl 2M pH 6,8, SDS 20%) 750 µL, APS 10% 100 µl y TEMED 6µl) durante 1 hora aproximadamente a 120V en cubeta (BRAND, Wertheim, Germany) con Running buffer (Tris 25mM, Glicina 190mM, SDS 0,1%, pH 8,3).

Para la electrotransferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Blotting Membrane 0,45µm, GE Healthcare Life Sciences) se empleó el buffer de Transferencia (Tris 25mM, glicina 190mM, metanol 20%, pH 8,3) durante 1 hora con un voltaje de 100V a 4°C.

La membrana se bloqueó con Leche al 5% en TBS-Tween 20 (Tris-HCl 20mM 150 mM NaCl, Tween20 0,1%, pH 7,5) durante una hora en agitación. Pasado el tiempo de bloqueo, la membrana se incubó, toda la noche a 4°C en agitación suave, con los anticuerpos primarios específicos frente a las proteínas de interés: NPM1 (1:1000 Mouse, Novus Biologicals. EE.UU.), GSTP (1:1000 Mouse, Santa Cruz BioTech, EE.UU.), DKC1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EE.UU.), NOP10 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EE.UU.), y TIN2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EE.UU.), y con β-actina (1:1000, Santa Cruz BioTech, EE.UU.) y la histona H3 como controles de carga (1:5000, Cell Signaling, Massachusetts, EE.UU.). Los anticuerpos se diluyeron en leche al 1% en TBS-Tween. Las membranas se lavaron con TBS-Tween tres veces durante 10 minutos cada vez y se incubaron durante 1 hora, en agitación suave, con el 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. Pasado ese tiempo, se realizaron otros tres lavados con TBS-Tween y se procedió a la detección quimioluminiscente mediante la incubación de las membranas con los reactivos del kit de revelado ECLTM Western Blotting Detection Reagents (Amersham GE HealthcareBio-Science AB, Uppsala, Suecia) a dilución 1:1 y se detectó la señal mediante el escáner densitométrico (*Image*

Quant LAS-4000, General Electrics). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ.

Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, y los resultados de los mismos se muestran en forma de media \pm desviación estándar. Para la comparación entre los dos grupos de estudio (siTARGET, siCONTROL) se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney, considerándose estadísticamente significativos aquellos contrastes con un valor de p inferior a 0.05. Los gráficos de barras representan la media de los replicados y las barras de error la desviación estándar. El análisis estadístico de los datos se llevó acabo con el software GraphPAD v 6.0.

6. Resultados

Caracterización de los modelos celulares

En los tres formatos de placas donde se realizó el silenciamiento por ARNi se alcanzó una densidad y viabilidad celular que posibilitó los estudios posteriores sobre estos modelos. La evaluación de la expresión génica y proteica sirvieron como control del proceso de silenciamiento. En la figura 7.A se encuentran reflejados los resultados de la RT-qPCR que se realizó a las 48 horas tras la primera transfección, observándose que la expresión génica se redujo significativamente (hasta un 90%) en los tres modelos siDKC1, siNOP10, y siTIN2.

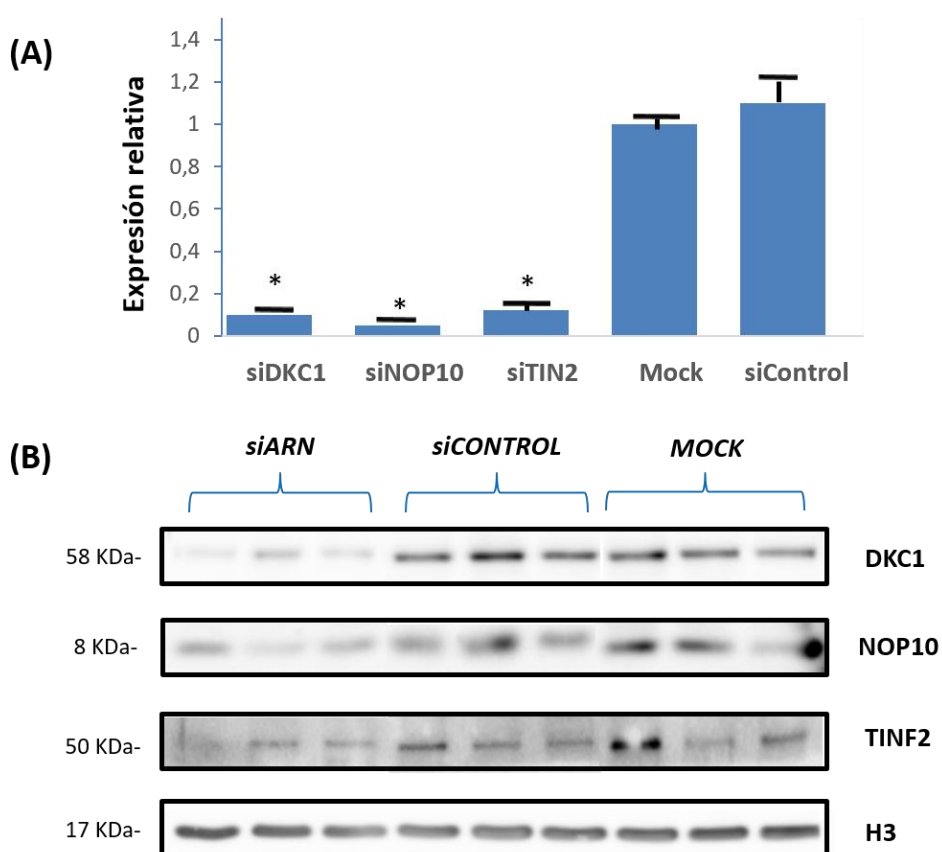


Figura 7. Análisis de los modelos celulares de DC (siDKC1, siNOP10, siTIN2) generados empleando la tecnología del ARNi, 48h después de la primera transfección. (A) Niveles de expresión de ARNm de *DKC1*, *NOP10* y *TIN2*, frente a las poblaciones control y MOCK evaluado por RT-qPCR. La expresión se comparó con *GADPH* como gen para la normalización. Los resultados están representados por la media y la DE de tres experimentos independientes. "*" corresponde a diferencias significativas respecto al siCONTROL. (B) Análisis de Western-blot de *DKC1*, *NOP10* y *TIN2* para tres réplicas. La expresión se comparó con *H3* como control.

También se llevó a cabo un análisis Western-blot en los tres modelos de silenciamiento, y se observó una disminución en los niveles proteicos de DKC1, NOP10 y TIN2, aunque esta reducción fue de menor magnitud (50%) que a nivel de ARNm (Fig. 7.B), tal vez por tratarse de proteínas que presentan un tiempo de vida media mayor.

Estudio de los niveles de expresión de 45s y 18s en las células silenciadas

Se determinó también la expresión relativa de las subunidades ribosomales 45s y 18s. La medida se llevó a cabo mediante una RT-qPCR por la técnica de SYBR Green. Se observó una disminución en su expresión en las poblaciones siDKC1, y siNOP10 respecto a la población siCONTROL (Fig. 8). El silenciamiento de *TINF2* produjo un descenso no significativo en la expresión de ambas subunidades ribosomales.

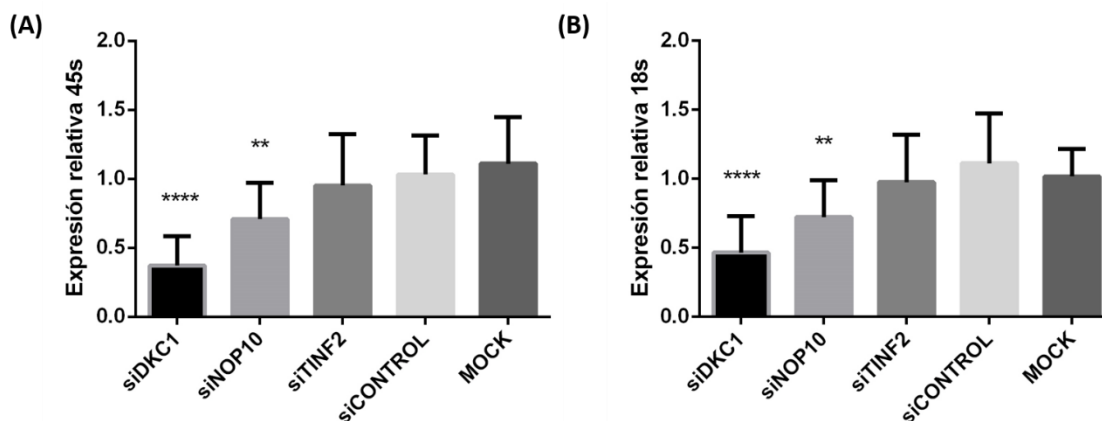


Figura 8. Expresión relativa de 45s y 18s. (A) Representación gráfica de la expresión relativa de 45s para las diferentes poblaciones silenciadas y sus controles (B) Representación gráfica de la expresión relativa de 18s para las diferentes poblaciones silenciadas y sus controles. Obtenido por RT-qPCR y calculados mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados de la expresión relativa están representados por la media y la SD de tres experimentos independientes. “*” corresponde a diferencias significativas respecto al siCONTROL. ($p < 0,001$).

Estudio de la morfología nucleolar

La validez del kit comercial “*CytoPainter Nucleolar Staining Kit- Green Fluorescence*” (Abcam, Cambridge, UK) para estudiar morfología nucleolar se evaluó en un principio en líneas celulares que suelen ser modelos empleados para estudiar el estrés oxidativo en el laboratorio CIBERER: células NIH 3T3, 3T3-L1 y HeLa. El número de nucléolos fue el único parámetro que se pudo medir mediante el kit, ya que el autoblanqueo impidió cuantificar el área como otro parámetro morfométrico. Las células 3T3 (tanto la línea NIH como la L1) presentaron una media de 10 nucléolos (Fig. 9), mientras que las HeLa presentaron una media de 2 a 3 nucléolos (Fig 11). De

lo cual concluimos que las líneas de fibroblastos de ratón disponibles en el laboratorio no eran adecuadas para proseguir experimentos con este kit.

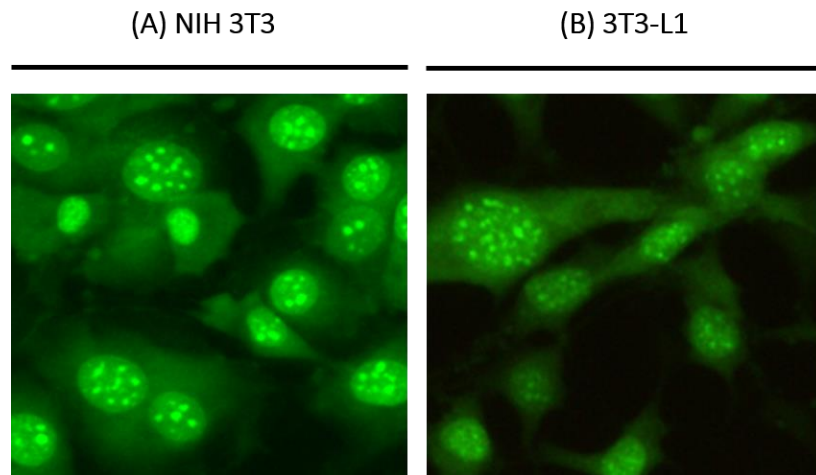


Figura 9. Morfología nucleolar en diferentes líneas celulares. Imágenes del microscopio de fluorescencia donde se muestra la morfología nucleolar en (A) NIH 3T3 y (B) 3T3-L1. Ambas teñidas empleando el *CytoPainter Nucleolar Staining Kit*.

Los resultados con células silenciadas para los genes *DKC1*, *NOP10* y *TINF2* no revelaron diferencias en el número de nucléolos (Fig. 10) respecto al control. Sin embargo, la pérdida de fluorescencia imposibilitó estudiar otro índice morfométrico.

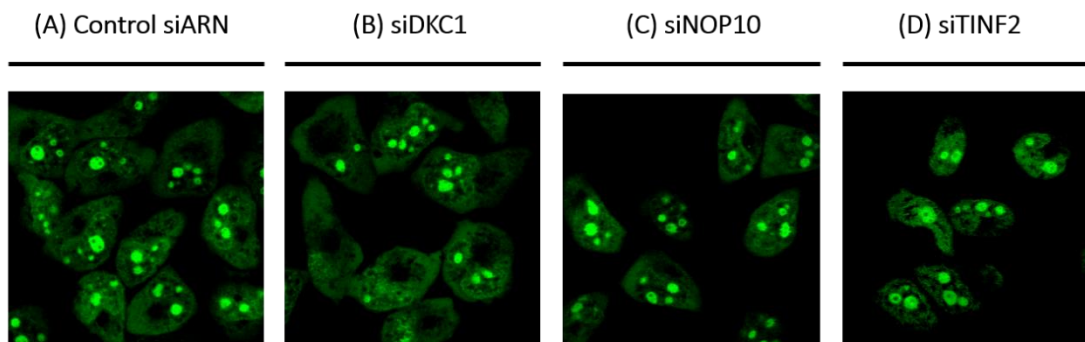


Figura 10. Estudio de la morfología nucleolar. (A-D) Imágenes de microscopía confocal donde se muestra la morfología del nucléolo en las diferentes poblaciones silenciadas y sus controles. Se utilizó un kit comercial para su marcaje.

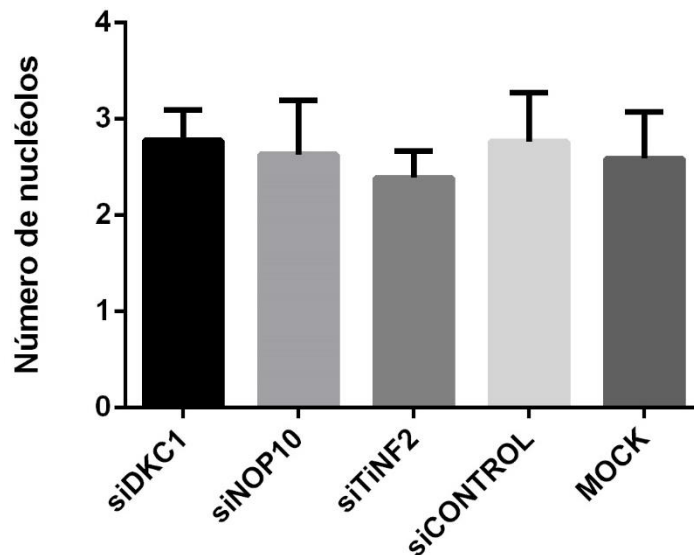


Figura 11. Contaje de nucléolos. Contaje del número de nucléolos en las diferentes poblaciones silenciadas. Los resultados de la expresión relativa están representados por la media y la SD de tres experimentos independientes (n=30 células).

Localización mediante microscopía confocal de GSTP y NPM1 en los modelos de silenciamiento

Los resultados de la IFI mediante microscopía confocal permitieron confirmar los resultados obtenidos con el kit para la tinción fluorescente del nucléolo. El número promedio de nucléolos en la línea siControl fue de 2,7 nucléolos. Tampoco se observaron diferencias en este parámetro entre los modelos de silenciamiento en relación a los controles. Otro resultado obtenido con ese ensayo fue comprobar la localización nuclear de GSTP (Fig. 12.E-H) y nucleolar de NPM1 (Fig. 12.I-L). Este hallazgo se confirmó por la tinción del núcleo con fluoromont DAPI como control nuclear.

En estas imágenes podemos observar que existe un importante descenso en la fluorescencia de NPM1 en los modelos siDKC1 y siNOP10 en comparación con la población siControl, sin embargo, en siTN2 se aprecia incremento de la tinción nucleolar. En los controles la tinción del nucléolo fue uniforme, en tanto en las células siDKC1 y siNOP10 se redujo la tinción en la zona central, o se limitó a la región perinucleolar y se hizo más aparente su localización en nucleoplasma (Fig. 13). La cuantificación de la fluorescencia confirmó estos hallazgos. La fluorescencia de GSTP se distribuyó homogéneamente en el núcleo y fue similar en todas los modelos silenciados y el control. Las imágenes de solapamiento (MERGE) confirman la presencia de GSTP en la región nuclear.

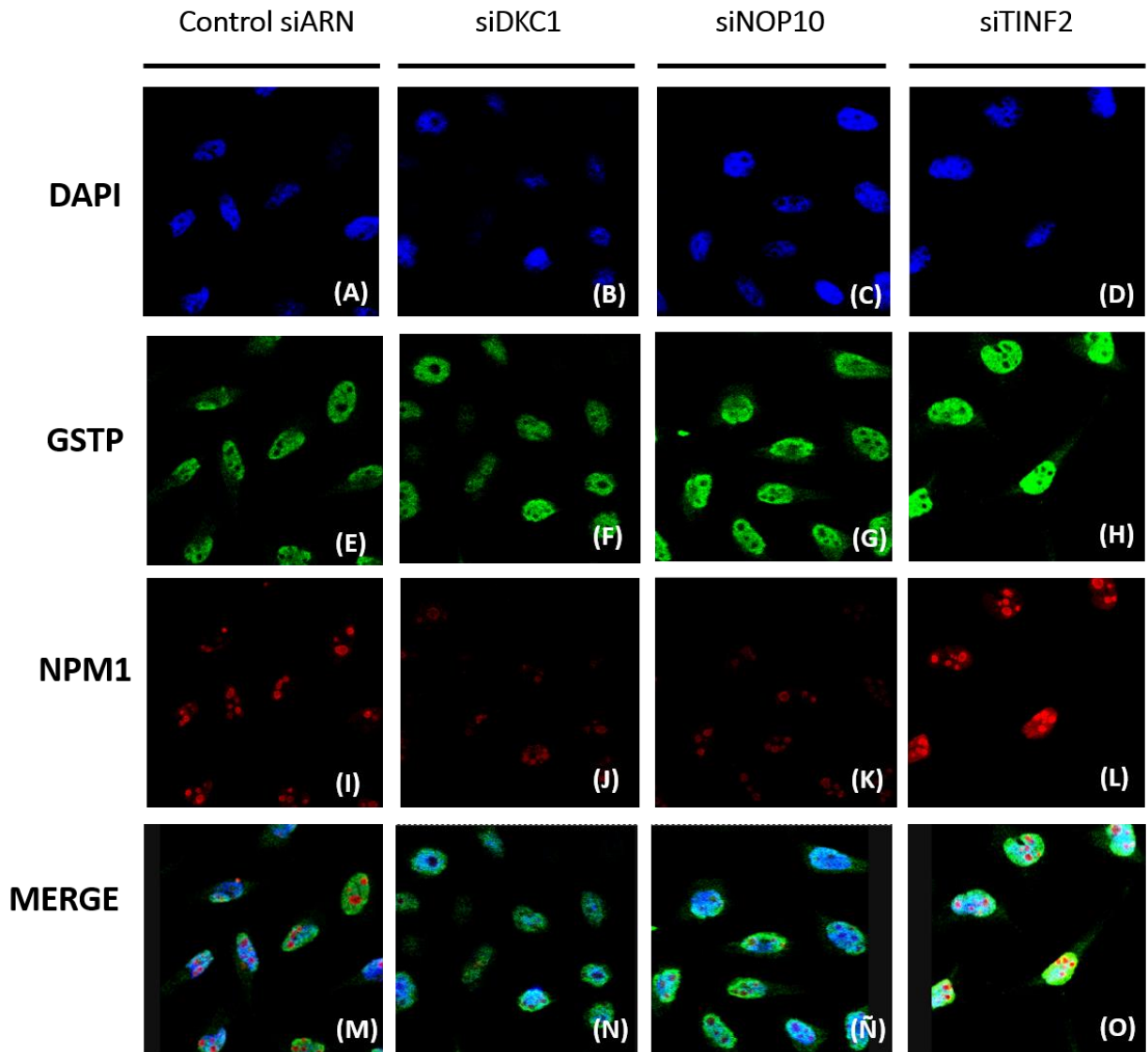


Figura 12. Estudio de la localización de GSTP y NPM1 en células HeLa silenciadas. Imágenes de microscopía confocal donde se muestra la localización de GSTP (E, F, G, H) y NPM1 (I, J, K, L) en las diferentes poblaciones de células silenciadas. Se utilizó el marcador fluoromont DAPI como control (A, B, C, D).

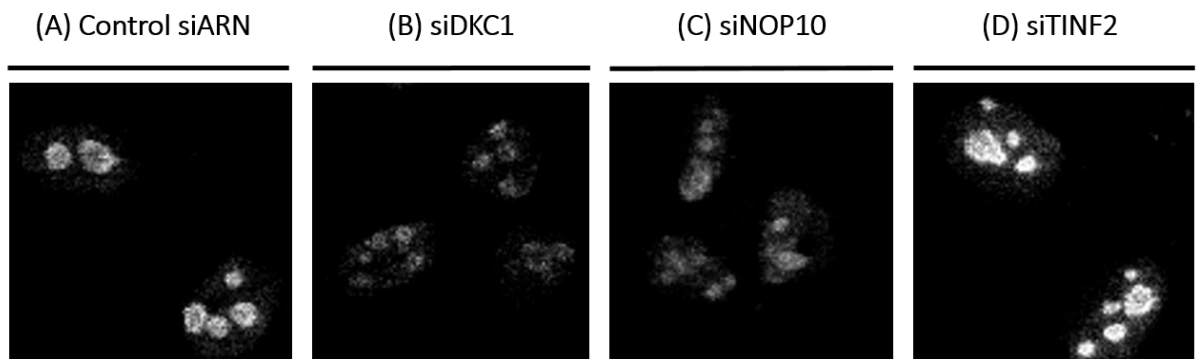


Figura 13. Inmunolocalización de NPM1 en células HeLa silenciadas. Imágenes de microscopía confocal y procesadas en ImageJ en formato 8-bits.

Por otro lado, el procesamiento de las imágenes de IFI con programa ImageJ mediante un plugin de colocalización permitió detectar que en las imágenes fusionadas (MERGE) de los modelos celulares siDKC1 y siNOP10 la NPM1 co-localiza con GSTP en el núcleo (Fig. 14.B y C). Respecto a siControl y siTIN2 se puede observar que ambas proteínas co-localizan en la zona perinucleolar. (Fig. 14.A y D). En las cuatro condiciones (siControl, siDKC1, siNOP10, siTIN2) la co-localización en las imágenes se muestra de color blanco (Fig. 14).

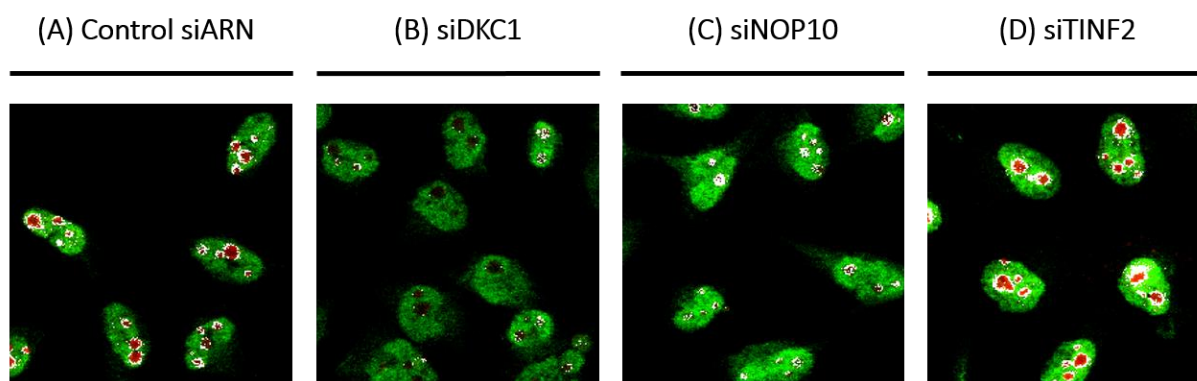


Figura 14. Estudio de la co-localización de GSTP y NPM1 en células HeLa silenciadas. Imágenes de microscopía confocal y procesadas en ImageJ empleando el plugin “Colocalization”. En blanco se muestran las zonas donde co-localizan GSTP y NPM1.

Estudio de viabilidad y citotoxicidad de Diamida y H₂O₂ en células HeLa

Con el fin de producir estrés oxidativo utilizamos diamida como agente que disminuye los niveles de GSH y H₂O₂ como agente oxidante.

La diamida se emplea usualmente en concentraciones de 0,05-0,5 mM ; en cambio el H₂O₂ puede usarse en tratamientos prolongados en concentraciones de nanomoles a 10 μM para producir efectos crónicos o en tratamientos cortos a concentraciones por encima de 100 μM para generar efectos agudos¹⁴. Sin embargo, las diferencias en la sensibilidad de cada tipo celular nos motivaron a ensayarlos con SRB^{40,41}. Los resultados obtenidos de este ensayo tras el tratamiento durante 24h con diferentes concentraciones de estas sustancias mostraron que se produce una disminución del porcentaje de supervivencia celular conforme se aumenta la dosis (Fig. 15.A y B). Esta relación inversa de la concentración frente a la supervivencia celular siguió un modelo sigmoideo a partir del cual se obtuvo una CI₅₀ de 0,25 mM para la diamida y de 0,07 mM para el H₂O₂. Con estos resultados seleccionamos 0,2 mM y 0,5 mM, como concentraciones de ensayo para la diamida y el H₂O₂, respectivamente, a fin de en tratamientos de 30 min generar un estrés oxidativo agudo⁴¹. Los estudios de viabilidad celular obtenidos por el ensayo del azul de tripano mostraron que estos tratamientos no disminuyeron la viabilidad celular (Fig. 15.C y D).

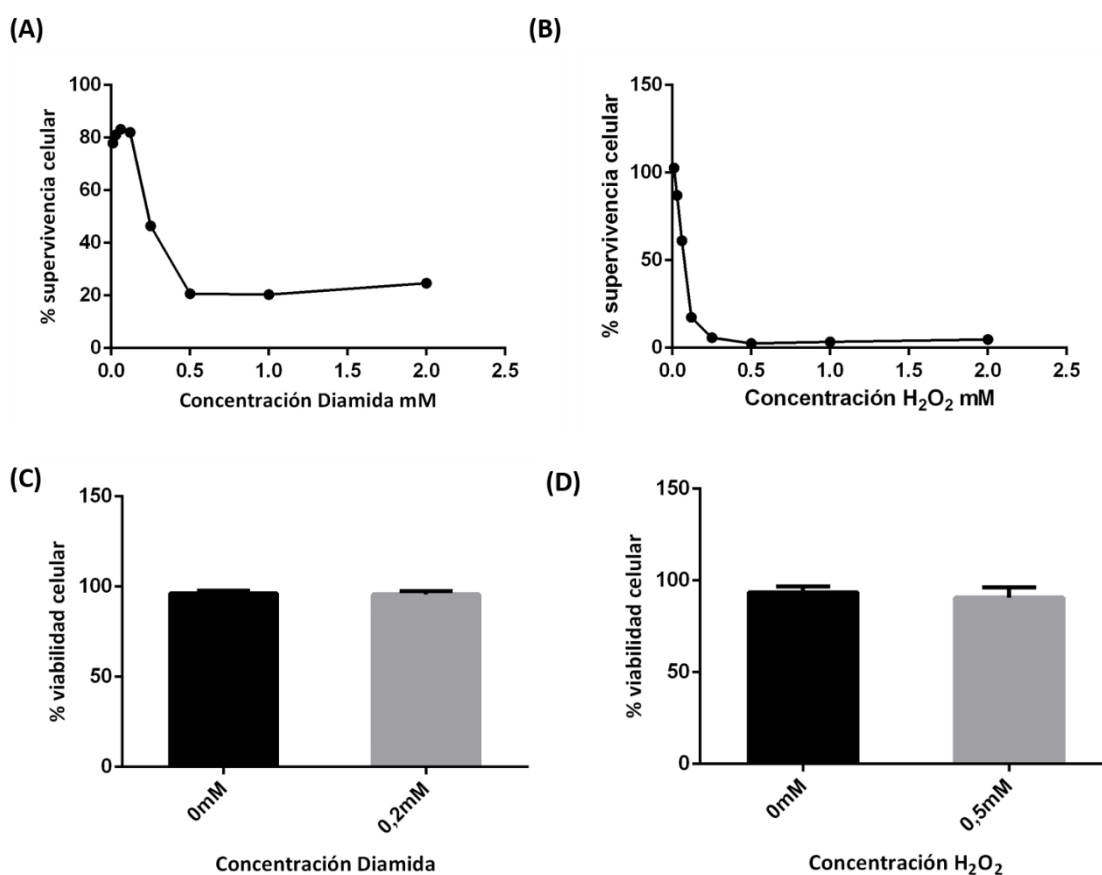


Figura 15. Estudio de citotoxicidad y viabilidad de células HeLa tratadas con diamida y H₂O₂. (A) Curva de supervivencia celular (%) mediante el ensayo de SRB de las células HeLa tratadas con diferentes concentraciones de diamida (0,01 mM; 0,03 mM; 0,06 mM; 0,12 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM). La CI_{50} obtenida para esta curva fue de 0,2480 mM. (B) Curva de supervivencia celular (%) mediante el ensayo de sulforodamina B de las células HeLa tratadas con diferentes concentraciones de H₂O₂ (0,01 mM; 0,03 mM; 0,06 mM; 0,12 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM). La CI_{50} obtenida para esta curva fue de 0,0635 mM. (C-D) Representación gráfica de los resultados del ensayo con azul de tripano de las células HeLa tratadas con 0,2 mM de diamida y 0,5 mM de H₂O₂ durante 30 minutos. Los resultados se representan como la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Evaluación de los niveles de GSH y del cociente GSSG/GSH en las células silenciadas tratadas con Diamida y H₂O₂

Los niveles de GSH libre y GSSG, así como su cociente GSSG/GSH se estudiaron como indicadores de estrés oxidativo en los modelos celulares de silenciamiento sin ningún tratamiento y expuestas por 30 min a 0,2 mM de diamida y 0,5 mM de H₂O₂¹⁴. En las células siDKC1 y siNOP10 se detectaron altos niveles de oxidación del GSH y del cociente GSSG/GSH demostrando estrés oxidativo en estas células. En siTIN2 no se apreció este efecto (Fig. 16.A).

En las células siDKC1, tratadas con diamida el cociente GSSG/GSH se incrementó respecto a siControl, sin embargo, este disminuyó en siNOP10 y siTIN2, aunque las diferencias no fueron

de significación estadística (Fig. 16.B). En cambio, en las células tratadas con H₂O₂ el cociente GSSG/GSH solo aumentó en la población siDKC1 y siTIN2, pero tampoco estas diferencias alcanzaron significación estadística (Fig. 16.C).

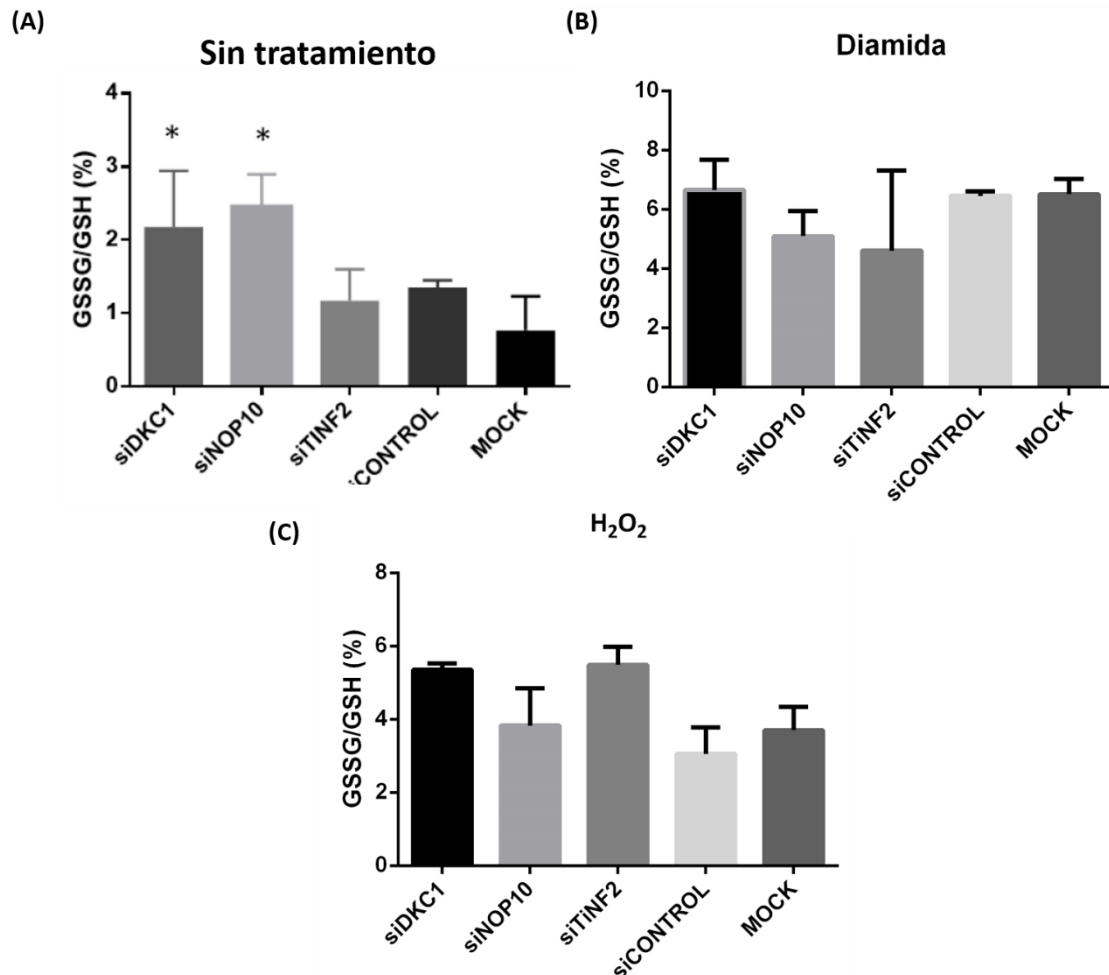


Figura 16. Cociente GSSG/GSH en las poblaciones silenciadas. (A) Representación gráfica del cociente GSSG/GSH en las poblaciones silenciadas no tratadas. (Trabajo final de grado de Fuster et al, 2016). (B) Representación gráfica del cociente GSSG/GSH de las poblaciones silenciadas tratadas con 0,2 mM de diamida durante 30 minutos (C) Representación gráfica del cociente GSSG/GSH de las poblaciones silenciadas tratadas con 0,5 mM de H₂O₂ durante 30 minutos. Los resultados están representados por la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. “*” indica diferencias significativas respecto a siCONTROL.

Estudio de la expresión proteica de GSTP y NMP1 en los extractos nucleolares

Otro de los objetivos que se propuso para este trabajo fue obtener diferentes fracciones celulares para analizar los niveles de expresión de NPM1 y GSTP en extractos citoplasmáticos, nucleares y nucleolares de células HeLa y NIH 3T3.

El rendimiento de la extracción a partir de células NIH 3T3 fue bajo, tanto partiendo de frascos de T75 como de células cultivadas en frascos T150, donde en confluencia se contabilizaron

18,4x10⁶ células aproximadamente (Tabla 2). La extracción partir de células HeLa tuvo mejor rendimiento, así que nos planteamos estudiar NMP1 y GSTP en los extractos proteicos de las diferentes fracciones subcelulares de esta línea celular.

Tabla 2: Rendimiento de las extracciones nucleolares.

NIH 3T3		
	Fracción citoplasma/núcleo	Fracción nucleolar
T150	0,0763 µg/µl	0,8632 µg/µl
T75	0,28146 µg/µl	0,35640 µg/µl
HeLa		
	Fracción citoplasma/núcleo	Fracción nucleolar
T75	0,55016 µg/µl	1,03942 µg/µl
	0,53453 µg/µl	1,43365 µg/µl
	0,70473 µg/µl	1,62565 µg/µl

Los resultados del Western-blot de las fracciones: citoplasma/núcleo y nucléolo nos permiten apreciar la proteína NPM1 en la fracción nucleolar y GSTP en la fracción citoplasma/núcleo, y en menor proporción en nucléolo. La Histona H3 solo se detectó en la fracción nucleolar y no en la fracción citoplasma/núcleo, en cambio la actina aparece en ambos sub-compartimentos celulares (Fig.17). Este resultado nos demostró que no logramos obtener extractos puros de nucléolo y solo logramos separar extractos citoplasmáticos de nucleares.

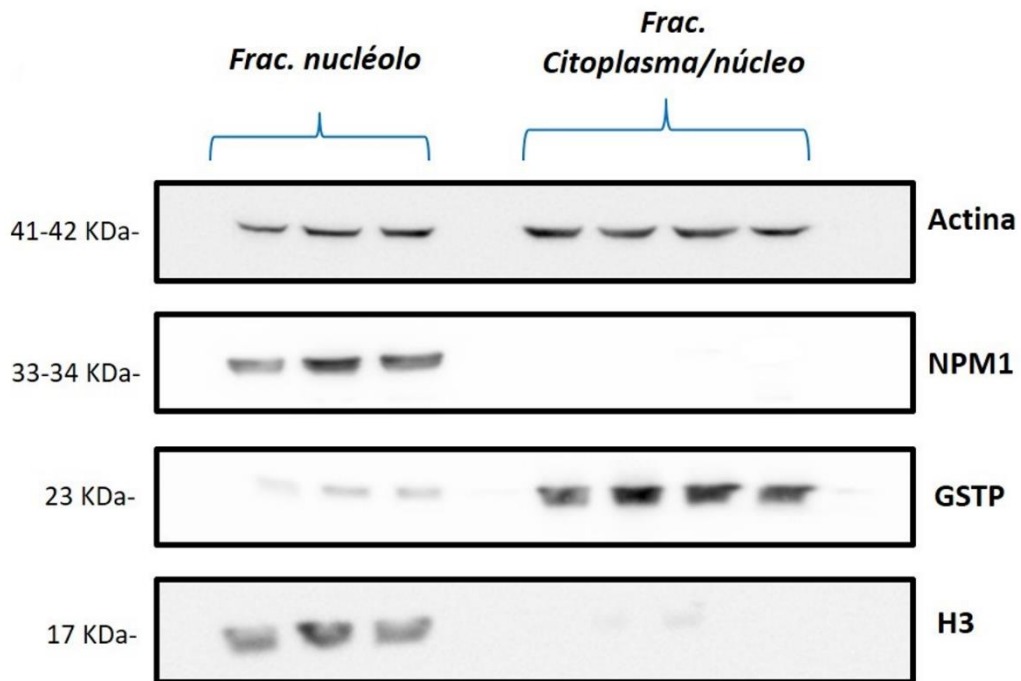


Figura 17. Estudio de la purificación de las diferentes fracciones celulares. Separación por Western blot de los diferentes extractos obtenidos mediante el protocolo de purificación nucleolar descrito³⁹. Se determinó la GSTP y NPM1 en todos los extractos y se empleó la actina y la H3 como controles de carga.

7. Discusión

Hasta hace muy poco la principal función que se le atribuía al nucléolo era la de su papel en la biogénesis ribosomal¹. Sin embargo, en la última década se han ido revelando otras funciones no ribosomales para el nucléolo, como la de mantener la estabilidad del ADN, la remodelación de la cromatina y la homeostasis redox, que a día de hoy son objeto de investigación^{14,15}. El nucléolo es capaz de detectar el estrés celular y gracias a su plasticidad y dinamismo morfofuncional puede coordinar diferentes respuestas y mantener la homeostasis celular^{20,42}.

El nucléolo se ha relacionado con múltiples patologías humanas, en las que probablemente se encuentran implicados diferentes mecanismos. Los errores en la biogénesis ribosomal, ya sea por mutaciones en genes ribosomales o en proteínas que participan en el procesamiento del ARNr, suelen ser el fallo descrito más común para un conjunto de patologías catalogadas como ribosomopatías⁴³. Además, la disfunción nucleolar puede desempeñar un papel en patologías degenerativas del sistema nervioso o del corazón, así como en enfermedades virales y oncológicas^{16,44,45}. Por último, pero no menos importante, la función y distribución de algunas proteínas nucleolares también se encuentra afectado en ciertas enfermedades progeroides^{46,47}. La comprensión mecanicista de la participación nucleolar en toda esta gama de patologías ha expandido el reciente campo de las “*nucleolopatías*” y su estudio continua siendo un reto⁴⁸.

La DC, modelo de ribosomopatía en la que se centra este trabajo, cursa con mutaciones en genes que codifican para snoRNP esenciales en el procesamiento ribosomal y en el mantenimiento de la longitud telomérica. La alteración en la respuesta de daño al ADN y el estrés oxidativo son otros rasgos distinguibles en la etiopatogenia de DC, aunque son interpretados como eventos secundarios⁴⁹.

En este trabajo se han empleado modelos celulares en los que se silenciaron de forma transitoria, por tecnología del ARNi, los genes *DKC1*, *NOP10* y *TINF2*, que se encuentran mutados en distintos patrones de herencia de DC⁵⁰. Los genes *DKC1* y *NOP10*, además de su función en el complejo telomerasa, se unen con ARN con motivos H/ACA participando así en la reacción de pseudouridilación de ARNrs y snARNs⁵¹, la biogénesis ribosomal y funciones del esplicesoma⁵². *TINF2*, además de su papel en el telosoma, también localiza en la mitocondria donde regula el metabolismo intermediario y la producción de EROs⁵³. Con estos precedentes se desarrolló un diseño experimental que permitiera dilucidar si las mutaciones en estos genes afectan al equilibrio redox y este puede ser detectado como estrés nucleolar.

En concordancia con la línea de investigación del grupo de investigación CIBERER sobre la fisiopatología de la DC utilizamos la tecnología de ARNi para el silenciamiento de los genes de interés siguiendo un protocolo de transfección directa secuencial, con la lipofectamina como agente transfectante. Se emplearon diversos formatos (placas de 8, 6 y 12 pocillos), lo que nos permitió diseñar varios experimentos. Como parte de este proceso comprobamos mediante RT-qPCR la expresión génica y proteica de los genes de interés, logrando reducir la expresión relativa de los genes, mediante la técnica de silenciamiento, hasta un 90% y la expresión proteica hasta un 50% aproximadamente. La comprobación por Western-blot del silenciamiento es muy importante en las células de mamíferos ya que sólo una fracción de los complejos silenciadores inducidos por ARN (RISCs) llevan a cabo la escisión del ARN dirigida por ARNs pequeños, mientras que el resto suprime la expresión interfiriendo en la síntesis de proteínas. Por lo tanto, la comprobación del silenciamiento sólo mediante la medición de los niveles de expresión del ARN sobreestima el silenciamiento para aquellas proteínas de vida larga o subestima el causado por contribuciones de RISCs⁵⁴. Por todo esto asumimos que la menor reducción de la expresión proteica observada es consecuencia al mayor tiempo de vida que presentan las proteínas, pero esta reducción en la actividad es suficiente para considerar como válido el silenciamiento⁵⁵⁻⁵⁷.

Otro requisito a considerar en estudios de silenciamiento es que el procedimiento no afecte a los ciclos celulares ni a la viabilidad celular, lo cual fue demostrado paralelamente por Fuster *et al*, (2016). Estos autores complementaron la caracterización de los modelos de silenciamiento evaluando la actividad telomerasa y la expresión de TERT y tal como se esperaba ambas estuvieron disminuidas en siDKC1 y siNOP10 pero no en siTIN2⁵⁸. La reacción de pseudouridilación también fue evaluada en los modelos de silenciamiento, dado que es una de las modificaciones covalentes más comunes del ARNr catalizadas en el nucléolo por las snoRNPs. DKC1 y NOP10 son snoRNPs que se asocian con la caja H/ACA en los snoARNs encargándose de pseudouridilar el ARN ribosómico (actividad pseudouridina sintasa). Estas proteínas nucleolares llevan a cabo funciones enzimáticas, incluyendo la rotura endonucleotílica durante la biogénesis ribosomal y actúan como chaperonas para el correcto plegamiento del pre-ARNr⁴³. Todo lo anterior explica que las mutaciones en *DKC1* y *NOP10* den lugar a DC²⁰.

Los resultados confirmaron que en siDKC1 y siNOP10 se produce una reducción de la pseudouridilación *in vitro* de ARNr, y que en siTIN2 no se detecta este efecto⁵⁹. Estos hallazgos también fueron observados a través de análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (por sus siglas en inglés HPLC)⁶⁰.

Con estos antecedentes estudiamos el efecto sobre la expresión proteica de dos subunidades ribosomales implicadas en la biogénesis ribosomal: subunidad 45s (pre-ARNs) y la subunidad 18s. La forma 45s se sintetiza a partir de la transcripción del ADN ribosomal y esta a su vez sufre una serie de modificaciones para dar lugar a las subunidades 28s, 18s y 5.8s en las que participan las snoRNPs³. Nuestros resultados muestran que la expresión de 45s y 18s se redujo significativamente en siDKC1 y siNOP10, pero no en la población siTIN2, lo que confirma que el fallo en la biogénesis ribosomal es un evento asociado a las mutaciones de los genes *DKC1* y *NOP10*.

Por lo demás, este silenciamiento agudo y transitorio no produjo un acortamiento telomérico en ninguno de los modelos⁵⁹. Todos estos resultados nos indican que tenemos un modelo celular que nos da la posibilidad de identificar otras funciones de los genes mutados en DC; funciones que con las células de pacientes con DC no podemos observar probablemente por estar “enmascarados” por mecanismos compensadores ante una disminución crónica de las proteínas.

Dado que el nucléolo participa en numerosos procesos biológicos, la disfunción nucleolar es un sello distintivo de situaciones de estrés celular, y estas últimas se traducen a su vez en un desequilibrio redox al cual el ARNr es particularmente sensible⁴¹.

Los estudios del papel del nucléolo en la respuesta celular al estrés oxidativo se han centrado principalmente en ensayos moleculares de la transducción de la señal de estrés mediante el sistema del represor tumoral p53 y la inactivación de la transcripción de ADNr en la que están implicadas proteínas nucleolares^{7,61}. Las observaciones citológicas sobre la respuesta nucleolar al estrés oxidativo no son tan frecuentes, a pesar de que poco a poco se va demostrando que son marcadores sensibles^{3,62,63}. En células de mamíferos el tamaño, la forma y el número de nucléolos están siendo empleados como marcadores de estrés celular³. Por ello nos propusimos aplicar un kit comercial de tinción fluorescente del nucléolo para estudiar diferentes parámetros morfológicos nucleolares. Ensayamos en dos de los principales modelos empleados en nuestro laboratorio para el estudio del estrés oxidativo, las células NIH 3T3 y HeLa y además en la línea 3T3-L1. La línea 3T3-L1 proviene de la línea celular 3T3 y presenta una morfología similar a los fibroblastos, pero tiene la capacidad de diferenciarse a un fenotipo similar a los adipocitos en condiciones adecuadas de cultivo. Ambas líneas murinas presentaron un elevado número de nucléolos ($11,7 \pm 0,6$), al contrario que las células HeLa que exhibieron de $3,2 \pm 0,5$ nucléolos⁶⁴. Trabajos previos describen a la línea 3T3 como hipertriploide, con la mitad de las células en interfase en euploidia y donde la mayoría de estas células presentan $3,4 \pm 0,7$ nucléolos por célula⁶⁵.

Suele referirse que la cantidad de nucléolos depende de la euploidia y que un elevado número de nucléolos en células en cultivo se correlaciona con aneuploidización asociada a un mal funcionamiento de la mitosis y transformación de las células, lo cual parece ser el proceso que observamos en nuestras líneas 3T3, evento que pudo estar influido por el número de pases por encima de 10 en ambas líneas. El evento de aneuploidización del ADN en células 3T3 asociado con mitosis y transformación anormal ha sido demostrado previamente ⁶⁶.

Los únicos parámetros útiles para distinguir aquellas células que presenten variabilidad en las características morfológicas nucleolares corresponden al aumento del perímetro nucleolar respecto al nuclear y al aumento en el número de nucléolos por núcleo, haciendo estos parámetros esenciales para cualquier estudio sobre el papel del nucléolo en la fisiología celular⁶⁵. Desafortunadamente el kit de marcaje empleado solo permitió la cuantificación de nucléolos debido a que el fotoblanqueo imposibilitó la medición del perímetro nucleolar, a pesar de las variaciones que se hicieron en el protocolo respecto a la reducción de la intensidad y el tiempo de exposición a la luz, y uso de sustancias frente al blanqueamiento.

En relación a las células silenciadas no observamos diferencias en el número de nucléolos respecto a siControl, denotando que las mutaciones en *DKC1*, *NOP10* y *TINF2* aparentemente no alteran la integridad del nucléolo. La fragmentación nucleolar se considera un proceso que se desencadena por factores estresantes, enfermedades o tratamientos farmacológicos y que se caracteriza por una redistribución de las proteínas nucleolares acompañada de la entrada al compartimento de componentes que normalmente no se encuentran en el nucléolo³. Por lo tanto, este hallazgo podría ser interpretado como una ausencia de estrés en nuestros modelos silenciados. Sin embargo, también hallamos en la literatura estudios donde no se detecta disrupción nucleolar tras la alteración de la biogénesis ribosómica⁶⁷. Esto datos podrían poner en duda la validez del nucléolo como un marcador, pero varios autores reconocen que la naturaleza frágil del nucléolo y el corto tiempo de residencia en esta estructura de muchas proteínas nucleolares, dificulta captar todos los cambios dinámicos que se suceden de forma tan rápida en este compartimento. Por otro lado, la inmunofluorescencia cuantitativa se complica por la falta de un único marcador para todas las condiciones de estrés. Por lo tanto, se requiere de marcadores adicionales para identificar el nucléolo, especialmente para aquellos tratamientos que promueven una fragmentación nucleolar.

La proteína NPM1 es una proteína nucleolar con papeles múltiples y complejos, entre los que destaca su función como un regulador clave en el control nucleolar de la homeostasis celular.

No obstante, también participa activamente como una chaperona en diferentes pasos de la síntesis de las subunidades ribosomales^{7,15}. La translocación de la proteína nucleolar NPM1 es una de las características más distintivas que se producen en el estrés nucleolar. En condiciones normales, la NPM1 se distribuye de forma homogénea por el nucléolo, pero se ha observado que mediante el uso de tratamientos que ocasionen estrés se produce un cambio en la distribución de la proteína. Se observó que con un tratamiento de 30 minutos de exposición con H₂O₂ se redujo significativamente la tinción en el área central nucleolar y la NPM1 se observó solo en la periferia nucleolar y su localización en el nucleoplasma se hizo más evidente⁴¹.

En nuestros modelos de silenciamiento nos planteamos estudiar la NPM1 y poder ver mediante IFI si el estrés celular asociado con la DC ocasionaba algún cambio visible en esta proteína. Los resultados de las IFIs muestran que hay un descenso en la fluorescencia de NPM1 en las poblaciones siDKC1 y siNOP10 mientras que se mantiene en la población siControl y se incrementa en siTIN2. La causa de lo observado en siDKC1 y siNOP10 podría ser una translocación al nucleoplasma como respuesta a fallos en la biogénesis ribosomal o al estrés oxidativo nucleolar inducido por mecanismos no dilucidados. Cabe destacar anteriormente en el laboratorio se observó también un aumento de GSSG y del ratio GSSG/GSH en los modelos de silenciamiento, concretamente en las poblaciones siDKC1 y siNOP10, lo que es un indicador de un estrés oxidativo⁵⁸. Los resultados obtenidos para siTIN2 concuerdan con toda la caracterización previa hecha en el laboratorio en relación al estado redox, donde no se detectó ningún marcador de estrés oxidativo⁵⁹. También es congruente con hallazgos que refieren que la reducción de la expresión de TIN2 mediante ARNi inhibió la producción de glucólisis y la producción de EROs⁶⁸

La translocación de NPM1 del nucléolo al nucleoplasma se observó por primera vez cuando las células se trataron con Act. D como un evento relacionado con la alteración de la biogénesis ribosomal. Posteriormente también se visualizó cuando las células se exponían a diferentes agentes citotóxicos¹⁴. En condiciones normales NPM1 interactúa con el extremo N-terminal de ARF lo que bloquea su paso al nucleoplasma y su asociación con MDM2⁷; promoviendo la degradación de p53. Sin embargo, en condiciones de estrés Arf, NPM1 y otras proteínas se liberan a nucleoplasma donde afectan la actividad de MDM2, y causan la estabilización de p53 y detención del ciclo celular^{7,69}. De hecho, en nuestro laboratorio Fuster *et al*, (2016) emplearon la p53 como un biomarcador downstream del estrés celular en estos modelos de silenciamiento⁵⁸. Esta proteína participa promoviendo la expresión de genes que actúan tanto en actividades antioxidantes cuando los niveles de estrés son bajos, reduciendo así los niveles

de estrés celular, o pro-oxidantes cuando los niveles de estrés son muy elevados como para ser viable para la célula, ocasionando la apoptosis celular⁷⁰. Los resultados de este estudio confirmaron que se encontraba aumentada su expresión en las 3 poblaciones silenciadas, sobre todo en siDKC1. Esto nos indica que la célula está respondiendo al estrés oxidativo.

El estudio de la co-localización de NPM1 y GSTP en las diferentes poblaciones silenciadas se observó que en siControl y en siTINF2 co-localizaban perinucleolarmente mientras que en siDKC1 y en siNOP10 se observó incluso la presencia de ambas proteínas en el nucléolo. Este resultado concuerda con el trabajo de Yang et al., que propuso a la s-glutacionilación de NPM1 como un mecanismo implicado en la translocación de NPM1 durante la oxidación nucleolar. Estos autores inactivaron la GSTP empleando la tecnología del ARNi y observaron que en diferentes situaciones de estrés celular (como el inducido por H₂O₂) se bloqueaba la translocación de NPM1 al nucleoplasma. De esta forma se pudo verificar que uno de los requisitos para que se produzca la translocación de NPM1 y por consiguiente la activación de p53 en una situación de estrés nucleolar es que la NPM1 sufra una s-glutacionilación dependiente de GSTP en la cisteína 275¹⁴. Nuestra experiencia nos permite inferir que el silenciamiento de *DKC1* y *NOP10* produce un estrés que favorece la interacción de NPM1 con GSTP, que conduce a la translocación de la proteína nucleolar y a la activación de p53.

Para confirmar este hallazgo nos propusimos obtener fracciones celulares (citoplasma, núcleo y nucléolo) que permitieran estudiar la expresión de dichas proteínas en estos compartimentos. Los análisis proteómicos tras la purificación de esta estructura han contribuido a la identificación de las numerosas proteínas, más de 700, que residen en él, que, junto que técnicas de imagen han permitido dilucidar las diversas funciones en las que participa³⁹. Es por ello que se considera de gran interés obtener extractos puros del nucléolo para estudiar, en nuestro caso, la dinámica proteica entre este y el núcleo-citoplasma en los diferentes modelos de silenciamiento.

Para ello, se intentó poner a punto una técnica de obtención de extracto nucleolar³⁹ en diferentes líneas celulares (NIH-3T3 y HeLa). El rendimiento obtenido empleando las células 3T3 fue mínimo por lo que no se pudo proseguir con un Western-blot. La segunda línea en la que se testó este protocolo de extracción fue en las células HeLa, la línea celular empleada en el silenciamiento. Modificaciones en el protocolo consiguieron obtener extractos con el suficiente rendimiento (tabla 2) como para que nos posibilitara estudiar diversas proteínas. Los resultados obtenidos de ese Western nos permiten confirmar que al final no se consiguió obtener un extracto nucleolar puro, ya que en la fracción que supuestamente corresponde al nucléolo se

observó la presencia de actina. Se ha observado que la actina y otras proteínas asociadas a ella puede llegar a estar presente en el núcleo y están implicadas en la remodelación de la cromatina y la activación genética a través de las proteínas nucleares BAFs, que pueden ser aisladas del núcleo asociadas a subunidades de actina⁷¹. La H3 se encuentra tanto en el núcleo como en el nucléolo. Este último contiene repeticiones en tándem de ADN ribosómico en las NORs¹, lo que confirma la presencia de H3. Por todo esto, dado que no se ha demostrado la presencia de la actina en el nucléolo, pero sí en el núcleo y en el citoplasma, nos permite confirmar que no es una fracción nucleolar pura. La purificación nucleolar es un proceso complejo dado que el nucléolo es una estructura no membranosa que se encuentra en constante intercambio con su entorno²⁰, lo que dificultan mantener su integridad durante todas las etapas de la extracción.

8. Conclusiones parciales

- La disminución aguda de los niveles de DKC1 y NOP10, ambos implicados en la etiopatogenia de la DC, afecta al equilibrio redox y a la biogénesis ribosomal, tanto a nivel de síntesis del pre-ARNr como al procesamiento de las subunidades ribosomales.
- La translocación de NPM1 es un marcador de estrés nucleolar relacionado con la acción de GSTP y la activación de la vía de p53.
- La disminución aguda de los niveles de TIN2 no produce un estrés oxidativo detectable por parámetros nucleolares.

9. Limitaciones

Muchas de las técnicas descritas no se habían realizado anteriormente en el laboratorio, por lo que se requirió de tiempo para su puesta a punto.

Por limitaciones técnicas no se logró el fraccionamiento celular que permitiera estudiar la expresión de las proteínas de interés en citoplasma núcleo y nucléolo. Esto hubiese permitido abordar el estudio de la expresión de GSTP y NPM1 en estos subcompartimentos en los modelos silenciados y bajo diferentes estados redox, así como su correlación con los niveles de GSH.

Otra limitación fue no incluir un control positivo, como la Actinomicina D, en el ensayo de morfología nucleolar con los modelos silenciados y analizadas por el Kit Cytopainter Nucleolar. Por lo tanto, para obtener unos resultados más fiables en relación al número de nucléolos como marcador debiera replicarse este ensayo.

10. Perspectivas futuras

Dado que es de gran importancia el estudio de la dinámica nucleolar para comprender mejor todos los mecanismos moleculares que acontecen en la célula, sería interesante evaluar otras proteínas nucleolares como marcadores, así como estudiar diversos modelos celulares en los que se silencien otros genes implicados en enfermedades raras, para determinar si se produce un estrés nucleolar que pueda ser empleado como un marcador de enfermedad.

Además, sería interesante estudiar en nuestros modelos de silenciamiento la s-glutationilación de NPM1 y la expresión de otras proteínas que participan en la cascada de activación de p53 dependiente de NPM1, como son la ARF y la MDM2.

Otro aspecto, sería estudiar, en un modelo de transfección estable para TIN2, el estrés oxidativo y la validez de parámetros nucleolares para detectarlo en este modelo.

11. Bibliografía

1. Lamond, A. I., Ly, T., Hutten, S. & Nicolas, A. The Nucleolus. *Encycl. Cell Biol.* **3**, 254–269 (2016).
2. Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P. & Hernandez-Verdun, D. Nucleolus: The fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 13–31 (2008).
3. Su, H., Kodiha, M., Lee, S. & Stochaj, U. Identification of Novel Markers That Demarcate the Nucleolus during Severe Stress and Chemotherapeutic Treatment. *PLoS One* **8**, e80237 (2013).
4. Boulon, S. *et al.* The nucleolus under stress. *Mol. Cell* **40**, 216–27 (2010).
5. Jurado, I. M. La organización funcional del nucleolo, la proliferación y el ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*. Alteraciones inducidas por cambios gravitatorios. (Universidad Autónoma de Madrid, 2008).
6. Rabanal, F. A. *et al.* Unstable inheritance of 45S rRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genet. Soc. Am.* **4**, 1201–1209 (2013).
7. James, A., Wang, Y., Raje, H., Rosby, R. & DiMario, P. Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus* **5**, 402–426 (2014).
8. Mehta, I., Bridger, J. & Kill, I. Progeria, the nucleolus and farnesyltransferase inhibitors. **38**, 287–91 (2010).
9. Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. & Bouvet, P. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* **112**, 761–772 (1999).
10. Zhang, D. *et al.* A Novel Post-translational Modification of Nucleolin, SUMOylation at Lys-294, Mediates Arsenite-induced Cell Death by Regulating gadd45 α mRNA Stability. *J. Biol. Chem.* **290**, 4784–4800 (2015).
11. Bartova, E. *et al.* Structure and Epigenetics of Nucleoli in Comparison With Non-nucleolar Compartments. *J. Histochem. Cytochem.* **58**, 391–403 (2010).
12. Shaw, P. J. Nucleolus. *eLS* (2005). doi:10.1038/npg.els.0003958
13. Amin, M. A. *et al.* Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 320–326 (2007).
14. Yang, K. *et al.* A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nat. Commun.* **7**, 13599 (2016).
15. Lindström, M. S. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem. Res. Int.* **2011**, 195209 (2011).
16. Parlato, R. & Liss, B. How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1842**, 791–797 (2014).
17. Zeng, J., Libien, J., Shaik, F., Wolk, J. & Hernández, A. I. Nucleolar PARP-1 Expression Is Decreased in Alzheimer's Disease: Consequences for Epigenetic Regulation of rDNA and Cognition. *Neural Plast.* **2016**, 1–9 (2016).
18. Danilova, N. & Gazda, H. T. Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis. Model. Mech.* **8**, 1013–1026 (2015).
19. Pérez Quilis, C. Estudio del estrés oxidativo en la disqueratosis congénita. (Universidad de Valencia, 2013).
20. Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J. & Lamond, A. I. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 574–585 (2007).
21. Mohaghegh, P. & Hickson, I. D. Premature aging in RecQ helicase-deficient human syndromes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1496–1501 (2002).
22. Dokal, I., Vulliamy, T., Mason, P. & Bessler, M. Clinical utility gene card for: Dyskeratosis congenita - update 2015. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, (2015).
23. Savage, S. A. *Dyskeratosis Congenita*. *GeneReviews*^(®) (University of Washington, Seattle, 1993).

24. Fernández García, M. S. & Teruya-Feldstein, J. The diagnosis and treatment of dyskeratosis congenita: a review. *J. Blood Med.* **5**, 157–67 (2014).
25. Martínez, P. & Blasco, M. a. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat. Rev.* **3**, 161–76 (2011).
26. Savage, S. A. *et al.* TIN2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet* **82**, 501–509 (2008).
27. Mason, P. J. & Bessler, M. The genetics of dyskeratosis congenita. *Cancer Genet.* **204**, 635–45 (2011).
28. Chen, L.-Y. *et al.* Mitochondrial Localization of Telomeric Protein TIN2 Links Telomere Regulation to Metabolic Control. *Mol. Cell* **47**, 839–850 (2012).
29. Pereboeva, L., Hubbard, M., Goldman, F. D. & Westin, E. R. Robust DNA Damage Response and Elevated Reactive Oxygen Species in TIN2-Mutated Dyskeratosis Congenita Cells. *PLoS One* **11**, e0148793 (2016).
30. Chen, L.-Y. *et al.* Mitochondrial Localization of Telomeric Protein TIN2 Links Telomere Regulation to Metabolic Control. *Mol. Cell* **47**, 839–850 (2012).
31. Markovic, J. *et al.* The depletion of nuclear glutathione impairs cell proliferation in 3t3 fibroblasts. *PLoS One* **4**, e6413 (2009).
32. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **5**, 9–19 (2012).
33. Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R. & Turner, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* **134**, 489–92 (2004).
34. Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **1**, 3159–65 (2006).
35. Ye, Z.-W. *et al.* Glutathione S -Transferase P-Mediated Protein S-Glutathionylation of Resident Endoplasmic Reticulum Proteins Influences Sensitivity to Drug-Induced Unfolded Protein Response. *Antioxid. Redox Signal.* **26**, 247–261 (2017).
36. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
37. Kosower, N. S., Kosower, E. M., Wertheim, B. & Correa, W. S. Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 593–596 (1969).
38. Vichai, V. & Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1**, 1112–1116 (2006).
39. Li, Z. F. & Lam, Y. W. in *The Nucleus* 35–42 (2015). doi:10.1007/978-1-4939-1680-1_4
40. Kosower, N. S. & Kosower, E. M. in *Methods in Enzymology* 123–133 (1995). doi:10.1016/0076-6879(95)51116-4
41. Mironova, A. A., Barykina, N. V & Zatsepina, O. V. Cytological analysis of the reaction of the nucleolar RNA and RNA-binding proteins to oxidative stress in HeLa cells. *Tsitologiya* **56**, 489–99 (2014).
42. Olson, M. O. J. Sensing Cellular Stress: Another New Function for the Nucleolus? *Sci. Signal.* **2004**, pe10-pe10 (2004).
43. Khanna-Gupta, A. Bone Marrow Failure Syndromes: The Ribosomopathies. *J. bone marrow Res.* **1**, (2013).
44. Ruggero, D. Revisiting the nucleolus: from marker to dynamic integrator of cancer signaling. *Sci. Signal.* **5**, pe38 (2012).
45. Duan, Z. *et al.* The nucleolar phosphoprotein B23 targets Newcastle disease virus matrix protein to the nucleoli and facilitates viral replication. *Virology* **452–453**, 212–222 (2014).
46. Mehta, I. S., Bridger, J. M. & Kill, I. R. Progeria, the nucleolus and farnesyltransferase inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 287–291 (2010).
47. Woo, L. L., Futami, K., Shimamoto, A., Furuichi, Y. & Frank, K. M. The Rothmund-

- Thomson gene product RECQL4 localizes to the nucleolus in response to oxidative stress. *Exp. Cell Res.* **312**, 3443–57 (2006).
48. Hetman, M. Role of the nucleolus in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1842**, 757 (2014).
 49. Dokal, I. Dyskeratosis congenita. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2011**, 480–6 (2011).
 50. Mason, P. J. & Bessler, M. The genetics of dyskeratosis congenita. *Cancer Genet.* **204**, 635–45 (2011).
 51. Trahan, C., Martel, C. & Dragon, F. Effects of dyskeratosis congenita mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 on assembly of H/ACA pre-RNPs. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 825–36 (2010).
 52. Vulliamy, T. *et al.* Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8073–8 (2008).
 53. Sullivan, L. B., Santos, J. H. & Chandel, N. S. Mitochondria and telomeres: the promiscuous roles of TIN2. *Mol. Cell* **47**, 823–4 (2012).
 54. Chang, K., Marran, K., Valentine, A. & Hannon, G. J. RNAi in cultured mammalian cells using synthetic siRNAs. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2012**, 957–61 (2012).
 55. Ting, T. *et al.* RNA Interference-Mediated Knockdown on DKC1 Gene in Chemosensitized Colorectal Cancer Cell Lines. *Int J Cancer Res Mol Mech* **1**, (2015).
 56. De Riso, V. *et al.* Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Res.* **37**, e96 (2009).
 57. Carmichael, G. *RNA silencing : methods and protocols.* (Humana Press, 2005).
 58. Fuster Martí, V., Ibañez-Cabellos, J. S. & García-Giménez, J. L. Caracterización molecular de modelos celulares asociados a tres genotipos de Disqueratosis Congénita. (UPV, 2015).
 59. Ibañez-Cabellos, J. S., Pérez Machado, G., García-Gimenez, J. L. & Pallardo, F. La depleción aguda de DKC1 y NOP10 produce estrés oxidativo. in *X Reunión Anual CIBERER* 13 (2016).
 60. Montanaro, L. *et al.* Dyskerin expression influences the level of ribosomal RNA pseudo-uridylation and telomerase RNA component in human breast cancer. **210**, 10–8 (2006).
 61. Wang, H., Chen, T., Weng, C., Yang, C. & Tang, M. Acrolein preferentially damages nucleolus eliciting ribosomal stress and apoptosis in human cancer cells. *Oncotarget* **7**, 80450–80464 (2016).
 62. Yang, K. *et al.* A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nat. Commun.* **7**, 13599 (2016).
 63. Grigoryev, A. A., Zharskaya, O. O., Bulycheva, T. I. & Zatsepina, O. V. Changes in the status of nucleolus during long-term culturing of human HeLa cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* **144**, 345–8 (2007).
 64. Farley, K. I., Surovtseva, Y., Merkel, J. & Baserga, S. J. Determinants of mammalian nucleolar architecture. *Chromosoma* **124**, 323–31 (2015).
 65. Karalyan, Z. A. *et al.* New indices in morphometry of nuclear structure in the NIH 3T3 cell line. *Cell Biol. Int.* **27**, 809–14 (2003).
 66. Nigro, S., Geido, E., Infusini, E., Orecchia, R. & Giaretti, W. Transfection of human mutated K-ras in mouse NIH-3T3 cells is associated with increased cloning efficiency and DNA aneuploidization. *Int. J. Cancer* **67**, 871–875 (1996).
 67. Fumagalli, S. *et al.* Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpl11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat. Cell Biol.* **11**, 501–8 (2009).
 68. Chen, L.-Y. *et al.* Mitochondrial Localization of Telomeric Protein TIN2 Links Telomere Regulation to Metabolic Control. *Mol. Cell* **47**, 839–850 (2012).
 69. Deregowaska, A. *et al.* Shifts in rDNA levels act as a genome buffer promoting

- chromosome homeostasis. *Cell Cycle* **14**, 3475–87 (2015).
70. Liu, D. & Xu, Y. p53, oxidative stress, and aging. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1669–78 (2011).
 71. Pederson, T. & Aebi, U. Actin in the nucleus: what form and what for? *J. Struct. Biol.* **140**, 3–9 (2002).

