

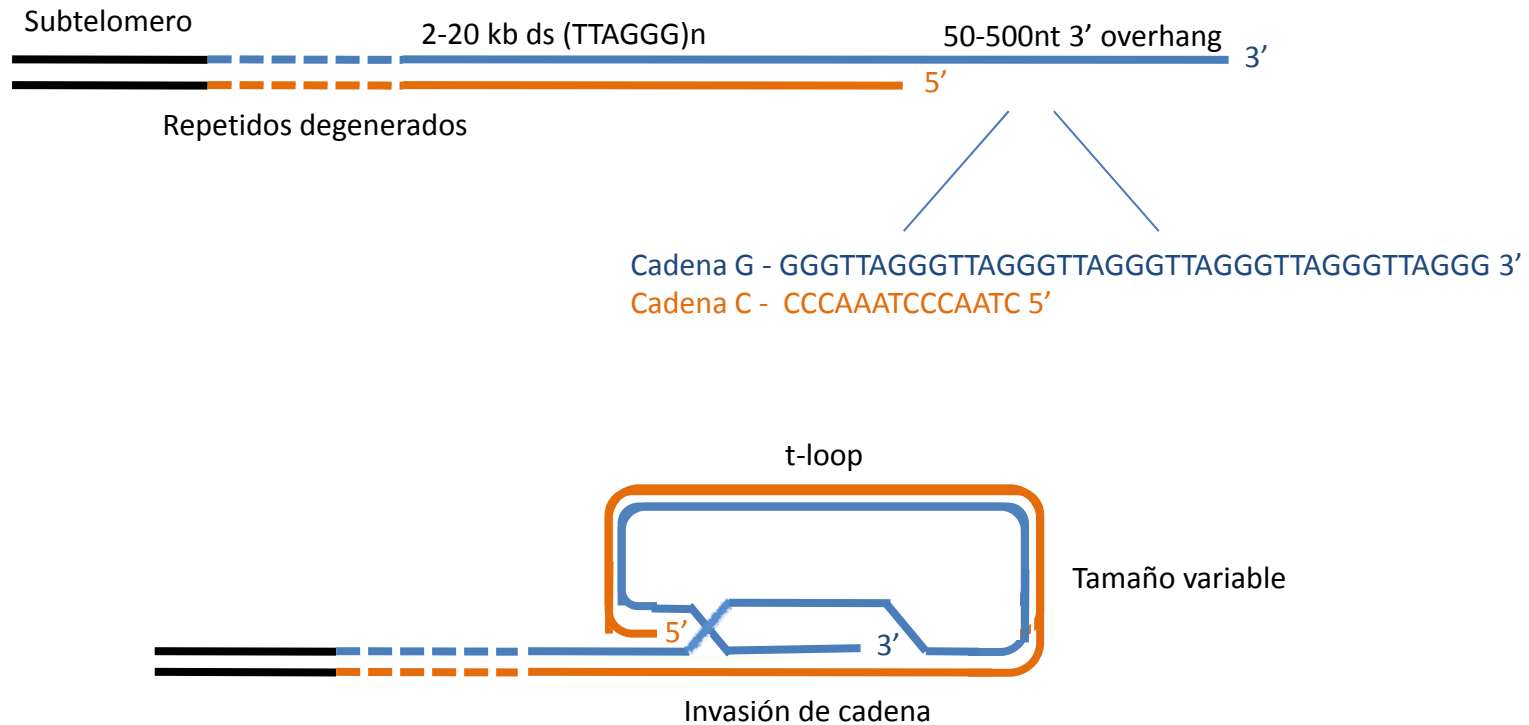


# Mecanismos de mantenimiento de telómeros

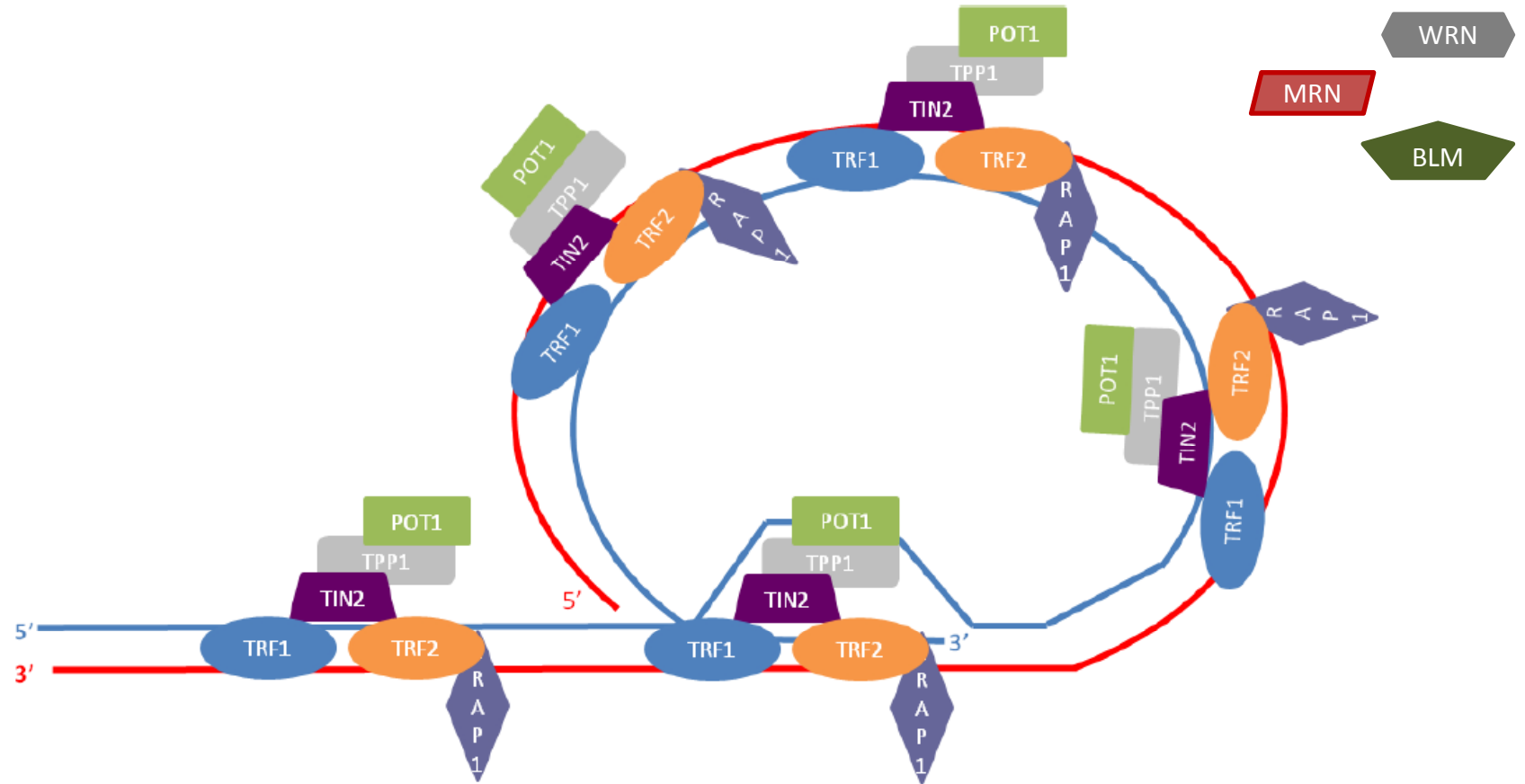
Alberto Hidalgo Bravo

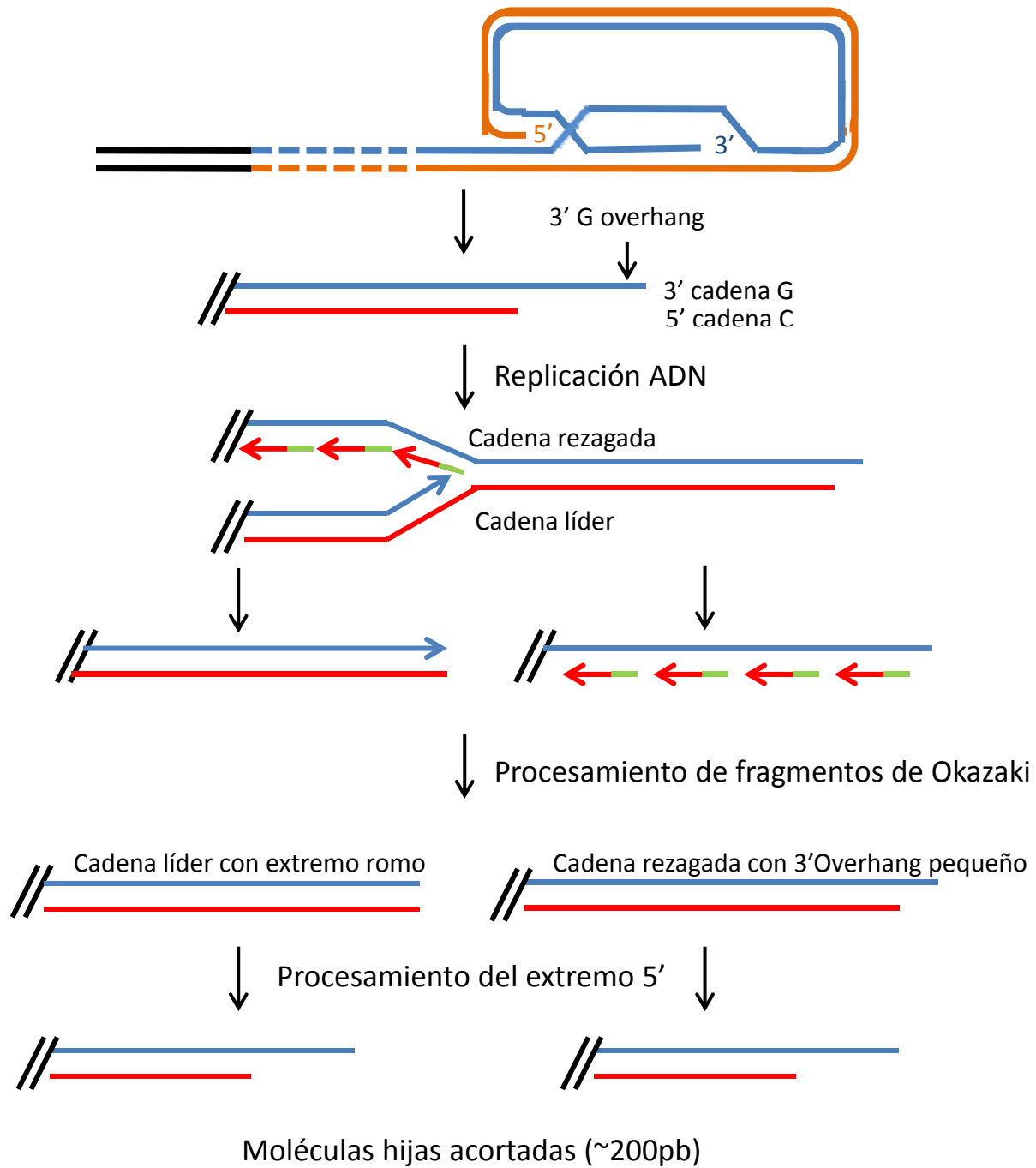
# Introducción

## Protección y estabilidad de cromosomas lineares



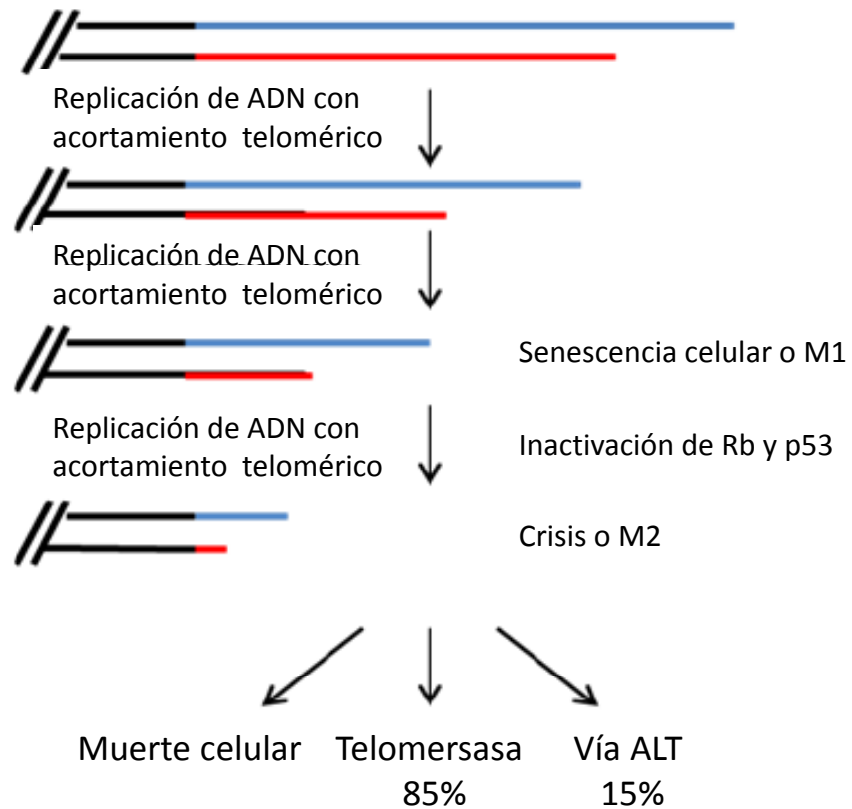
# Introducción



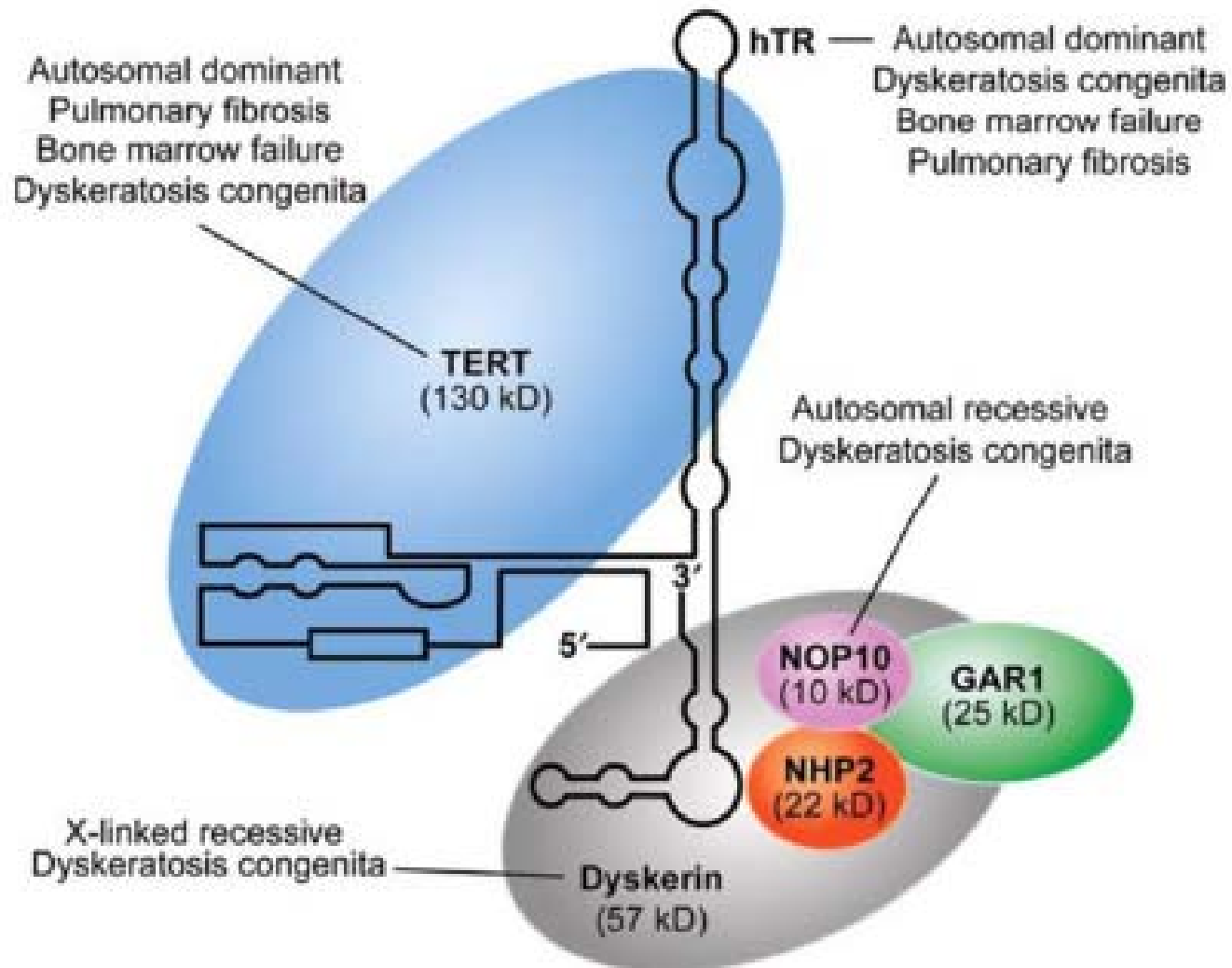


# Introducción

## Reloj biológico

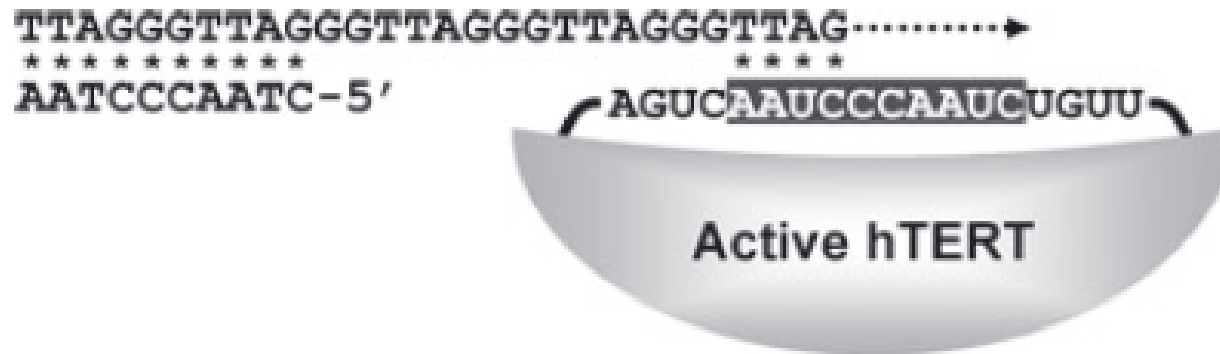


# Telomerasa



# Introducción

- Células madre embrionarias
- Espermatogonias
- Células madre de médula ósea
- No en células somáticas



# Introducción

## Terapia antineoplásica

- Inhibidores de telomerasa
- Inmunoterapia contra células que expresan telomerasa
- Transfección con genes suicidas
- Activación de virus líticos



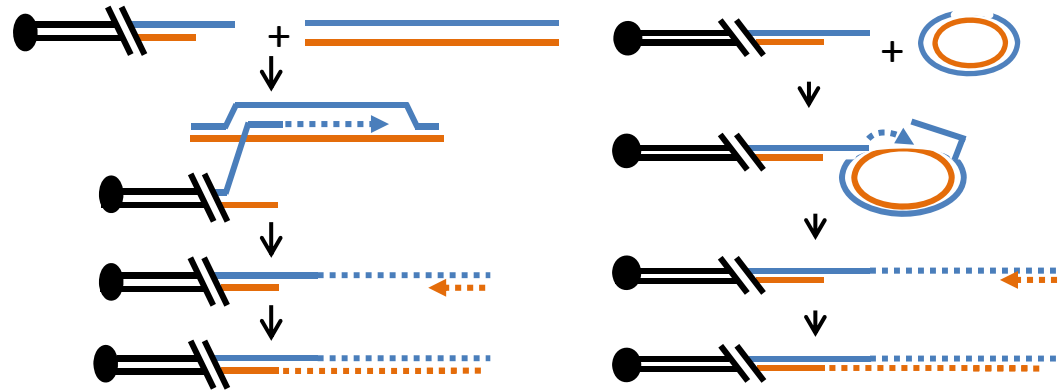
# Introducción

Células ALT (Alternative Lengthening of Telomeres)

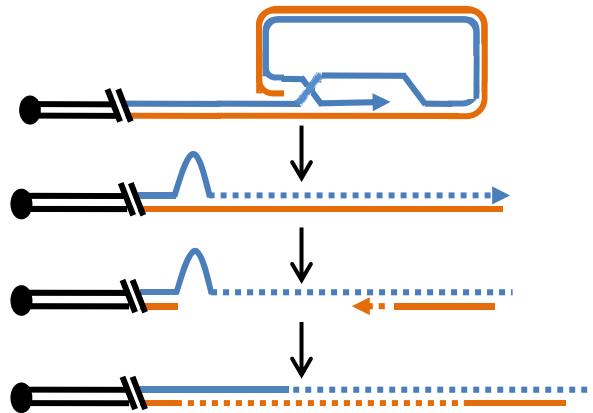
- Longitud heterogénea de telómeros
- ADN extra-cromosómico
  - ✓ ADN circular parcialmente de doble cadena (Círculos C)
- Inestabilidad en MS32
- APBs (ALT associated PML bodies)
  - ✓ PML
  - ✓ DNA telomérico
  - ✓ Shelterina
  - ✓ Proteínas de recombinación/reparación: MRN, WRN, BLM, RAD52
- Recombinación Homóloga
  - ✓ Secuencias copiadas de un telómero a otro
  - ✓ Intercambio de cromátides hermanas en telómeros
  - ✓ Mutaciones complejas en los repetidos degenerados

# Introducción

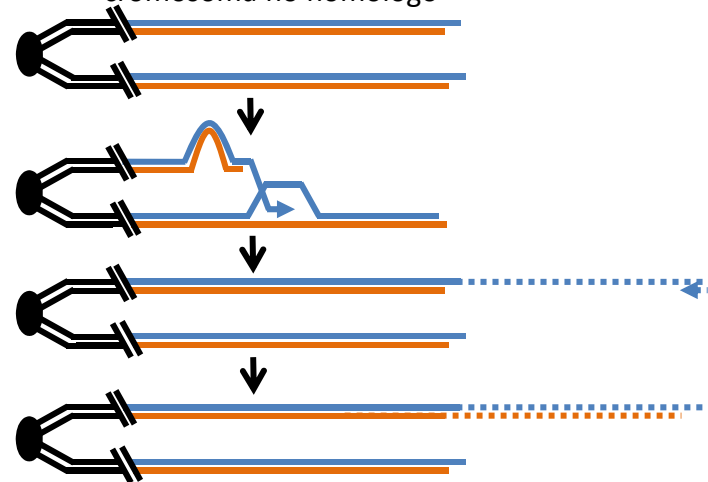
Uso de ADN extracromosómico como templado



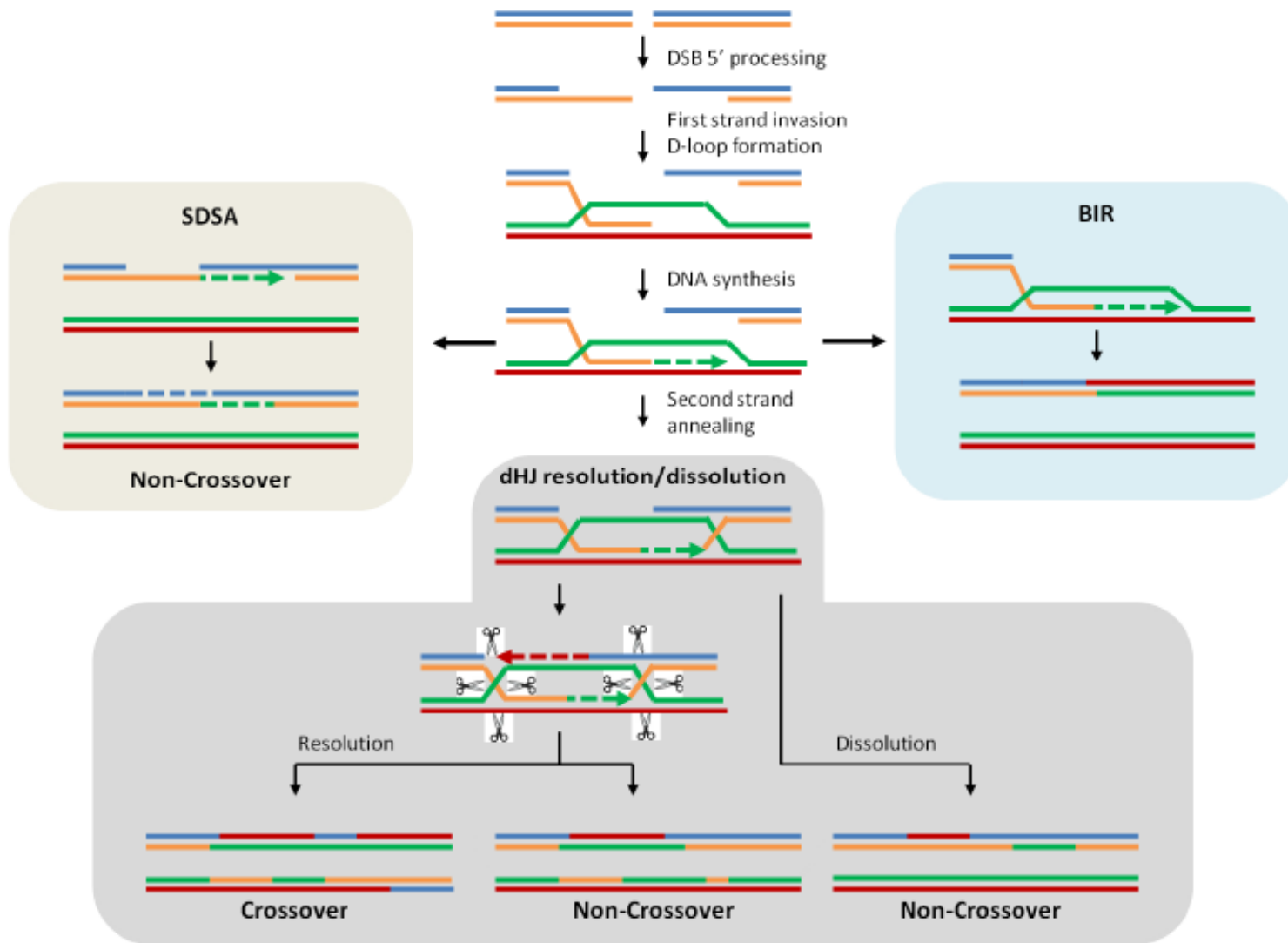
Extensión a partir del 3' overhang



Invasión de cromátide hermana o cromosoma no homólogo



# Introducción



# Introducción

-  TTAGG
-  TGAGG
-  TCAGG



# Introducción



# Introducción

## **WRN y BLM**

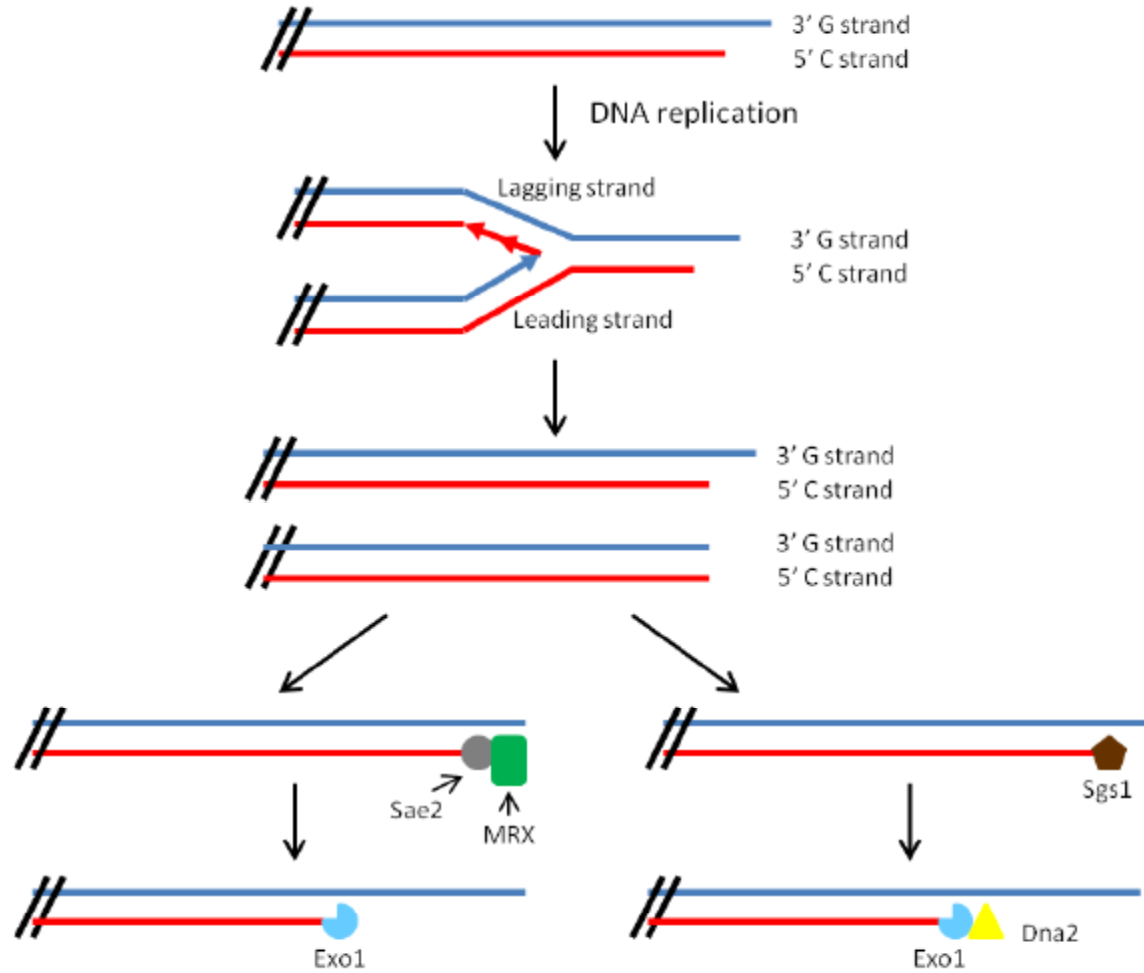
- Interacción entre BLM y WRN con TRF1, TRF2 y POT1
- TRF1 y TRF2 regulan la función de BLM en sustratos teloméricos
- BLM y WRN se localizan en APBs
- BLM forma un complejo con la topoisomerasa III, RMI1 y RMI2 (RTR)
- WRN interacciona con RAD52

# Introducción

## CtIP

- Interacciona con MRN (MRE11-RAD50-NBS)
- Interactúa con EXO1
- El homólogo en *S. cerevisiae* sae2 es necesaria para la generación del 3' overhang
- Es sustrato de desacetilización por SIRT6

# Introducción



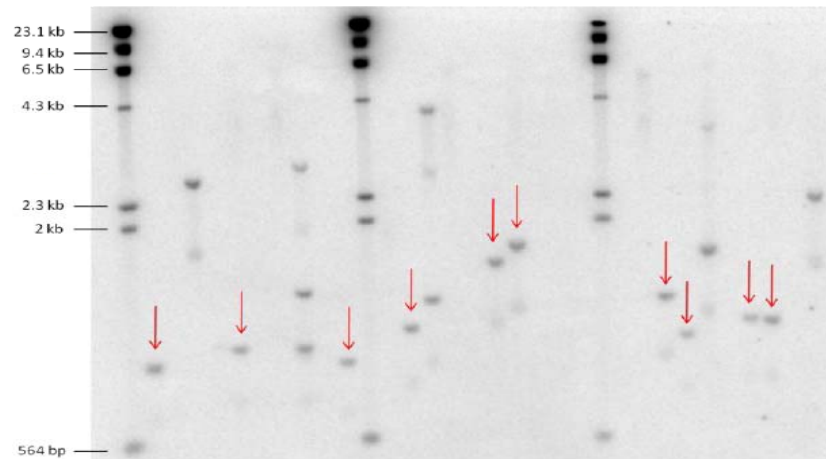
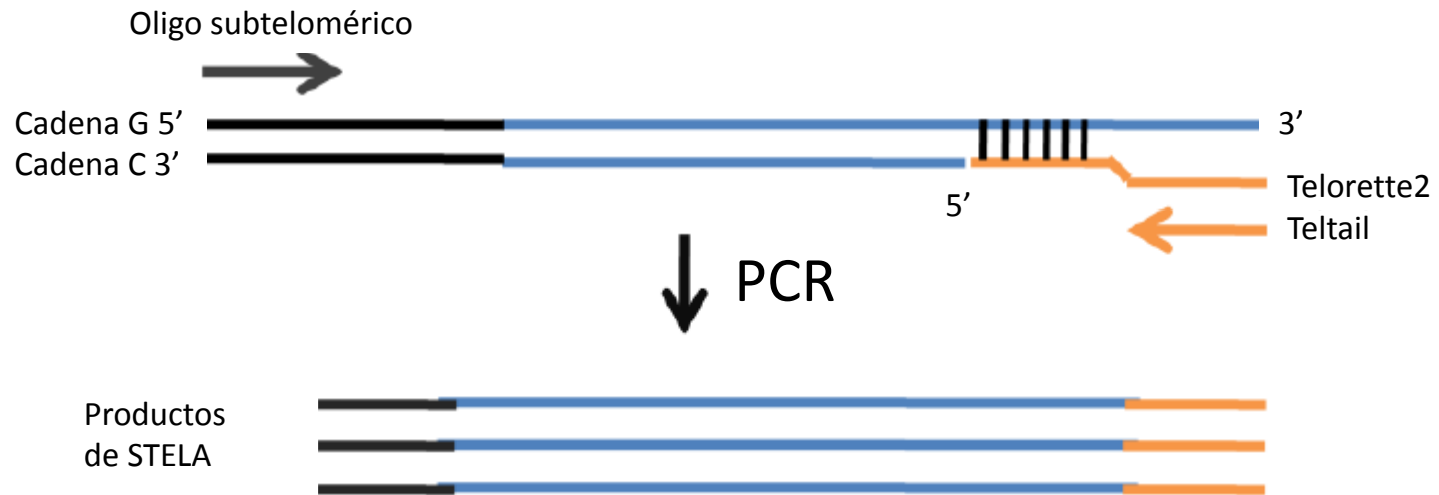


# Objetivo

Investigar la participación de las RecQ helicasas WRN y BLM y de CtIP en la vía de mantenimiento de telómeros basada en recombinación homóloga ALT.

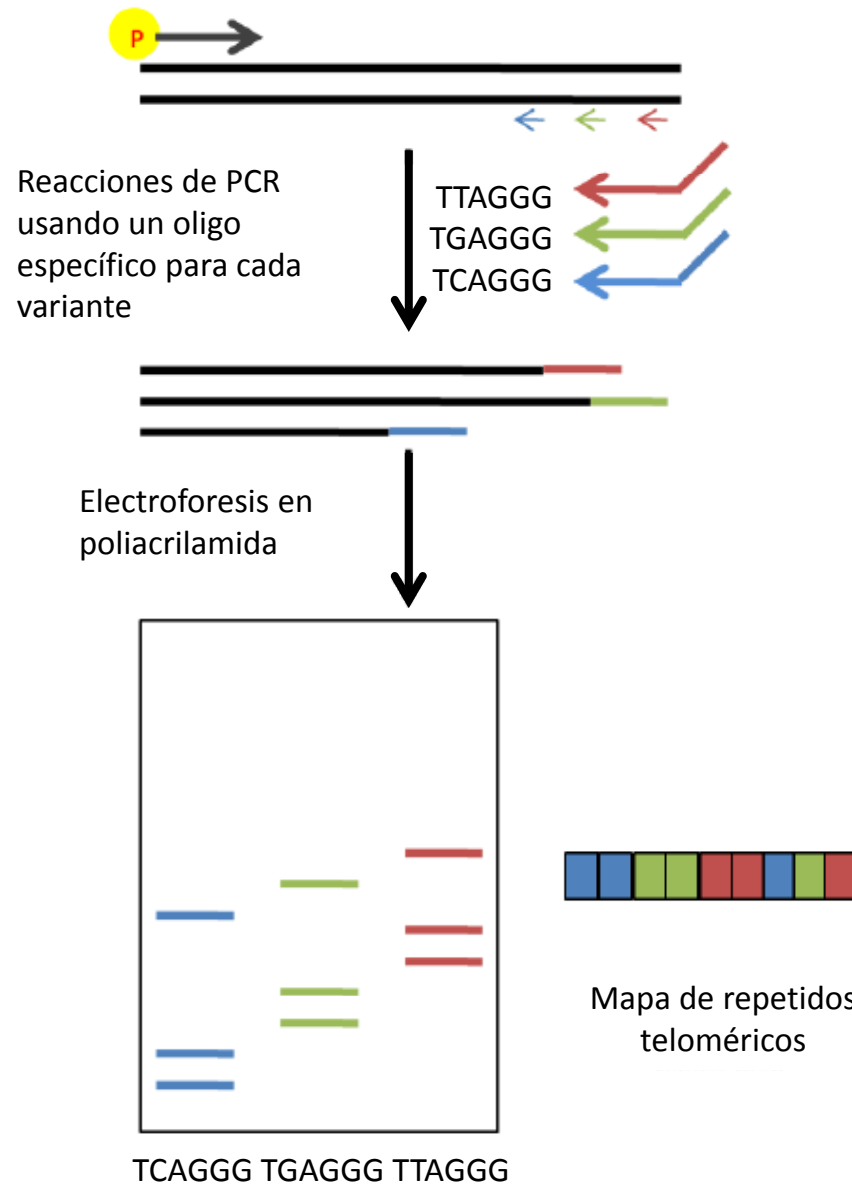
# Métodos

## Single Telomere Length Analysis STELA



# Métodos

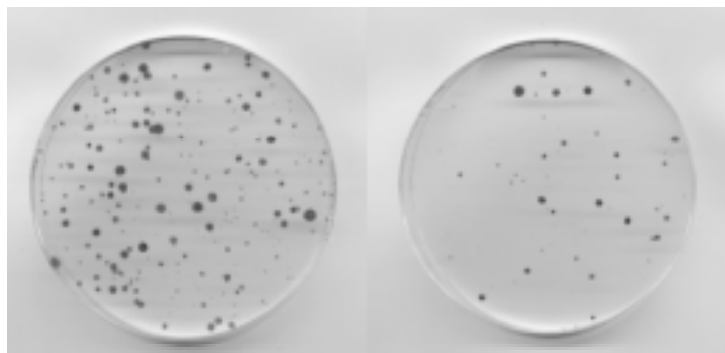
Telomere  
variant repeat  
(TVR)



# Resultados y discusión

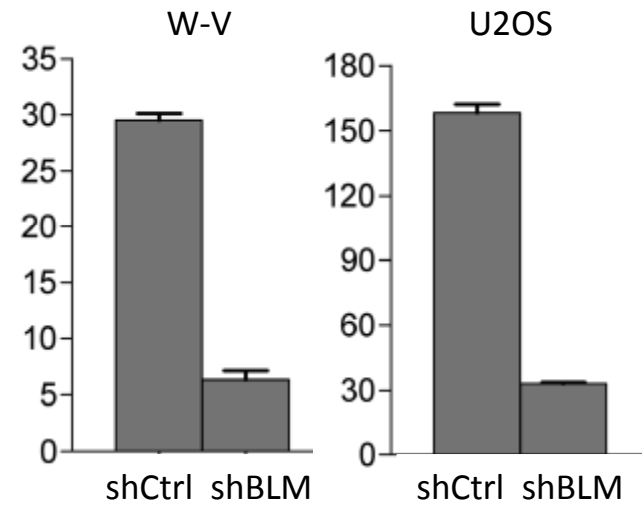
## Eficiencia de formación de colonias

### Línea celular U2OS



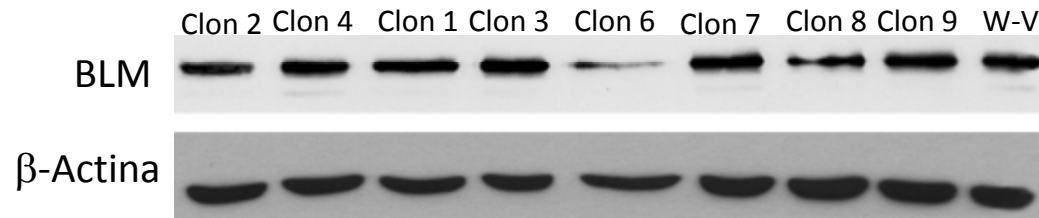
shCtrl

shBLM

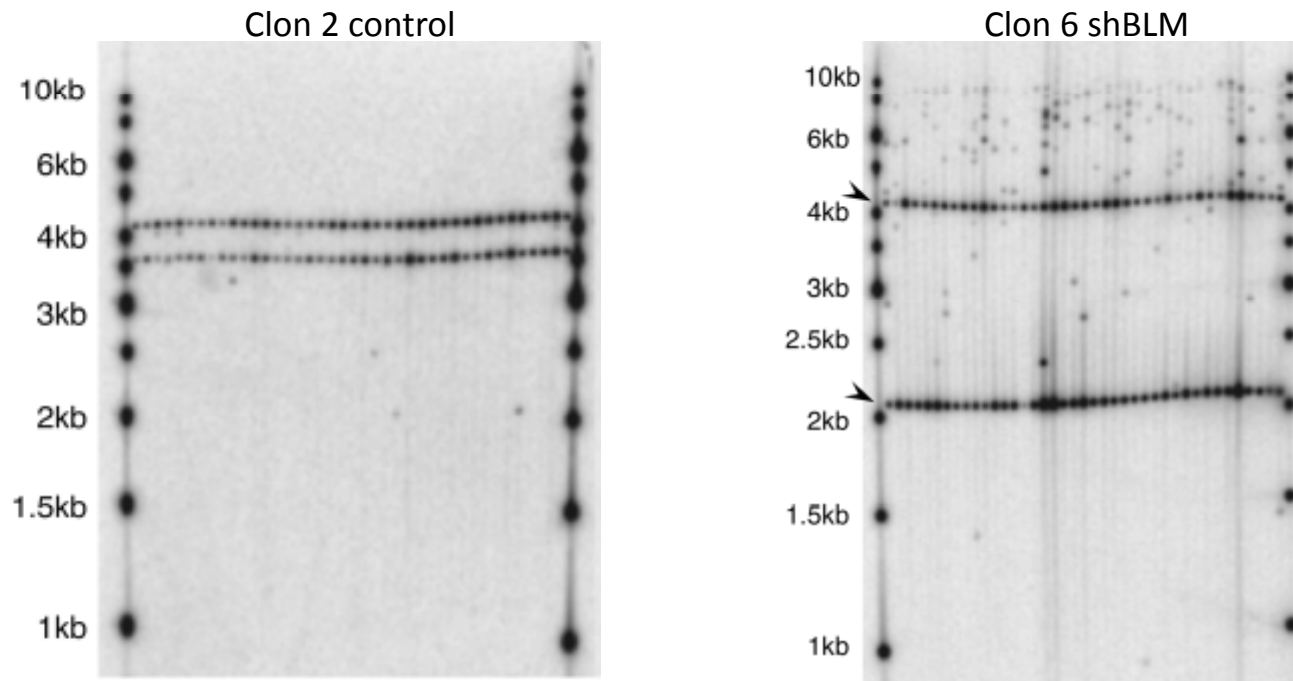


# Resultados y discusión

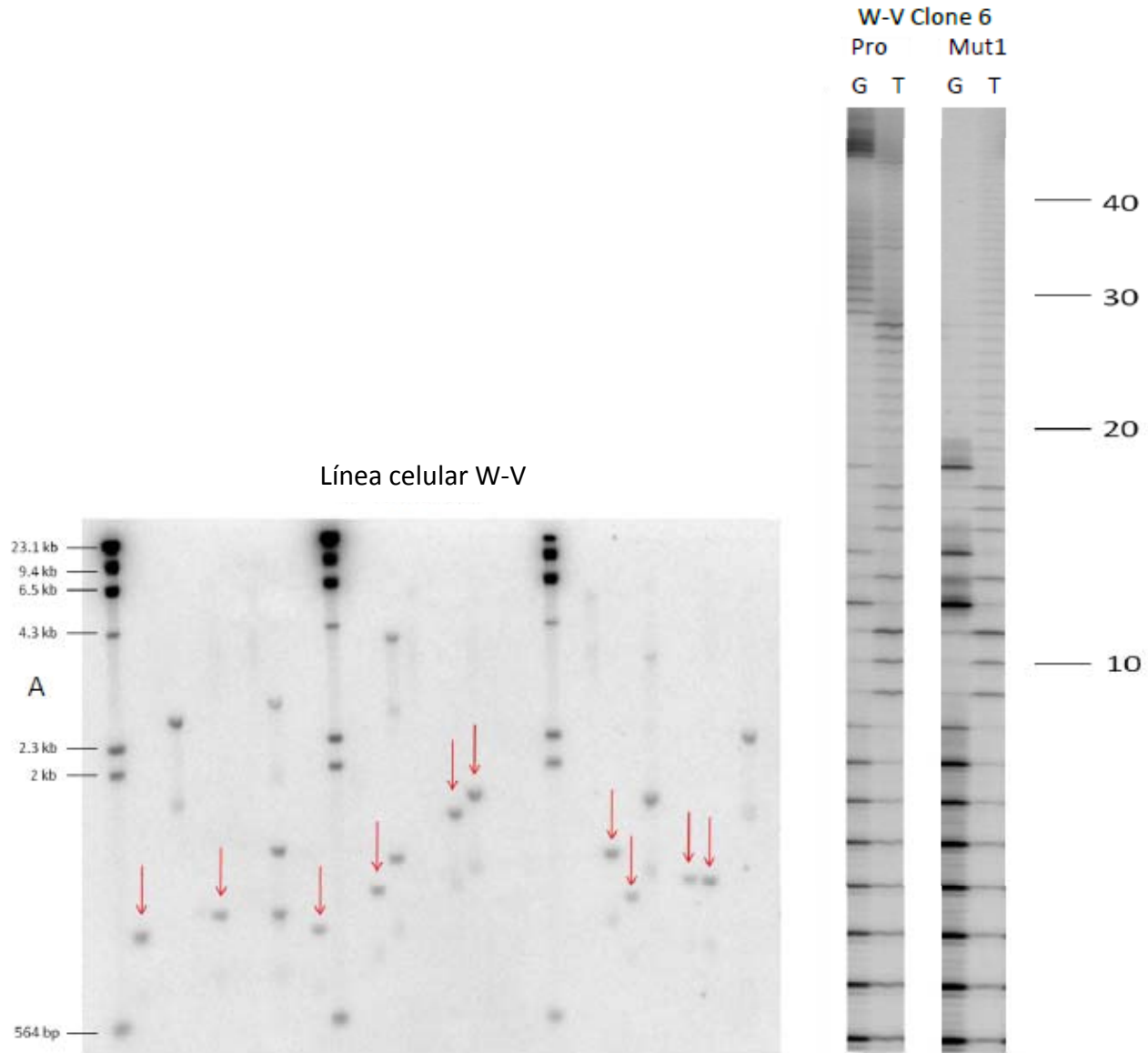
## Expresión estable



## Inestabilidad de MS32



# Resultados y discusión



# Resultados y discusión

## A) Mapas de TVR de la línea celular W-V

Progenitor GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGGGGTGTGTTTTTTTTGGGTGTGTT... (468)  
Mutante 1 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT... (1)  
Mutante 2 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT... (1)  
Mutante 3 GGGGGGGGTT... (1)  
Mutante 4 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGGGGTGTGTTTTTTTTGGGTGTGTT... (1)  
Mutante 5 GGGGGGGGTTTGTTT... (1)  
Mutante 6 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGGGGTGTGTTTTTTTTTTTTGTTGGGTGTGTT... (1)

## B) Mapas de TVR del clon control

Progenitor GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGGGGTGTGTTTTTTTTGGGTGTGTT... (107)  
Mutante 1 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTTTTTTGGGTGTGTTT... (1)  
Mutante 2 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTGGGGGGGGTGTGTTTTTTTTGGGTGTGTT... (1)  
Mutante 3 GGGGGGGGTTTGTGTT... (1)

## C) Mapas de TVR del clon shBLM

Progenitor GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGGGGTGTGTTTTTTTTGGGTGTGTT... (186)  
Mutante 1 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT... (14)  
Mutante 2 GGGGGGGGTT... (3)  
Mutante 3 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT... (4)  
Mutante 4 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGGGTGTGTTTTTTTTGGG... (1)  
Mutante 5 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT... (1)  
Mutante 6 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT... (2)  
Mutante 7 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGGGGTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTT... (4)  
Mutante 8 GGGGGGGGTTTGTGTTTGTTTTTTTTTGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT... (1)

T=TTAGGG G=TGAGGG

# Resultados y discusión

Frecuencia de mutación en líneas celulares ALT+, WRN+ y WRN-

Líneas celulares ALT+	Moléculas mutantes detectadas (complejas)	Moléculas analizadas	Frecuencia de mutación (%)
IICF/a2 (WRN+)*	14 (6)	219	6.4 (2.7)
JFCF6 (WRN+)*	4 (4)	104	3.8 (3.8)
WI38V13/2RA (WRN+)*	9 (9)	163	5.5 (5.5)
Total	27 (19)	486	5.5 (3.9)
W-V (WRN-)	6 (0)	474	1.3 (0)

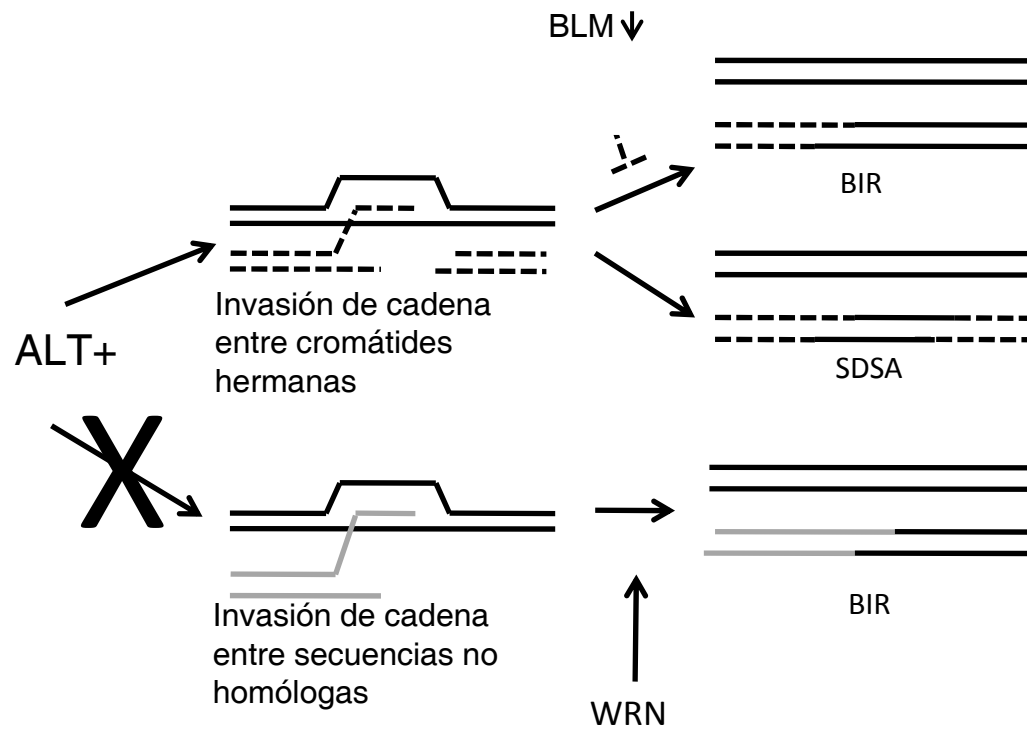
\*Datos tomados de Nat. Genet., 2002:30, 301–305.

Frecuencia y tasa de mutación en la línea celular W-V, un clon control y clon transfectado con shBLM

Grupo	Moléculas analizadas	Mutantes detectados	Frecuencia de mutación	Tasa de mutación
Línea celular W-V	474	6	1.3%	ND
W-V Clon control W-V	110	3	2.7%	$1.4 \times 10^{-3}$
W-V Clon shBLM (40% expresión de BLM)	216	30 (8 diferentes)	13.8%	$6.9 \times 10^{-3}$

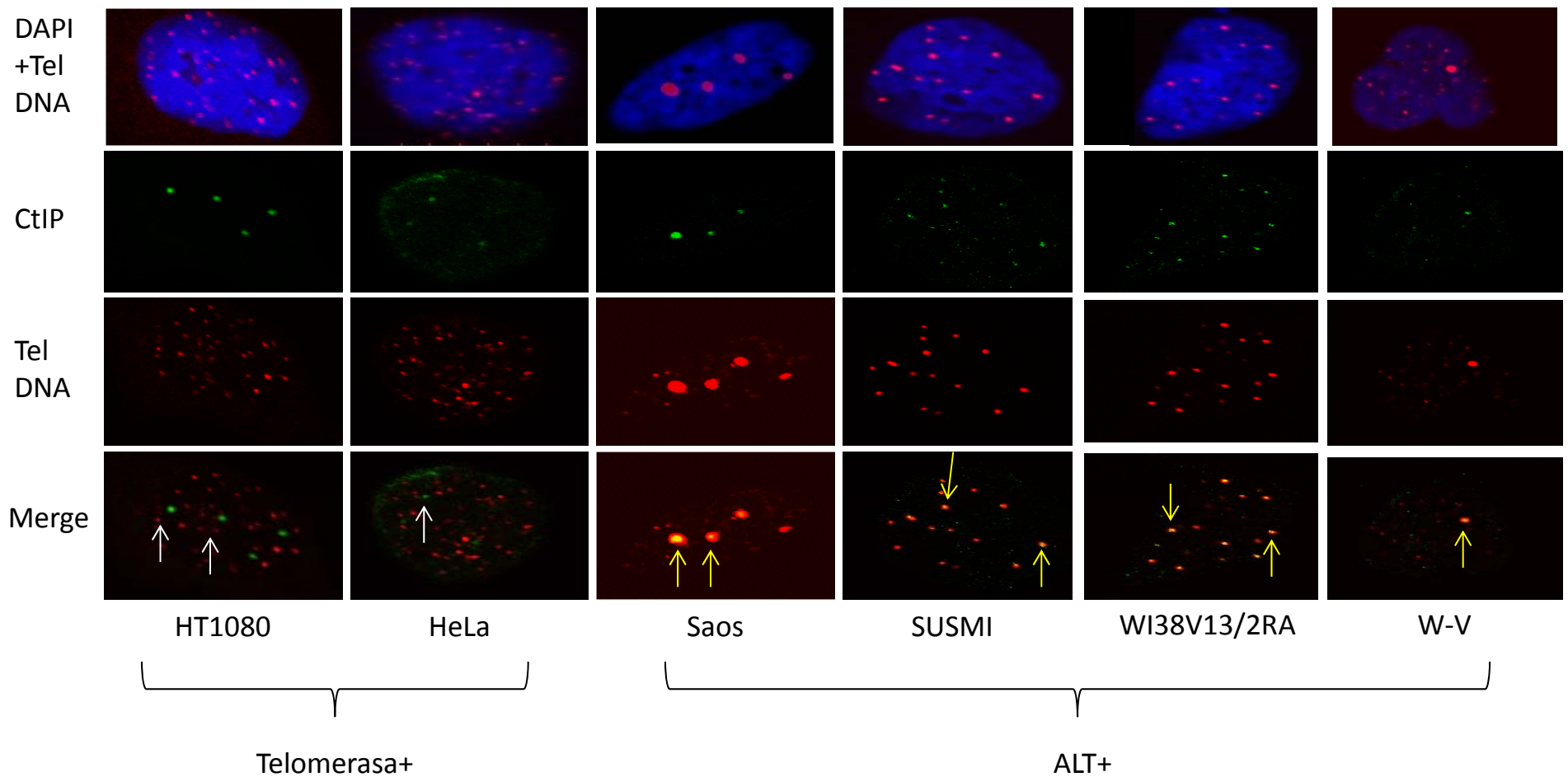


# Resultados y discusión



# Resultados y discusión

## Colocalización de CtIP y DNA telomérico



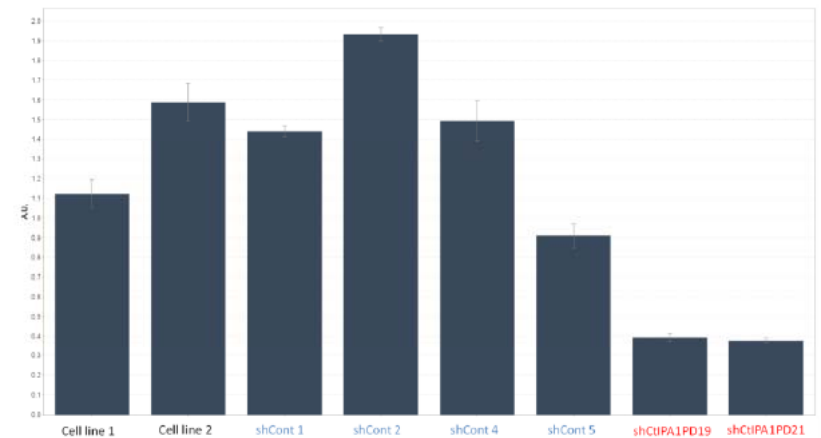
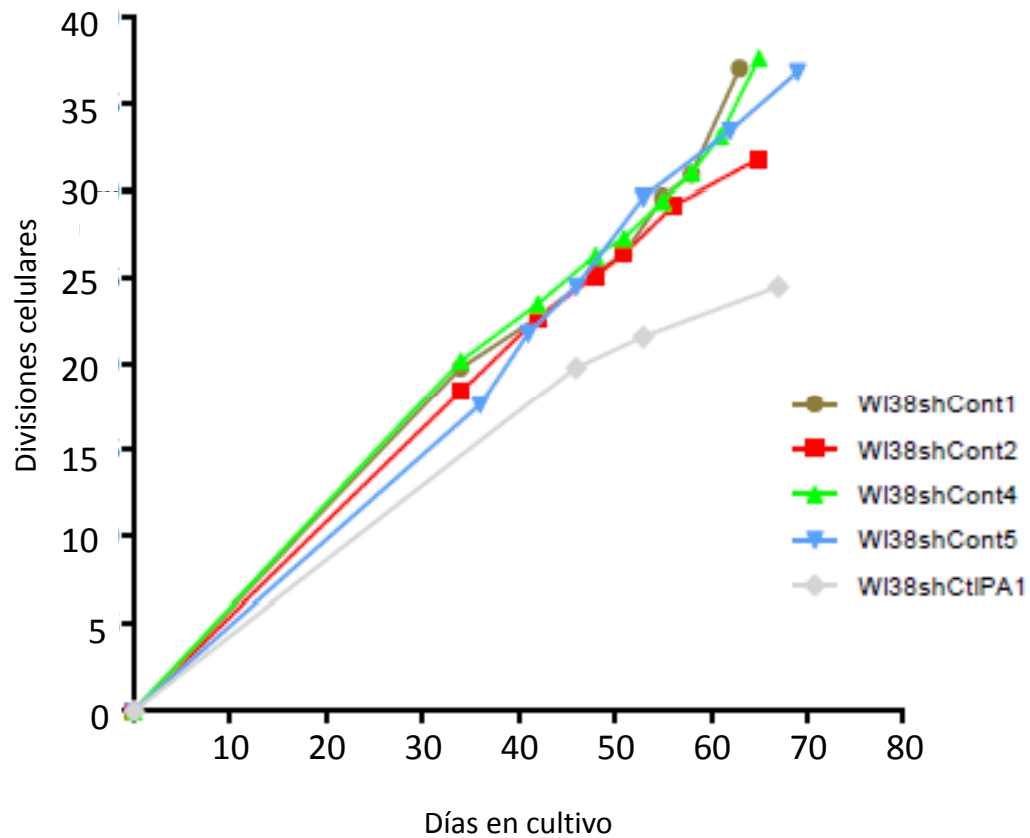
# Resultados y discusión

## Colocalización de CtIP y DNA telomérico

Línea Celular	Porcentaje de células positivas para colocalización de CtIP/DNA (número de células)	Total de células contadas
HT1080	0.08% (1)	1155
HeLa	0	1274
WI38V13/2RA	38% (42)	110
SUSMI	23% (25)	107
W-V	25% (29)	115
SAOS	11.7% (12)	114

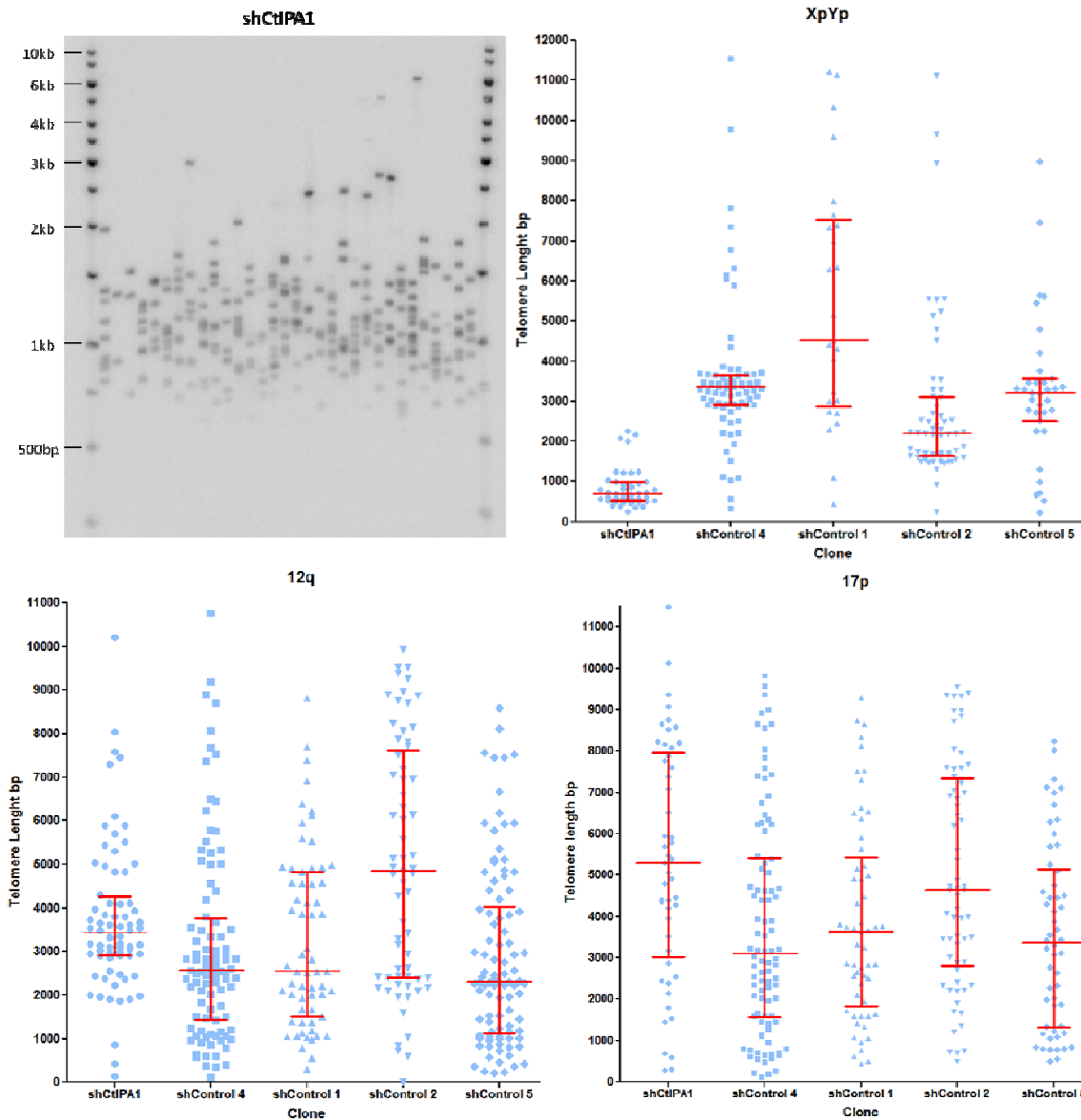
# Resultados y discusión

Clones con expresión estable de shCtIP



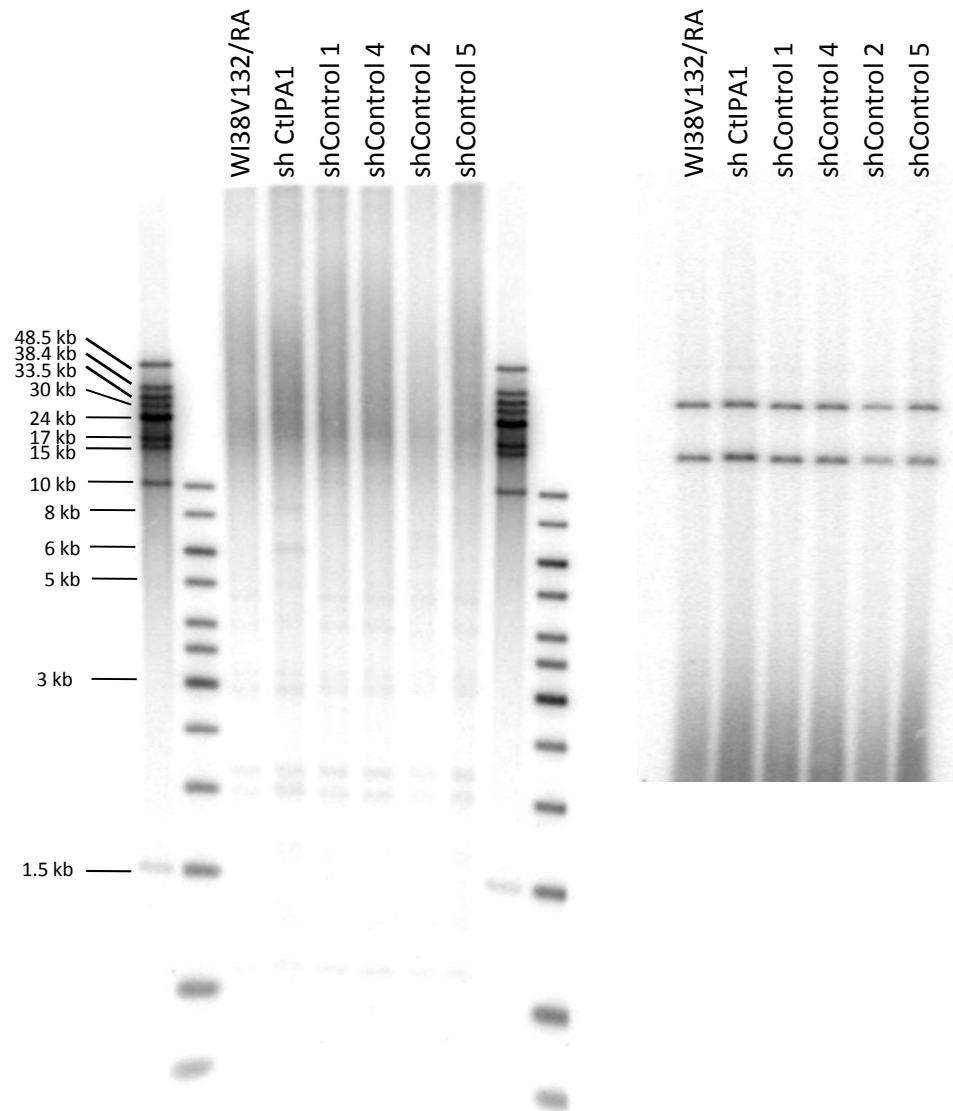
# Resultados y discusión

Longitud del telómero por STELA



# Resultados y discusión

Longitud del telómero por TRF (Telomere restriction fragment)



	Mediana
WI38V13/2RA	33.28
shCtIPA1	32.45
shControl1	33.85
shControl2	31.33
shControl3	26.14
shControl4	31.13

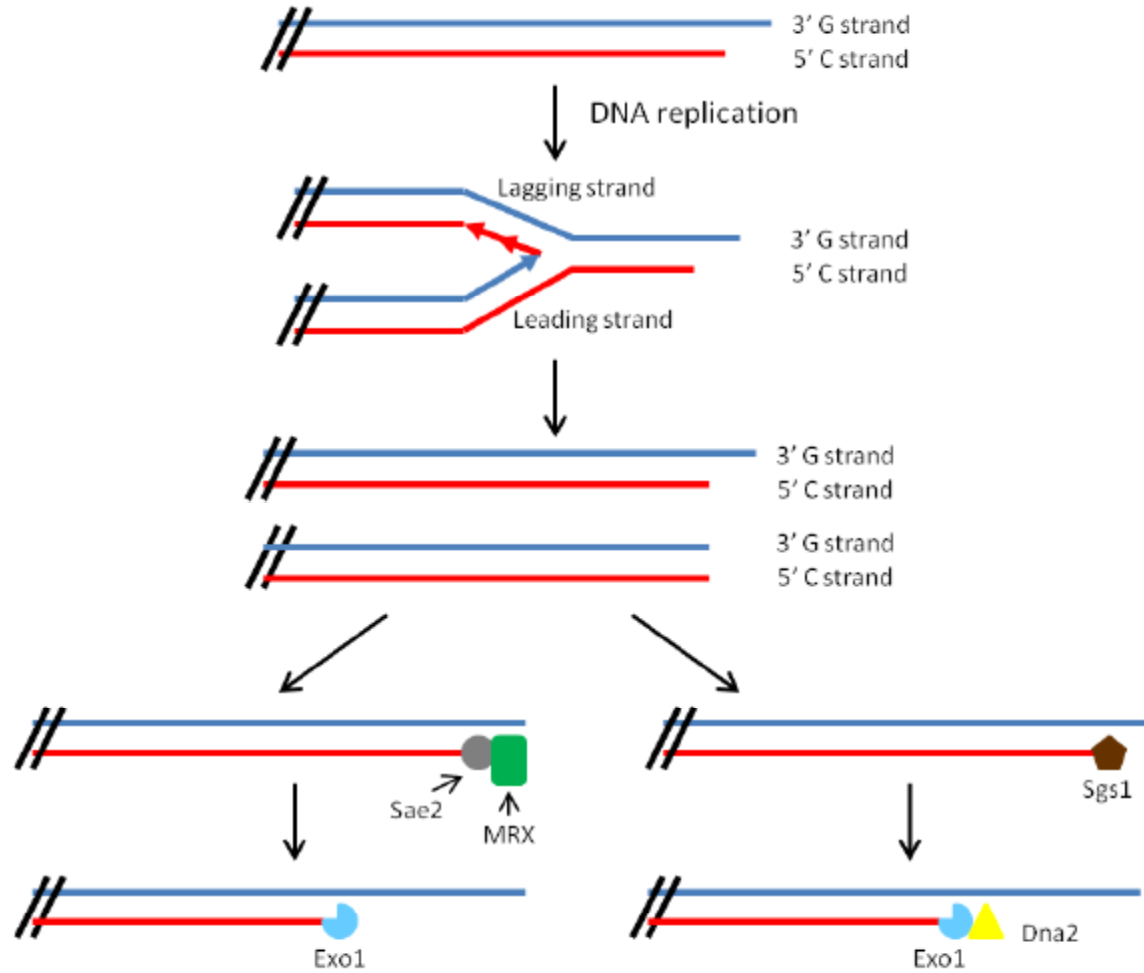
# Resultados y discusión

- Mutaciones teloméricas
- Inestabilidad de MS32
- Abundancia de Círculos C

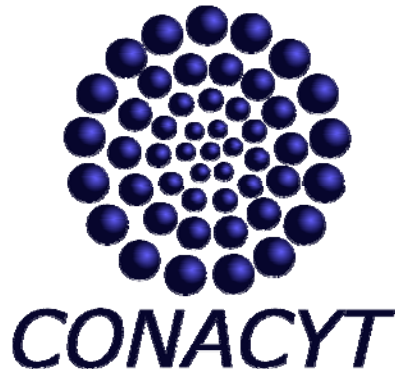
## Trabajo futuro

- CtIP en APBs
- Etapa del ciclo celular
- Presencia de fusiones o señales de daño
- Longitud del 3' overhang

# Introducción







Gracias!