



TESIS DE PASANTÍA DE GRADO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA  
- ORIENTACIÓN BIOLOGÍA MOLECULAR -

# **FUNCIONAMIENTO Y PATRÓN DE LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA WERNER FRENTE A LA ALTERACIÓN DE COMPONENTES DE LA LÁMINA NUCLEAR**

**VALERIA DA COSTA**

**Tutor: Rubén Agrelo**

**Co-tutor: Miguel Arocena**

**Laboratorio de Epigenética del Cáncer y el Envejecimiento**

**Institut Pasteur de Montevideo**

**Febrero 2015**



*"La biología molecular ha mostrado que hasta los más sencillos de todos los sistemas  
vivientes en la Tierra hoy, son objetos tremendamente complejos, (...) cada célula es  
en realidad una verdadera fábrica miniaturizada que contiene miles de piezas  
exquisitamente diseñadas de intrincada maquinaria molecular,  
compuesta en total de cien mil millones de átomos,  
mucho más complicada que cualquier máquina construida por el hombre  
y absolutamente sin paralelo en el mundo inanimado"*

*Michael Denton*

## AGRADECIMIENTOS

---

A mis tutores, Dr. Rubén Agrelo y Dr. Miguel Arocena por su orientación en este trabajo, por su paciencia y buena disposición, y por todo lo que me enseñaron en este tiempo.

A mi familia, en especial a mis padres y mi hermana, por su apoyo incondicional y siempre estar presentes en cada paso de mi vida.

A Ignacio, por su amor y apoyo, y por estar a mi lado siempre.

A mis compañeros de laboratorio, Fabián, Vanina, Franco, Natalia y Santiago, por su compañía y disposición a ayudar, y por darme su visión de las cosas.

A mis profesoras de biología de secundaria, que me inspiraron y despertaron mi interés en la ciencia.

A mis amigos, por estar siempre presentes y pendientes de cada paso que doy.

A los servicios de Microscopía del Institut Pasteur, en especial a Marcela Díaz y Soledad Astrada, al servicio de Microscopía Electrónica de Facultad de Ciencias, UdelaR, en especial a Gabriela Casanova y Gaby Martínez, y al servicio de Citometría del Institut Pasteur, en especial a Sabina Victoria.

## TABLA DE CONTENIDO

---

<b>Resumen</b> .....	<b>8</b>
<b>Hipótesis de trabajo</b> .....	<b>9</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>9</b>
Objetivos específicos .....	9
<b>Introducción</b> .....	<b>10</b>
Cáncer y Envejecimiento .....	11
RecQHelicasas .....	12
WRN y su progeria asociada: Síndrome de Werner .....	13
Lámina Nuclear, LMNA y su implicancia en el Síndrome de Werner Atípico .....	16
El Nucleolo y su relación con WRN y LMNA .....	17
Transfección con shARN como herramienta para el estudio de las posibles interacciones entra LMNA y WRN .....	18
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>20</b>
Línea celular.....	20
Generación de protocolo de Sincronización .....	20
Midiprep .....	21
Generación de línea celular .....	22
Sincronización.....	23
Inmunofluorescencia.....	23
Extracción de proteínas .....	24
Extracción de ADN.....	24
Extracción de ARN.....	25
Western Blotting.....	25
Microscopía Electrónica.....	27
Cariotipos.....	27
Análisis Estadísticos .....	28
Anticuerpos utilizados.....	28
<b>Resultados</b> .....	<b>29</b>
Sincronización celular.....	29

Inmunotinciones previas a transfección.....	29
Silenciamiento de LMNA.....	33
Inmunotinciones post transfección .....	34
Microscopía Electrónica.....	36
Cariotipos.....	37
<b>Discusión .....</b>	<b>39</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>43</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>47</b>
<b>Apéndice 1: Recetas.....</b>	<b>48</b>

## TABLA DE FIGURAS

---

Esquema de WRN con las mutaciones asociadas .....	<b>14</b>
Esquema de LMNA con las mutaciones descritas en el síndrome de Werner atípico .....	<b>16</b>
Esquema de la distribución de las regiones del nucléolo .....	<b>17</b>
Vector pGFP-V-RS.....	<b>21</b>
Gráfica sincronización de células HeLa con diferentes pulsos de Aph y Thy .....	<b>29</b>
Inmunotinciones realizados en HeLa control previo a transfección en células no sincronizadas (Microscopía Epifluorescencia) .....	<b>30</b>
Inmunotinciones realizados en HeLa control previo a transfección en células no sincronizadas (Microscopía Confocal) .....	<b>31</b>
Gráfica de los porcentajes de células a partir de inmunotinciones .....	<b>31</b>
Inmunotinción de LMNA y DAPI .....	<b>32</b>
Inmunotinción de WRN y Nucleolina.....	<b>32</b>
Imágenes de expression de GFP en células transfectadas .....	<b>33</b>
Silenciamiento de LMNA.....	<b>33</b>
Localización de WRN en HeLa control y LMNA -/-.....	<b>34</b>
Porcentaje de localización de WRN en HeLa control y HeLaLMNA -/-.....	<b>35</b>
Inmunotinción de WRN y Nucleolina en células control y LMNA -/-.....	<b>35</b>
Imágenes de núcleos de la línea control y la línea LMNA -/- con Microscopía Electrónica ....	<b>36</b>
Conteo de intercambios entre cromátidas hermanas.....	<b>37</b>
Conteo de aberraciones cromosómicas .....	<b>38</b>

## RESUMEN

---

Werner (WRN) codifica para una proteína de la familia de las RecQhelicadas, con funciones ADNexonucleasa y helicasa, que mantiene la integridad del genoma. Participa en la reparación, replicación y recombinación del material genético. Mutaciones en este gen provocan el síndrome de Werner, que causa inestabilidad genómica, envejecimiento acelerado y una mayor predisposición al cáncer. A su vez, se observó que el Síndrome de Werner Atípico es causado mutaciones en el gen de lamina tipo A (LMNA),

Mediante inmunofluorescencia, se estudió la localización de WRN intranuclear y su relación con otras proteínas del núcleo. Los resultados indican una localización en la región perinucleolar tanto de WRN y como de LMNA. A su vez, estos patrones de localización de WRN y LMNA podría estar indicando una interacción funcional entre estas proteínas.

Se estableció una línea celular con LMNA silenciada para estudiar posibles alteraciones en la localización y función de WRN, la ausencia de LMNA fue confirmado por Inmunofluorescencia y Western Blotting. Mediante inmunofluorescencia, se observó una deslocalización de Werner de su patrón nuclear y nucleolar, frente a la ausencia de LMNA. A su vez, se observó mediante microscopía electrónica de transmisión un cambio en la estructura nucleolar, en especial en los centros fibrilares. Se realizaron algunos estudios funcionales con cariotipos, y se observó un aumento en las anomalías cromosómicas que podría deberse a la deslocalización de WRN.

Estos estudios sugieren que la LMNA es la estructura física que podría interaccionar de forma directa o indirecta con WRN, manteniendo su localización celular y de esta forma permitiendo su correcto funcionamiento. El silenciamiento de la LMNA tendría implicancias en la función de WRN, la estabilidad genómica y por ende podría arrojar luz en los mecanismos de envejecimiento y cáncer.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

---

LMNA le podría brindar un soporte físico a WRN para su correcto funcionamiento. La ausencia de la misma en células de cáncer generaría inestabilidad genómica, al provocar la deslocalización de WRN, y provocaría defectos citogenéticas, en el procesamiento del ARN y en la reparación durante la replicación de ADN.

## OBJETIVOS

---

**El objetivo general de este trabajo es estudiar preliminarmente la influencia del déficit de LMNA a nivel de WRN en una línea celular derivada de cáncer de cérvix.**

---

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- 1- Generar una línea celular HeLa LMNA (-/-) por transfección estable con un ARNsh.
- 2- Realizar algunos ensayos funcionales y de localización de WRN en la línea silenciada, comparándola con una línea HeLa control.

## INTRODUCCIÓN

---

Las células tienen un complejo sistema para mantener la integridad genómica. Este comprende la capacidad de la célula de evadir mutaciones e implica replicar el ADN de forma precisa y así transmitir la información genética fielmente (Ouyang et al, 2008). El mantenimiento de la integridad genómica es un aspecto fundamental para todas las células. Debido a que las mismas se encuentran expuestas constantemente a daños en el ADN producido por sus productos normales del metabolismo o provenientes del ambiente, han desarrollado mecanismos que responden frente a lesiones específicas del ADN (Ouyang et al, 2008). Si la reparación del ADN ocurre sin errores, el genoma se preserva, pero si el daño es demasiado extenso, la célula sufre apoptosis (Ouyang et al, 2008).

Daños en el ADN incluyen adiciones químicas o rupturas en las bases, formando un nucleótido anormal o un fragmento del mismo, o roturas en una o dos cadenas (Bernstein et al. 2013). Derivan de tres grandes fuentes: agentes ambientales, como luz UV, radiación ionizante o químicos genotóxicos; especies reactivas de oxígeno derivadas de la respiración o peroxidación lipídica; e hidrólisis espontánea de residuos nucleotídicos que induce sitios abásicos o desaminación de determinados residuos (Giglia-Mari et al, 2010)

Si el ADN con una base dañada se replica, se puede insertar una base incorrecta en la cadena complementaria, y esto puede convertirse en una mutación en la próxima ronda de replicación. A su vez, si una rotura de doble hebra se repara incorrectamente, puede llevar a rearrreglos cromosómicos, que pueden involucrar el locus de un gen, y que el mismo se corte o pase a estar regulado de forma anormal. Si este tipo de cambios logra pasar a la siguiente generación, también es una forma de mutación (Bernstein et al. 2013).

Para evitar que esto ocurra, las células tienen un sofisticado sistema de respuesta frente al daño en el ADN, que incluye mecanismos de reparación del daño y proteínas de puntos de control del ciclo celular (Giglia-Mari et al, 2010). Los mecanismos de reparación incluyen la reparación por escisión de base, por escisión de nucleótido, reparación de mal apareamiento y reparación de rotura de doble hebra por extremos no homólogos o por recombinación homóloga. WRN interacciona físicamente con componentes encargados de estas dos últimos mecanismos de reparación por recombinación del ADN (Chen et al, 2003).

Mutaciones en proteínas vinculadas a la reparación del ADN o a puntos de control en el ciclo celular, aumentan la tasa de mutaciones en la célula. Este aumento en la tasa de mutaciones aumenta la probabilidad de que ocurra una mutación causante de cáncer, y a su vez, que se alteren los mecanismos de control posibilita a la célula a avanzar en el ciclo celular a pesar del daño en el ADN (Ouyang et al. 2008).

### **Cáncer y Envejecimiento**

El riesgo de padecer cáncer depende dramáticamente de la edad. Esto se explica porque la transformación maligna necesita una secuencia de eventos (por ejemplo modificaciones en el ADN vinculado al control del ciclo celular) y la probabilidad de que estos eventos se verifiquen depende del tiempo y la “dosis” de exposición a una serie de agentes físicos, químicos y biológicos (Barrios et al, 2014).

Asociado al envejecimiento, hay un aumento en el daño en el ADN y roturas de doble hebra sin reparar, errores en la regulación del ciclo celular, cambios hormonales y un aumento en la exposición a mutágenos. Se ha observado experimentalmente que la reparación aberrante del ADN y desregulación del ciclo celular confieren una alta probabilidad de muchos tipos de cáncer (Tinoco et al, 2012). A su vez, los tejidos o tipos celulares que están crónicamente estimulados y pasan por muchas rondas de replicación del ADN de forma rápida, van a tener un aumento en la probabilidad de sufrir errores en su ADN, que pueden llevar al desarrollo de cáncer (Tinoco et al, 2012).

Hayflick demostró que las células somáticas normales tienen un límite de divisiones celulares antes de entrar en senescencia (Hayflick, 1965). Después de superar este número determinado de divisiones, conocido como el límite de Hayflick, la célula somáticas normales entran en un estado irreversible donde se arresta su crecimiento, y comienza un proceso de senescencia replicativa (Tinoco et al, 2012). Si escapa a este mecanismo, comienza el proceso de inmortalización que puede llevar a su transformación en una célula maligna.

También se ha visto que el número de divisiones es más importante que el tiempo transcurrido, ya que células que se mantuvieron quiescentes por meses, y luego fueron puestas a proliferar de nuevo, se dividieron aproximadamente el mismo número de veces

que aquellas que no se mantuvieron quiescentes, con lo que habría cierta memoria en el número de replicaciones (Tinoco et al, 2012).

Los síndromes progeroides, son enfermedades genéticas que conllevan un envejecimiento acelerado. Afectan a todos o casi todos los tejidos del organismo. Algunos investigadores las denominan progerias segmentarias, dado que están asociados con muchos de los signos del envejecimiento, pero también se conocen muchas diferencias (Goto, 1997). Algunos ejemplos clásicos son Hutchinson Guilford, Síndrome de Werner y Síndrome de Rothmund-Thompson. La identificación de los genes que al sufrir una mutación desencadenan estas progerias, y la función de las proteínas que codifican puede llevar a arrojar luz sobre los mecanismos moleculares que llevan al envejecimiento normal (Tinoco et al, 2012). Si hay genes que regulan el envejecimiento normal, podrían estar involucrados a su vez, en el control proliferativo de las células, y por lo tanto intervenir en el proceso de transformación de las mismas. Muchos de estos genes son genes supresores de tumores, dentro de los cuales se pueden identificar aquellos involucrados en el control proliferativo (Gate-Keepers) o los involucrados en la protección del genoma (Care-Takers). En este último grupo se encuentra la proteína de interés, WRN (Agrelo, 2010).

### **RecQ Helicasas**

RecQ es una familia de helicasas dependientes de ATP muy conservadas, necesarias para la reparación de ADN. Su función es necesaria para prevenir la inestabilidad genómica.

Las helicasas son enzimas que separan las cadenas complementarias de ácidos nucleicos doble cadena estables, utilizando energía derivada de la hidrólisis de ATP. Las moléculas simple hebra de ARN o ADN producidas son usadas como moldes o sustrato en varios procesos biológicos como replicación, recombinación, reparación y transcripción (Hanada & Hickson, 2007).

RecQ fue identificada inicialmente en *Escherichia coli* como un factor involucrado en modular la resistencia a la inanición de Timina y en la recombinación homóloga (Umezu et al, 1990).

En eucariotas, las proteínas de la familia de las RecQ están involucradas en varios procesos celulares, incluyendo el envejecimiento, replicación del ADN, recombinación y reparación.

Además de WRN, en humanos también se incluyen las proteínas BLM, RecQ4, RecQ5 y RecQ1. La importancia de su función se evidencia particularmente por tres síndromes vinculados a mutaciones en tres genes de proteínas de la familia: Bloom (mutaciones en BLM), Werner (mutaciones en WRN) y Rothmund & Thompson (mutaciones en RecQ4). Estas mutaciones resultan en inestabilidad genómica (aumentos en rearrreglos cromosómicos, roturas cromosómicas o híper-recombinación) y una predisposición a varios tipos de cáncer (Bernstein et al, 2003).

### **WRN y su progeria asociada: Síndrome de Werner**

El síndrome de Werner es causado por mutaciones en el gen de WRN, que codifica para una proteína de la familia de las RecQ helicasas. Se trata de un síndrome progeroide autosómico recesivo que causa inestabilidad genómica, envejecimiento acelerado y una mayor predisposición al cáncer (Opresko et al, 2003).

Los pacientes de Werner presentan un gran número de signos clínicos y síntomas asociados al envejecimiento prematuro, pero tienen varias diferencias clínicas frente al envejecimiento normal. Estos síntomas aparecen en la segunda o tercera década de la vida del paciente, e incluyen encanecimiento del cabello, cataratas, osteoporosis, aterosclerosis, diabetes mellitus tipo 2 (Opresko et al, 2003). También presentan una alta incidencia de neoplasmas malignos, en particular sarcomas (Opresko et al, 2003). Las causas más comunes de muerte entre estos pacientes son cáncer o aterosclerosis a una edad promedio de 46 años (Moser et al, 1998).

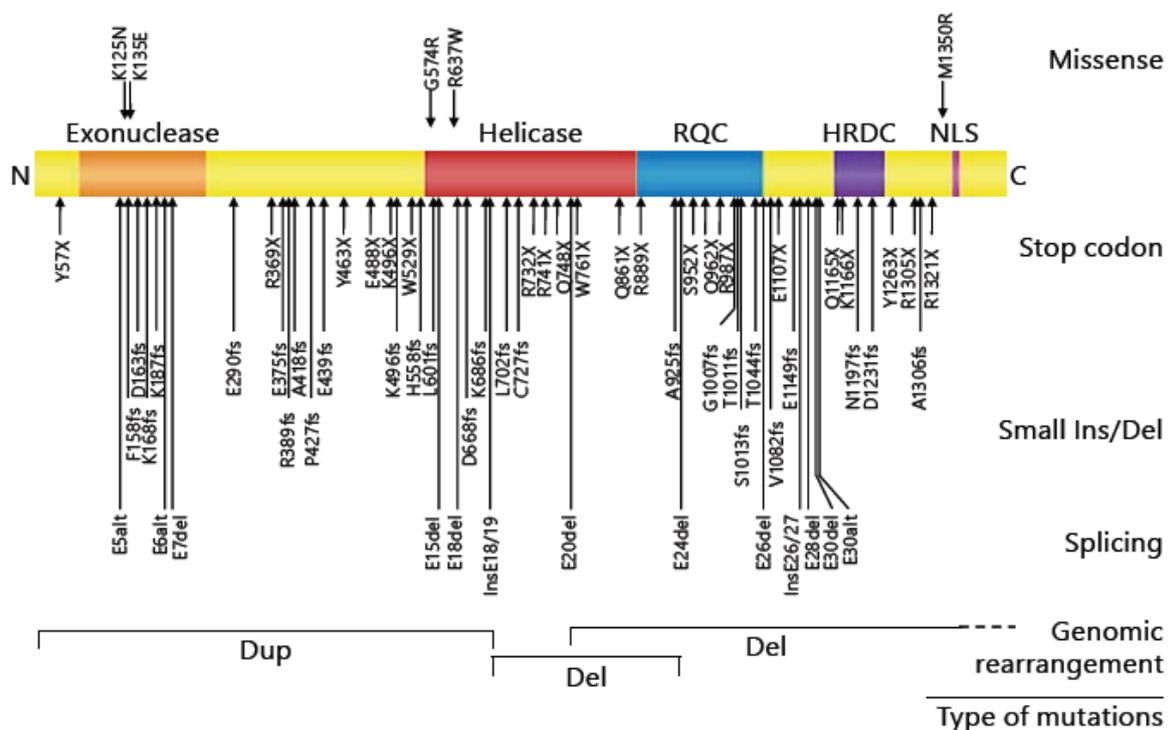
A nivel celular se identificaron tres fenotipos de líneas celulares de pacientes de Síndrome de Werner:

1. Los fibroblastos y linfocitos de estos pacientes tienen una capacidad limitada de crecimiento en cultivos celulares (Martin et al, 1970, Melarango et al, 1995).
2. Presencia de inestabilidad molecular o citogenética (manifestada por una multiplicidad de rearrreglos cromosómicos, que se describen como "variegated translocated mosaicism"), aunque no se observa aumento de intercambios entre cromátidas hermanas (Melarango et al, 1995).

- Sensibilidad selectiva a 4NQO (Oghburn et al, 1997) y Camptotecina (Poot et al, 1999). El 4NQO es un compuesto químico mutagénico y carcinógeno, que al reducirse genera especies reactivas de oxígeno que provocan daño en el ADN. La camptotecina es un fármaco utilizado contra tumores malignos, con propiedades antiproliferativas por inhibición de la topoisomerasa 1. También se ha visto que linfoblastos deficientes en WRN son sensibles a melfalan, clorambucilo, mitomicina C y cis-platino (Poot et al, 2001).

A su vez, se ha encontrado que diversas mutaciones en el gen de LMNA generan un cuadro de síntomas similar al síndrome de Werner, pero con una disminución en la edad de aparición de los mismos, de un promedio de 39 años en el síndrome de Werner a 23 años en esta progeria, a la que se le llamó Síndrome de Werner atípico (Chen et al, 2003, Nyugen et al, 2007)

El gen de WRN, localizado en el cromosoma 8p12 codifica para una proteína de 1432 aminoácidos (AA) de la familia de las RecQhelicases, con funciones ADN3'-5' exonucleasa y 3'-5' helicasa ATP dependiente (Agrelo, 2010). Su función es mantener la integridad del genoma, participando en la reparación, replicación y recombinación del material genético



**Fig. 1-** Esquema de WRN con las mutaciones asociadas. Se observan los diferentes dominios enzimáticos y la señal de localización nuclear. A su vez, están marcadas las mutaciones descritas del síndrome de Werner, clasificadas según el tipo de mutación. Imagen de Oshima & Hisama 2014.

(Popuri et al, 2012). In vitro, los sustratos de este enzima incluyen varios intermediarios de estos procesos, como por ejemplo, Holliday Junctions, estructuras de ARN-ADN o estructuras tipo horquilla (Opresko et al, 2003). Por lo tanto, WRN funciona como una helicasa accesoria que participa en la resolución de estructuras inusuales durante la replicación del ADN que aparecen tanto en sitios frágiles comunes como en telómeros, y que si no son resueltos pueden impedir la replicación normal del mismo (Pirzio et al. 2008). Deficiencia de WRN lleva a un aumento considerable de aberraciones cromosómicas, ya que se acumulan roturas en los mismos y estas se localizan específicamente en sitios frágiles comunes (Pirzio et al. 2008).

WRN también participa en la reparación del ADN, siendo importante para la reparación de roturas de doble cadena mediante recombinación homóloga, unión de segmentos no homólogos y en la reparación de roturas de simple hebra por reparación por escisión de base (Bohr, 2005).

A su vez, se ha visto que WRN está relacionado con la transcripción de ARN a nivel del nucléolo. Las células transcripcionalmente activas presentan una localización nucleolar de WRN, y este se deslocaliza del nucléolo cuando las células ingresan en una etapa quiescente por falta de suero o por exposición a 4NQO (Gray et. al, 1998). Sin embargo, se observó que la localización nucleolar de WRN estaría relacionada con la transcripción de ARNr pero no ARNm (Shiratori, et al, 2002). Más específicamente, se encontró que WRN y la ARN polimerasa I (ARN pol I) forman un complejo en el nucléolo, y que en pacientes de síndrome de Werner presentan una tasa de transcripción menor de ARNr, y esto podría ser uno de los principales defectos que llevan al fenotipo de envejecimiento acelerado (Shiratori et al, 2002).

WRN presenta una secuencia C-terminal de señal de localización nuclear (NLS), que señala su ubicación intranuclear luego de ser sintetizada (Opresko et al, 2003). Dentro del núcleo, WRN se localiza en el nucléolo, foci nucleares y nucleoplasma. Los diferentes patrones de localización dependen del ciclo celular y del daño en el ADN (Opresko et al, 2003). Estos patrones en células HeLa fueron descritos como: a-nucleolar; b- nuclear difuso; c nucleolar+nuclear difuso; d- en foci nucleares, siendo el patrón nucleolar el observado en células en condiciones normales (Opresko et al, 2003)

Las mutaciones de WRN que causan el fenotipo de Síndrome de Werner se encuentran a lo largo del marco abierto de lectura pero una mayor proporción (63%) se encuentran desde la mitad hacia la región que codifica para el extremo C-terminal (Moser et al, 1998). La mitad de estas mutaciones se tratan de sustituciones de bases, otra parte de inserciones o deleciones pequeñas, pero también se ha identificado una inserción de 15kb y otra de 105 pares de bases (Moser et al, 1998)

El resultado de estas mutaciones en los pacientes de síndrome de Werner produce un ARNm inestable del cual se traduce una proteína trunca, sin señal de localización nuclear y sin algunos de sus dominios enzimáticos (Rodriguez-Lopez et al, 2002).

Recientemente, se ha reportado que el gen de WRN sufre inactivación epigenética por hipermetilación de la isla CpG en una amplia variedad de tumores de tanto origen mesenquimal y epitelial, incluidos aquellos observados en pacientes de síndrome de Werner (Agrelo, 2010).

### Lámina Nuclear, LMNA y su implicancia en el Síndrome de Werner Atípico

La matriz nuclear es una estructura compleja que proporciona el soporte físico para la replicación, procesamiento y transporte del ARN en eucariotas. Uno de los componentes de la matriz nuclear es la lámina nuclear, que es una red de fibras densas y finas que limita la superficie interna de la membrana nuclear interna y ayuda a sostener la envoltura nuclear (Dechat et al, 2011).

A pesar de que en el pasado se la consideraba una estructura rígida, se ha observado su amplio dinamismo y su participación en funciones como la localización de dominios

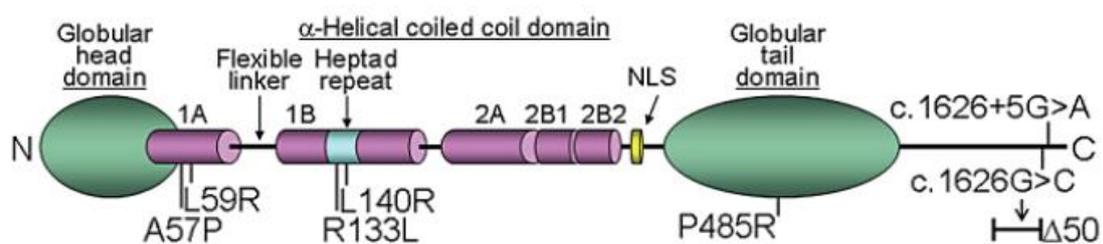


Fig. 2- Esquema de LMNA con las mutaciones descritas en el síndrome de Werner atípico. Imagen de Oshima & Hisama, 2014

cromosómicos, organización de la cromatina y la regulación de la expresión génica (Agrelo et al. 2006).

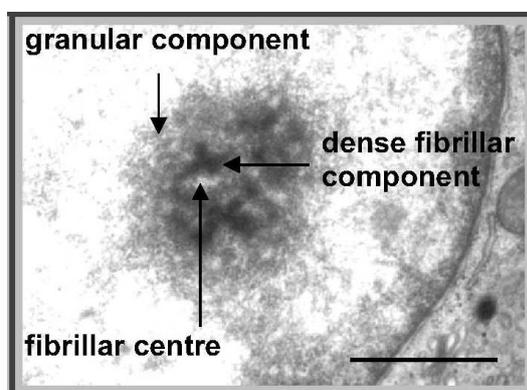
La lámina nuclear está compuesta por proteínas de filamentos intermedios tipo V llamadas laminas. Las laminas se dividen en tipo A y tipo B. La lamina tipo A es codificada por el gen LMNA, que mediante splicing alternativo traduce ambas isoformas A y C. (Martin et al, 2009).

Se observó que la Lamina B contribuye a la plasticidad funcional de un importante compartimento nuclear, el nucléolo y que su expresión reducida se correlaciona con una disminución gradual en la transcripción por ARN polimerasa II (Martin et al, 2009). También se conoce que la Lamina A/C está presente en el nucléolo (Martin et al, 2009).

Se han descrito diversas mutaciones en LMNA en pacientes con diferentes síndromes de envejecimiento prematuro, como Hutchinson-Gilford, Displasia mandibuloacral, Síndrome Malouf y Síndrome de Werner que es de nuestro interés. También se observan patologías clínicas que incluyen síntomas progeroides, como una apariencia facial especial, Atrofia epidérmica, lipodistrofia y varias deficiencias metabólicas (Guo et al, 2014).

El gen de la Lamina A/C, que codifica para componentes centrales de la lámina Nuclear sufre silenciamiento transcripcional por hipermetilación de islas CpG en el promotor tanto en leucemias como linfomas (Agrelo et al. 2005). Por lo tanto LMNA es un excelente blanco para el uso de drogas desmetilasas (por ejemplo 5-azacytidine) para desmetilar y reactivar el mismo en cánceres hematológicos (Agrelo et al. 2005).

### El Nucléolo y su relación con WRN y LMNA



**Fig. 3-** Esquema de la distribución de las regiones del nucléolo. Se observa el componente granular, centro fibrilar y componente fibrilar denso.

El nucléolo es una estructura intranuclear donde ocurre la transcripción y procesamiento de ARNr y el ensamblaje de los ribosomas. En este sitio se transcriben las subunidades 18S de la subunidad menor del ribosoma (40S) y las subunidades 5.8S y 28S de la subunidad mayor (60S) por la ARNpol I.

Tiene tres regiones definidas por su diferente apariencia al visualizarlo con microscopía electrónica: los centros fibrilares, los componentes fibrilares densos y el componente granular (Pederson, 2011). En la región fibrilar densa se encuentran pre-ARNr que siguen asociados a su cadena molde de ADN y pueden estar asociados a proteínas o pequeños ARN nucleolares; mientras que en la zona granular se encuentran los complejos ribosomales más maduros (Olson, 2010). Los centros fibrilares son la interfase entre las zonas antes mencionadas (Olson, 2010).

El nucléolo puede tener una estructura reticular, compacta o con forma de anillo de acuerdo a la distribución de la ribonucleoproteína (Olson, 2010). Las células HeLa tienen un nucléolo compacto, que se caracteriza porque los gránulos del componente granular están altamente compactados y no formando una red como en el nucléolo reticular (Olson, 2011).

Estudios de la actividad de la ARNpol I demostraron que las cadenas nacientes se encuentran en el componente fibrilar denso y su interfase con el centro fibrilar, y que son liberadas hacia el componente fibrilar denso, para posteriormente madurar en el componente granular (Hozak et al, 1994). Por lo tanto, la factoría transcripcional estaría compuesta por cada centro fibrilar asociado con numerosas unidades de transcripción y polimerasas y su componente fibrilar denso asociado.

Como se mencionó anteriormente, WRN tiene una localización principalmente nucleolar en células normales (Suzuki, et al, 2001). También se sabe que, con respecto a la lámina nuclear, tanto las laminas tipo B como tipo A/C tiene un importante papel en la formación y mantenimiento del nucléolo (Martin et al, 2009).

### **Transfección con shARN como herramienta para el estudio de las posibles interacciones entre LMNA y WRN**

La introducción experimental de ARN a células puede usarse en determinados sistemas biológicos para interferir con la función de un gen endógeno (Fire et al, 1998). Para silenciar el gen de interés, se introduce tanto ARNsi como ARNsh que tienen como blanco el ARNm del gen, y pueden entrar en la vía de los ARNi directamente una vez que ingresaron al citoplasma (como en el caso del ARNsi), o pueden ingresar a la célula para expresarse y ser procesados para formar ARNsi, que luego pueden ingresar a la vía de RISC (en el caso del ARNsh) (Barbosa et al, 2014).

Los ARNsh (short hairpinARN, ARN cortos tipo horquilla) son utilizados frecuentemente para silenciar determinado gen de una célula. Se pueden ingresar a la célula mediante vectores plasmídicos, transcritos por promotores para ARN Pol III o promotores de Pol II modificados, o incluso dentro de vectores de producción viral (Moore, Guthrie et al. 2010).

Los ARNsh son capaces de integrarse al ADN y consisten de dos secuencias complementarias de 19 a 22 nucleótidos de ARN unidos por un loop corto de entre 4-11 nucleótidos (Moore et al. 2010). Después de la transcripción, la secuencia de ARNsh se exporta al citosol, donde es reconocido por la enzima endógena Dicer, que procesa el ARNsh a duplas de ARNsi (Moore et al. 2010). Estos ARNsi se unen al ARNm blanco y se incorpora al complejo RISC para la degradación de ARNm específico de secuencia (Moore et al. 2010).

La principal ventaja de los ARNsh contra los ARNsi es que los primeros, al incorporarse al ADN, generan una transfección estable, y la concentración de transcripto no disminuye a medida que la célula prolifera, como sí ocurre con la concentración de ARNsi, que se va diluyendo a medida que la célula se va dividiendo. A su vez, los ARNsi, si se encuentran en muy altas concentraciones pueden generar efectos inespecíficos (off-target effects). Sin embargo, la creación de una línea celular estable con un ARNsh es una tarea larga, ya que debe obtenerse el ARNsh clonado en un vector de interés, y las células deben ser seleccionadas contra un antibiótico cuya resistencia este incluida en el plásmido (Moore et al. 2010).

Esta técnica se utilizó en la línea celular HeLa, que deriva de una muestra de cáncer de cérvix tomada en 1951 de una paciente llamada Henrietta Lacks. Esta línea celular tiene la particularidad de tener un alto índice de proliferación, lo que la vuelve un muy buen modelo en el estudio del cáncer.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

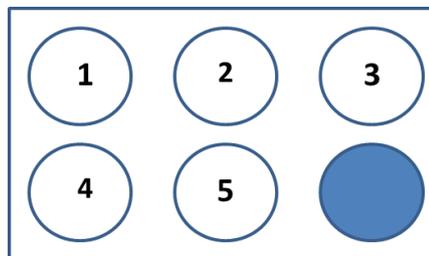
### Línea celular

Se trabajó con una línea celular de HeLa que fueron cultivadas en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina y 1% de solución de penicilina-estreptomicina.

### Generación del protocolo de sincronización de células HeLa en fase S

Se realizó un experimento de puesta a punto de la técnica de sincronización de células HeLa en fase S. Para esto se realizaron dos pulsos combinando DMEM/Afidilcolina (Aph) (0,1µg/mL) y DMEM/Timidina (Thy) (2mM) a las células plaqueadas en un 30% de confluencia.

1. Aph + Aph
2. Aph + Thy
3. Thy + Aph
4. Thy+ Thy
5. Control



Después de un primer pulso se las dejó incubando por 17 horas a 37°C. Seguidamente, se las dejó por 8 horas a 37°C con DMEM normal. Se prosiguió con un segundo pulso y dejándolas 16 horas a 37°C para arrearlas en fase G1/S. Finalmente, se dejó a las células incubando a 37°C por 1:30 horas para que entraran en fase S y se prosiguió a colectar las mismas mediante tripsinización.

Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1 mL de buffer fosfato salino (PBS). Luego se volvieron a centrifugar y el pellet se resuspendió en 50 µL de PBS. A la suspensión se le agregó 1 mL de alcohol etílico (EtOH) 70% a -20°C vortexeando y se las dejó a -20° C por 13 días.

Las células fueron centrifugadas en una microcentrifuga a 4°C a 10000 rpm por 1 minuto. Se les retiró el sobrenadante y se agregó sin resuspender 1 mL de PBS, y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones anteriores.

Se les retiró el sobrenadante y se las resuspendió en 200 µL de PBS y se agregaron 30 µL ARNasa A en una concentración final de 10 mg/mL. Se las dejó en baño a 37°C por 25

minutos. Finalizado este tiempo se centrifugaron en las condiciones detalladas anteriormente. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 300  $\mu$ L de solución de ioduro de Propidio (PI) y se las dejó reposar a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) por 30 minutos.

El contenido de ADN fue medido en el citómetro de flujo CyAn (BeckmanCoulter) del Institut Pasteur, Montevideo y los datos fueron procesados con el software FCS 4 Express de De Novo Software.

### Midiprep

Para el silenciamiento de LMNA se utilizaron los siguientes vectores:

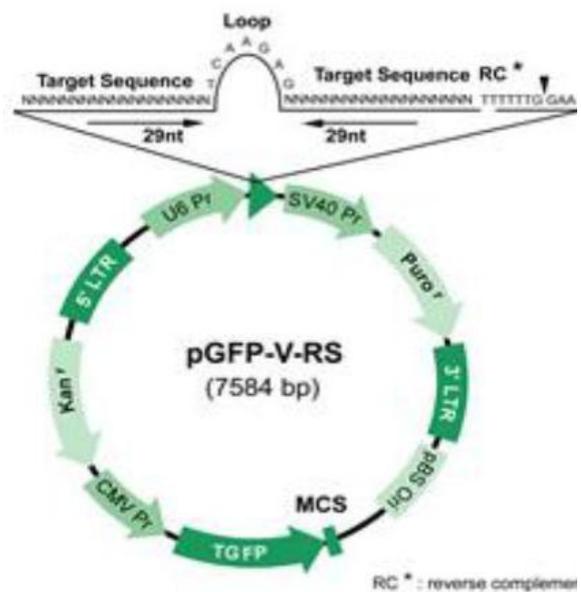
- shARN TR30013 no efectivo como control negativo
- shARN GI314035 (GACGAGTACCAGGAGCTTCTGGACATCAA)
- shARN GI314036 (CATGAGGACCAGGTGGAGCAGTATAAGAA) ,

Todos fueron construidos en el plásmido PGFP-V-RS (Fig. 4). Este plásmido contiene resistencia a Puomicina y Kanamicina, y GFP como gen reportero. Los vectores construidos en los plásmidos fueron obtenidos de forma comercial.

Para la amplificación de los vectores, se incorporó el plásmido por electroporación en bacterias electrocompetentes, para posteriormente plaquear las mismas en placas de petri con ágar LB con kanamicina y seleccionar de esta forma aquellas bacterias que hubiesen incorporado el plásmido.

Las colonias que crecieron en la placa fueron luego puestas a crecer en suspensión.

El ADN de estas bacterias fue purificado mediante el sistema de Pure Yield. En primer lugar, el pellet de células fue lisado con la solución de lisado para luego neutralizarlas con la solución de neutralización. El preparado fue centrifugado y el sobrenadante se pasó por una



**Fig. 4-** Vector pGFP-V-RS. En este vector fueron clonados los shARN, contiene resistencia a Puomicina y Kanamicina, y GFP como gen reportero.

columna de limpieza y unión de ADN. A continuación se lavó la columna de unión con una solución de Endotoxina de remoción y lavado. El ADN fue eluido mediante el sistema de elución a vacío utilizando agua libre de nucleasas.

### **Generación de línea celular**

Se realizó un pasaje de las células HeLa el día anterior y se las dejó creciendo en medio normal *overnight*. Se realizó una transfección directa en las células HeLa a un 50% de confluencia usando los plásmidos amplificados anteriormente.

Para la transfección se utilizó el kit de effectenetransfectionreagent de Qiagen. La efectina es una sustancia lipídica no liposomal diseñada para alcanzar altas eficiencias de transfección. Se usa en conjunto con el Enhancer y el Buffer EC. En el primer paso, el ADN se condensa por la interacción con el Enhancer en el buffer EC, y luego se le agrega la efectina para formar los complejos Efectina-ADN condensado. Estos complejos se mezclan con el medio y son incorporados a las células.

En primer lugar se mezclaron en un eppendorf 4 $\mu$ L del ADN correspondiente con 96 $\mu$ L de Buffer EC. Se agregó 3,2 $\mu$ L de Enhancer (1 mg/mL), se vortexeó y se incubó 4 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 10 $\mu$ L de Effectene (1 mg/mL), se vortexeó y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó 600 $\mu$ L de medio a la preparación. Por cada vector se realizó un duplicado de la preparación.

Las células HeLa fueron lavadas con PBS y se les agregó 1600 $\mu$ L de medio. A continuación se les agregó la mezcla de ADN por goteo, se homogenizó y se las dejó incubando por 24 horas.

Pasadas las 24 horas se procedió a un pasaje celular 1/3, por lo que se obtuvo 3 pocillos de células por cada duplicado de los vectores, con un total de 3 placas de 6 pocillos.

Después de 24 horas se procedió a seleccionar las células transfectadas con puromicina, cambiando el medio con puromicina cada 5-6 días. Se realizaron 4 pulsos de selección.

Las células fueron pasadas a placas de 100mm a los 25 días de realizada la transfección. Este pasaje se realizó por tripsinación de las células y pasaje directo a las placas de 100mm en un medio normal DMEM sin puromicina.

A los 4 días de este pasaje se procedió a congelar algunas de las placas (4 con el vector 35, 3 de ellas perteneciendo a la misma transfección, y 3 del vector 36, dos de ellas perteneciendo a la misma transfección). Se tripsinaron por 5 minutos a 37°C, se centrifugaron en medio normal por 5 minutos a 900 rpm y se resuspendieron en 3 mL de Medio de Congelamiento (90% FCS 10% DMSO). Se repartieron en 3 criotubos que fueron llevados a -80°C permitiendo su enfriamiento de forma gradual.

A los 7 días del pasaje se congeló una placa del vector 35, y a los 15 días dos placas del vector 13 y una del vector 36, mediante el mismo procedimiento detallado anteriormente.

Para descongelar y usar las células de las líneas para los experimentos, se prosiguió descongelando los criotubos en el baño a 37°C. Se pasaron las células a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue aspirado y se centrifugaron nuevamente con 1 mL de PBS sin resuspender. Finalmente, el pellet de células fue resuspendido en medio normal DMEM y plaqueado en placas de 100 mm.

### **Sincronización en fase S**

Las células fueron sincronizadas en fase S mediante un doble de pulso de Aph. La Aph es un tetraciclicoditerpenoide producida por el hongo *Cephalosporium aphidicola* que inhibe selectivamente a la ADN polimerasa  $\alpha$ , que es esencial para la síntesis de ADN durante la replicación. De esta forma se afecta la replicación pero no la reparación o la replicación mitocondrial. La Aph bloquea el ciclo celular en la transición de la fase G1 a S.

A partir de una placa con células en un 30% de confluencia, se realizó un primer pulso de Aph 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se las dejó a 37°C por 17 horas, pasado este tiempo se las dejó creciendo en DMEM normal por 8 horas. Se les dio un segundo pulso de Aph, al cambiarles el medio por DMEM/Aph 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se las dejó por 16 horas. Pasado este tiempo, se las volvió a dejar en DMEM normal para que entren a fase S. El tiempo en que se las dejó incubando en este último paso dependió del experimento posterior.

### **Inmunofluorescencia**

Se realizaron inmunotinciones previas a la transfección en células HeLa no sincronizadas, y en células control y LMNA -/- posterior a la transfección, tanto sincronizadas como no sincronizadas.

Las células HeLa fueron tripsinizadas, colectadas y plaqueadas en placas de pocillos de 35 mm. Después de un período de entre dos y tres días fueron lavadas con PBS 1x y fijadas con Paraformaldehído (PAF) al 4% (m/V) en PBS 1x por 12 minutos. Se lavaron con PBST (0,1% tween/PBS 1x) y se dejaron 5 minutos de pre-extracción en buffer citrato. Las células fueron bloqueadas con buffer de bloqueo (1% (m/V) de albumina de suero bovino (BSA) en PBST) e incubadas *overnight* con anticuerpo primario y 10 U/mL de ADNasa 1 a 4°C.

Al día siguiente se lavaron dos veces con buffer de bloqueo por 5 minutos y 1 vez con PBST. Seguidamente se incubaron las células en cámaras húmedas con anticuerpo secundario a temperatura ambiente por 1 hora. Se lavó dos veces con buffer de bloqueo por 5 min y una vez con PBST. Se utilizó vectashield como medio de montaje con DAPI. Las muestras fueron analizadas con Microscopio de Epifluorescencia Invertido Olympus IX 81 y Microscopio Confocal Leica Modelo DMI6000 TCS-SP5.

### **Extracción de Proteínas**

Para la extracción de proteínas de las células, se tripsinizó una placa de 100 mm confluyente. Las células fueron lavadas con PBS mediante centrifugación. Los pellet fueron resuspendidos en 500 µL de RIPA buffer con 1 tableta de inhibidor completo de proteasas "Complete mini EDTA free" de Roche LifeScience cada 10 mL, y se centrifugó por 25 minutos a 10000 rpm a 4°C. El sobrenadante se conservó a -20°C.

Para calcular la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford y las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro de nanodrop. Para la curva de calibración con BSA se midieron 10 µL de cada concentración con 300 µL de reactivo de Bradford. El método de Bradford se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 a las proteínas. Las proteínas se unen a la forma azul del colorante para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

### **Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN, se utilizó una placa de 100 mm confluyente de cada línea (Control y LMNA -/-). Las células fueron tripsinizadas y colectadas en tubos Falcon de 15 mL. Se centrifugaron por 5 minutos a 1000 rpm, y el pellet fue resuspendido en 1 mL de PBS. La suspensión fue transferida a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y centrifugada a 1000 rpm por 5

minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 30 µL de Buffer TE pH 8 y se le agregó 470µL del mismo buffer. Se agregaron 500 µL de Fenol Cloroformo Isomil Alcohol y se agitó. Posteriormente, fue centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, y se conservó el sobrenadante. Al mismo se le incorporó 300 µL de Isopropanol, 50 µL de Acetato de Sodio (AcNa) 3,0 M y 1 µL de glucógeno. Luego se centrifugó por 30 minutos a 13000 rpm a 4°C y el pellet fue deshidratado con EtOH 70% por centrifugación y resuspendido en buffer TE pH 8 y guardado a -20°C.

### **Extracción de ARN**

Para la extracción de ARN, se utilizó una placa de 100mm confluyente de cada línea (Control y LMNA -/-). Las células fueron tripsinizadas y colectadas en tubos Falcon de 15 mL. Se centrifugaron por 5 minutos a 1000 rpm, y el pellet fue resuspendido en 1 mL de PBS. La suspensión fue transferida a tubos Eppendorf de 1,5 mL y centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se le agregó 1 mL de Trizol de Sigma, se vortexeó y se dejó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 200µL de cloroformo, se volvió a vortexear y se centrifugó por 3 minutos a 20238 rpm a 4°C. Después de esta centrifugación se observaron 3 fases, de las cuales se prosiguió con la superior, en la cual se encuentra el ARN. A la misma, se le agregó 500 µL de isopropanol, se vortexeó y se dejó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por 10 minutos a 20238 rpm a 4°C. El pellet fue deshidratado con EtOH 70% y resuspendido en 40 µL de agua DEPC, y guardado a -80°C.

### **Western Blotting**

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida 10% (Rango 20-300 kDa) o 7% (rango 50-500 kDa), con un gel de concentración de 3,9%. Estos geles se prepararon en el sistema de Biorad.

Se utilizaron vidrios de 1,5 mm y se colocó en gel de separación hasta 1 cm antes de donde llegaría el peine. Se lo dejó polimerizar por 1 hora utilizando Isopropanol para que el borde superior del gel polimerice de forma uniforme.

Cuando el gel polimerizó, se extrajo la capa de isopropanol del gel se separación y se virtió el gel de concentración hasta el tope del molde. Posteriormente se colocó el peine de 10 pocillos y se lo dejó polimerizar por 1 hora.

Se prepararon 30 $\mu$ g de proteína con buffer de corrida 1x, y fueron calentadas por 5 minutos a 95°C previo al sembrado.

La corridas se realizaron utilizando el sistema BioRad, con buffer de corrida 5% Tris-glicina diluido 1/5. Se corrieron con  $V_{cte}=100$  V, cuidando que la corriente se mantuviese en el rango 0,02-0,03 A.

Posterior a la corrida, se prosiguió con una electro-transferencia en sistema semi-seco. Para el mismo se utilizó Buffer de Transferencia/ 20% Metanol. La membrana de nitrocelulosa fue inactivada con metanol por 1 minuto y luego se la dejó en agua destilada por 3 minutos. Pasado este tiempo se mantuvo en buffer de transferencia. Los papeles Whatman y el gel se sumergieron en buffer de transferencia por 5 minutos.

Se montó el dispositivo, colocando 3 papeles whatman, seguidos de la membrana de nitrocelulosa, por encima se colocó el gel de poliacrilamida finalizando con 3 papeles whatman. La transferencia se realizó con  $A_{cte}= 0,3$  A, cuidando que el voltaje se mantenga entre 6-8 V por aproximadamente 1 hora.

Al finalizar la transferencia se verificó la eficiencia de la misma utilizando la técnica de Rojo Ponceau. Para esto se trata la membrana por 15 segundos con metanol y después con 15 minutos con Rojo Ponceau.

La membrana se lavó tres veces con PBST por 5 minutos cada lavado, y se bloqueó con 0,5% leche en polvo descremada en PBST por 30 minutos. Posterior al bloqueo se la incubó con el anticuerpo primario respectivo *overnight* a 4°C.

Al día siguiente se lavó la membrana tres veces con PBST por 5 minutos, y se incubó por 1 hora con el anticuerpo secundario respectivo conjugado a peroxidasa de rábano, diluido en solución de bloqueo a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBST y se incubó con la solución de revelador ECL plus Western Blotting Detection Reagent de Amersham Biosciences por 5 minutos.

La exposición se realizó en la película fotográfica Amersham Hyperfilm ECL con tiempos variados y el revelado fue realizado de forma manual.

### **Microscopía Electrónica**

Las células fueron levantadas de las placas con fijador PAF al 4% y 2,5% de Glutaraldehído. Las muestras se procesaron siguiendo el protocolo de rutina por el grupo de Microscopía Electrónica de Transmisión de Facultad de Ciencias, UdelaR.

Las muestras procesadas se observaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo JEM1010, operando a 100 kv. Las imágenes fueron capturadas con una cámara HAMAMATSU C4742-95.

### **Cariotipos**

A una placa de 100 mm de células HeLa a un 30% confluencia con 10 mL de medio de cultivo, se las trató con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BrdU por 48 horas. Después de pasado este tiempo, se las lavó con PBS y se incubaron por 40 minutos con 100  $\mu\text{L}$  de Karyomax (Colchicina). Finalmente se tripzinizaron y se centrifugaron para extraer el medio de cultivo. Las células fueron resuspendidas en 7,5 g/L de KCl 1 M precalentado a 37°C y se incubaron en baño a la misma temperatura por 20 minutos.

Pasado este tiempo, las células fueron centrifugadas para eliminar el KCl 1 M, y se fijaron con 10 mL de Fijador de Carnoy. Se incubaron en el fijador por 30 minutos y fueron centrifugadas y se eliminó el fijador sobrenadante. Este procedimiento se repitió 3 veces más pero con incubaciones de 10 minutos cada una. Finalmente, las células fueron resuspendidas en un volumen pequeño de fijador fresco y conservadas a 4°C.

Los cariotipos se realizaron esparciendo una gota de 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión anterior en un portaobjetos, y dejándola secar. Posteriormente, se pasó el portaobjetos por encima de vapores de agua a ebullición para producir la ruptura de la membrana celular. Los cromosomas se tiñeron con DAPI o con Naranja de Acridina. Para la tinción con DAPI, se utilizó Vectashield + DAPI como medio de montaje y se selló un cubreobjetos con esmalte. Para teñir con naranja de Acridina, se dejaron los portaobjetos correspondientes incubando con 0,1 mg/mL de naranja de acridina por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se los

enjuagó con agua corriente y se los incubó 1 minuto en Sorensen Buffer. Se montaron con Medio Vectashield sin DAPI y se selló un cubreobjetos con esmalte.

Las imágenes de los cariotipos se observaron en microscopía de Epifluorescencia. A partir de los cariotipos teñidos con DAPI se contabilizaron aberraciones cromosómicas (dentro de las cuales se incluyeron rupturas cromosómicas, fragmentos acéntricos, intercambios cromosómicos (dicéntricos y anillos), intercambios de cromátidas (estructuras trirradiales y tetraradiales) y rupturas de cromátidas).

A partir de los cariotipos teñidos con naranja de Acridina se contabilizaron Intercambios entre cromátidas hermanas.

### **Análisis Estadísticos**

Para los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad. Se realizó la prueba de T de student para corroborar si la media de los datos obtenidos entre dos muestras tienen una diferencia significativa. Para esto último se calculó el valor P, estableciéndose 95% como el intervalo de confianza.

### **Anticuerpos utilizados**

Para las inmunotinciones, se utilizaron como anticuerpos primarios: Lamin A/C H110 rabbit policlonal de Santa Cruz (1/50), WRN H-300 rabbit policlonal de Santa Cruz (1/200), Fibrilarina B-1 mouse monoclonal de Santa Cruz (1/100), Nucleolina C-23 mouse monoclonal de Santa Cruz (1/100), WRN D-6 mouse monoclonal de Santa Cruz (1/100), Lamin A/C mouse ab4789 de AbCam (1/200). Como anticuerpos secundarios se utilizó Alexa 568 anti-rabbit de Invitrogen (1/500), Alexa 568 anti-mouse de invitrogen (1/500), Alexa 546 anti-rabbit de invitrogen (1/500), Alexa 647 anti-mouse de invitrogen (1/500), Alexa 488 anti-rabbit de Invitrogen (1/500) y Alexa 488 anti-mouse de Invitrogen (1/500).

Para western blot se utilizaron como anticuerpos primarios: Lamin A/C mouse ab4789 de AbCam (1/500), WRN H-300 rabbit policlonal de Santa Cruz (1/500), Beta- Actina Rabbit ab 8227 (1/1000) y como anticuerpos secundarios Horseradish Peroxidase Goat anti mouse (1/5000) y Horseradish peroxidase Donkey anti Rabbit de GE Healthcare (1/5000).

## RESULTADOS

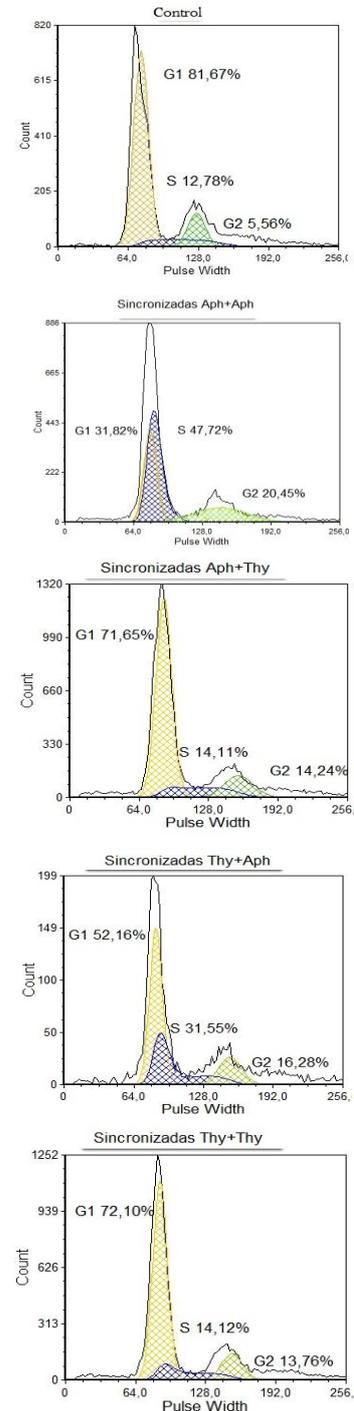
### Sincronización celular

A partir de las muestras con los diferentes pulsos de Aph y Thy, se obtuvieron las gráficas mostradas en la figura 5. Para cada gráfica se contabilizaron 10000 eventos. Se observa que el mayor porcentaje de sincronización se obtuvo con el doble pulso de Aph, aumentando el porcentaje de células en fase S en la línea control de 12,78% a 47,72% en las células tratadas con esta droga. A su vez, las células en fase G1 disminuyen de 81,67% a 31,82%. A partir de este experimento, se elaboró un protocolo de sincronización para las células HeLa que se utilizó durante todo el trabajo.

### Inmunotinciones previas a transfección

Para estudiar la localización subcelular de las proteínas que se van a estudiar (LMNA y WRN), y su relación con otras proteínas nucleares específicas de la región fibrilar y granular del nucléolo, se realizaron inmunotinciones previas a la transfección, en la línea celular HeLa asincrónicas, buscando si existía un patrón de localización relacionado entre las mismas.

En primer lugar se observaron las imágenes con microscopía de epifluorescencia (Fig. 6) para luego visualizar las mismas con microscopía confocal tomando imágenes a diferentes alturas del plano y observando la localización de las proteínas en diferentes planos de la célula. Posteriormente se seleccionaron planos medios de la célula donde se considera que se observa de forma más representativa los patrones de localización de estas proteínas (Fig 7). En ambas figuras se



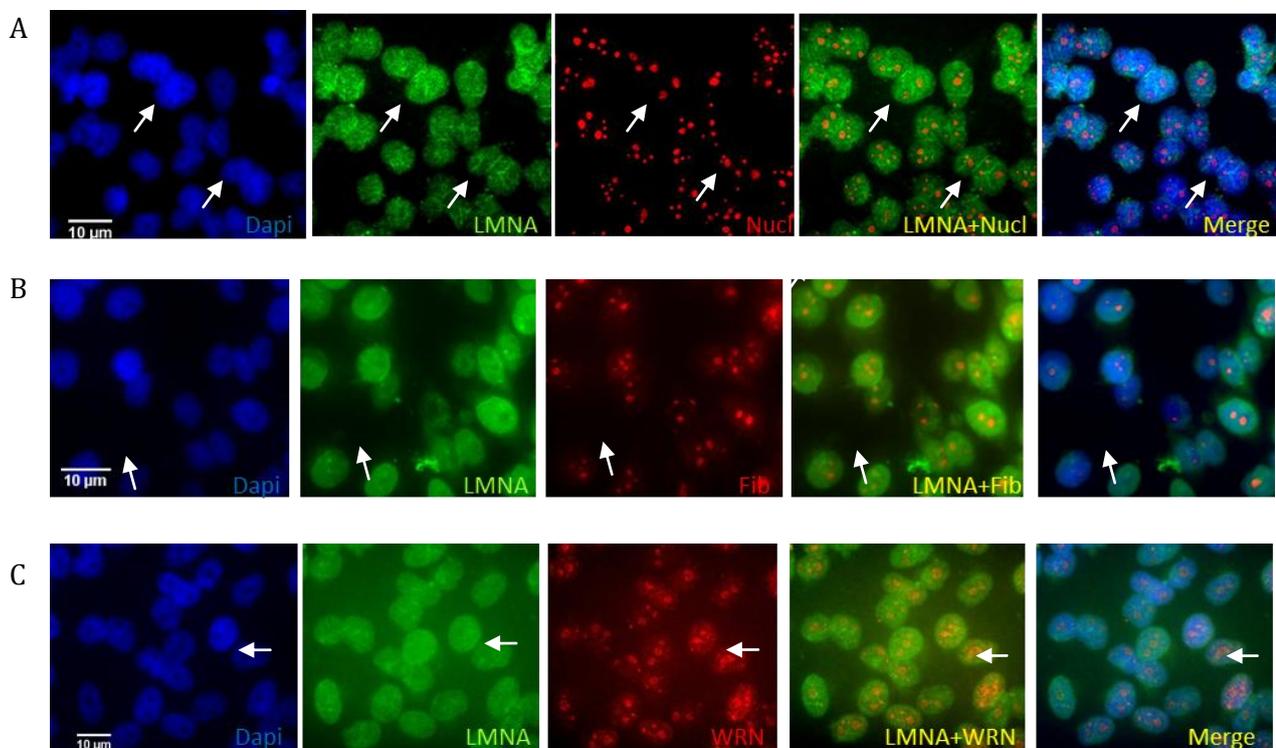
**Fig. 5-** Gráficos de sincronización en HeLa con diferentes pulsos de Aph y Thy. En naranja se observa G1, en azul la fase S y en verde G2.

señalizan con flechas blancas los patrones descritos en algunas células representativas.

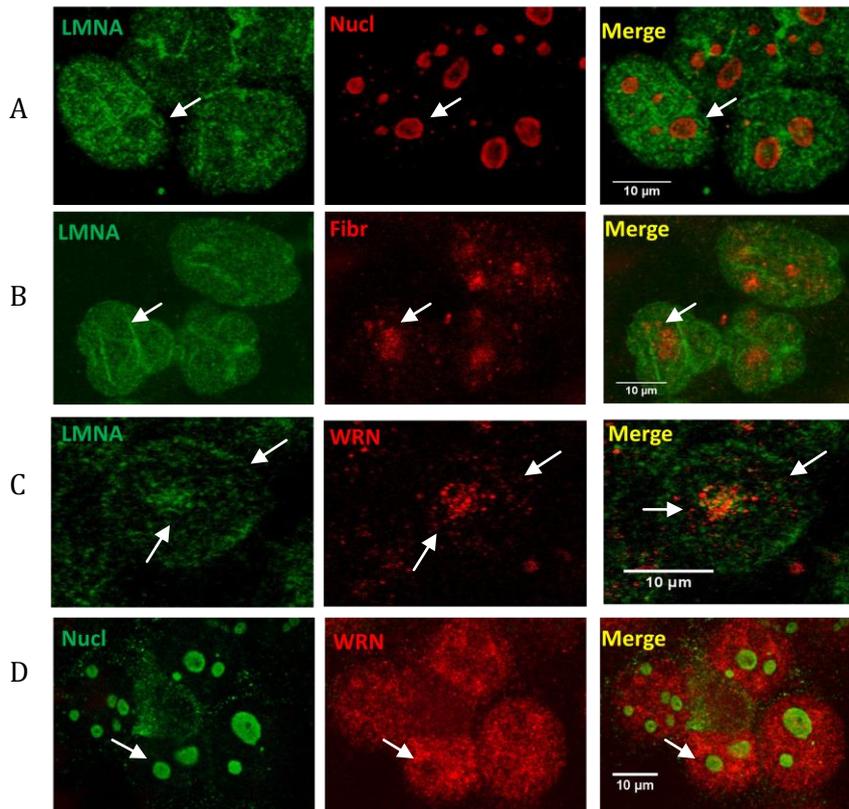
Al estudiar cómo se localiza LMNA en relación a nucleolina (Nucl) (Fig 6-A, 7-A), se observa que la primera se encuentra rodeando a esta última, formando arcos alrededor del nucléolo. La nucleolina tiene un patrón de localización con forma de anillo, altamente concentrada en los bordes, donde estaría la región granular del nucléolo.

Posteriormente, se estudió LMNA y fibrilarina (Fibr) (Fig 6-B, 7-B) y se vuelve a apreciar la formación de arcos de la LMNA rodeando lo que correspondería al nucléolo y atravesando el mismo. En este caso, la fibrilarina se encuentra localizada en acúmulos dentro del núcleo, que corresponderían al nucléolo y concentrada hacia el centro de los mismos.

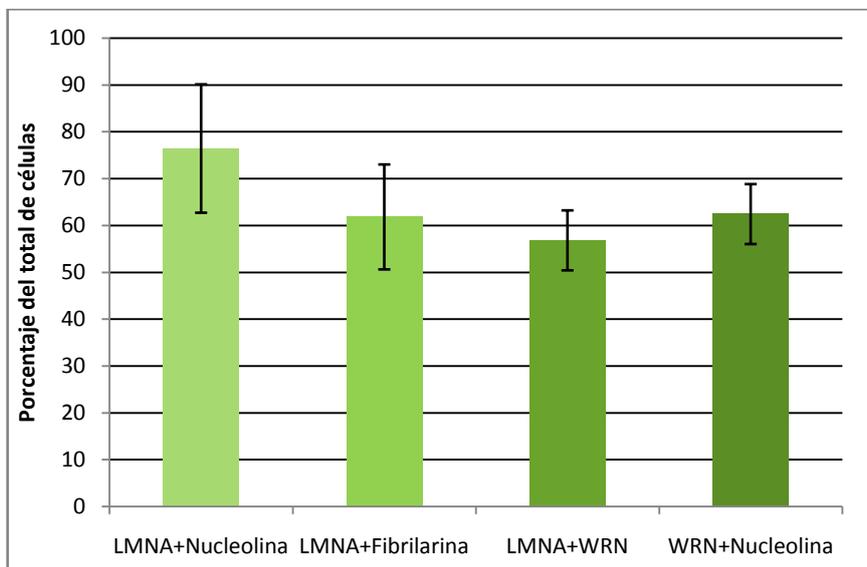
A su vez, se observó cómo localizan WRN y LMNA (Fig 6-C, 7-C), y se encontró que aunque ambas tienen una distribución nuclear, se encuentran acumulados de forma muy cercana en la región nucleolar y perinuclear. Debido a que anteriormente se observó que LMNA se encuentra acumulada en la región que rodea al nucléolo, estos puntos de localización de LMNA y WRN podrían estar en esta misma región.



**Fig. 6-** Inmunotinciones realizadas en células HeLa no sincronizadas. Se visualizó el patrón de localización de (A)- Lamina A/C (LMNA)+Nucleolina (Nucl); (b)- Lamina A/C (LMNA)+Fibrilarina (Fibr); (c)- Lamina A/C (LMNA)+Werner (WRN). Imágenes fueron obtenidas en microscopía de epifluorescencia. Con flechas se indican núcleos representativos de los patrones descritos en el texto.



**Fig. 7-** Inmunotinciones realizadas en HeLa control previo a transfección en células no sincronizadas. Se visualizó el patrón de localización de Lamina A/C (LMNA)+Nucleolina (Nucl); Lamina A/C (LMNA)+Fibrilarina (Fibr); Lamina A/C (LMNA)+Werner (WRN); Nucleolina (Nucl) + Werner (WRN). Con flechas se indican núcleos representativos de los patrones descritos en el texto. Las imágenes fueron obtenidas en microscopía confocal.



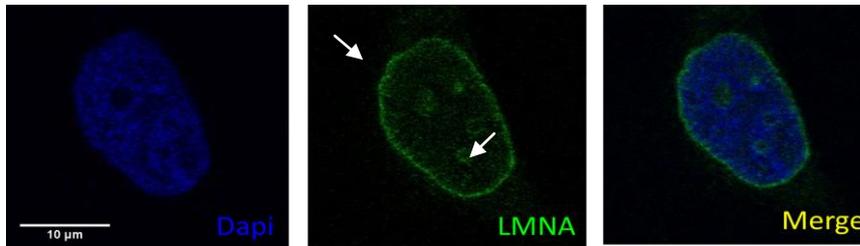
**Fig. 8-** Gráfica de los porcentajes de células a partir de inmunostinings. Se contaron las células en las que se observa el patrón de localización descrito y sus correspondientes desvíos estandar.

Para corroborar esto último, se realizó la tinción para visualizar cómo localizan WRN y Nucleolina (Fig 7-D). En este experimento, la distribución de WRN en el núcleo fue con patrón difuso, pero se observa que la misma se encuentra acumulada rodeando a la nucleolina.

A partir de todas las imágenes, se realizó un conteo total de 300 células por combinación de anticuerpos y se calculó el porcentaje de las mismas que presentaran el patrón descrito anteriormente, para cada combinación (Fig. 8) Para LMNA y nucleolina el porcentaje dio 76,4% con SD de 13,7% para LMNA y fibrilarina

61,8% con SD de 11,2%; para LMNA y WRN 56,8% con SD de 6,4% y para WRN y nucleolina 62,4% con SD de 6,4%.

Posteriormente, se decidió realizar una inmunotinción de Lamina A/C en células normales con DAPI, para visualizar como era su patrón de localización en relación a la estructura

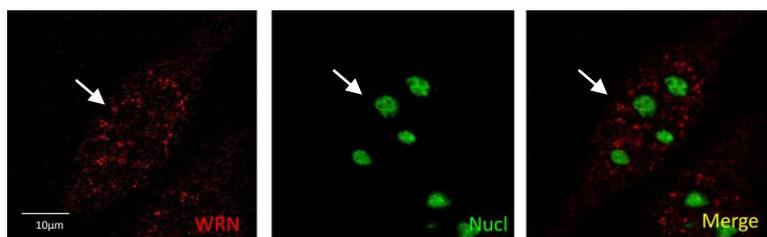


**Fig. 9-** Inmunotinción de LMNA A/C y Dapi. Imagen obtenida por microscopía confocal. La región perinuclear y las zonas de acumulación de LMNA que corresponderían a los nucléolos se señalan en flechas blancas.

nuclear. Se observó que la lámina se encuentra acumulada hacia la periferia nuclear (Fig. 9, flechas blancas), y que tiene puntos de

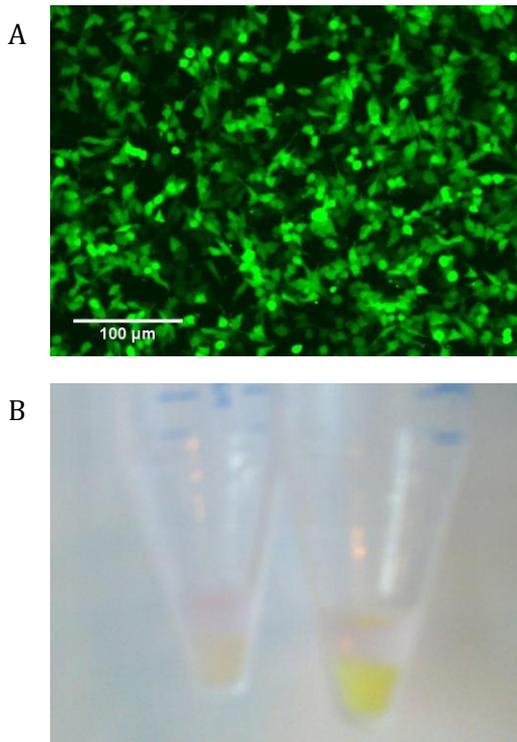
acumulación en las regiones que corresponderían a nucléolos (Fig. 9, señalados con flechas blancas). La diferencia del patrón observado de LMNA entre esta figura y las anteriores se debe a que por razones de combinación de anticuerpos, fue necesario utilizar diferentes anticuerpos para marcar la LMNA.

Finalmente, se realizó una inmunotinción de WRN y Nucleolina en células sincronizadas, para observar si el patrón de distribución de WRN en relación al nucléolo varía en comparación con las células no sincronizadas (Fig. 10). Se observó que en células sincronizadas en fase S, WRN tiene una distribución más localizada en puntos de acumulación en el núcleo y menos difusa. Estos puntos corresponderían a regiones que rodean el nucléolo y se señalan con flechas blancas.



**Fig. 10-** Inmunotinción de WRN y Nucleolina. Imagen en células sincronizadas obtenida con microscopía confocal. La flecha blanca indica regiones de acumulación de WRN.

## Silenciamiento de LMNA

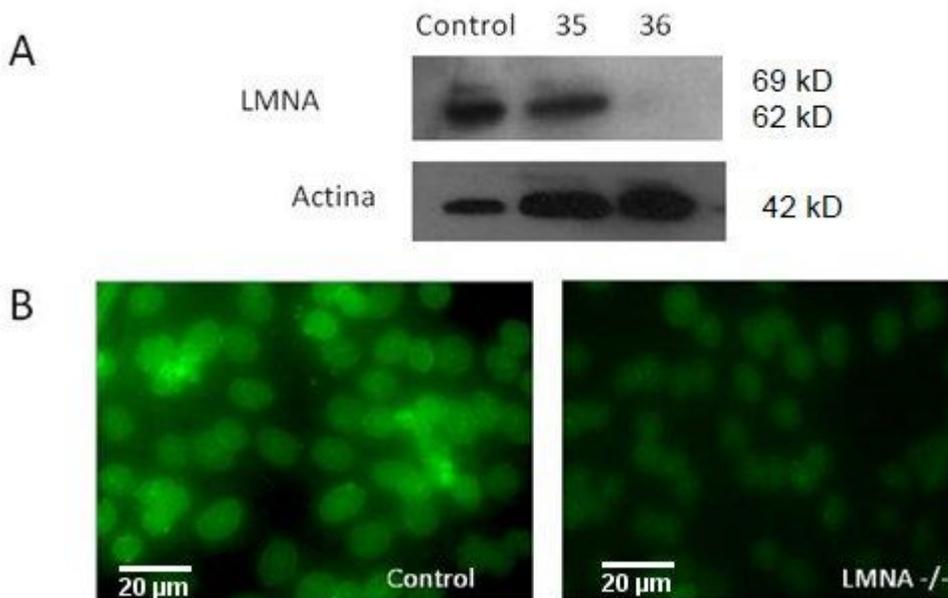


**Fig .11-** Imágenes de expresión de GFP en células transfectadas. **A-** Imagen in vivo de clon 36 de fluorescencia en FITC obtenida con microscopio de Epifluorescencia. **B-** Foto del pellet de células 13 (izquierda) y 36 (derecha).

Como se mencionó anteriormente, las células fueron transfectadas con ARNsh control (13), ARNsh GI314035 (35) y ARNsh GI314036 (36). Por microscopía de epifluorescencia se visualizó la expresión de GFP de las células 36. Se observó una alta intensidad de fluorescencia al excitar con FITC (Fig. 11-A). A su vez, se observa que al tripsinizar las células y centrifugarlas, el pellet tiene una coloración verdosa intensa, correspondiente a la alta expresión de la proteína fluorescente (Fig 11-B).

Para comprobar el silenciamiento de LMNA, se realizó un western blot anti LMNA (Fig. 12-A). En primer lugar, la banda correspondiente a Actina, que fue el control de carga utilizado, se ve con alta intensidad en los tres carriles, aunque se

observa que hay una mayor concentración de proteínas en el carril correspondiente a las



**Fig. 12-** Silenciamiento de LMNA **A-** Western Blot anti LMNA con actina como control de carga. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a células transfectadas con ARNsh control (13), ARNsh GI314035 (35) y ARNsh GI314036 (36). **B-** Inmunotinción anti lamina A/C para el control y la línea 36 (LMNA -/-). Imágenes tomadas con microscopio de Epifluorescencia con tiempo de exposición 300 ms.

células 35 y aún mayor en el 36 en comparación con el control. Se observó que para las células 13 y 35, aparecen dos bandas a la altura de 70kD, una más intensa y otra un poco más difusa, que corresponderían a las dos bandas de LMNA. En cambio, para las 36, estas bandas no aparecen.

También se realizó una inmunotinción anti LMNA en las células 13 (control) y 36 (Fig. 12-B), observándose una mayor intensidad de señal en las células control en todas las células.

A partir de los resultados obtenidos del silenciamiento LMNA, se decidió continuar trabajando con las células 13 (control) y 36 (LMNA-/-).

### Inmunotinciones post-transfección

En primer lugar, se estudió la localización nuclear de WRN en las dos líneas celulares (Fig 13). Se observó que para el control, WRN continúa teniendo una localización perinucleolar, ya que se observan puntos de acumulación rodeando el nucléolo. De todas

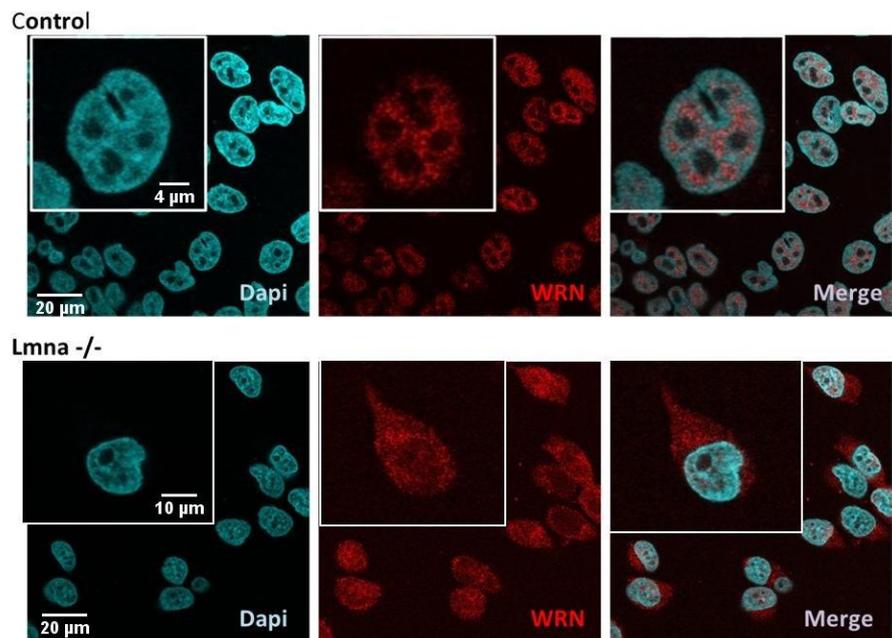
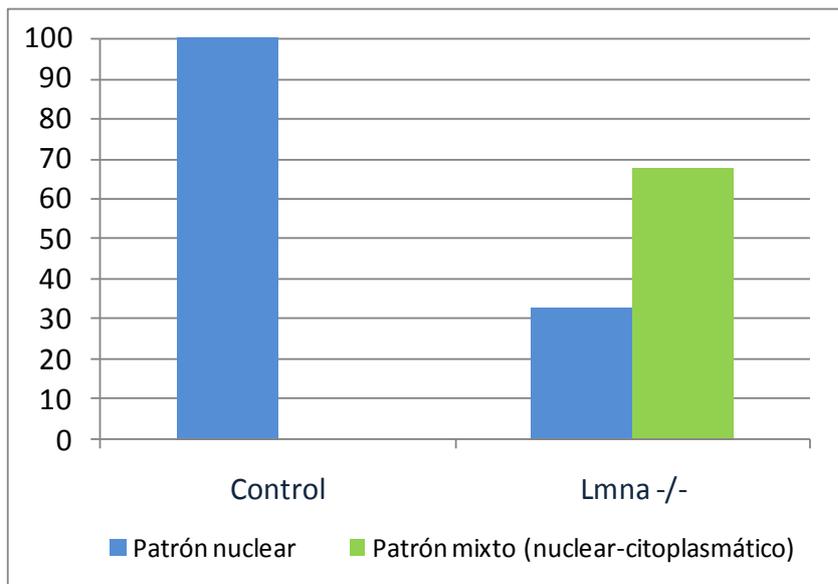


Fig. 13- Localización de WRN en HeLa control y LMNA -/-. Las imágenes en celeste corresponde a Dapi y en rojo a WRN. Imágenes obtenidas con microscopia confocal.

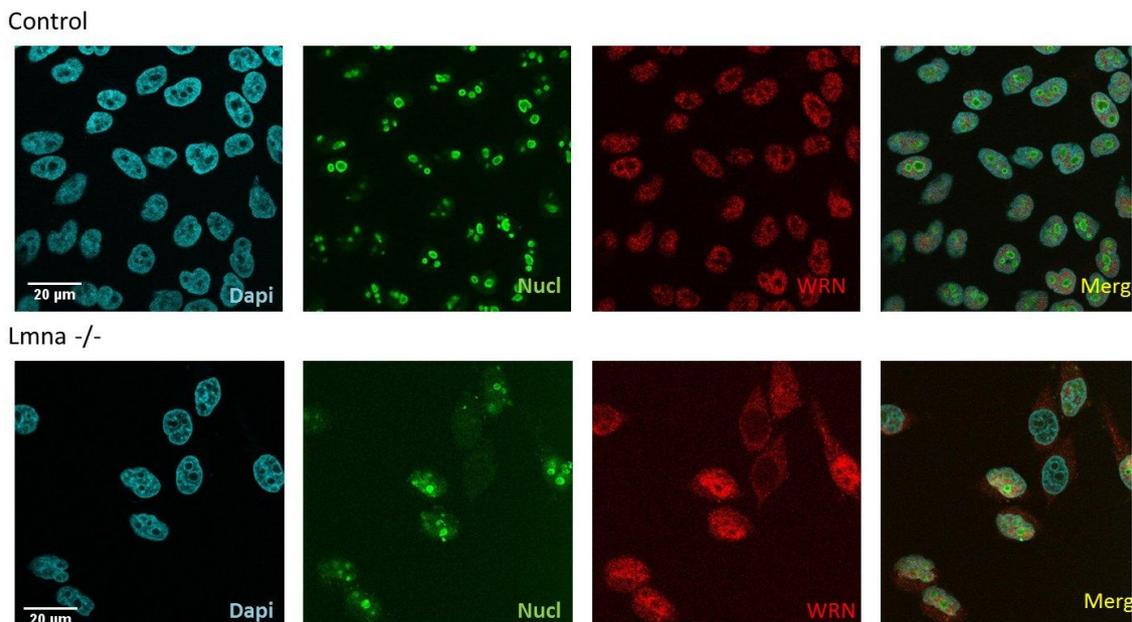
formas, se observa que se encuentra en todo el núcleo. En cambio, al estudiar las células LMNA -/-, se observa que el patrón de WRN cambia, ya no se observan estos puntos de acumulación, sino que se encuentra difuso en el núcleo, y en algunas células se observa también en el citoplasma. A su vez, se observa que el patrón de WRN en estas células varía de una célula a otra, en algunas llegándose a observar una leve marca del patrón de localización normal, y en otras una mayor concentración de WRN en el citoplasma que en el núcleo.



**Fig. 14-** Porcentaje de localización de WRN en HeLa control y HeLa LMNA  $-/-$ . Se contabilizaron 200 células y se clasificaron según tenían WRN nuclear (azul) o WRN nuclear y citoplasmático (verde). Las control tienen 100% distribución nuclear mientras que las silenciadas tienen 32,5% distribución únicamente nuclear y 67,5% localización tanto en núcleo como citoplasma.

Se realizó un conteo de 200 células en la línea control y la línea LMNA  $-/-$ , distinguiéndose entre las que tenían WRN localizado únicamente a nivel nuclear y WRN localizado a nivel nuclear y citoplasmático (Fig. 14). Se observa que en la línea control, el 100% de las células

contabilizadas presentaban WRN nuclear, mientras que en las carentes de lamina A/C, un 32,5% presentaban patrón nuclear mientras que las restantes presentaban una localización tanto a nivel nuclear como citoplasmático (67,5%).

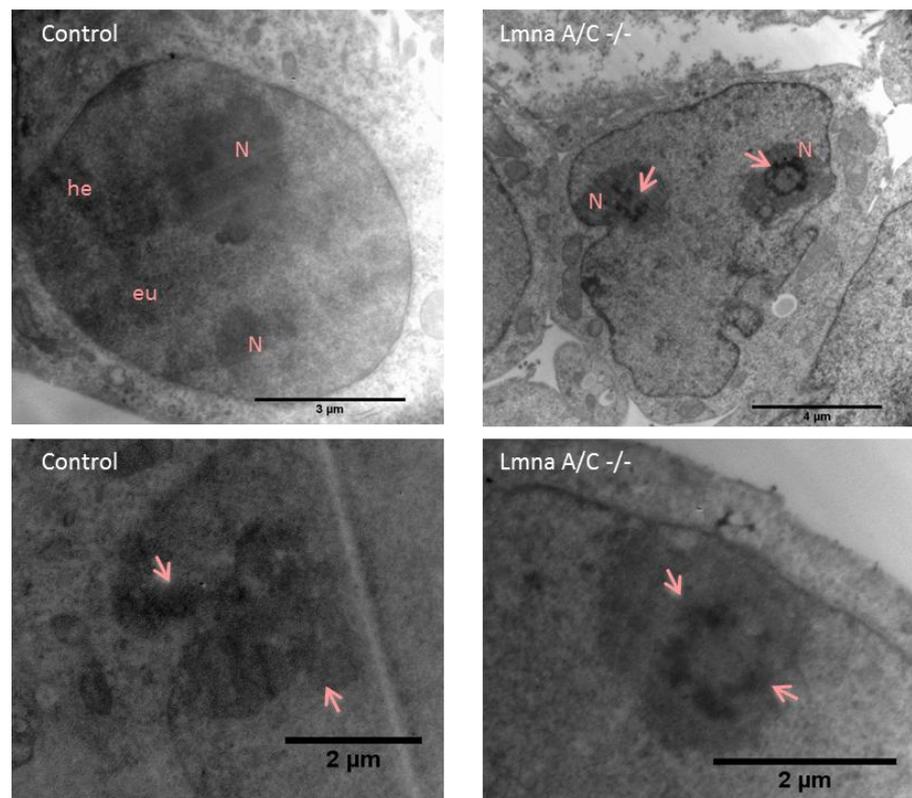


**Fig .15-** Inmunotinción de WRN y Nucleolina en células control y LMNA  $-/-$ . En celeste se observa el DAPI, en verde la nucleolina (Nucl), en rojo Werner (WRN) y el merge. Secciones ópticas de imágenes obtenidas por microscopía confocal

Para ver si esta deslocalización también estaba representada a nivel el nucléolo, se realizó una inmunotinción marcando la proteína nucleolina de la región granular del nucléolo. En el control se sigue observando que la nucleolina tiene un patrón con forma de anillo, muy marcado en varios sitios dentro del núcleo, que corresponderían con el nucléolo (Fig.15) En cambio, en las células LMNA  $-/-$ , el patrón de la nucleolina cambia ligeramente, ya no se observa tan marcada y específica su localización, sino que se observa que también esta difusa por el núcleo. A su vez, se pierde el patrón tipo anillo que se observaba en las células control. Incluso, hay algunas células en que no se observa acumulada en los sitios que corresponderían al nucléolo. En esta tinción también se utilizó anticuerpo anti-WRN y se volvió a observar el patrón descrito anteriormente y las diferencias entre el control y la LMNA  $-/-$ .

### Microscopía Electrónica

A partir de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica (Fig. 16), se observó que las células control tienen una estructura nuclear esperada, con la aparición de al menos un nucléolo por núcleo. Se pueden distinguir regiones de heterocromatina y eucromatina en las mismas.

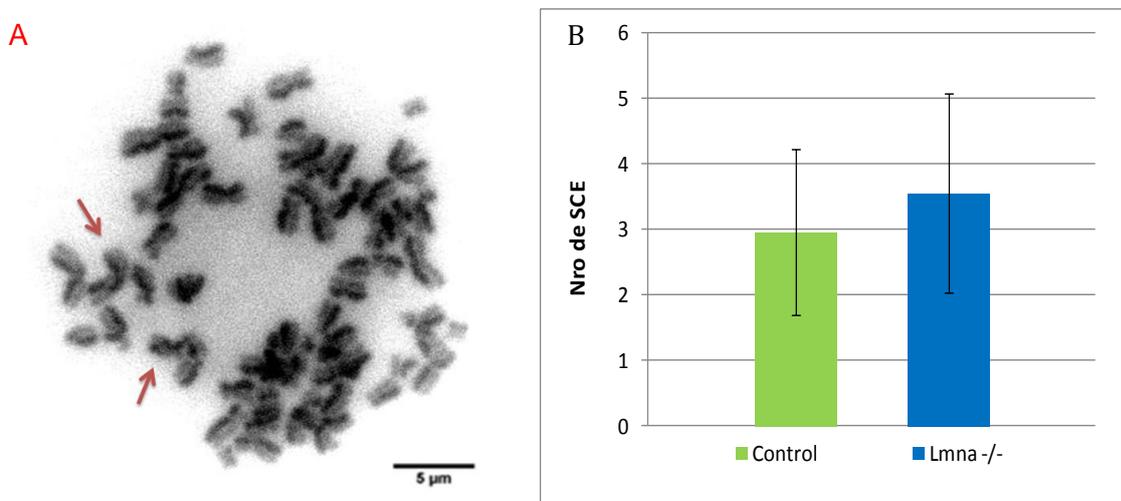


**Fig. 16-** Imágenes de núcleos de la línea control y la línea LMNA  $-/-$ . (N) se refiere a nucléolos, (he) heterocromatina, (eu) eucromatina. Las flechas señalan estructuras electrón densas, que corresponden a los centros fibrilares. Imágenes tomadas con microscopía electrónica de transmisión

En cuanto a la línea LMNA  $-/-$ , se observa que la envoltura nuclear se encuentra distorsionada, por la aparición de varios plegamientos en la misma. A su vez, las regiones de eucromatina y heterocromatina no se llegan a visualizar tan fácilmente.

A su vez, se observa que los centros fibrilares, caracterizados por ser las zonas más electrón densas del nucléolo, parecerían estar más altamente compactados en la línea LMNA  $-/-$ . En las células control se los observa menos densos y más dispersos por el nucléolo.

### Cariotipos



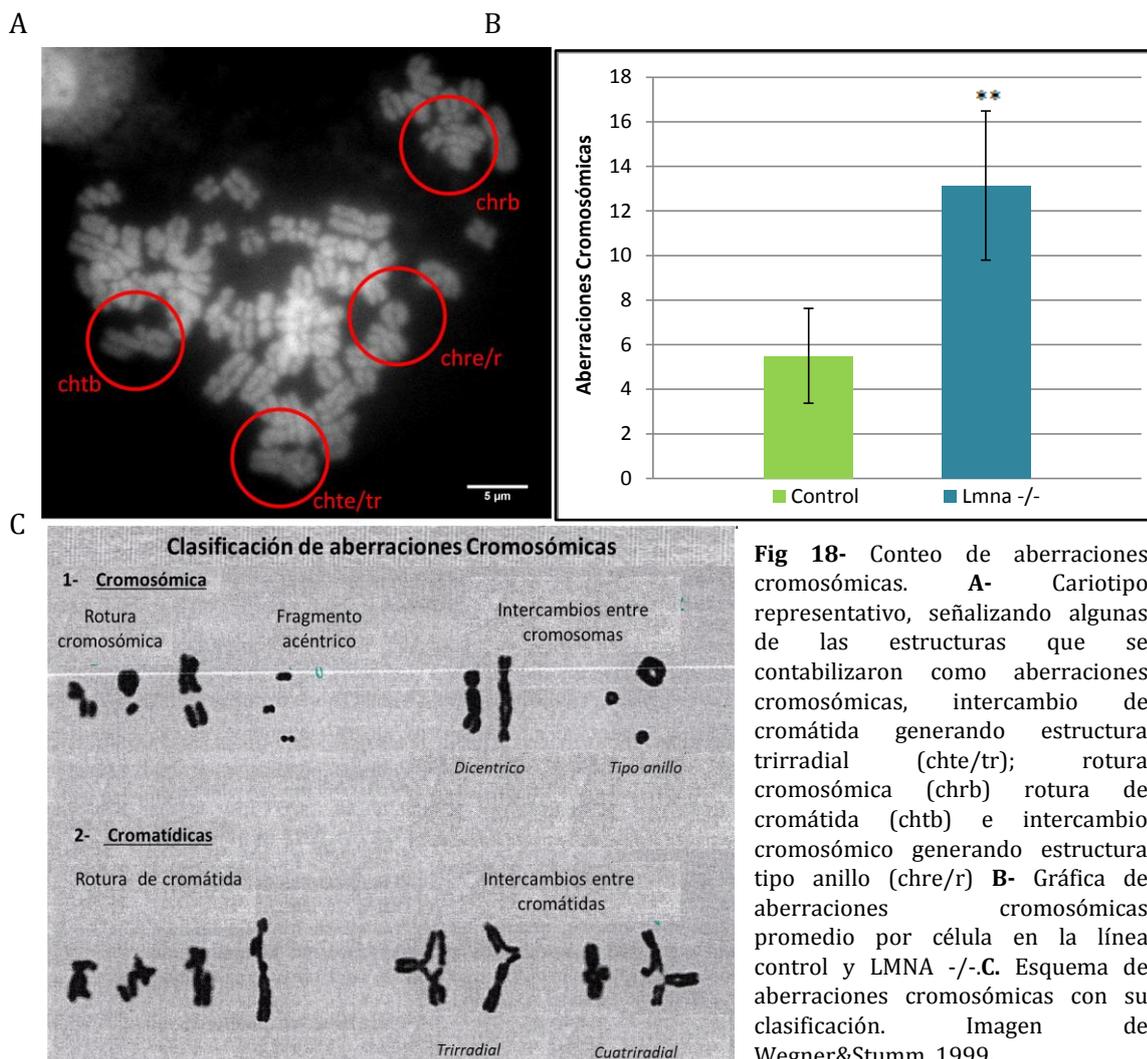
**Fig. 17-** Conteo de intercambios entre cromátidas hermanas. **A-** Cariotipo representativo de la visualización de intercambios entre cromátidas hermanas. **B-** Gráfico del número de intercambios entre cromátidas hermanas promedio (Nro de SCE) por célula en la línea control y en la línea LMNA  $-/-$ .

Con respecto al conteo de intercambios entre cromátidas hermanas visualizados en las metafases con naranja de acridina (Fig. 17), se comparó el número de intercambios entre cromátidas hermanas (Nro de SCE) en 25 metafases de cada línea (control y LMNA  $-/-$ ). Al dejar que las células incorporaran BrdU durante dos ciclos de replicación y basándose en que la replicación del ADN es semi-conservativa, se espera que las cromátidas hermanas difieran en la concentración de BrdU incorporado en sus hebras de ADN. Dado que la naranja de acridina tiñe de forma diferencial según la concentración de BrdU, las cromátidas hermanas se van a visualizar una con mayor intensidad que la otra, y de esta forma se podrá distinguir cuando ocurrió un evento de intercambio entre las mismas (ejemplos señalados con flechas en la Fig. 17-A).

Los resultados para la línea control fueron de media de 2,96 y SD=1,27, mientras que para las células LMNA -/- se calculó una media de 3,56 y SD= 1,53. La comparación de las medias con su respectiva desviación estándar mediante el test estadístico T arrojó un valor p de 0,1425, lo que lleva a que el resultado es no significativo.

Para el conteo de aberraciones cromosómicas (células marcadas con DAPI), se comparó la media de aberraciones para 50 metafases de cada línea utilizada (Fig. 18). Se contabilizaron como aberraciones cromosómicas: roturas cromosómicas, fragmentos acéntricos, intercambios cromosómicos que generen fragmentos dicéntricos o estructuras tipo anillo, roturas de cromátidas, e intercambios de cromátidas generando estructuras cuatrirradiales y trirradiales (Fig. 18c).

Para las células control, la media fue de 5,50 y su SD de 2,13, pero al depletar la lamina A/C la media fue de 13,14 y su desvío estándar 3,34. Al realizar el test estadístico T, el valor p calculado fue <0,001, lo que lleva a que estas muestras tienen una diferencia muy significativa.



## DISCUSIÓN

---

El objetivo de este trabajo era estudiar el efecto del déficit de LMNA en células derivadas de cáncer en WRN. Debido a que recientemente se descubrió que el fenotipo de síndrome de Werner no es causado solamente por mutaciones en WRN, sino que diversas mutaciones de la LMNA desencadenan los mismos síntomas del síndrome de Werner (Chen et al, 2003, Nyugen et al, 2007), resulta lógico pensar que ambas proteínas deben estar interaccionando de alguna forma. Se conoce que las mutaciones en WRN llevan a una proteína trunca no funcional, que no puede ingresar al núcleo. Por lo tanto, los pacientes con este síndrome acumulan mutaciones porque la proteína no puede llegar al núcleo y no puede catalizar las reacciones que necesita para reparar los errores durante la replicación o resolver estructuras formadas por la hebra de ADN que impiden el avance normal de la polimerasa.

Debido a que LMNA está involucrada en diversas progerias dentro de las laminopatías, dentro de las cuales se encuentra el Síndrome de Werner Atípico, se considera como hipótesis de este trabajo, que esta estructura podría tener una suma importancia en la funcionalidad de WRN, actuando como un soporte físico para la misma, y permitiendo que se localice en las regiones del núcleo donde lleva a cabo su función.

Nuestro estudio muestra que las inmunotinciones de las células HeLa podrían revelar la existencia de una relación en el patrón de localización de WRN y la LMNA. Ambas se encuentran acumuladas rodeando el nucléolo, donde se ha descrito la región perinucleolar. A su vez, se observó la localización de dos proteínas de regiones específicas del nucléolo: Nucleolina, de la región granular y Fibrilarina, de la región fibrilar. Estas tinciones permitieron corroborar que, efectivamente, las regiones de acumulación de la lámina y WRN eran rodeando el nucléolo.

Se ha visto que la presencia de la región perinucleolar se correlaciona con el fenotipo de transformación, ya que predomina en células de cáncer frente a líneas celulares normales, en especial en células HeLa y en células T84 pertenecientes a carcinoma de colon y que puede funcionar como un indicador de la capacidad de metástasis del cáncer (Huang et al, 1997; Norton et al, 2008). Aún no se tiene en claro si la presencia de WRN y LMNA en esta zona del núcleo en células transformadas está asociada a la región perinucleolar descrita

por los autores mencionados, o que ambas proteínas se acumulan rodeando el nucléolo independientemente de la formación del compartimiento perinucleolar.

Con estos experimentos previos, se apunta a una posible interacción entre la LMNA y WRN pudiendo ser tanto directa o indirecta, con alguna o algunas proteínas como intermediarios. Esto se confirmará a futuro mediante inmunoprecipitaciones.

Se procedió a la generación de la línea celular HeLa LMNA (-/-) para poder estudiar la localización y el funcionamiento de forma preliminar de WRN una vez que la célula no tienen lamina tipo A, alcanzándose un alto porcentaje de silenciamiento de la misma.

El hecho que WRN tenga un porcentaje tan alto de deslocalización en la línea silenciada, apuntaría a señalar la existencia de una interacción con la LMNA y la actuación de la misma como un soporte físico. Probablemente, el nexo a nivel de la lámina esté ubicado hacia la región amino terminal, donde se encuentran las mutaciones descritas por Chen et al, 2003. Como dos de estas mutaciones se encuentran en regiones hepta repetidas del dominio de la  $\alpha$ -hélice (en el sitio 133 y 140), se cree que no afectan la estructura de dimerización de LMNA, pero sí interacciones intermoleculares (Chen et al, 2003). Estos sitios de la proteína, así como el 57 y 59, podrían tratarse del punto donde interactúa LMNA con WRN de forma directa o indirecta, o podrían estar formando una estructura terciaria que permita la correcta interacción entre dichas proteínas. Las sustituciones que se encuentran hacia la región carboxilo terminal llevan a errores en el splicing alternativo como el que se ve en pacientes con el síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford (Chen et al, 2003).

También se ve que la ausencia de LMNA podría estar afectando al nucléolo, ya que la proteína nucleolina, propia de la región granular, pierde su patrón de localización característico. Mientras anteriormente se observaba que se acumulaba hacia la periferia del nucléolo, en la región que corresponde a la región granular y tenía una forma tipo anillo, al silenciar la lámina, en algunos casos pierde este patrón de anillo e incluso se la observa menos definida en cuanto a su forma.

Con respecto a los resultados obtenidos por microscopía electrónica, los puntos electrón densos que se observan en las células con LMNA silenciada, podrían estar generados por inconvenientes a nivel de la ARN polimerasa I. Previamente se observó por Shiratori et al, 2002, que Werner co-precipita con la subunidad RPA40 de la ARNpol I, indicando que WRN

nucleolar está asociado a la ARNpol I durante la transcripción de ARNr. Sin embargo, al precipitar Werner no se detecta ARNpol I, lo que los autores sugirieron que se debe a que un gran porcentaje de WRN está libre del complejo de ARNpol I.

Como ya se describió anteriormente, las cadenas nacientes de ARNr son sintetizadas en la interfase entre el componente fibrilar y el fibrilar denso y son liberadas hacia este último. Si al silenciar LMNA se observa esta acumulación en la zona fibrilar densa, podríamos especular que WRN participa activamente en la transcripción de ARNr, y debido a que no puede progresar correctamente, quedan acumuladas cadenas nacientes que se observan como zonas muy electrón densas. Esta aberración a nivel de la transcripción podría no deberse a problemas a nivel de WRN, sino a que la falta en la estructura física que le proporciona la lámina nuclear no le permite localizarse en estos puntos necesarios para funcionar correctamente. Como ya se mencionó anteriormente, se abordará esta hipótesis con nuevas aproximaciones experimentales en el futuro como por ejemplo co-inmunoprecipitaciones.

Finalmente, se hizo una primera aproximación a la posible alteración en la funcionalidad de WRN dependiente de la alteración de la LMNA. Se evaluó mediante el conteo de intercambios entre cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas. Como se vio anteriormente por Melarango et al, 1995, cuando WRN está afectado se ve un aumento en las aberraciones cromosómicas pero no así en los intercambios entre cromátidas hermanas. Dado que nuestros resultados coinciden con esto último, podemos inferir que corrobora con el hecho que WRN es la proteína que se está viendo afectada al silenciar LMNA y no otras proteínas de reparación del ADN como BLM que genera altas tasas de intercambios entre cromátidas hermanas. Sin embargo, no podemos descartar que la causante de estas aberraciones sea la misma ausencia de LMNA.

En conclusión, nuestros datos apuntan a que la LMNA podría ser la estructura que mantiene (de forma indirecta o directa) a WRN correctamente localizado en el nucléolo. A su vez, la misma podría estar actuando de soporte físico en la organización intranucleolar. La ausencia de LMNA generaría deslocalización de WRN y por lo tanto problemas en síntesis de unidades ribosomales por la ARNpol I, que se podría evidenciar por la alteración en los centros fibrilares. Al deslocalizarse, WRN perdería su funcionalidad, lo que se estaría

observando experimentalmente por el aumento significativo de las aberraciones cromosómicas. Sin embargo, no hay que descartar que los efectos observados podrían estar causados por otras proteínas que interactúan con LMNA, o incluso ser un efecto directo de la ausencia de Lamina tipo A.

El hecho que mutaciones en la LMNA generen envejecimiento acelerado, podría deberse a la deslocalización de WRN observada, siendo este trabajo un primer acercamiento a la localización y funcionamiento de WRN en ausencia de LMNA. Este punto podría tener implicancias en el paciente neoplásico, ya que el silenciamiento de la LMNA podría utilizarse como herramienta terapéutica. Al no permitir a WRN ejercer su función en la célula maligna, la haría blanco de drogas quimioterapéuticas para las cuales las células de Werner son hipersensibles

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Agrelo, R. (2010) "Epigenetic Silencing of Progeroid Syndromes" *Epigenetics of Aging*. Editor Tollefsbol, T.O. *Springer* 345-370
- Agrelo, R., Cheng, W., Setlen, F., Ropero, S., Espada, J., Fraga, M.F., Herranz, M., Paz, M.F., Sanchez-Céspedes, M., Artiga, M.J., Guerrero, D., Castells, A., von Kobbe, C., Bohr, V.A. & Esteller, M. (2006). "Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(23): 8822-8827.
- Agrelo, R., Setien, F., Espada, J., Artiga, J., Rodriguez, M., Perez-Rosado, A, Sanchez Aguilera, A., Fraga, M.F., Piriz, M.A. & Esteller, M. (2005). "Inactivation of the lamin A/C gene by CpG island promoter hypermethylation in hematologic malignancies, and its association with poor survival in nodal diffuse large B-cell lymphoma." *J Clin Oncol* **23**(17): 3940-3947.
- Barbosa, D., D'Avila, V., Avansini, S., Schwambach, A., Campos, T. & Lopes-Cendes, I.(2014) "The new world of ARNs" *Genet Mol Biol* **37** (1): 285-293
- Barrios E., Alonso, R. Garau, M. & Musetti, C.(2014) "Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer" Registro Nacional de Cáncer
- Bernstein, C., Prasad A.R., Nfonso, V. & Bernstein, H (2013). "DNA Damage, DNA Repair and Cancer." *New research Directions in DNA repair*. Capítulo 16: 413-465
- Bernstein, D.A. & Keck, J.L.(2003) "Domain mapping of *Escherichia coli* RecQ defines the roles of conserved N- and C-terminal regions in the RecQ family" *Nucleic Acids Res* **31**(11): 2778-2785
- Bohr V.A. (2005) "Deficient DNA repair in the human progeroid disorder, Werner syndrome" *Mutat Res*. **577**(1-2):252-9
- Chen L., Huang S., Lee L., Davalos A., Schiest R.H., Campisi J. & Oshima J. (2003) "WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair" *Aging Cell* **2**(4):191-9
- Chen, L., Lee, L., Kudlow, A., Dos Santos, H.G., Sletvold, O., Shafeghati, Y., Botha, E.G., Garg, A., Hanson, N.B., Martin, G.M., Mian, S., Kennedy, B.K., & Oshima, J.(2003) "LMNA mutations in atypical Werner's syndrome" *Mech of disease* **362**: 404-445
- Dechat, T., Adam, S.A., Taimen, P., Shimi, T. & Goldman, R.D. (2011) "Nuclear lamins" *The nucleus* **33**:54 Editores Misteli, T & Spector D.L.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998) "Potent and specific genetic interference by double stranded ARN in *Caenorhabditis elegans*" Nature **391**: 806-811
- Giglia-Mari, G., Zotter, A. & Vermeulen, W. (2011) "ADN damage response" The nucleus 361:380 Editores Misteli, T & Spector D.L
- Goto M. (1997) "Hierarchical deterioration of body systems in Werner's syndrome: implications for normal ageing" Mech Ageing Dev **98**(3):239-54
- Guo, H., Luo, N., Hao, F. & Bai, Y. (2014). "p.Pro4Arg mutation in LMNA gene: a new atypical progeria phenotype without metabolism abnormalities." Gene **546**(1): 35-39.
- Hanada, K. & Hickson, I.D. (2007). "Molecular genetics of RecQ helicase disorders." Cell Mol Life Sci **64**(17): 2306-2322.
- Huang, S., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. & Spector, D.L. (1997) "The dynamic organization of the perinucleolar compartment in the cell Nucleus" J cell biol **137**(5): 965-974
- Hayflick, L. (1965) "The limited in vitro lifetime of Human diploid Cell Strains" Exp Cell Res **37**: 614-636
- Hozak P., Cook, P.R. Schofer, C., Mosgoller, W., Wachtler, F. (1994) "Site of transcription of Ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells" J. Cell Sci. **109**: 1427-1436
- Martin, G.M., Sprague, C.A. & Epstein, C.J. (1970) "Replicative Life-Span of Cultivated Human Cells" Int A Path **23** (1): 86-92
- Martin, C., Chen, S., Maya-Mendoza, A., Lovric, J., Sims, P.F. & Jackson, D.A. (2009) "Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli" J Cell Sci. **122**: 1551-1562
- Melarango, M.I, Pagni, D. & Cardoso, M.A. (1995) "Cytogenetic Aspects of Werner's Syndrome lymphocyte cultures" Mech Ageing Dev **78**: 117-122
- Moore, C. B., Guthrie E.H., Huang, M. & Taxman D.J. (2010). "Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown." Methods Mol Biol **629**: 141-158.
- Moser, M.J., Oshima, J. & Monnat, R.J. (1998) "WRN mutations in Werner's Syndrome" Hum mutat **13**: 271-279
- Norton, J. T., Pollock, C.B., Wang, C., Schink, J.C., Kim, J.J., & Huang, S. (2008) "Perinucleolar compartment prevalence is a phenotypic pancancer marker of malignancy" American Cancer Society **Vol 113 No 4**: 861-869

- Nyugen, D., Leistriz, D.F., Turner, L., MacGregor, D., Ohson, K., Dancey, P., Martin, G.M. & Ohima, J. (2007) "Collagen expression in fibroblasts with a novel LMNA mutation" Biochem Biophys Res Commun **352**: 602-608
- Ogburn, C.E., Oshima, J., Poot, M., Chen, R., Hunt, K.E., Gollahon, K.A., Rabinovitch, P.S. & Martin GM. (1997) "An apoptosis-inducing genotoxin differentiates heterozygotic carriers for Werner helicase mutations from wild-type and homozygous mutants" HumGenet **101**(2):121-5
- Olson, M. (2010) "Nucleolus: Structure and Function." Encyclopedia of Life Sciences John Wiley & Sons, Ltd:Chichester.
- Olson, M. (2004) "The nucleolus" Springer Science & Business Media
- Opresko, P.L., Cheng, W.H., von Kobbe, C., Harrigan, J.A. & Bohr V.A. (2003) "Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process" Carcinogenesis. **24**(5):791-802.
- Ouyang, K. J., Woo, L.L. & Ellis, N.A.. (2008). "Homologous recombination and maintenance of genome integrity: cancer and aging through the prism of human RecQ helicases." Mech Ageing Dev**129**(7-8): 425-440.
- Pederson, T.(2011) "The nucleolus" The nucleus 209:224 Editores Misteli, T & Spector D.L.
- Pirzio, L. M., Pichierri, P., Bignami, M. & Franchitto, A. (2008). "Werner syndrome helicase activity is essential in maintaining fragile site stability." J Cell Biol**180**(2): 305-314.
- Poot, M., Gollahon, K.A. & Rabinovitch, P.S. (1999) " Werner syndrome lymphoblastoid cells are sensitive to camptothecin-induced apoptosis in S-phase" Hum Genet.**104** (1):10-14
- Poot, M., Yom, J.S, Whang S.H., Kato, J.T., Gollahon, K.A., Rabinovitch, P.S. (2001) "Werner syndrome cells are sensitive to DNA cross-linking drugs" FASEB J.**15**(7):1224-6.
- Popuri, V., Huang, J., Ramamoorthy, M., Tadokoro, T., Croteau, D.L. & Bohr, V.A. (2012) "RECQL5 plays co-operative and complementary roles with WRN syndrome helicase" Nucleic Acids Res **41**(2):881-99
- Rodríguez-López, A.M., Jackson, D.A., Iborra, F. & Cox, L.S. (2002) " Asymmetry of ADN replication fork progression in Werner's syndrome" Aging Cell. **1**(1):30-39.
- Shiratori, M., Suzuki, T., Itoh, C., Goto, M., Furuichi, Y. & Matsumoto, T. (2002) "WRN helicase accelerates the transcription of ribosomal ARN as a component of an ARN polymerase I-associated complex" Oncogene**21**(16):2447-54

- Tinoco, G., Thein, M. & Ershler W. B. (2012) "Biological Aspects of Cancer and Aging" Cancer and Aging handbook. Capítulo 2: 13-34
- Umezū, K., Nakayama, K., Nakayama, H. (1990) "Escherichia coli RecQ protein is a DNA helicase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:5363-5377
- Wegner R, & Stumm M. (1999) "Diagnosis of Chromosomal Instability Syndromes" Diagnostic Cytogenetics. *Springer Lab Manual* 251-268
- Yan, R., Hallan A., Stockley, P.G. & Boyes, J. (2014). "Oncogene dependency and the potential of targeted ARNi-based anti-cancer therapy." Biochem J **461**(1): 1-13.

## ABREVIATURAS

---

WRN- Proteína Werner

LMNA- Lamina A/C

AA- aminoácidos

ARNpol I- ARNpolimerasa I

ARNsh - pequeños ARN tipo horquilla

ARNsi - pequeños ARN de interferencia

ARNi - ARN de interferencia

Aph- Afidilcolina

Thy - Timidina

PBS- Buffer Fosfato Salino

etOH - Alcohol etílico

T<sub>amb</sub>- Temperatura ambiente

GFP - Proteína verde fluorescente

PAF - Paraformaldheído

BSA - Albumina de Suero Bovino

PI - Ioduro de Propidio

BrdU - Bromo desoxiuridina

NLS - Señal de localización Nuclear

## APÉNDICE 1: RECETAS

---

### PBS 20x

- 160,0g NaCl 0,20 M
- 4,0 g KCl 5,0 mM
- 28,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 36 mM
- 4,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,0mM

.en 800 mL de H<sub>2</sub>O destilada  
-ajustar pH a 7,4 con HCl

### PBS 1x

Para preparar 500 mL:

- Diluir 25 mL de PBS 20x en 475mL H<sub>2</sub>O destilada

### PBST 1x (0,1% Tween/PBS 1x)

Para preparar 500 mL:

- Diluir 25 mL de PBS 20x en 475mL H<sub>2</sub>O destilada
- 500 µL de Tween 20

### DMEM

- 450 mL DMEM
- 10% FBS/FCS
- 5mL L-glutamina
- 5mL AA no esenciales
- 5mL Solución de penicilina-estreptomina

### Medio de Congelamiento

- 90% FCS
- 10% DMSO

### RIPA buffer

- 50 mM Tris-Cl pH 8
- 150 mMNaCl
- 1% Tritón X100
- 0,5% Desoxicolato de Sodio
- 0,1% SDS

Llevar a 250 mL de H<sub>2</sub>O destilada

### Buffer A

10mM Hepes pH 7,9

5mM MgCl<sub>2</sub>

0,25 M sacarosa

0,5 mM DTT

0,5 mM PMSF

Llevar a 250 mL de H<sub>2</sub>O destilada, Filtrar (Almacenar a 4°C)

### Buffer B

10mM Hepes pH 7,9

25% Glicerol

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1 mM EDTA

0,5 mM DTT

0,5 mM PMSF

Llevar a 250 mL de H<sub>2</sub>O destilada, Filtrar (Almacenar a 4°C)

### Buffer TE

10mM Tris pH 8

1mM EDTA pH 8

Disolver en agua destilada

### Buffer citrato

0,1% Citrato de Sodio

0,05% Tween 20

Disolver en agua destilada y ajustar a pH 6

### Buffer de bloqueo Inmunofluorescencia

5% BSA en PBST 1x

### Western Blot

<b>Gel de separación</b>	<b>10%</b>	<b>7%</b>
dH <sub>2</sub> O	3,25 mL	4,65 mL
4xSDS/Tris-Cl pH 8,8	2,25mL	2,25 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida(30%/0,8% m/v)	3,0 mL	2,1 mL
10% m/v APS	90 µL	90 µL
TEMED	10µL	10 µL

<b>Gel de concentración</b>	<b>3,9%</b>
dH <sub>2</sub> O	3,05 mL
4xSDS/Tris-Cl pH 6,8	1,25mL
Acrilamida/Bis-acrilamida(30%/0,8% m/v)	0,65mL
10% m/v APS	50 µL
TEMED	10 µL

Buffer de corrida

2 g SDS  
 1,56 g Tris Base  
 94 g Glicina  
 Llevar a 1L en dH<sub>2</sub>O

Buffer de transfer

5,86 g Glicina  
 11,62 g Tris  
 3,75 mL SDS 20%  
 Llevar a 1600 mL de dH<sub>2</sub>O, Agregar 400mL Metanol previo a su uso

Buffer de bloqueo WB

5% leche descremada en polvo en PBST 1x

Fijador de Carnoy

Metanol/Ácido acético (3:1)

Sorensen Buffer

Solución X: 9,08g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1L dH<sub>2</sub>O  
 Solución Y: 23,88 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O en 1L dH<sub>2</sub>O  
 Mezclar 508 mL X + 492 mL Y. Ajustar a pH 6,8