

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA

UNIVERSIDAD FRANCISCO
DE VITORIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Mención en Investigación Clínica

**“Localización y caracterización de fusiones
de ADN procedentes del mecanismo de
Alargamiento Alternativo de Telómeros
(ALT)”**



Curso 2020/2021

Alumna: Sara Monreal Peinado

Tutor: Dr. Ignacio Flores Hernández
Centro Nacional de Investigaciones
Cardiovasculares (CNIC), Madrid (España)

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	4
ABREVIATURAS.....	6
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Líneas celulares utilizadas	14
2. Cultivo de células tumorales	14
3. Contaje celular	14
4. Visualización de las células en cultivo.....	15
5. Extracción ADN citoplasmático y nuclear de células HeLa y U2OS 1	15
6. Aislamiento ADN liberado al espacio extracelular de células HeLa y U2OS 1.....	16
7. Monocapa de células en portaobjetos.....	17
8. Cuantificación de la longitud telomérica y detección de fusiones teloméricas.....	18
9. Inmunofluorescencia para el estudio de las estructuras PML-NBs.....	23
10. Ensayo para el análisis de la actividad telomerasa	24
RESULTADOS.....	28
1. Aislamiento del ADN de núcleo, citoplasma y sobrenadante de cultivo celular de células ALT+ y ALT- con el fin de caracterizar fusiones teloméricas.....	28
1.1. Cantidad de ADN insuficiente para secuenciar.....	28
2. Caracterización de células ALT+ y ALT-.	29
2.1. Mayor longitud telomérica y heterogeneidad en células ALT+	29
2.2. Mayor presencia de PML-NBs en células ALT+	30
2.3. Ausencia de actividad telomerasa en células ALT+	31
3. Detección de fusiones asociadas a homología o a NHEJ.....	32

3.1. Mayor presencia de ambas fusiones en células ALT+, sobretodo de fusiones ALT-H 32

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 34

BIBLIOGRAFÍA 36

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Imagen de la cámara de Neubauer y las cuadrículas de recuento de células.....	14
Figura 2. Esquema de los pasos a seguir en la centrifugación para separar las fracciones nuclear y citoplasmática.	15
Figura 3. Proceso seguido para la extracción de ADN a partir de sobrenadante de cultivo celular.	17
Figura 4. Esquema de montaje del kit de cytospin y citocentrifuga para la creación de una monocapa de células sobre un portaobjetos.....	18
Figura 5. Representación del método de PER para la extensión de los oligonucleótidos de las sondas.	19
Figura 6. Hibridaciones realizadas para la detección de la secuencia de ADN de interés mediante la SABER-FISH.....	19
Figura 7. Hibridaciones realizadas junto con “branching” para aumentar la detección de la secuencia de ADN de interés mediante la SABER-FISH.....	20
Figura 8. Representación de la sonda y de las horquillas utilizadas	22
Figura 9. Descripción de la técnica de TRAP fluorescente empleada para medir la actividad telomerasa presente en células tumorales humanas ALT+ y ALT-.....	25
Figura 10. Cuantificación longitud telomérica en diferentes líneas tumorales humanas ALT- (HeLa y HCT 116) y ALT+ (U2OS 1, U2OS 2 y SaOS-2).	30
Figura 11. Inmunofluorescencia de los cuerpos nucleares PML en diferentes líneas tumorales. 31	
Figura 12. Análisis de la actividad telomerasa en diferentes líneas tumorales humanas ALT- y ALT+ utilizando Cy5-TRAP.....	32
Figura 13. Detección de telómeros y fusiones asociadas a NHEJ (fusión TTAAA) y de fusiones asociadas a homología de secuencias (fusión ALT-H) en células ALT- y ALT+.....	33

TABLAS

Tabla 1. Secuencias modelo para el diseño de las diferentes secuencias de las horquillas y sondas	20
Tabla 2. Condiciones que se utilizaron para el desarrollo de la SABER-FISH.....	21
Tabla 3. Espectros de absorción y emisión de los fluoróforos Cy3.5 y Alexa Fluor 488.	21
Tabla 4. Contenido de los mixes utilizados en los diferentes pasos de la SABER-FISH.....	23
Tabla 5. Contenido medio de montaje para SABER-FISH.....	23
Tabla 6. Anticuerpos empleados en la inmunofluorescencia de PML-NBs.	24

Tabla 7. Espectros de absorción y emisión del fluoróforo Cy5.	24
Tabla 8. Contenido del buffer de lisis utilizado para la extracción de proteínas.....	26
Tabla 9. Contenido del buffer de TRAP utilizado para que se dé la elongación de secuencias teloméricas mediante la telomerasa.....	27
Tabla 10. Cuantificación del ADN extraído de núcleo, citoplasma y sobrenadante de cultivo celular de células HeLa (ALT-) y U2OS 1 (ALT+).	28

ABREVIATURAS

A	Adenina
AND (DNA)	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alargamiento alternativo de los telómeros (<i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>)
ALT+	Células ALT positivas
ALT-	Células ALT negativas
ALT-H	Fusión ALT asociada a procesos de homología
APB	Cuerpos nucleares de leucemia promielocítica asociados a ALT
ARN (RNA)	Ácido ribonucleico
ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated</i>
BL1	Primer tampón de lisis
BL2	Segundo tampón de lisis
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Bst polimerasa	Polimerasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
C	Citosina
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate
ddH₂O	Agua didestilada (doblemente destilada)
DDR	Respuesta al daño en el ADN (<i>DNA Damage Response</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
dNTP	Desoxinucleótidos
ds	Doble hebra o cadena (<i>double strand</i>)
DSB	Rotura de doble cadena (<i>Double Strand Break</i>)
DTT	1,4-dithiothreitol
ECTR	Repeticiones teloméricas extracromosómicas
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
FBS	Suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)

G	Guanina
GITC	Tiocianato de guanidinio
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-iletanosulfónico
HR	Recombinación homóloga (<i>Homologous Recombination</i>)
kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
MET	Transición mesenquimal-epitelial
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NHEJ	Recombinación no homóloga o Unión de extremos no homólogos (<i>Non-homologous end joining</i>)
NTP	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PER	<i>Primer-exchange reaction</i>
PFA	Paraformaldehído
PML	Proteínas de leucemia promielocítica (<i>Promyelocytic Leukemia</i>)
PML-NB	Cuerpos nucleares de proteínas de leucemia promielocítica (<i>Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POT1	Protección de telómeros 1 (<i>Protection of Telomeres 1</i>)
RAP1	Proteína represora y activadora 1 (<i>Transcriptional Repressor/Activator Protein 1</i>)
RT	Temperatura ambiente (<i>Room Temperature</i>)
SABER-FISH	<i>Signal Amplification By Exchange Reaction and Fluorescence In Situ Hybridation</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
ss	Hebra única (<i>single strand</i>)
SSC	Solución salina de citrato de sodio (<i>Saline-Sodium-Citrate</i>)
SSCT	SSC y Twee-20

T	Timidina
TA	Activación de la telomerasa
TA+	Actividad de la telomerasa positiva
TBE	Disolución tampón de Tris, borato y EDTA
TERC	Molde de ARN de la telomerasa (<i>Telomerase RNA Component</i>)
TERT	Componente catalítico de la telomerasa (<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>)
TIF	Focos inducidos por la disfunción de los telómeros (<i>Telomere Dysfunction-Induced Foci</i>)
TIN2	Proteína nuclear de interacción con TRF1 2 (<i>TRF1-interacting Protein 2</i>)
TMM	Mecanismo de mantenimiento de los telómeros (<i>Telomere Maintenance Mechanism</i>)
TPP1	Proteína de interacción con POT1 y TIN2 1 (<i>POT1 and TIN2-organizing Protein</i>)
TRAP	Protocolo de amplificación de las repeticiones teloméricas (<i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>)
TRF1	Factor de unión a la repetición telomérica 1 (<i>Telomeric Repeat-Binding Factor 1</i>)
TRF2	Factor de unión a la repetición telomérica 2 (<i>Telomeric Repeat-Binding Factor 2</i>)
TS	(<i>Telomerase Substrate</i>)
T-SCE	Intercambio de cromátidas hermanas teloméricas (<i>Telomere-Sister Chromatid Exchange</i>)
ua	Unidades arbitrarias

ABSTRACT

Los telómeros son estructuras que protegen el material genético de la pérdida de ADN codificante y de otros procesos de reparación. Cuando una célula se divide pierde parte de la estructura telomérica pudiendo llegar a un punto en el que el proceso de división queda interrumpido al quedar el ADN desprotegido. Por tanto, para hacer a una célula inmortal esta necesita activar mecanismos de mantenimiento de los telómeros (TMM).

Existen diferentes TMM, la activación de la telomerasa (TA) y el alargamiento alternativo de los telómeros (ALT). Una característica de las células ALT+ (positivas para el mecanismo ALT) son las roturas generadas en los extremos teloméricos produciéndose ECTRs (Repeticiones teloméricas extracromosómicas). En este trabajo hemos analizado si las ECTRs se fusionan entre sí por mecanismos asociados a procesos de homología o de NHEJ (*Non-Homologous End Joining*). Además, hemos estudiado la localización de las ECTRs para su posterior caracterización mediante NGS (*Next Generation Sequencing*).

Previamente nos cercioramos, mediante la técnica TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*), que las células ALT+ usadas en este estudio no presentan actividad telomerasa. También comprobamos que estas células presentan una mayor heterogeneidad e intensidad de fluorescencia (longitud telomérica) y una mayor presencia de PML-NBs (Cuerpos nucleares de Leucemia Promielocítica) al compararlas con las células con TA. Por último, localizamos fusiones entre ECTRs usando la técnica SABER-FISH (*Signal Amplification By Exchange Reaction and Fluorescent In Situ Hybridization*). La detección de fusiones mostró mayor presencia de ambos tipos de fusiones en células ALT+, estando en mayor proporción las asociadas a homología. En cuanto al aislamiento de estas fusiones, para su posterior caracterización, se obtuvieron niveles muy bajos.

En conclusión, las células tumorales ALT+ presentan las características propias de este tipo de TMM, es decir, mayor longitud y heterogeneidad telomérica, ausencia de actividad telomerasa y mayor cantidad de PML-NBs. También se ha visto como las fusiones asociadas a este mecanismo son mayoritarias en células ALT+, lo que concuerda con lo esperado. Por otro lado, el rendimiento adquirido en la extracción del ADN no fue el esperado y por eso se requiere amplificar ese material genético para su posterior secuenciación y caracterización.

INTRODUCCIÓN

Los telómeros son complejos de nucleoproteínas heterocromáticos ubicados en los extremos de los cromosomas eucariotas, protegiéndolos de ser reconocidos como extremos de cadena simple y evitando así la pérdida de ADN (Ácido desoxirribonucleico) codificante [1]. Por lo tanto, los telómeros desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la estabilidad del genoma [1, 2].

Los telómeros humanos están formados por conjuntos de repeticiones en tándem de secuencias 5'-TTAGGG-3' de entre 3 y 12 kilobases (kb) de longitud [1]. Estas secuencias terminan en una sola hebra (*single strand*, ss) rica en guanina (G) para formar un extremo 3' protuberante. Este extremo es capaz de plegarse sobre sí mismo formando un bucle t (*t-loop*) gracias a la ayuda del complejo shelterina [1]. Este complejo se compone de las proteínas TRF1 (*Telomeric Repeat-Binding Factor 1*), TRF2 (*Telomeric Repeat-Binding Factor 2*), POT1 (*Protection of Telomeres 1*), TIN2 (*TRF1-interacting Protein 2*), TPP1 (*POT1 and TIN2-organizing Protein*) y RAP1 (*Transcriptional Repressor/Activator Protein 1*) [1, 3, 4, 5]. TRF1 y TRF2 se unen al ADN telomérico de doble cadena (*double strand*, ds), mientras que POT1 se une al ADNss telomérico. El resto de los componentes son reclutados a través de interacciones con TRF1 y TRF2 [1, 3, 4, 5]. TRF2 estimula la formación del *t-loop*, que protege los extremos de los cromosomas de su unión mediante reparación no homóloga (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ) [5]. Este bucle también inhibe la activación de la cascada de señalización ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*), impidiendo el desencadenamiento de la respuesta al daño en el ADN (*DNA Damage Response*, DDR) al considerarse el ADN telomérico desprotegido como rotura de doble cadena (*Double Strand Break*, DSB) [2, 5].

Durante cada división celular, se produce un acortamiento telomérico debido a la incapacidad de la maquinaria de replicar el último fragmento de Okazaki de la hebra rezagada y a la ausencia de la actividad telomerasa [1]. Por lo que, tras sucesivas rondas de replicación los telómeros alcanzan un acortamiento telomérico crítico [6]. Este fenómeno puede activar la DDR con la consecuente parada del ciclo celular y, con la posterior, senescencia y/o apoptosis, pero también puede tener lugar la replicación defectiva de las células [1, 3, 7]. Esta replicación defectiva estará caracterizada por la unión de los extremos cromosómicos mediante NHEJ dando lugar a la formación de puentes teloméricos, que impedirán la correcta segregación de los cromosomas entre células hijas y la formación de fusiones teloméricas [8].

Esto supone una barrera de proliferación para las células tumorales. Sin embargo, los tumores han adquirido modificaciones para evitar esta senescencia replicativa [6].

Para evitar este acortamiento e incluso la formación de fusiones basadas en NHEJ, y así estabilizar el genoma, se hace necesaria la activación un mecanismo de mantenimiento de los telómeros (*Telomere Maintenance Mechanism*, TMM) [6]. Existen dos mecanismos, la activación de la telomerasa (*Telomerase Activity*, TA) y el alargamiento alternativo de los telómeros (*Alternative Lengthening of Telomeres*, ALT) [6, 9].

La telomerasa es una enzima ribonucleoproteica formada por una subunidad catalítica, TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*), y una plantilla de ARN (Ácido Ribonucleico), TERC

(*Telomerase RNA Component*) [1, 9, 10]. Este proceso lo realiza mediante la transcripción inversa, por parte de TERT, de plantillas de ARN utilizadas como molde para la síntesis de repeticiones teloméricas [9, 10]. De esta manera se agregan repeticiones teloméricas ricas en G a los extremos 3' de los cromosomas contrarrestando parcialmente el acortamiento de los telómeros y manteniendo la homeostasis de los cromosomas [11]. Este TMM, basado en el uso de la telomerasa, se cree que es un mecanismo que ha surgido tardíamente en la evolución de los organismos eucariotas y que se considera fácilmente controlable [12].

Por otro lado, el alargamiento alternativo de telómeros, o también llamado ALT, es considerado un TMM ancestral [12]. Está basado en la recombinación homóloga (*Homologous Recombination*, HR) y en la replicación tanto intra (entre secuencias adyacentes del mismo telómero) como intertelomérica (entre secuencias de distintos telómeros) que utiliza moldes teloméricos para la síntesis de *novoo* de este tipo de ADN [5, 13, 14].

Se ha descrito la capacidad de las células cancerosas de activar un TMM para apoyar su crecimiento e inmortalización [6]. De ambos mecanismos, el más común es la TA que se encuentra presente en el 85-90% de los cánceres humanos, especialmente los de origen epitelial [15]. Además de ciertos tumores, las células madre embrionarias y multipotentes y las células progenitoras de linaje presentan activa su telomerasa de manera transitoria hasta su diferenciación [18]. Sin embargo, las células somáticas humanas presentan una represión de su actividad y se cree que pueden presentar el mecanismo ALT, aunque no en suficiente grado como para mantener sus telómeros de forma óptima [18, 19].

El 10-15% de tumores restantes carecen de actividad telomerasa detectable teniendo como mecanismo de mantenimiento el alargamiento alternativo de los telómeros [16]. Este se encuentra en tumores de origen mesenquimal y neuroepitelial [17].

A la vez se ha observado que los TMM pueden sufrir un cambio temporal de uno hacia el otro (ALT ↔ Telomerasa). Este cambio se produce de manera dependiente del ciclo celular o dependiente de la progresión del tumor [20]. De esta forma se pasaría de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal gracias a la transición epitelial-mesenquimal (EMT) o de manera contraria gracias a la transición mesenquimal-epitelial (MET) [20]. Esto desencadena en la formación de poblaciones de células en mosaico, es decir, de un fenotipo híbrido, con presencia de más de un TMM a la vez [20, 21].

En cuanto al mecanismo ALT, las células que mantienen sus telómeros a partir de este mecanismo suelen ser independientes de la actividad telomerasa [22]. Estas células presentan una combinación de dos o más características moleculares, incluidos (1) los telómeros de longitud heterogénea, que van desde muy cortos hasta más de 50 kb; (2) la presencia de cuerpos nucleares de leucemia promielocítica (*Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies*, PML-NB; *Promyelocytic Leukemia Protein*, PML) asociados a ALT (*ALT-Associated PML Bodies*, APB); (3) focos inducidos por la disfunción de los telómeros (*Telomere Dysfunction-Induced Foci*, TIF); (4) alta tasa de intercambio de cromátidas hermanas teloméricas (*Telomere-Sister Chromatid Exchange*, T-SCE); (5) repeticiones teloméricas extracromosómicas abundantes (ECTR); (6) copias interteloméricas de etiquetas (*Intertelomeric Tag Copying*) como evidencia de que la

recombinación intertelomérica ocurre específicamente en células ALT positivas (ALT+) [5, 20, 22]. Esto último sucede a través de la inserción de una secuencia codificante en un telómero individual y la observación de que esa secuencia ha sido copiada en otros telómeros [5].

Todas estas características son utilizadas en conjunto como marcadores para diferenciar células ALT+ de células ALT negativas (ALT-), estas últimas son telomerasa positiva (TA+) en la mayoría de los casos.

Respecto al marcador PML-NBs, estos son dominios nucleares que contienen la proteína PML codificada por el protooncogén PML [23]. La función de esta proteína no se conoce exactamente, pero si se sabe que desempeña un papel directo en la vía apoptótica así como en la senescencia replicativa, participando como supresor de tumores [24, 25]. Las líneas celulares ALT+ contienen una nueva forma de cuerpo de PML considerado cuerpos PML asociados a ALT, es decir, los APBs. En ellos se aprecian ciertas diferencias, como por ejemplo la ausencia de actividad galactosidasa la cual está asociada a la senescencia, lo que les proporciona cierta ventaja competitiva con respecto a las células normales [24]. También se piensa que estos APBs podrían aparecer en células ALT+ que están destinadas a sufrir apoptosis debido a que no son capaces de mantener sus telómeros de forma correcta [24]. Estos PML-NBs no llega a ser exclusivamente de células ALT+ ya que se han observado también en células telomerasa positivas con telómeros largos [5].

Los APBs albergan ADN telomérico y proteínas asociadas a telómeros, así como varias proteínas que facilitan la HR, la replicación y la respuesta al daño [26]. Por esto mismo, se cree que los APBs representan los sitios de la HR y el alargamiento de los telómeros mediado por ALT [5]. Dentro de estos cuerpos nucleares, se ha observado la acumulación de bucles y otras estructuras necesarias para la protección de los extremos teloméricos, como por ejemplo cuadruplexos G (G4). Estas producen el colapso de las horquillas de replicación dando lugar a la formación de DSBs y desencadenando la liberación de secuencias teloméricas [22]. Estas secuencias, en teoría, pueden llegar a dar fusiones si los telómeros se encuentran desprotegido. La caracterización de estas fusiones es un objetivo del presente trabajo.

Asimismo, las células ALT+ suelen tener una elevada respuesta de daño al ADN en los telómeros causado por el estrés de la replicación. Es aquí donde se forman los TIFs, es decir, focos de daño en el ADN en los que se encuentran asociadas proteínas de respuesta al daño como la histona H2AX. Pero no todas las células ALT+ presentan una proporción significativamente mayor de TIFs en comparación con las células TA+ [5].

Otro marcador de este tipo de células es la presencia de T-SCE, la cual refleja un aumento de la recombinación en los telómeros. Por tanto, que las células ALT+ muestren altos niveles de T-SCE representa la existencia de gran cantidad de eventos de cruce telomérico, pero no es indicativo de extensión de los telómeros [5, 27].

A su vez, estas células presentan ADN telomérico extracromosómico (ECTR), debido a roturas de secuencias teloméricas anteriormente descritas en los APBs, que pueden ser tanto de naturaleza lineal como circular [5, 20]. Se pueden distinguir ADN circular telomérico bicatenario (círculo T), ADN circular monocatenario parcial (círculos G y círculos C), ADN bicatenario lineal de

alto peso molecular (complejo T) [20]. A pesar de esto, este marcador no es excluyente de ALT+ ya que los círculos t y los c se han detectado en células tumorales TA+ y en células madre embrionarias humanas con telómeros largos [5].

Se ha comprobado que en células ALT+ se ha detectado ADN telomérico en el citosol lo que implica la presencia de ECTRs fuera del núcleo [28].

Teniendo en cuenta toda esta información, queremos comprobar si esas ECTRs son liberadas al medio extracelular ya que de ser así podrían tratarse de un novedoso marcador tumoral. De esta forma, este trabajo de fin de grado tiene como objetivos:

- Averiguar la localización nuclear, citoplasmática o extracelular de estas ECTRs en células tumorales y caracterizar su secuencia por NGS (*Next Generation Sequencing*).
- Comprobar si las roturas generadas en los extremos teloméricos dentro de los APBs de estas células producen la formación de fusiones asociadas a procesos de homología.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares utilizadas

Las líneas de células tumorales humanas utilizadas en las diferentes técnicas fueron:

- 1 línea de células de cáncer de cérvico-uterino: HeLa.
- 1 línea de células de cáncer colorrectal: HCT 116.
- 3 líneas de células de osteosarcoma: U2OS (U2OS 1 y U2OS 2) y SaOS-2.

Las células ALT+ serán las de las líneas U2OS 1, U2OS 2 y SaOS-2. Las células ALT-, es decir, TA+, serán las de las líneas HeLa y HCT 116.

2. Cultivo de células tumorales

Se cultivaron las células tumorales en placas Petri de 150mm de diámetro (Falcon® 150mm TC-treated Cell Culture Dish) en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco) suplementado con 5 U/ml de penicilina (Gibco), 5 µg/ml de estreptomina (Gibco), 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado, a 37°C con un 5% de CO₂ en el aire durante 2 semanas.

En el momento de empezar a trabajar con estas células, había aproximadamente 20 x 10⁶ células por placa. Se recogieron todas las células y se fijaron en PFA al 4% durante 10 minutos para posterior uso en los diferentes experimentos.

3. Contaje celular

Se cuantificó la concentración celular usando la cámara de Neubauer y la fórmula representada en la **Figura 1**.

De media, los valores de células obtenidos, por tipo de línea celular cultivadas en placas Petri de 150mm, a los dos días desde la tripsinización y la nueva siembra fueron los siguientes:

- HeLa: 40 x 10⁶ células.
- HCT 116: 31,5 x 10⁶ células.
- U2OS 1: 31,8 x 10⁶ células.
- U2OS 2: 39,3 x 10⁶ células.
- SaOS-2: 31,5 x 10⁶ células.

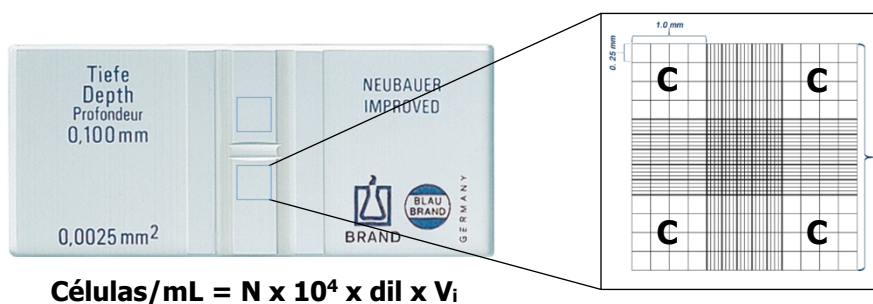


Figura 1. Imagen de la cámara de Neubauer y las cuadrículas de recuento de células. Esta cámara se utiliza para determinar el número de células por unidad de volumen de un líquido, en este caso en medio de cultivo. Para el

recuento de estas células se contó el número de células de los cuatro cuadrados grandes de las esquinas señalados por una "C". Se hizo la media (N) de las cuatro mediciones obtenidas, es decir, de las células presentes en 1mm² (0,1μL), y se multiplicó por el factor de dilución (dil), por el volumen en el que he resuspendido las células inicialmente (Vi) y por 10⁴ (factor de conversión para tener la cantidad de células por mL). Imágenes obtenidas de internet a partir de las páginas web: <https://www.brand.de/es/camaras-de-recuento> y <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>.

4. Visualización de las células en cultivo

La observación de las células para su mantenimiento se realizó a través del microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 con un objetivo 10x.

5. Extracción ADN citoplasmático y nuclear de células HeLa y U2OS 1

Para la extracción del ADN de la fracción nuclear y citoplasmática, seguimos los pasos indicados en el apartado "*Fractionation and cytosolic DNA and RNA extraction*" en Métodos del artículo "*Cytosolic Genomic DNA functions as a Natural Antisense*" [29] descrito a continuación.

La separación de las fracciones nuclear y citoplasmática de células HeLa y U2OS 1 se realizó mediante el uso de la centrifugación diferencial. Esta se basa en la separación por tamaño de las moléculas a partir de la fuerza centrífuga. Para ello se utiliza una serie de centrifugaciones repetidas a diferentes tiempos y velocidades, siendo estas últimas de forma incremental. El proceso seguido para las centrifugaciones viene indicado en la **Figura 2**.

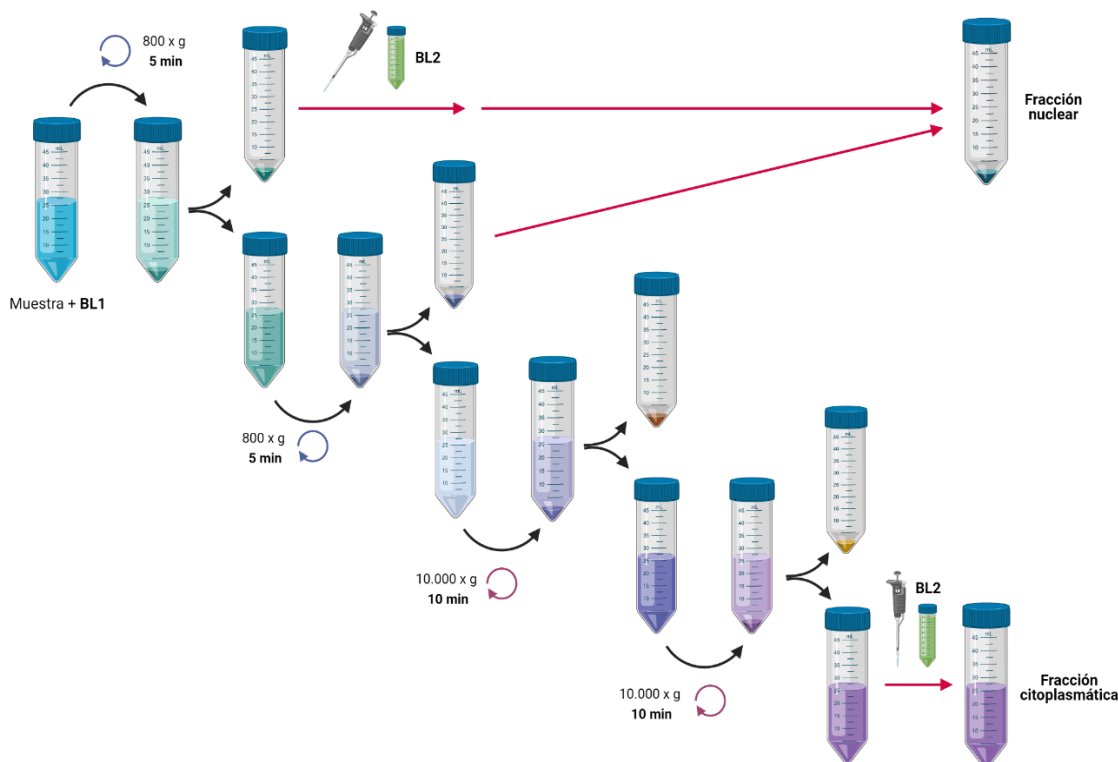


Figura 2. Esquema de los pasos a seguir en la centrifugación para separar las fracciones nuclear y citoplasmática. A partir de las muestras celulares, con el primer tampón de lisis, se hacen centrifugaciones repetidas

a diferentes velocidades y tiempos. A las fracciones obtenidas se les añadirá el segundo tampón de lisis. Las centrifugaciones se realizaron en una Centrifuga Hi-speed SORVALL RC6 PLUS (Rotor: F13S-14X50CY). BL1: 1^{er} Tampón de lisis (*Buffer lysis*). BL2: 2^o Tampón de lisis. Figura creada a partir de Biorender.

Para realizar la separación primero fue necesario lisar el extracto celular obtenido que contenía 15×10^6 células (5×10^6 células por columna de aislamiento de ADN). Se añadió un primer tampón de lisis que contenía 20 mM HEPES (pH=7,4), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 1 mM EDTA, y se dejó incubar 20 minutos a 4°C. A continuación, se lisaron las células mecánicamente pasando 15 veces el extracto con tampón de lisis por una aguja de calibre 25. Se realizaron las primeras centrifugaciones a 800 x g durante 5 minutos y de aquí se obtuvo la fracción nuclear a partir de los pellets de cada centrifugación. Las siguientes centrifugaciones se realizaron a 10.000 x g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante obtenido, que pasará a formar la fracción citoplasmática. Todas las centrifugaciones fueron realizadas en un Centrifuga Hi-speed SORVALL RC6 PLUS (Rotor: F13S-14X50CY).

A las fracciones obtenidas se les añadió un segundo tampón de lisis que contenía 50 mM HEPES (pH=8,0), 150 mM NaCl, 10% de glicerol, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,5% de SDS y 100 µg/mL de proteinasa K (Sigma-Aldrich) y 1 mg/mL RNase A y se dejó incubar 1h a 37°C.

Para extraer el ADN de las fracciones obtenidas se usaron 2 tipos de columnas:

- Zymo-Spin Columns (Zymo Research) para ADN: recogen material genético de >30kb.
- QIAquick Spin Columns (Qiagen): recogen material <10kb.

A partir de 2 columnas de Zymo Research y 1 de Qiagen, y mediante otra serie de centrifugaciones para eluir y lavar, se separó el material genético. Las centrifugaciones se realizaron en una Centrifuga 5417C Eppendorf.

Se cuantificó mediante el espectrofotómetro Qubit (ThermoFisher) que es capaz de medir fluorimétricamente la cantidad de material genético. Esto se realizó gracias a la unión de un marcador fluorescente a las muestras.

6. Aislamiento ADN liberado al espacio extracelular de células HeLa y U2OS 1

Para el aislamiento del ADN libre de células circulantes (Circulating cell-free DNA, cfDNA) del sobrenadante celular usamos el protocolo basado en el artículo "*UltraPrep is a scalable, cost-effective, bead-based method for purifying cell-free DNA*" [30]. El proceso viene descrito en la **Figura 3**.

Las muestras de sobrenadante celular fueron recogidas de 2 placas de 150mm de 20×10^6 de células cada una.

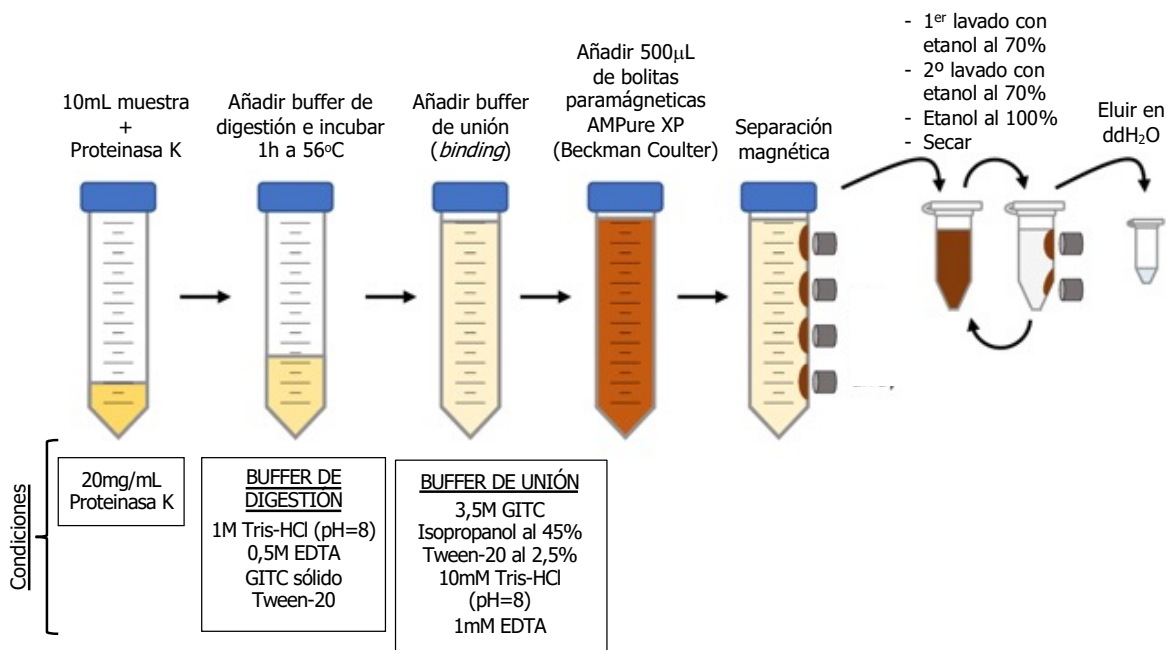


Figura 3. Proceso seguido para la extracción de ADN a partir de sobrenadante de cultivo celular. Imagen obtenida del artículo "UltraPrep is a scalable, cost-effective, bead-based method for purifying cell-free DNA"[30].

7. Monocapa de células en portaobjetos

Para la realización del resto de experimentos descritos, se hace necesaria la utilización de una capa fina de células conseguida a partir de una suspensión. Para ello se utilizará un kit para hacer Cytospin (Clip para portaobjetos, portaobjetos, filtro y cytofunnel) y una citocentrífuga (ThermoFisher) (**Figura 4**). Gracias a la fuerza centrífuga de la citocentrífuga, las células de la suspensión serán proyectadas hacia el portaobjetos creando la monocapa deseada. La información fue obtenida a partir de la página web: <https://sumanlab.com/wp-content/uploads/2020/07/51-Citocentrifuga.pdf>

Primero, se fijaron las células recogidas de un cultivo celular en en PFA al 4% durante 10 minutos. Después se hicieron diluciones de las muestras en PBS 1x. Se colocó el kit como indica la **Figura 4** y se cargó 100µL de muestra de células en el cytofunnel. A continuación, se centrifugó durante 1 minuto a 600 rpm y, finalmente, se obtuvieron portaobjetos con una monocapa de células.

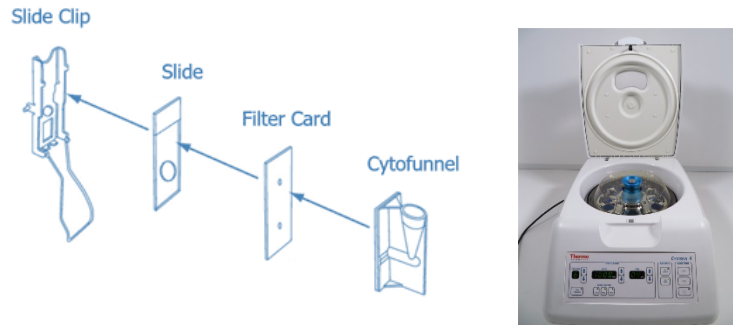


Figura 4. Esquema de montaje del kit de cytospin y citocentrífuga para la creación de una monocapa de células sobre un portaobjetos. El orden a seguir para la correcta utilización del kit de Cytospin viene indicado en la imagen de la izquierda: clip para portaobjetos (*slide clip*), portaobjetos (*slide*), filtro (*filter card*) y cytofunnel. La imagen de la derecha representa la citocentrífuga utilizada. Imágenes obtenidas de internet a partir de las páginas web: <https://www.euromabnet.com/protocols/cytospin.php#figure1> y <https://www.marshallscientific.com/Thermo-Scientific-Cytospin-4-Centrifuge-p/th-cyto4.htm>.

8. Cuantificación de la longitud telomérica y detección de fusiones teloméricas

Analizamos la longitud telomérica de las células mediante SABER-FISH (*Signal Amplification By Exchange Reaction and Fluorescence In Situ Hybridation*) [31]. Las fusiones teloméricas asociadas a procesos de homología o de NHEJ también fueron analizadas mediante este método.

La SABER-FISH fue realizada en una monocapa de células pegada sobre un portaobjetos a través del método de Cytospin descrito en el punto 7.

Este método se basa en la amplificación y detección simultánea de secuencias de ácido nucleico en muestras fijadas. El objetivo de este es mejorar la funcionalidad de las sondas FISH basadas en oligonucleótidos y conseguir una mayor amplificación de las secuencias en cuestión. Consta de 3 pasos [31]:

a. Síntesis in vitro del concatémero de la sonda mediante el mecanismo PER.

Para la realización de este método se utilizan sondas obtenidas comercialmente. En su extremo 3' se sitúan unos oligonucleótidos de ADNss a los cuales se unirán los marcadores de fluorescencia (sonda fluorescente). Para que este método proporcione una mayor eficiencia que la FISH convencional, es necesario alargar la secuencia de oligonucleótidos de la sonda. Esto se consigue mediante el uso de ciclos PER (*Primer-exchange reaction*), mecanismo capaz de sintetizar, de forma autónoma, secuencias de ADNss aleatorias a partir de oligonucleótidos de ADN cortos (**Figura 5**). Para ello utiliza una horquilla catalítica unida a una polimerasa que añade repetidamente el mismo dominio de secuencia de 9pb (pares de bases) a los oligonucleótidos monocatenarios. De esta forma se obtiene la sonda con una secuencia de oligonucleótidos extendida de forma repetitiva llamada concatémero.

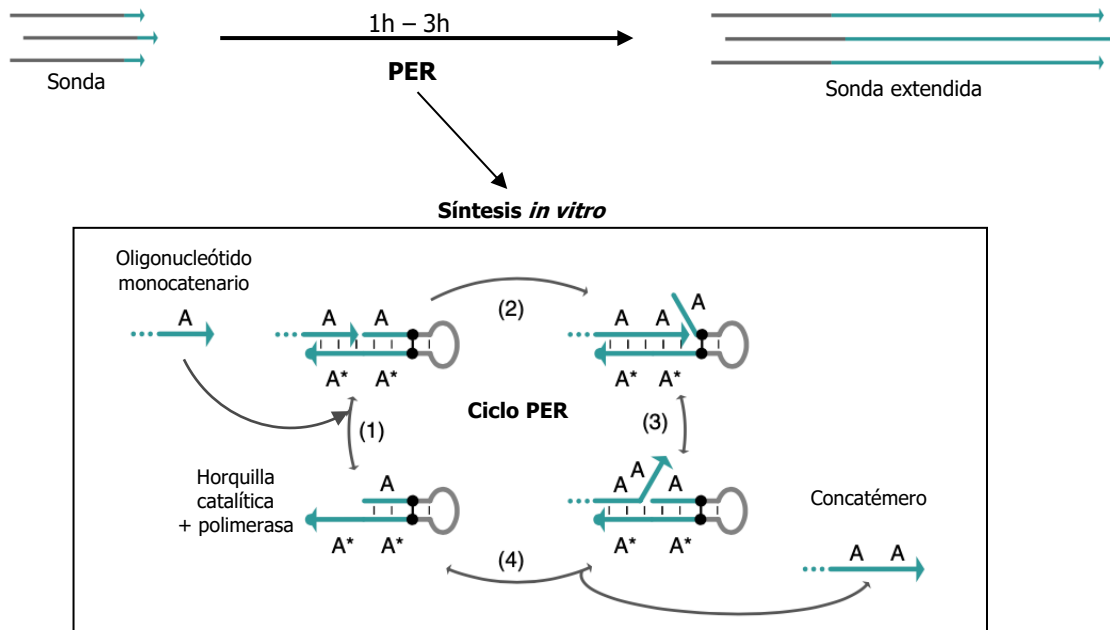


Figura 5. Representación del método de PER para la extensión de los oligonucleótidos de las sondas. La síntesis *in vitro* de los oligonucleótidos se realiza a partir de los ciclos PER en los que participan una horquilla catalítica unida a una polimerasa. De esta manera se forma el concatémero, por repeticiones de la secuencia de 9pb del oligonucleótido [31].

b. Hibridación *in situ* de la muestra con la sonda.

Una vez realizadas las diferentes rondas de amplificación de la sonda mediante PER, se procede a su hibridación *in situ* con la secuencia de interés (**Figura 6**).

c. Hibridación de la sonda fluorescente.

Después se hará la hibridación de la sonda fluorescente, sonda unida a un fluoróforo, al concatémero extendido de la sonda unida a mi secuencia de interés (**Figura 6**).

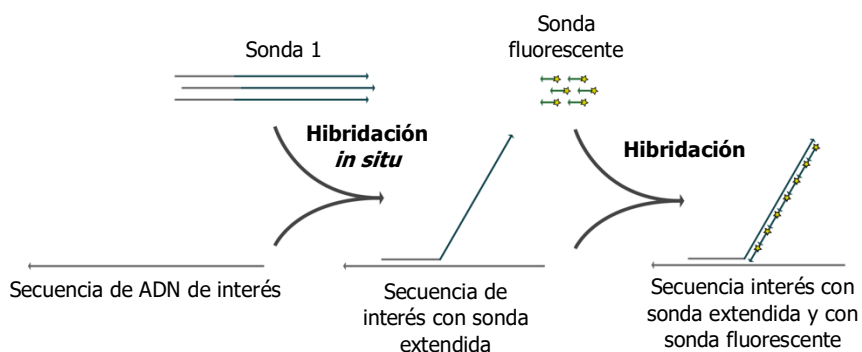


Figura 6. Hibridaciones realizadas para la detección de la secuencia de ADN de interés mediante la SABER-FISH. La primera hibridación será la unión de la sonda complementaria a mi secuencia de interés. El siguiente paso será la hibridación de la sonda fluorescente al oligonucleótido extendido de la sonda anterior [31].

Además de anteriores pasos, hemos añadido un paso extra llamado "*branching*", que se realiza antes de hibridar con la sonda fluorescente, en el que creamos sondas ramificadas a partir de sondas "puente" (**Figura 7**). Este paso permite aumentar más los niveles de señal fluorescente y lograr mejores resultados a la hora de medir cualquier cantidad de ADN, indierentemente de si presenta un pequeño tamaño [31].

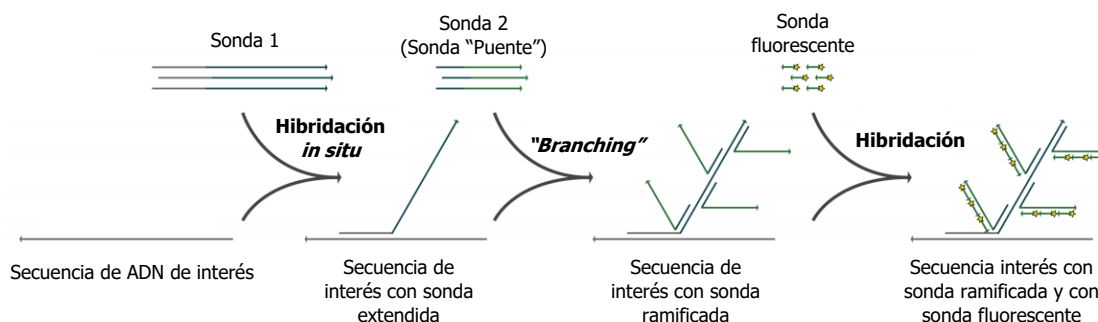


Figura 7. Hibridaciones realizadas junto con "branching" para aumentar la detección de la secuencia de ADN de interés mediante la SABER-FISH. Se añade un paso extra llamado "*branching*" para aumentar los niveles de señal fluorescente. En este paso, se unirá una sonda "puente" a la sonda de la primera hibridación consiguiendo una sonda ramificada [31].

Las sondas de hibridación utilizadas fueron:

- Sonda 1: creada mediante PER a partir de una sonda comercial.
- Sonda 2: creada mediante PER a partir de una sonda diseñada complementaria a sonda 1.
- Sonda fluorescente: llevan incorporadas un fluoróforo que puede ser Cy3.5 (Integrated DNA Technologies, IDT) o Alexa Fluor 488 (Integrated DNA Technologies, IDT).

Para el diseño de las sondas y horquillas se siguieron los datos apuntados en la **Tabla 1**. Las secuencias específicas no se pueden mostrar porque son objeto de una patente.

Diseño de secuencias	
Horquilla	5'- A(Secuencia de 9pb del oligonucleótido)GGGCCTTTTGGCCC(Secuencia inversa al oligonucleótido complementaria)T(Secuencia inversa al oligonucleótido complementaria)TTTTTT -3'
Clean.G	5'- CCCCAGAAAGTGGCCTCGGGCCTTTTGGCCCGAGGCCACTTTCG -3'
Sonda 1	5'- (Secuencia diana de 48pb) TTT (Secuencia de 9pb del oligonucleótido) -3'
Sonda 2	5'- (Secuencia de 28pb complementaria a las 9pb del oligonucleótido) TTT (Secuencia de 9pb) -3'
Sonda fluorescente	5'- /5dye/TT(Secuencia inversa al oligonucleótido complementaria)T(Secuencia inversa al oligonucleótido complementaria)T -3'

Tabla 1. Secuencias modelo para el diseño de las diferentes secuencias de las horquillas y sondas [31].

Condiciones del experimento

La SABER-FISH se realizó en muestras ALT+ (U2OS 1, U2OS 2 y SaOS-2) y ALT- (HeLa y HCT 116) con el fin de detectar los telómeros de células y dos tipos de fusiones teloméricas:

- Fusión asociada a NHEJ: TTAAA.
- Fusión asociada a homología: ALT-H.

Las condiciones utilizadas se describen en la **Tabla 2**. En la **Tabla 3** se incluyen los espectros de absorción y emisión de los fluoróforos utilizados en las sondas fluorescentes.

1ª condición			2ª condición		
Sonda 1	Sonda 2	Sonda fluorescente	Sonda 1	Sonda 2	Sonda fluorescente
Frente a los telómeros (1µg)	No	Sonda Cy3.5	Frente a los telómeros (1µg)	No	Sonda Cy3.5
Frente a la fusión TTAAA (5µg)	Frente a sonda 1	Sonda Alexa Fluor 488	Frente a la fusión ALT-H (5µg)	Frente a sonda 1	Sonda Alexa Fluor 488

Tabla 2. Condiciones que se utilizaron para el desarrollo de la SABER-FISH.

Espectros absorción y emisión de los fluoróforos		
	Fluoróforo Cy3.5	Fluoróforo Alexa Fluor 488
Espectro absorción (nm)	581	492
Espectro emisión (nm)	596	517
Color emisión	Rojo	Verde

Tabla 3. Espectros de absorción y emisión de los fluoróforos Cy3.5 y Alexa Fluor 488. Información obtenida de internet a partir de la página web de la empresa comercial: <https://eu.idtdna.com/site/catalog/modifications/dyes>.

Protocolo de PER: Amplificación oligonucleótidos de las sondas

Para la síntesis *in vitro* del concatémero, primero se preparó la mezcla de PER, sin horquilla y sin sonda, que contenía: PBS 10x, 100 mM MgSO₄, mezcla de dNTPs, 1 µM de horquilla Clean.G, Bst LF polimerasa (McLab) y ddH₂O. La horquilla Clean.G se usa para filtrar una pequeña cantidad de nucleótidos contaminantes que pueden detener la extensión.

A continuación, se añadió la horquilla de PER (5 μM) y se dejó incubar a 37°C durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, se añadió 10 μM de la sonda 1 sin extender (**Figura 8**) y se incubó a 37°C durante 2h, y 10 μM de la sonda 2 sin extender, y se incubó a 37°C durante 1.5h, que son los tiempos de extensión necesarios para que se dé el concatémero deseado.

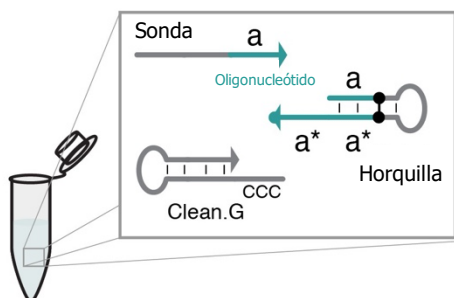


Figura 8. Representación de la sonda y de las horquillas utilizadas [31].

Después, se calentó a 80°C durante 20 minutos para inactivar la polimerasa Bst. A partir de aquí, obtuvimos la sonda 1 y 2 extendidas.

Para comprobar la longitud que presentaron estas sondas, las dejamos correr en un gel de agarosa al 2%. Para cuantificar las sondas que obtuvimos, estas se midieron con el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher).

Hibridación *in situ*

Para la hibridación *in situ* se permeabilizaron las muestras con una solución de PBS 1x y Triton X-100 al 0,5% durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron con PBS 1x y Tween-20 al 0,1% durante 2 minutos. Se incubaron en HCl al 0,1 N durante 5 minutos y se hicieron varios lavados con SSCT (SSC 2x y Tween-20 al 0,1%). Se dejó incubar en una solución de SSCT y formamida al 50% durante 5 minutos y después se añadió la misma solución y se dejó incubar a 60°C durante 1h. A cada portaobjetos se le añadió 120 μL del mix de hibridación (**Tabla 4**) junto con 1 μg de sonda 1 ya extendida y se dejó incubar 80°C durante 3 minutos. A partir de aquí, las muestras se dejaron toda la noche a 44 °C en un ambiente húmedo (cámara húmeda).

"Branching"

Para que se diera la hibridación de la sonda 2 con la sonda 1 fue necesario añadir 120 μL del mix de "branching" (**Tabla 4**) junto con 1 μg de sonda 2, con previos lavados con SSCT 2x. La mix se dejó incubar 1.5h a 37°C.

Hibridación sonda fluorescente

Tras varios lavados con SSCT 2x y PBS 1x, se procedió a incubar 1h a 37°C con 120 μL de mix de hibridación de la sonda fluorescente (**Tabla 4**) junto con 1 μM de sonda fluorescente. Después, se incubó con DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol) en dilución 1:1000 (Merck Millipore) para contrateñir los núcleos y se montó con medio de montaje de SABER-FISH (**Tabla 5**).

MIX DE HIBRIDACIÓN SONDA 1	MIX DE "BRANCHING"	MIX DE HIBRIDACIÓN SONDA FLUORESCENTE
Formamida al 50%	Formamida al 30%	
SSC 2x, pH=7	SSC 2x, pH=7	PBS 1x
1% Tween-20	1% Tween-20	0,1% Tween-20
10% Dextran sulfate	10% Dextran sulfate	10% Dextran sulfate
200 ng/μL RNase A	200 ng/μL RNase A	

Tabla 4. Contenido de los mixes utilizados en los diferentes pasos de la SABER-FISH [31].

MEDIO MONTAJE SABER-FISH

Glicerol al 80%
 PBS 1x
 20 mM Tris-HCl, pH=8
 2,5 mg/mL Propyl gallate

Tabla 5. Contenido medio de montaje para SABER-FISH [31].

Una vez realizados estos pasos se tomaron imágenes de los portaobjetos con un microscopio confocal Leica SP5 provisto de los programas LAS AF.

Para medir la longitud telomérica se cuantificó la intensidad de fluorescencia del Cy3.5. Dicha cuantificación se realizó de manera manual en imágenes de células empleando NIS-Elements Viewer, ImageJ (Fiji) y Metamorph.

Para la detección de fusiones teloméricas, las imágenes fueron visualizadas con ImageJ (Fiji).

9. Inmunofluorescencia para el estudio de las estructuras PML-NBs

La inmunofluorescencia fue realizada en una monocapa de células pegada sobre un portaobjetos a través del método de Cytospin descrito en el punto 7 de **Materiales y métodos**.

Se permeabilizó con una solución de Triton X-100 al 0,2% con PBS 1x durante 10 minutos a RT (temperatura ambiente). Se bloquearon las uniones inespecíficas incubando durante 30 minutos en una solución de bloqueo que contenía 3% de albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) junto con PBS 1x.

En la **Tabla 6** se indican los anticuerpos y la dilución empleada. Los anticuerpos monoclonales fueron diluidos en una solución de PBS 1x, con BSA al 1% y con Triton X-100 al 0,1%.

El anticuerpo primario se incubó a RT durante 2 horas, mientras que el anticuerpo secundario se incubó durante una hora a RT. Se incubó con DAPI en dilución 1:1000 (Merck Millipore) y se montó con medio de montaje de SABER-FISH (**Tabla 5**).

	Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios + Sondas fluorescentes
PML-NBs	Ratón anti-PML (PG-M3), Santa Cruz Biotechnology (1:250)	Cabra anti-mouse-Alexa Fluor 488, Servicio de Microscopía del CNIC (1:500)

Tabla 6. Anticuerpos empleados en la inmunofluorescencia de PML-NBs. Se indica la casa comercial y, entre paréntesis, la dilución de trabajo empleada. PML-NBs: Cuerpos nucleares de Leucemia Promielocítica.

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica SP5 provisto de los programas LAS AF.

10. Ensayo para el análisis de la actividad telomerasa

La actividad telomerasa se midió mediante el protocolo de amplificación de las repeticiones teloméricas (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*, TRAP) fluorescente [32] con algunas modificaciones (**Figura 9**) [33, 34].

Dicho protocolo consiste en un primer paso en el que el extracto proteico de las células, donde se encuentra la telomerasa, se incuba con un oligonucleótido denominado TS (*Telomerase Substrate*) acoplado al fluoróforo Cy5 (**Tabla 7**; Integrated DNA Technologies, IDT). Este oligonucleótido actúa como sustrato para que la telomerasa adicione tres o más repeticiones teloméricas. De este modo, si la telomerasa está presente en las células, esta enzima elonga el oligonucleótido TS.

Espectros absorción y emisión del fluoróforo Cy5	
Espectro absorción (nm)	648
Espectro emisión (nm)	668
Color emisión	Infrarrojo

Tabla 7. Espectros de absorción y emisión del fluoróforo Cy5. Información obtenida de internet a partir de la página web de la empresa comercial: <https://eu.idtdna.com/site/catalog/modifications/dyes>.

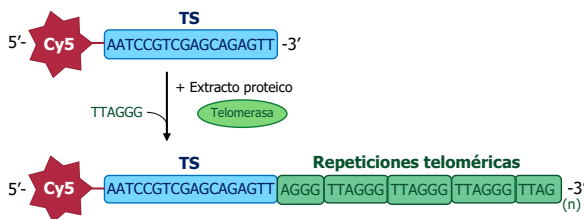
En segundo lugar, los productos obtenidos de la actividad de la telomerasa son amplificados mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) gracias a la Taq polimerasa. Para ello se usan el oligonucleótido "forward" TS y un oligonucleótido "reverse" complementario a las secuencias teloméricas repetidas, ANCOR. Este último presenta un "ancla" de 6 pb en el extremo 5' que no es telomérico ni complementario a las secuencias teloméricas. La presencia de este "ancla" reduce

la formación de artefactos de PCR, como por ejemplo formación de dímeros de los oligonucleótidos, y evita la elongación 3' de los productos de la telomerasa al tapar el extremo 3' de esos productos después del primer ciclo de PCR [32, 35].

En dicha PCR se incluye además el oligonucleótido TSOG de 36 pb que actúa como control interno de la reacción. Este control sirve para detectar los falsos negativos originados por la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa que se identificaría por la desaparición de la banda de dicho control [34]. El oligonucleótido TSOG es amplificado por el oligonucleótido "forward" TS y su propio oligonucleótido "reverse", OG. Por lo tanto, el control interno se considera semicompetitivo, ya que solo comparte uno de los oligonucleótidos, TS, utilizados para amplificar los productos de la telomerasa.

Una vez amplificados dichos productos, éstos se separan mediante electroforesis y se visualizan gracias al fluoróforo Cy5. De esta forma, a mayor actividad telomerasa, mayor es la intensidad de las bandas y mayor es además el número de bandas.

1. Adición de las repeticiones teloméricas por la telomerasa.



2. Amplificación mediante PCR.

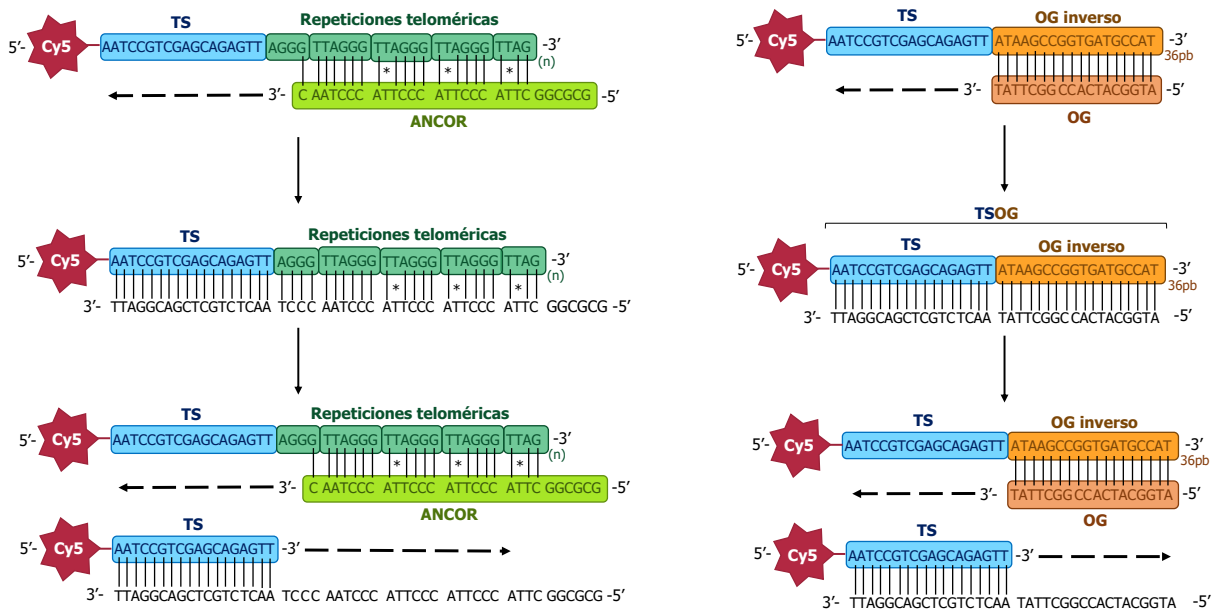


Figura 9. Descripción de la técnica de TRAP fluorescente empleada para medir la actividad telomerasa presente en células tumorales humanas ALT+ y ALT-. Primero se extrajeron las proteínas del cultivo celular, donde se encontrará la telomerasa, e incubaron con el oligonucleótido TS (sustrato para la telomerasa) acoplado al

fluoróforo Cy5. En caso de estar presente la telomerasa, este sustrato se elongará dando lugar a repeticiones teloméricas. A continuación, los productos obtenidos se amplificaron mediante PCR usando los oligonucleótidos TS y ANCOR. En dicha PCR se incluyó además el oligonucleótido TSOG, que se amplificaría con los oligonucleótidos TS y OG, actuando como control interno de la reacción [32, 33, 34].

Previo al comienzo del protocolo, se necesita extraer las proteínas del cultivo celular de las diferentes líneas tumorales ALT+ (U2OS 1, U2OS 2, SaOS-2) y ALT- (HeLa, HCT 116).

Para ello primero, se extrajeron las diferentes líneas tumorales cultivadas y se centrifugaron para descartar el medio de cultivo y quedarnos solamente con el extracto celular.

A continuación, para extraer las proteínas, se lisaron las muestras siguiendo los siguientes pasos:

1. Añadir Buffer de lisis (**Tabla 8**).
2. Dejar incubar 30 minutos a 4°C.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
4. Recoger el sobrenadante.

BUFFER DE LISIS	
Solución stock	Añadir al usar
10 mM Tris-HCL, pH=7,5	10% CHAPS
1 mM MgCl ₂	0,1 M PMSF
1 mM EGTA	Coctel inhibidor de proteasa (1000x)
10% Glicerol ddH ₂ O	14,3 M B-mercaptoetanol

Tabla 8. Contenido del buffer de lisis utilizado para la extracción de proteínas. A la izquierda viene indicado el contenido del buffer stock. A la derecha se indica lo que se tiene que añadir al buffer stock en el momento de utilización de este [32].

La concentración de proteína se determinó mediante el método Bradford empleando el kit DC™ Protein Assay (BIO-RAD). La cantidad de proteína empleada para el TRAP fue 1 µg para las células en un volumen total de 1 µL.

Posteriormente, se incubó durante 30 minutos a 37°C en 48,6 µL de Mix A que contiene Buffer TRAP (**Tabla 9**), ddH₂O, 2,5 mM dNTP y 100 ng/µl del oligonucleótido Cy5-TS (5'-/5Cy5/AATCCGTCGAGCAGAGTT-3').

BUFFER TRAP

1 M Tris-HCL, pH=8,3
1 M MgCl₂
2,5 M KCl
0,005% Tween-20
0,5 M EGTA
ddH₂O

Tabla 9. Contenido del buffer de TRAP utilizado para que se dé la elongación de secuencias teloméricas mediante la telomerasa [32].

Después se consiguió el volumen final de la reacción de 50 µl al añadir 0,4µL de Taq polimerasa y 1µL de la mezcla de oligonucleótidos: 100 ng/µl de OG (5'-ATGGCATCACCGGCTTAT-3'), 100 ng/µl de ANCOR (5'-GCGCGGCTAACCCCTAACCTAAC-3') y 0,01 attomoles/µl de TSOG (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTATAAGCCGGTGATGCCAT-3').

Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos para inactivar la telomerasa y después se sometieron a 30 ciclos de amplificación (95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos y 72°C 30 segundos) y a un ciclo de extensión a 72°C durante 7 minutos. Estos pasos se realizaron en un termociclador.

Para la detección de la actividad telomerasa, los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 10% mediante electroforesis a 125 V utilizando TBE 0,5 como tampón de funcionamiento. Estos productos fluorescentes se visualizaron con Typhoon 9400. Se usó como control positivo las células tumorales HeLa. Como controles negativos se emplearon el buffer de lisis y ddH₂O.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta que los grupos utilizados son ALT-, aquellas líneas celulares que no tienen presente el mecanismo de ALT pero si tienen actividad telomerasa (TA+), y ALT+, aquellas líneas que tienen activo el mecanismo de ALT y no presentan actividad telomerasa, los resultados obtenidos se indican a continuación.

1. Aislamiento del ADN de núcleo, citoplasma y sobrenadante de cultivo celular de células ALT+ y ALT- con el fin de caracterizar fusiones teloméricas.

1.1. Cantidad de ADN insuficiente para secuenciar

Para comprobar si las repeticiones teloméricas extracromosómicas (ECTR) son liberadas al medio extracelular, extrajimos el ADN de HeLa y U2OS 1, tanto de núcleo, citoplasma y sobrenadante, siguiendo el proceso descrito en los apartados 5 y 6 de **Materiales y métodos**.

Una vez aislado el ADN de estas células, se cuantificó la cantidad de este mediante el dispositivo Qubit. Los resultados obtenidos se indican en la **Tabla 10**.

NÚCLEO						
	HeLa			U2OS 1		
ng/ μ L	0,346	0,103	0,181	0,144	0,0554	0,033
ng totales	12,11	3,605	6,335	5,04	1,939	1,155
CITOPLASMA						
	HeLa			U2OS 1		
ng/ μ L	0,0631	0,0419	0,0464	0,0217	0,0199	0,0185
ng totales	2,2085	1,4665	1,624	0,7595	0,6965	0,6475
SOBRENADANTE DE CULTIVO CELULAR						
	HeLa		U2OS 1			
ng/ μ L	0,058	0,071	0,107	0,093		
ng totales	17,4	21,3	32,1	27,9		

Tabla 10. Cuantificación del ADN extraído de núcleo, citoplasma y sobrenadante de cultivo celular de células HeLa (ALT-) y U2OS 1 (ALT+). Las dos primeras mediciones de núcleo y citoplasma se realizaron en las columnas "Zymo-Spin Columns" (Zymo Research) y la última medición se realizó en las columnas "QIAquick Spin Columns" (Qiagen). Cantidad medida en ng/ μ L y en ng totales (multiplicado por el volumen final, 35 μ L en el caso del núcleo y citoplasma y 300 μ L en el del sobrenadante). Medición realizada a partir del espectrofotómetro Qubit.

Para comprobar si en el ADN extraído se encuentran las secuencias que buscamos, quisimos secuenciar, mediante NGS, el material genético obtenido. La cantidad de ADN mínima necesaria para realizar NGS de manera eficiente es de 200 ng. Como las cantidades obtenidas fueron más

bajas de la requerida para la secuenciación, será necesario amplificar esa cantidad para la posterior realización de NGS y así verificar la presencia de las ECTRs buscadas.

2. Caracterización de células ALT+ y ALT-.

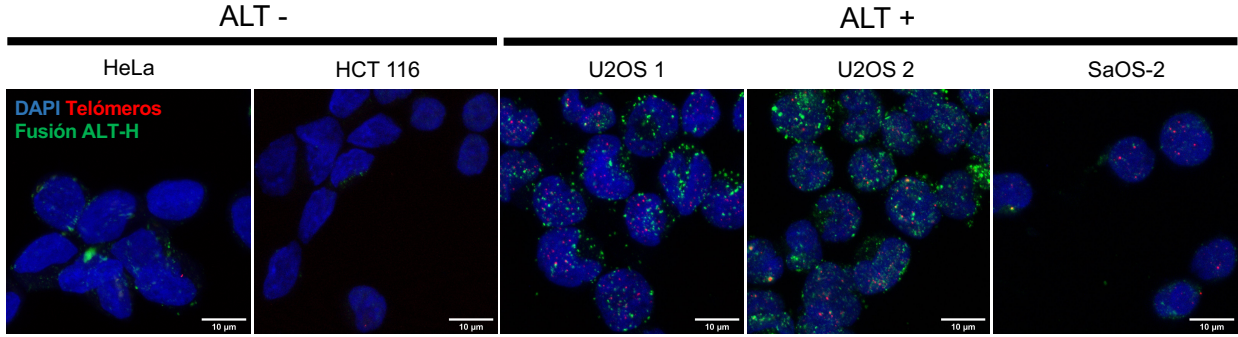
Con el fin de comprobar si las roturas que se producen en los extremos teloméricos dentro de los APBs producen la formación de fusiones asociadas a procesos de homología, previamente quisimos cerciorarnos de que las líneas tumorales utilizadas corresponden con los grupos ALT- o ALT+. Para ello se analizaron las características moleculares que sabemos que presentan las células ALT+: mayor heterogeneidad telomérica, presencia de APBs y ausencia de actividad telomerasa.

2.1. Mayor longitud telomérica y heterogeneidad en células ALT+

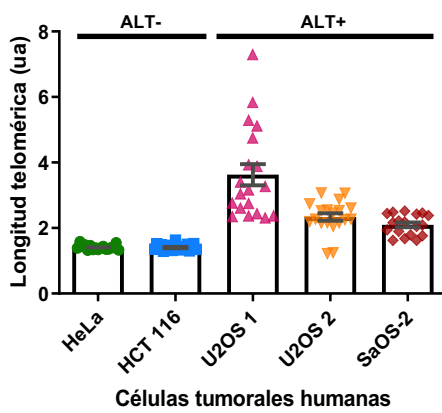
En primer lugar, se estudió la longitud telomérica de las diferentes células. Esta se comprobó mediante la realización de la técnica de SABER-FISH siguiendo el proceso descrito en el apartado 8 de **Materiales y métodos**.

Las secuencias teloméricas fueron marcadas con la sonda Cy3.5 (**Figura 10 A**) y posteriormente se midió la intensidad de fluorescencia de esta sonda. Se observó que las células ALT+ presentaban longitudes más heterogéneas y de mayor tamaño en comparación con las células ALT- (**Figura 10 B, C, D**).

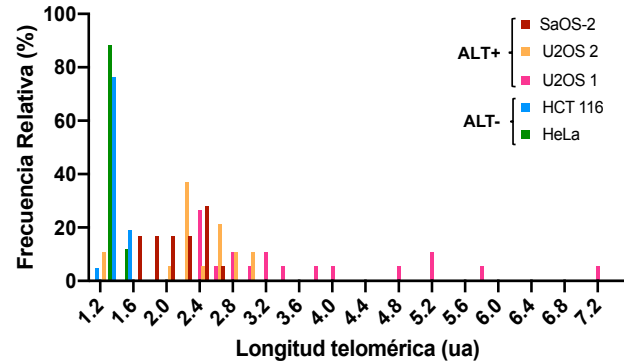
A



B



C



D

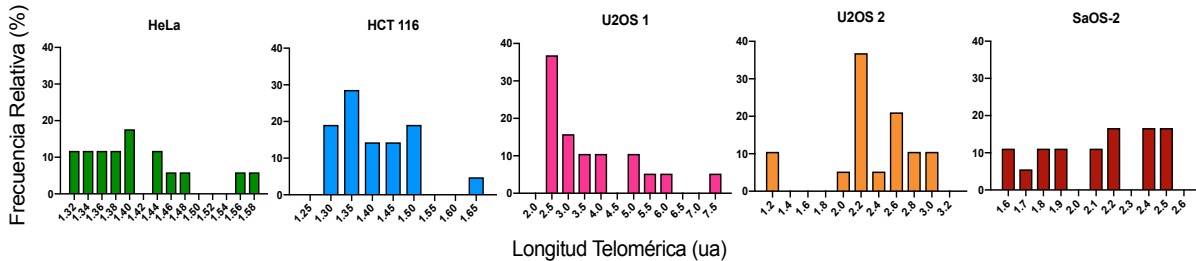


Figura 10. Cuantificación longitud telomérica en diferentes líneas tumorales humanas ALT- (HeLa y HCT 116) y ALT+ (U2OS 1, U2OS 2 y SaOS-2). (A) Presencia de secuencias teloméricas marcadas en rojo (fluoróforo Cy3.5) en las células ALT- y ALT+ (Escala: 10 μ m). (B) La longitud telomérica, medida en unidades arbitrarias (ua), que se obtuvo de la cuantificación de la señal de fluorescencia de Cy3.5 se representó en una gráfica de barras. Con el fin de comprobar la heterogeneidad, la distribución de frecuencias de las longitudes teloméricas fue representada mediante histogramas: todas las líneas celulares (C) agrupadas y (D) de manera individual.

Las imágenes fueron visualizadas con un microscopio confocal Leica SP5 provisto del programa LAS AF. Las mediciones se realizaron mediante los programas Leica LAS X, ImageJ (Fiji), NIS-Elements Viewer y Metamorph. La gráfica de barras y los histogramas fueron creados a partir de GraphPad Prism 8.

2.2. Mayor presencia de PML-NBs en células ALT+

Se quiso comprobar la presencia de APBs, es decir, estructuras PML-NBs con ADN telomérico asociado, pero los experimentos realizados no llegaron a ponerse a punto para incluirse en este trabajo. Sin embargo, si se comprobó la cantidad de PML-NBs en ambos grupos celulares.

Se realizó una inmunofluorescencia, proceso descrito en el apartado 9 de **Materiales y métodos**, para detectar los PML-NBs en diferentes líneas cancerosas (**Figura 11**). Se usó un anticuerpo primario de ratón anti-PML (PG-M3 *Santa Cruz Biotechnology*[®]) y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón unido al fluoróforo Alexa Fluor 488. Finalmente, se observó presencia más numerosa de estos cuerpos nucleares en células ALT+ en comparación con las células ALT-.

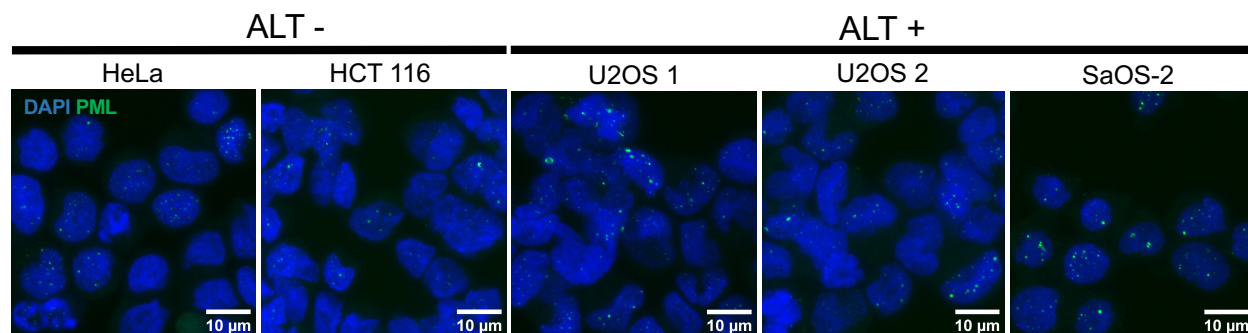


Figura 11. Inmunofluorescencia de los cuerpos nucleares PML en diferentes líneas tumorales. Presencia de PML-NBs marcados en verde (fluoróforo Alexa Fluor 488) en las células ALT- y ALT+. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Leica SP5 provisto del programa LAS AF. Escala: 10µm.

2.3. Ausencia de actividad telomerasa en células ALT+

La actividad de la telomerasa se estudió mediante la técnica de TRAP descrita en el apartado 10 de **Materiales y métodos**.

En el gel (**Figura 12**) se puede observar la existencia, en células ALT-, de una escalera incremental de ADN de 6 pb que corresponde a los diferentes productos de la telomerasa amplificados. Esta escalera refleja la cantidad de actividad telomerasa por equivalente celular o proteína utilizada en el ensayo. Además, se puede observar una banda, situada debajo de los productos de la telomerasa, que corresponde con el control interno de la reacción del TRAP (36 pb), es decir, el oligonucleótido TSOG. La presencia de esta banda nos asegura que la Taq polimerasa no ha sido inhibida y que, por tanto, la amplificación ha sido correcta.

Con los resultados obtenidos en el gel, se verificó la presencia de la actividad telomerasa en células ALT-. También, se verificó la ausencia en las células ALT+ ya que no se encontró dicha escalera de ADN. Por otro lado, no fue necesario cuantificar la actividad ya que solo se quiso ver la presencia o ausencia de la enzima.

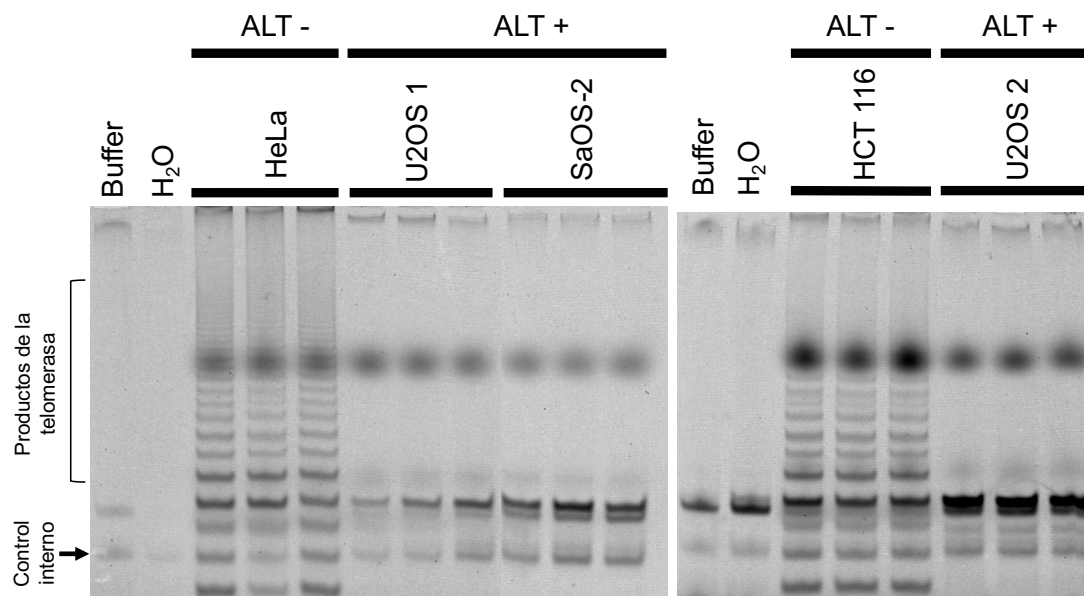


Figura 12. Análisis de la actividad telomerasa en diferentes líneas tumorales humanas ALT- y ALT+ utilizando Cy5-TRAP. La medición de la actividad fue realizada mediante TRAP fluorescente. Los resultados fueron mostrados en un gel de acrilamida no desnaturante al 10% y visualizados con Typhoon 9400. Se emplearon como controles negativos el buffer de lisis usado para la técnica y el H₂O. Como control positivo se utilizaron las células HeLa, ya que está comprobado la activación de esta enzima en dicha línea [36].

3. Detección de fusiones asociadas a homología o a NHEJ

Como objetivo final, se quiso comprobar si las roturas generadas en los extremos teloméricos daban lugar a la formación de fusiones ALT asociadas a procesos de homología o a procesos de no homología (NHEJ).

3.1. Mayor presencia de ambas fusiones en células ALT+, sobretodo de fusiones ALT-H

Para diferenciar las distintas fusiones ALT entre las ECTRs se usó la técnica SABER-FISH descrita en el apartado 8 de **Materiales y métodos**.

Se realizó la técnica SABER-FISH para dos condiciones:

- Telómeros + Fusión ALT asociada a NHEJ (TTAAA).
- Telómeros + Fusión ALT asociada a homología (ALT-H).

La sonda fluorescente usada para detectar telómeros fue la sonda Cy3.5 y la que se usó para detectar las fusiones fue la sonda Alexa Fluor 488.

Se detectaron las señales de fluorescencia y se comprobó que ambas fusiones tienen más predominancia, siendo más destacable la presencia de fusiones ALT-H frente a las fusiones TTAAA, en las células ALT+ que en las ALT- (**Figura 13**).

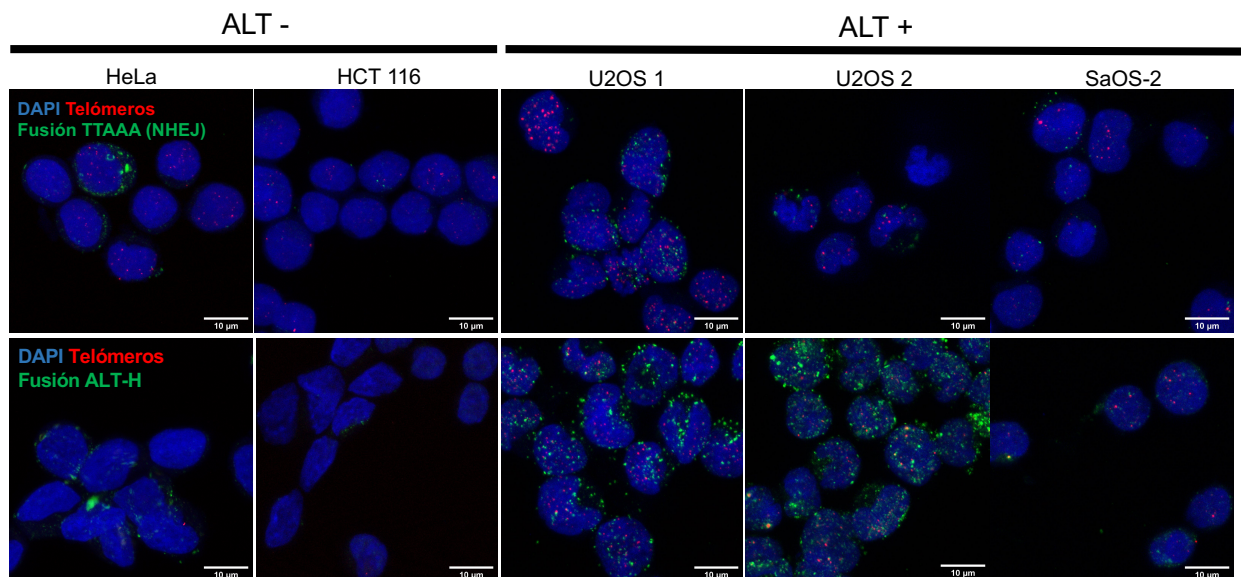


Figura 13. Detección de telómeros y fusiones asociadas a NHEJ (fusión TTAAA) y de fusiones asociadas a homología de secuencias (fusión ALT-H) en células ALT- y ALT+. En la parte superior, se pueden observar las imágenes tomadas para las fusiones TTAAA (verde), es decir, las fusiones no asociadas a homología. En la parte inferior, se observan las fusiones ALT-H (verde), es decir, las fusiones asociadas a homología entre las secuencias. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Leica SP5 provisto del programa LAS AF. Escala: 10 μ m.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo se ha centrado en el estudio de secuencias teloméricas extracromosómicas y su posible implicación como potencial marcador tumoral.

A día de hoy, sabemos que las células tumorales han desarrollado mecanismos de evasión de la senescencia gracias al mantenimiento de los telómeros. Entre estos mecanismos se encuentran la activación de la telomerasa y el alargamiento alternativo de los telómeros. Las células que presentan este último muestran asociadas unas estructuras, los APBs, que parecen ser exclusivas de este mecanismo. Dentro de estas estructuras, se ha visto que se dan las condiciones óptimas para la liberación de secuencias teloméricas (ECTR) debido a las roturas de doble cadena. Así, se han descrito la presencia de ECTRs en el citosol de células con presencia del mecanismo ALT, lo que nos quiere decir que estas secuencias teloméricas no son exclusivamente del núcleo, si no que se puede dar su liberación al citoplasma. Esto nos puede dar una pista a la hora de establecer la posibilidad de que estas secuencias se exociten fuera de la célula. Pero para ello, primero habría que averiguar la cantidad de ECTRs en el medio intracelular y, en caso de no encontrarse ninguna, comprobar si son expulsadas al medio extracelular ya que dentro no tendrían funcionalidad.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y los expuestos en la introducción, en este trabajo se ha intentado demostrar la localización de las ECTRs a nivel celular con el fin de caracterizar su secuencia y averiguar más información sobre estas secuencias teloméricas liberadas. Además, se ha querido comprobar si en células con el mecanismo ALT se dan fusiones asociadas a homología o a no homología y, en caso de ser así, comprobar si esas ECTRs fusionadas se dan dentro de los APBs.

En primer lugar, se quiso demostrar la presencia y localización de las ECTRs en células tumorales tanto ALT+ como ALT-. Para ello se extrajo el ADN siguiendo la metodología descrita anteriormente y se cuantifico la cantidad de este en las diferentes localizaciones deseadas (núcleo, citoplasma y medio extracelular). Desgraciadamente, la cantidad obtenida fue muy por debajo del mínimo esperado y requerido para realizar NGS. Esto nos hizo plantearnos si el procedimiento utilizado fue el más indicado para la extracción de este material genético. Debido a que existen múltiples posibilidades sobre cuál es la fuente de error, lo apropiado sería repetir el experimento con otro abordaje de extracción. A pesar de estos resultados tan poco eficientes, se decidió realizar una amplificación del material genético obtenido para la posterior secuenciación y así poder verificar la presencia de las fusiones buscadas. Este proceso final no ha podido ser incluido a tiempo en este trabajo.

Para comprobar que las líneas tumorales utilizadas presentaban el TMM esperado, es decir, la telomerasa o el ALT, se hicieron diferentes experimentos para comprobar ciertas características moleculares presentes en uno u otro mecanismo.

Primero, se comprobó la longitud telomérica de las células mediante la realización de la técnica SABER-FISH. Se demostró que las células ALT+ presentaban longitudes más heterogéneas y de mayor tamaño en comparación con la ALT-. Como ya se sabe, las células que presentan la telomerasa activa tienen longitudes de telómero homogéneas más cortas [21], lo que concuerda

con los resultados obtenidos. Después, se quiso comprobar la existencia de mayor cantidad de APBs en células ALT- pero los experimentos no se consiguieron poner a punto para incluirse en este trabajo. Por eso, se han incluido los resultados de la presencia de PML-NBs, a través de una inmunofluorescencia, en ambos grupos celulares. Estos resultados verifican la existencia de mayor cantidad de estos cuerpos nucleares en células ALT+. Otra de las características que se quiso comprobar es la presencia de actividad telomerasa. Mediante la técnica de TRAP, se confirmó la presencia de la actividad de esta enzima en células ALT- y, además, se demostró la ausencia de esta en células ALT+.

Estos resultados confirman que las líneas celulares utilizadas corresponden a los grupos esperados.

El último experimento realizado fue el de la detección de fusiones asociadas a procesos de homología y de fusiones asociadas a procesos de no homología (NHEJ). Esta detección se quiso realizar para comprobar si las ECTRs producidas en los APBs daban lugar a la formación de este tipo de fusiones. La realización de la técnica SABER-FISH para detectar las fusiones nos dio como resultado mayor presencia de ambas fusiones en células ALT+, pero siendo más destacable la presencia de fusiones ALT-H en comparación con las fusiones asociadas a NHEJ. Sin embargo, la explicación de la presencia de fusiones ALT-H en células ALT- está aún por determinar.

Para demostrar si esas fusiones se dan en APBs se hace necesario la realización conjunta de la SABER-FISH con una inmunofluorescencia, metodología que no ha podido ser realizada para este trabajo.

En conclusión, los resultados de este trabajo aportan fuerza a la idea de que las fusiones asociadas a procesos de homología (ALT-H) se encuentran presentes de forma muy abundante en las células ALT+ e invitan a seguir investigando al respecto. Por otro lado, pese a haber quedado muy lejos del objetivo inicial de secuenciar estas fusiones para su caracterización, se ha ido comprobando que metodología de extracción no es apropiada. Estos datos son relevantes para el grupo de investigación en el que se ha realizado este proyecto, el cuál trabaja sobre la hipótesis de que las fusiones generadas son expulsadas del núcleo y posiblemente también de la célula. Por tanto, la extracción, aislamiento y secuenciación del ADN de las fusiones, así como la detección de estas fusiones dentro del núcleo, descritas en este trabajo ya han aportado algunas pistas sobre el origen y el destino de las fusiones teloméricas asociadas a ALT.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Shay, J. W.; Wright, W. E. Telomeres and telomerase: Three decades of progress. *Nat. Rev Genet.* 2019; 20(5): 299–309. doi: 10.1038/s41576-019-0099-1
- [2]. Denchi, E. L.; de Lange, T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature.* 2007; 448(7157): 1068-71. doi: 10.1038/nature06065
- [3]. Turner, K. J.; Vasu, V.; Griffin, D. K. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells.* 2019; 8: 73. doi: 10.3390/cells8010073
- [4]. Maciejowski, J.; de Lange, T. Telomeres in cancer: Tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017, 18, 175-186. doi: 10.1038/nrm.2016.171
- [5]. Sobinoff, A. P.; Pickett, H. A. Alternative Lengthening of Telomeres: DNA Repair Pathways Converge. *Trends Genet.* 2017; 33(12):921-932. doi: 10.1038/s41576-019-0099-1
- [6]. Gocha, A. R.; Acharya, S.; Groden, J. WRN loss induces switching of telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *PLoS One.* 2014; 9(4): e93991. doi: 10.1371/journal.pone.0093991
- [7]. Bernal, A.; Tusell, L. Telomeres: implications for cancer development. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(1): 294. doi: 10.3390/ijms19010294
- [8]. Murnane, J. P. Telomere Dysfunction and Chromosome Instability. *Mutat Res.* 2012; 730(1-2): 28-36. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.04.008
- [9]. Yaswen, P.; MacKenzie, K. L.; Keith, W. N.; Hentosh, P.; Rodier, F.; Zhu, J.; et al. Therapeutic targeting of replicative immortality. *Semin. Cancer Biol.* 2015; 35: S104-S128. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.007
- [10]. Estébanez, B.; Rodríguez-Miguel, P.; Fernández-Gonzalo, R.; González-Gallego, J. Beneficial effect of physical exercise on telomere length and aging, and genetics of aging-associated noncommunicable diseases. *Sports, Exercise, and Nutritional Genomics, Academic Press.* 2019; 11: 509-538. doi: 10.1016/B978-0-12-816193-7.00022-1
- [11]. Zvereva, M. I.; Shcherbakova, D. M.; Dontsova, O. A. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc).* 2010; 75(13): 1563-1583. doi: 10.1134/s0006297910130055
- [12]. Pickett, H.A.; Reddel, R.R. Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015; 22(11): 875–880. doi: 10.1038/nsmb.3106
- [13]. Dunham, M. A.; et al. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.* 2000; 26(4): 447–50 doi: 10.1038/82586

- [14]. Muntoni, A.; et al. Telomere elongation involves intra-molecular DNA replication in cells utilizing alternative lengthening of telomeres. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(6): 1017–27. doi: 10.1093/hmg/ddn436
- [15]. Gaspar, T. B.; Sá, A.; Lopes, J. M.; Sobrinho-Simões, M.; Soares, P.; Vinagre, J. Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. *Genes.* 2018; 9(5): 241. doi: 10.3390/genes9050241
- [16]. Cesare, A. J.; Reddel, R.R. Alternative lengthening of telomeres: Models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet.* 2010; 11(5): 319–330. doi: 10.1038/nrg2763
- [17]. Reddel, R. R. Telomere maintenance mechanisms in cancer: Clinical implications. *Curr Pharm Des.* 2014; 20 (41):6361–6374. doi: 10.2174/1381612820666140630101047
- [18]. Sugarman, E. T.; Zhang, G.; Shay, J. W. In perspective: An update on telomere targeting in cancer. *Mol Carcinog.* 2019; 58(9): 1581-88. doi: 10.1002/mc.23035
- [19]. Neumann, A. A.; Watson, C. M.; Noble, J. R.; Pickett, H. A.; Tam, P. P.; Reddel, R. R. Alternative lengthening of telomeres in normal mammalian somatic cells. *Genes Dev.* 2013; 27(1): 18–23. doi: 10.1101/gad.205062.112
- [20]. Recagni, M.; Bidzinska, J.; Zaffaroni, N.; Folini, M. The Role of Alternative Lengthening of Telomeres Mechanism in Cancer: Translational and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel).* 2020; 12(4): 949. doi:10.3390/cancers12040949
- [21]. Gocha, A. R. S.; Nuovo, G.; Iwenofu, O. H.; Groden, J. Human Sarcomas Are Mosaic for Telomerase-Dependent and Telomerase-Independent Telomere Maintenance Mechanisms. *J Am Soc Cytopathol.* 2013; 182(1): 41-48. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.001
- [22]. Zhang, J.; Zou, L. Alternative lengthening of telomeres: from molecular mechanisms to therapeutic outlooks. *Cell Biosci.* 2020; 10(1): 30. doi: 10.1186/s13578-020-00391-6
- [23]. Zheng, P.; Guo, Y.; Niu, Q.; Levy, D. E.; Dyck, J. A.; Lu, S.; et al. Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation. *Nature.* 1998; 396(6709): 373-376. doi: 10.1038/24628
- [24]. Yeager, T. R.; Neumann, A. A.; Englezou, A.; Huschtscha, L. I.; Noble, J. R.; Reddel, R. R. Telomerase-negative Immortalized Human Cells Contain a Novel Type of Promyelocytic Leukemia (PML) Body. *Cancer Res.* 1999; 59(17): 4175-4179.
- [25]. Takahashi, Y.; Lallemand-Breitenbach, V.; Zhu, J.; de Thé, H. PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene.* 2004; 23(16): 2819–2824. doi: 10.1038/sj.onc.1207533
- [26]. Nabetani, A.; Ishikawa, F. Unusual Telomeric DNAs in Human Telomerase-Negative Immortalized Cells. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(3): 703-713. doi: 10.1128/MCB.00603-08
- [27]. Henson, J. D.; Reddel, R. R. Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS Lett.* 2010; 584(17): 3800-3811. doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.009

- [28]. Chen, Y. A.; Shen, Y. L.; Hsia, H. Y.; Tiang, Y. P.; Sung, T. L.; Chen, L. Y. Extrachromosomal telomere repeat DNA is linked to ALT development via cGAS-STING DNA sensing pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 2017; 24(12): 1124-1131. doi: 10.1038/nsmb.3498
- [29]. Asada, K.; Ito, K.; Yui, D.; Tagaya, H.; Yokota, T. Cytosolic Genomic DNA functions as a Natural Antisense. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 8551. doi:10.1038/s41598-018-26487-1
- [30]. Raymond, C. K.; Raymond, F. C.; Hill, K. UltraPrep is a scalable, cost-effective, bead-based method for purifying cell-free DNA. *PLoS One.* 2020; 15(6): e0231854. doi: 10.1371/journal.pone.0231854
- [31]. Kishi, J. Y.; Lapan, S. W.; Beliveau, B. J.; West, E. R.; Zhu, A.; Sasaki, H. M.; et al. SABER amplifies FISH: enhanced multiplexed imaging of RNA and DNA in cells and tissues. *Nat Methods.* 2019; 16(6): 533–544. doi: 10.1038/s41592-019-0404-0
- [32]. Herbert, B.; Hochreiter, A. E.; Wright, W. E.; Shay, J. W. Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol. *Nat Protoc.* 2006; 1(3):1583-1590. doi: 10.1038/nprot.2006.239
- [33]. Banerjee, P. P.; Jagadeesh, S. Non-radioactive assay methods for the assessment of telomerase activity and telomere length. *Methods Mol Biol.* 2009; 523: 383-394. doi: 10.1007/978-1-59745-190-1_25
- [34]. Aix, E.; Gutierrez-Gutierrez, O.; Sanchez-Ferrer, C.; Aguado, T.; Flores, I. Postnatal telomere dysfunction induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through p21 activation. *J Cell Biol.* 2016; 213(5): 571-583. doi: 10.1083/jcb.201510091
- [35]. Kim, N. W.; Wu, F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(13): 2595–2597. doi: 10.1093/nar/25.13.2595
- [36]. Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell.* 1989; 59(3): 521–529. doi: 10.1016/0092-8674(89)90035-4