



# **IMPLICACIÓN DE LA NUCLEOTIDOHIDROLASA DCTPP1 EN LA REGULACIÓN DEL POOL DE NUCLEÓTIDOS Y EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD GENÓMICA**

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

Blanca Martínez Arribas

Tesis Doctoral

Septiembre 2019



# **IMPLICACIÓN DE LA NUCLEOTIDOHIDROLASA DCTPP1 EN LA REGULACIÓN DEL POOL DE NUCLEÓTIDOS Y EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD GENÓMICA**

Memoria presentada por la graduada  
Blanca Martínez Arribas para optar  
al grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular

Granada, Septiembre de 2019

**Blanca Martínez Arribas**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Blanca Martínez Arribas  
ISBN: 978-84-1306-379-9  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/58248>



## RESUMEN

La precisión con la que la célula lleva a cabo la replicación de su material genético es esencial para su supervivencia y un factor clave en la fidelidad de dicha replicación es la concentración absoluta y relativa de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) (Mathews, 2006). Así, desequilibrios en el pool de dNTPs pueden promover errores durante la replicación (Kumar *et al.*, 2011). Más aún, la falta de alguno de los precursores del DNA provoca una severa inestabilidad mitocondrial y cromosómica en células eucariotas, especialmente después de producirse daños en el genoma, ya que los mecanismos de reparación requieren nucleótidos para la síntesis de DNA. Por tanto, es necesario un control estricto de las rutas de síntesis y de catabolismo de dNTPs ya que cualquier defecto en su regulación causa fenómenos de estrés replicacional y compromete la estabilidad del genoma (Mathews, 2014; Pai & Kearsey, 2017).

Las enzimas implicadas en metabolismo de nucleótidos desempeñan un papel fundamental en la regulación y control del pool de nucleótidos, tanto en situaciones fisiológicas normales como patogénicas. Estas enzimas pueden además jugar un papel relevante en la activación y/o degradación de fármacos. Todo ello confiere especial interés al estudio y caracterización de nuevas enzimas implicadas en estas rutas metabólicas y su regulación a nivel bioquímico y celular. Es el caso de la nucleotidohidrolasa humana DCTPP1. DCTPP1 hidroliza dCTP dando lugar a dCMP y pirofosfato, controlando de esta manera los niveles intracelulares de dCTP (Requena *et al.*, 2014). Además presenta una alta afinidad por derivados de desoxicitidina modificados en posición 5 de la base como el 5-formil-dCTP, 5-yodo-dCTP o el 5-metil-dCTP. En correlación con su actividad bioquímica, las células deficientes en esta nucleotidohidrolasa presentan altos niveles de dCTP y son hipersensibles a la exposición a los análogos 5-yodo-2'-desoxicitidina y 5-metil-2'-desoxicitidina.

En este trabajo se ha confirmado el papel de DCTPP1 en la homeostasis de dCTP, pero además se ha descrito una nueva función en el mantenimiento de los niveles de dTTP. En ausencia de DCTPP1, las células presentan un pool de dCTP elevado, una disminución del pool de dTTP y la aparición de un pool de dUTP, cuya incorporación al DNA es potencialmente genotóxica. Como consecuencia del aumento del ratio dUTP/dTTP, las células deficientes en DCTPP1 acumulan uracilo en el DNA y muestran una activación de la respuesta a daños en el DNA, alteraciones en el ciclo celular y un fenotipo hipermutador que afecta tanto al DNA nuclear como al mitocondrial. Asimismo, en ausencia de DCTPP1, las células son altamente dependientes del salvamento de nucleósidos para el mantenimiento de los niveles de dTTP. Nuestros resultados indican un papel prominente de DCTPP1 en la provisión de dTTP via la síntesis *de novo* y en el equilibrio del pool de nucleótidos pirimidínicos, una función que está intrínsecamente relacionada con la preservación de la integridad genética. Nuestro estudio identifica a la enzima DCTPP1 como un factor fundamental a tener en cuenta a la hora de analizar las causas moleculares que subyacen a patologías humanas causadas por desbalances del pool de dNTPs. Además, dado que la modulación de la actividad de DCTPP1 permite alterar la síntesis *de novo* y la homeostasis de nucleótidos pirimidínicos, puede ser una herramienta terapéutica en células tumorales donde existe una alta demanda de nucleótidos asociada a su elevada capacidad replicativa.

Por otra parte se ha establecido un modelo de quiescencia para el estudio del metabolismo de dNTPs en células no replicativas. En tejidos diferenciados, donde no hay replicación del DNA nuclear y por tanto la síntesis *de novo* y la vía de recuperación citosólica no son funcionales, la integridad y replicación del DNA mitocondrial depende en gran medida de la ruta de salvamento mitocondrial (Hakansson *et al.*, 2006; Saada, 2009). DCTPP1 presenta una localización ubicua en núcleo, citosol y mitocondria (Requena *et al.*, 2014). En células no replicativas la expresión de DCTPP1 en núcleo y citosol desaparece y solo se detecta la proteína en mitocondria. Este modelo permitirá profundizar en el papel

de DCTPP1 en el mantenimiento del pool mitocondrial de dNTPs, su posible implicación en el desarrollo de los síndromes de depleción mitocondrial y su utilidad en terapias que modulen la provisión y el equilibrio del pool de nucleótidos en este organelo.





# ÍNDICE

A.	INTRODUCCIÓN.....	1
A.1.	METABOLISMO DE PIRIMIDINAS.....	1
A.1.1.	Biosíntesis <i>de novo</i> de nucleótidos pirimidínicos .....	2
A.1.2.	Ruta de recuperación de nucleótidos pirimidínicos .....	5
A.1.3.	Catabolismo de nucleótidos pirimidínicos.....	6
A.1.4.	Regulación del metabolismo de pirimidinas.....	7
A.1.4.1.	Regulación a nivel de ciclo celular del metabolismo de nucleótidos.....	8
A.1.4.2.	Regulación alostérica de enzimas del metabolismo de nucleótidos.....	10
A.1.5.	Metabolismo mitocondrial de nucleótidos pirimidínicos.....	13
A.2.	NTP-PIROFOSFATASAS .....	16
A.2.1.	Clasificación y tipos de NTP-pirofosfatasas.....	17
A.2.2.	NTP pirofosfatasas todo- $\alpha$ .....	19
A.2.3.	DCTPP1 .....	22
A.3.	Metabolismo de nucleótidos e inestabilidad genética .....	26
A.4.	Alteraciones del metabolismo de pirimidinas y su implicación en patologías humanas.....	27
B.	OBJETIVOS .....	33
C.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
C.1.	MATERIALES.....	37
C.1.1.	Líneas celulares .....	37
C.1.1.1.	Células humanas.....	37
C.1.1.2.	Bacterias .....	38

C.1.2.	Medios de cultivo.....	38
C.1.3.	Compuestos, tampones y soluciones.....	39
C.1.3.1.	Compuestos.....	39
C.1.3.2.	Tampones y soluciones.....	39
C.1.4.	Anticuerpos.....	40
C.1.5.	Oligonucleótidos.....	41
C.1.6.	Plásmidos.....	42
C.1.7.	Programas informáticos y bases de datos.....	43
C.1.7.1.	Programas informáticos.....	43
C.1.7.2.	Bases de datos.....	44
C.1.8.	Análisis estadístico.....	44
ii	C.2. MÉTODOS.....	45
C.2.1.	Manipulación y mantenimiento de líneas celulares.....	45
C.2.2.	Criopreservación y descongelación.....	46
C.2.3.	Clonación de la dUTPasa humana en el vector pEGFP.....	47
C.2.4.	Transfección transitoria de líneas celulares.....	48
C.2.4.1.	Silenciamiento génico mediante siRNA.....	48
C.2.4.2.	Sobreexpresión de proteínas.....	49
C.2.5.	Ensayos de proliferación celular.....	50
C.2.6.	Análisis del ciclo celular mediante FACS.....	52
C.2.7.	Generación de una línea <i>knockout</i> mediante el sistema CRISPR/Cas9.....	52
C.2.8.	Inducción de quiescencia.....	54
C.2.9.	<i>Western blot</i> .....	54

C.2.10.	Inmunofluorescencia y microscopía confocal .....	55
C.2.10.1.	Detección de DCTPP1 mediante inmunofluorescencia .....	55
C.2.10.2.	Análisis de foci de $\gamma$ H2AX .....	56
C.2.10.3.	Cuantificación de puentes de anafase.....	57
C.2.11.	Determinación de los niveles intracelulares de nucleótidos.....	57
C.2.11.1.	Ensayo de la DNA polimerasa .....	57
C.2.11.2.	Cromatografía de intercambio aniónico.....	58
C.2.12.	Determinación de uracilo en DNA genómico .....	59
C.2.13.	Ensayo de mutagénesis del gen HPRT .....	60
C.2.14.	Determinación de la mutagénesis en el DNA mitocondrial mediante resistencia a cloranfenicol.....	62
C.2.15.	Metabolómica.....	63
D.	RESULTADOS.....	67
D.1.	EFFECTO DE LA REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE DCTPP1 EN CÉLULAS MCF-7 .....	67
D.1.1.	Silenciamiento transitorio de DCTPP1 mediante siRNA.....	67
D.1.2.	DCTPP1 regula el <i>pool</i> de nucleótidos pirimidínicos en células MCF-7 y mantiene un ratio dUTP/dTTP adecuado.....	69
D.1.4.	Activación de la respuesta a daños en el DNA en células deficientes en DCTPP1 72	
D.1.5.	La disminución del ratio dUTP/dTTP contrarresta la activación del DDR.....	74
D.1.6.	Implicación de la uracil-DNA glicosilasa (UNG) en la activación de DDR en células deficientes en DCTPP1.....	77
D.2.	ESTUDIO DEL PAPEL BIOLÓGICO DE DCTPP1 EN CÉLULAS HAP1 .....	78

D.2.1.	Caracterización de una línea celular HAP1 <i>knockout</i> para DCTPP1 .....	78
D.2.2.	Generación de una segunda línea HAP1 deficiente en DCTPP1 .....	81
D.2.3.	Caracterización metabólica de la línea DCTPP1-KO.....	82
D.2.4.	Análisis del contenido en uracilo y de marcadores de respuesta a daño en DNA en las líneas HAP1.....	86
D.2.5.	Efecto de la modulación del ratio dUTP/dTTP en la activación de DDR .....	88
D.2.6.	Papel de UNG en la fosforilación de H2AX en células DCTPP1-KO .....	92
D.2.7.	Análisis de la frecuencia de mutación de células DCTPP1-KO.....	93
D.3.	CONTRIBUCIÓN DE DCTPP1 A LA SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> EN CÉLULAS HAP1 .....	95
D.3.1.	Contribución de DCTPP1 a la supervivencia celular en ausencia de la ruta de salvamento de nucleósidos pirimidínicos .....	95
D.3.2.	El <i>pool</i> de dNTPs y la integridad genética dependen de DCTPP1 y del salvamento de dThd.....	97
D.4.	ESTUDIO DEL PAPEL DE DCTPP1 EN QUIESCENCIA.....	100
D.4.1.	CCD-34Lu como modelo celular de quiescencia .....	100
D.4.2.	Análisis de la localización de DCTPP1 en células quiescentes.....	103
E.	DISCUSIÓN.....	109
E.1.	PAPEL DE DCTPP1 EN LA HOMEOSTASIS DE NUCLEÓTIDOS DE PIRIMIDINA.....	110
E.1.1.	DCTPP1 participa en el mantenimiento de los niveles de dCTP .....	110
E.1.2.	DCTPP1 interviene en la síntesis <i>de novo</i> de dTTP.....	112
E.2.	IMPORTANCIA DE DCTPP1 EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD GENÉTICA.....	114
E.3.	DCTPP1 Y CÁNCER .....	120

E.4. DCTPP1 Y MITOCONDRIA.....	122
F. CONCLUSIONES .....	131
I. REFERENCIAS.....	137
H. ANEXOS .....	163



## ABREVIATURAS

### A

---

**AGS.** Síndrome de *Aicardi-Goutières*.

**Amp.** Ampicilina.

**ANOVA.** Análisis de la varianza.

**AP.** Abásico.

**APC/C.** *Anaphase promoting complex/cyclosome* o complejo promotor de la anafase/ciclosoma.

**ATCasa.** Aspartato transcarbamilasa.

**ATCC.** *American Type Culture Collection*.

**ATM.** *Ataxia-telangiectasia mutated gene* o gen mutado en la ataxia telangiectasia.

**ATR.** *ATM-Rad3-related gene* o gen relacionado con ATM-Rad3.

**5Aza-dCyd.** 5-aza-desoxicitidina o decitabina.

**5Aza-dCTP.** 5'-aza-2'-deoxicitidina-5'-trifosfato.

### B

---

**BER.** *Base excision repair* o reparación por excisión de bases.

**BHD.** Brazo de homología derecho.

**BHI.** Brazo de homología izquierdo.

**BR.** *Blocking reagent* o reactivo de bloqueo.

**5Br-dCTP.** 5-bromo-dCTP.

**BrdU.** Bromodesoxiuridina.

### C

---

**CAD.** Carbamil fosfato sintetasa; aspartato transcarbamilasa; dihidroorotasa.

**CAP.** Cloranfenicol.

**Carbamil-P.** Carbamil fosfato.

**CDA.** Citidina desaminasa.

**Cdh1.** Cadherina 1.

**CDK.** Quinasa dependiente de ciclina.

**Chk1.** Quinasa de checkpoint 1.

**Chk2.** Quinasa de checkpoint 2.

**CML.** *Chronic myeloid leukemia* o leucemia mieloide crónica.

**CMPK.** UMP/CMP quinasa.

**CMPK2.** UMP/CMP quinasa 2, mitocondrial.

**CPSII.** Carbamil fosfato sintetasa.

**CRISPR.** *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaçadas.

**CTCF.** *Corrected total cell fluorescence* o fluorescencia total corregida.

**CTPS.** CTP sintetasa.

### D

---

**DAPI.** Diclorohidrato de 4',6-diamidina-2-fenilindol.

**(d)ADP.** (Desoxi)adenosina-5'-difosfato.

**(d)AMP.** (Desoxi)adenosina-5'-monofosfato.

**(d)ATP.** (Desoxi)adenosina-5'-trifosfato.

**(d)CDP.** (Desoxi)citosina-5'-difosfato.

**dCK.** Desoxicitidina quinasa.

**(d)CMP.** (Desoxi)citosina-5'-monofosfato.

**DCTD.** dCMP desaminasa.

**(d)CTP.** (Desoxi)citosina-5'-trifosfato.

**DCTPP1.** dCTP pirofosfatasa 1.

**(d)Cyd.** (Desoxi)citidina.

**DDR.** *DNA damage response* o respuesta a daño en el DNA.

**DF.** *Dilution factor* o factor de dilución.

**(d)GDP.** (Desoxi)guanosina-5'-difosfato.

**dGK.** Desoxiguanosina quinasa.

**(d)GTP.** (Desoxi)guanosina-5'-trifosfato.

**DHF.** Dihidrofolato.

**DHFRL1.** Dihidrofolato reductasa L1.

**DHOasa.** Dihidrootasa.

**DHODH.** Dihidroorotato deshidrogenasa.

**DHP.** Dihidropirimidinasas.

**(d)IDP.** (Desoxi)inosina-5'-difosfato.

**(d)ITP.** (Desoxi)inosina-5'-trifosfato.

**(d)ITPasa.** (Desoxi)ITP hidrolasa.

**DNA.** Ácido desoxirribonucleico.

**(d)NDP.** (Desoxi)nucleótido-5'-difosfato.

**(d)NMP.** (Desoxi)nucleótido-5'-monofosfato.

**DNMT.** DNA metiltransferasa.

**(d)NTP.** (Desoxi)nucleótido-5'-trifosfato.

**DMSO.** Dimetilsulfóxido.

**DPD.** Dihidropirimidina deshidrogenasa.

**DSBs.** *Double strands breaks* o roturas dobles de cadena.

**DTT.** Ditioneitol.

**dTDP.** (Desoxi)timidina-5'-difosfato.

**dThd.** Timidina.

**dTMP.** (Desoxi)timidina-5'-monofosfato o timidilato.

**dTTP.** (Desoxi)timidina-5'-trifosfato.

**(d)UDP.** (Desoxi)uridina-5'-difosfato.

**(d)UMP.** (Desoxi)uridina-5'-monofosfato.

**(d)Urd.** (Desoxi)uridina.

**(d)UTP.** (Desoxi)uridina-5'-trifosfato.

**dUTPasa.** dUTP hidrolasa.

## E

**EAR.** *Epilepsy associated repeat* o repetición asociada a epilepsia.

**EDTA.** Ácido etilén diamino tetraacético.

**EMBL-EBI.** Laboratorio Europeo de Biología Molecular – Instituto Europeo de Bioinformática.

## F

**FACS.** *Fluorescence activated cell sorting*.

**FIA.** *Flux injection analysis* o análisis por inyección de flujo.

**FITC.** Isotiocianato de fluoresceína.

**5-FdUrd.** 5'-fluoro-2'-desoxiuridina.

**5-FU.** 5-fluorouracilo.

**F(d)UMP.** 5-fluoro-2'-(desoxi)uridina-5'-monofosfato.

**F(d)UTP.** 5-fluoro-2'-(desoxi)uridina-5'-trifosfato.

## G

**GAPDH.** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

**gDNA.** DNA genómico.

**GFP.** *Green fluorescent protein* o proteína verde fluorescente.

## H

**<sup>3</sup>H.** Tritio.

**H2AX.** Histona H2A.

**HAT.** Hipoxantina, aminopterina, timidina.



**hENT1.** Transportador humano de equilibrio de nucleótidos.

**HEPES.** Ácido N-(2-Hidroxi-etil)-piperazina-N-(2-etanosulfónico).

**HPLC.** *High performance liquid chromatography* o cromatografía líquida de alta resolución.

**HPRT.** Hipoxantina fosforribosil transferasa.

**HT.** Hipoxantina, timidina.

## I

---

**IC50.** Concentración de inhibición 50.

**5I-dCyd.** 5-iodo-desoxicitidina.

**5I-dCTP.** 5-iodo-2'-deoxicitidina-5'-trifosfato.

**IF.** Inmunofluorescencia.

**IgG.** Inmonoglobulina G.

**IMDM.** *Iscove's modified Dulbecco's medium* o medio de Dulbecco modificado por Iscove.

**ITPA.** ITP hidrolasa humana.

## K

---

**Kan.** Kanamicina.

**K<sub>m</sub>.** Constante de Michaelis-Menten.

**KO.** *Knockout*.

## L

---

**LB.** *Lysogeny broth* o medio LB.

**LC.** *Liquid chromatography* o cromatografía líquida.

**LC3.** O MAP1LC3, *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*.

## M

---

**mdN.** Desoxinucleasa mitochondrial.

**MDS.** *Mitochondrial depletion syndrome* o síndrome de depleción mitocondrial.

**m-dUTPasa.** dUTPasa mitocondrial.

**5Me-dCyd.** 5-metil-2'-desoxicitidina.

**5Me-dCTP.** 5-metil-2'-deoxicitidina-5'-trifosfato.

**MEM.** *Minimum essential medium* o medio mínimo esencial.

**MF.** *Mutation frequency* o frecuencia de mutación.

**MMR.** *Mismatch repair* o reparación de errores en emparejamiento.

**MNGIE.** *Mitochondrial neurogastro-intestinal encephalopathy* o encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial.

**MRM.** *Multiple reaction monitoring* o monitorizado de reacciones múltiples.

**mRNA.** RNA mensajero.

**mtDNA.** DNA mitocondrial.

## N

---

**NCBI.** *National Center for Biotechnology Information*.

**NDK.** Nucleótido difosfato quinasa.

**nDNA.** DNA nuclear.

**NDPK-D.** Nucleótido difosfato quinasa D.

**n-dUTPasa.** dUTPasa nuclear.

**NTP.** Nucleótido trifosfato.

**Nudix.** *Nucleoside diphosphate-linked moiety X*.

**NUDT.** Enzima tipo Nudix.

## O

---

**O/N.** *Overnight* o durante la noche.

**OMP.** Orotidilato.

**OMPDC.** Orotidina monofosfato descarboxilasa.

**OPRT.** Orotato fosforribosil transferasa.

**ORF.** *Open reading frame* o pauta abierta de lectura.

## P

---

**p53R2.** Subunidad 2 de la ribonucleótido reductasa inducible por p53.

**PBS.** *Phosphate buffered saline* o tampón fosfato salino.

**PBS-T.** PBS con Tween 20®.

**PCR.** *Polymerase chain reaction* o reacción en cadena de la polimerasa.

**PE.** Eficiencia de plaqueo.

**PEO.** *Progressive external ophtalmoplegia* o oftalmoplegia externa progresiva.

**PI.** *Propidium iodide* o yoduro de propidio.

**PNC1.** Transportador de nucleótidos de pirimidina 1.

**PPi.** Pirofosfato.

x

**PRPP.** Fosforribosil pirofosfato.

**PRPS2.** PRPP sintetasa 2.

**Puro.** Gen de resistencia a puromicina.

**PVDF.** Polifluoruro de vinilideno.

## R

---

**R1.** Subunidad 1 de la RNR, subunidad grande.

**R2.** Subunidad 2 de la RNR, subunidad pequeña.

**Rad52.** *DNA repair protein RAD52 homolog* u homólogo de la proteína de reparación de DNA RAD52.

**RNA.** Ácido ribonucleico.

**RNasa.** Ribonucleasa.

**RNR.** Ribonucleótido reductasa.

**ROI.** *Region of interest* o region de interés.

**TMPK2.** Timidilato quinasa mitocondrial.

**RPA.** *Replication Protein A* o proteína de replicación A.

**RPD.** *Relative population doubling* o duplicación relativa de la población.

**RRM2B.** RNR formada por la subunidad R1 y la subunidad p53R2.

**rRNA.** RNA ribosómico.

## S

---

**SAMHD1.** Proteína que contiene los dominios SAM (*Sterile Alpha Motif*) y HD (*Histidine-Aspartate*).

**SBF.** Suero bovino fetal.

**sgRNA.** *Single guide RNA* o RNA guía de cadena sencilla.

**SHMT2.** Serina hidroximetil transferasa 2.

**siRNA.** *Small interference RNA* o RNA pequeño de interferencia.

**SD.** *Standard deviation* o desviación estándar.

**SDS.** Dodecil sulfato sódico.

**SDS-PAGE.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.

**SLC.** Transportadores *solute carrier*.

## T

---

**TAE.** Tris, ácido acético, EDTA.

**TCA.** Ácido tricloroacético.

**6-TG.** 6-tioguanina.

**6-TGMP.** 6-tioguanosina monofosfato.

**6-TGTP.** 6-tioguanosina trifosfato.

**THF.** Tetrahidrofolato.

**TK1.** Timidina quinasa 1, nuclear.

**TK2.** Timidina quinasa 2, mitocondrial.

**TMPK.** Timidilato quinasa.

**Tris.** Tris(hidroximetil)-amino metano.

**TS.** Timidilato sintasa.

**TP.** Timidina fosforilasa.

## U

---

**UCK.** Uridina-citidina quinasa.

**UMPH-1.** UMP hidrolasa.

**UMPS.** UMP sintasa.

**UNG.** Uracil DNA glicosilasa.

**UP.** Ureidopropionasa.

**UPasa.** Uridina fosforilasa.

**USP7.** *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* o ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa.

**UV.** Ultravioleta.

## V

---

**VIH.** Virus de inmunodeficiencia humana.

## W

---

**WB.** *Western blot.*

**WT.** *Wild type* o silvestre.

## X

---

**XTP.** Xantosina-5'-trifosfato.

**XTP3TPA.** *XTP3 transactivated protein A*  
o DCTPP1





# INTRODUCCIÓN

---



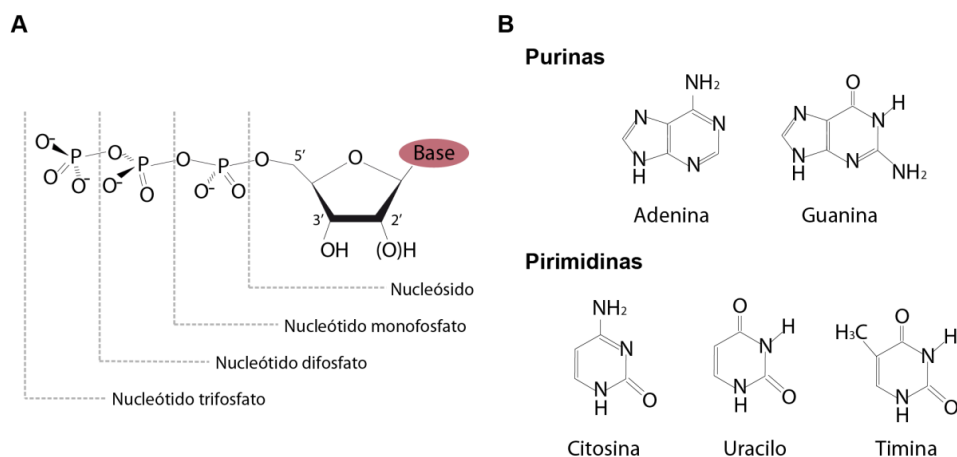




## A. INTRODUCCIÓN

### A.1. METABOLISMO DE PIRIMIDINAS

Los nucleótidos son los precursores de los ácidos nucleicos, por ello juegan un papel crucial en el almacenamiento y expresión de la información genética, además, llevan a cabo otra gran variedad de funciones en el metabolismo celular. Por ejemplo, el ATP es el principal transportador de energía, sirve como donador de grupo fosfato en reacciones de fosforilación y participa como transmisor de señales extracelulares. El GTP participa en rutas de transducción de señales y como inhibidor del complejo de la traducción. Además, el CTP y el UTP actúan de precursores del CDP-diacilglicerol y de la formación de UDP-azúcares respectivamente (Evans & Guy, 2004).



**Figura A.1. Estructura bioquímica de los diferentes elementos que componen un nucleótido.** A. Estructura de un (desoxi)ribonucleótido con sus tres componentes característicos: la base nitrogenada, el azúcar y los correspondientes residuos de fosfato. B. Bases nitrogenadas del DNA. Derivados de purina: adenina y guanina; derivados de pirimidina: citosina, uracilo y timina.

Existen dos rutas de síntesis de nucleótidos, bien pueden ser sintetizados *de novo* o ser reciclados por la vía de recuperación. La síntesis *de novo* utiliza aminoácidos, ribosa-5-P,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{NH}_3^+$ . En la vía de recuperación o salvamento las bases y los nucleósidos

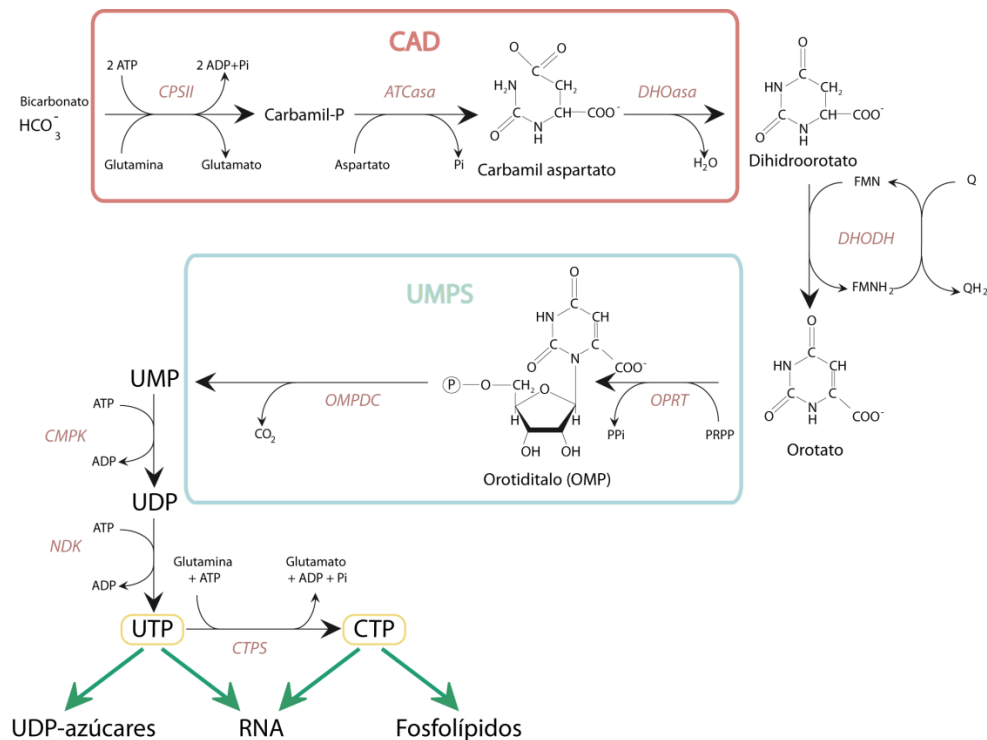
provenientes de la degradación de los ácidos nucleicos o importados del exterior celular se reciclan para formar nucleótidos trifosfato de nuevo. Ambas vías de síntesis se encuentran interconectadas y rigurosamente reguladas y su contribución relativa depende del tipo celular y del estado de la célula. Por regla general la síntesis *de novo* es más activa en células altamente proliferativas, donde hay una alta demanda de precursores para la síntesis de DNA, mientras que su actividad es mínima en células y tejidos diferenciados.

### **A.1.1. Biosíntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos**

En la síntesis *de novo* los nucleótidos se sintetizan a partir de precursores simples. Las primeras reacciones de síntesis del anillo pirimidínico las lleva a cabo la enzima trifuncional citoplasmática denominada CAD, partiendo de bicarbonato, glutamina, aspartato y ribosa-5-P (Evans & Guy, 2004). En primer lugar se forma el carbamil fosfato (carbamil-P) citosólico a partir de bicarbonato, un grupo amino procedente de la glutamina y dos moléculas de ATP (Figura A.2). Esta primera reacción es el paso limitante de la biosíntesis y está catalizada por la actividad carbamil fosfato sintetasa II (CPSII). El aspartato es el donador del resto del anillo de pirimidina en una reacción llevada a cabo por la aspartato transcarbamilasa (ATCasa). El último paso de las reacciones catalizadas por CAD, es la producción de dihidroorotato por acción de la dihidroorotasa (DHOasa) que permite el cierre del anillo aromático de pirimidina.

El dihidroorotato difunde a la mitocondria donde la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) lo convierte en orotato. Concretamente la DHODH se encuentra en la membrana interna de la mitocondria orientada hacia el espacio intermembranal. En paralelo a la oxidación de dihidroorotato a orotato, la ubiquinona es reducida, de forma que la biosíntesis de nucleótidos queda acoplada a la cadena respiratoria mitocondrial.

De nuevo en el citoplasma la enzima bifuncional UMP sintasa (UMPS) es la encargada de catalizar las dos últimas reacciones para dar lugar como producto final UMP. Primero, mediante su actividad orotato fosforribosil transferasa (OPRT) transfiere el grupo fosforribosil pirofosfato (PRPP) al orotato, generando orotidilato (OMP). Finalmente, la actividad OMP descarboxilasa (OMPDC) genera, a partir de OMP, el precursor de los nucleótidos de pirimidina, el UMP.

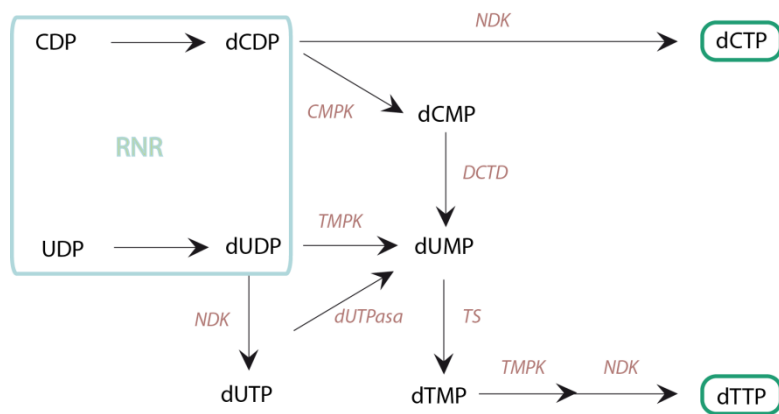


**Figura A.2. Biosíntesis de novo de pirimidinas.** Las reacciones catalizadas por CAD se encuentran recuadradas en rojo y en azul las reacciones catalizadas por la UMP sintasa (UMPS). CPSII: carbamil fosfato sintetasa II; ATCasa: aspartato transcarbamilasa; DHOasa: dihidroorotasa; DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa; OPRT: orotato fosforribosil transferasa; OMPDC: OMP descarboxilasa; CMPK: UMP/CMP quinasa; NDK: nucleótido difosfato quinasa; CTPS: CTP sintetasa.

El UMP es fosforilado por las quinasa dependientes de ATP, UMP/CMP quinasa (CMPK) y nucleósido difosfato quinasa (NDK), a UDP y UTP respectivamente. CMPK es capaz de fosforilar además de UMP, CMP y dCMP y con menor eficiencia dUMP, AMP y dAMP, mientras que NDK fosforila ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos tanto pirimidínicos como purínicos.

La enzima CTP sintetasa (CTPS) es la encargada de sintetizar CTP a partir de UTP. En la reacción, dependiente de ATP, el grupo amino de la glutamina es transferido a la posición C-4 del UTP para dar lugar a CTP. Esta enzima supone otro paso clave de la síntesis *de novo* al ser el punto limitante para la síntesis de nucleótidos de citosina.

La conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos tiene lugar por medio de la ribonucleótido reductasa (RNR), que cataliza la reducción de los ribonucleótidos difosfato (NDPs), tanto de purinas como de pirimidinas, a desoxirribonucleótidos difosfato (dNDPs) (Figura A.3). Se trata de otra enzima clave de la biosíntesis de nucleótidos. La RNR lleva a cabo la reducción del átomo de carbono en posición 2' de la ribosa del UDP y el CDP, generando dUDP y dCDP respectivamente. NDK es la enzima encargada de la última fosforilación dando lugar a los correspondientes nucleótidos trifosfato dUTP y dCTP.



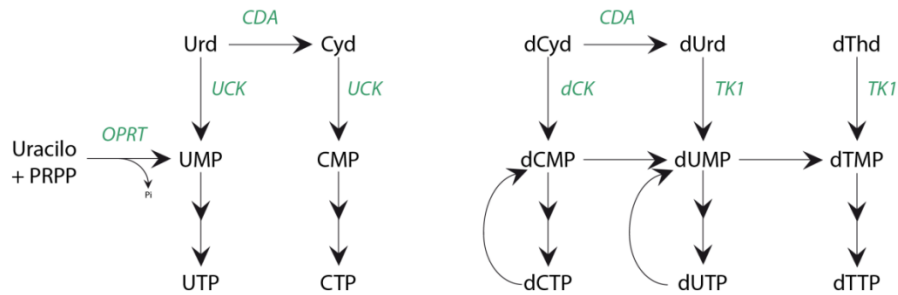
**Figura A.3. Síntesis de dNTPs a partir de CDP y UDP.** RNR: Ribonucleótido reductasa. CMPK: UMP/CMP quinasa; NDK: nucleótido difosfato quinasa; TMPK: timidilato quinasa; TS: timidilato sintasa; DCTD: dCMP desaminasa.

La síntesis de nucleótidos de timidina requiere de la actividad timidilato sintasa (TS) que cataliza la metilación del dUMP para dar lugar a timidilato (dTMP), precursor de la síntesis de dTTP. El dUMP puede provenir de dos fuentes distintas. Se puede generar por la hidrólisis de dUTP por la dUTPasa o puede provenir de la desaminación de dCMP, vía

dCMP desaminasa (DCTD). Una vez sintetizado, el dTMP es fosforilado a dTDP por la timidilato quinasa (TMPK) y finalmente a dTTP por la NDK.

### **A.1.2. Ruta de recuperación de nucleótidos pirimidínicos**

En la ruta de recuperación de pirimidinas los nucleósidos generados por la degradación del DNA y el RNA o provenientes de fuentes exógenas como la dieta, son convertidos en nucleótidos monofosfato ((d)NMPs), permitiendo su incorporación a la síntesis de pirimidinas. La recuperación de pirimidinas es un proceso energéticamente favorable, se requiere un mol de ATP para la formación de un mol de nucleótido, frente a los 5 moles de ATP necesarios en la síntesis *de novo*. A nivel de base las células solo son capaces de recuperar uracilo (Figura A.4). La transferencia de la ribosa-5-P al uracilo a partir de PRPP es catalizada por la OPRT, dando lugar a la formación de UMP y pirofosfato (PPi). La recuperación también puede ocurrir a nivel de nucleósido mediada por quinasas específicas (Figura A.4). En el citosol, la timidina (dThd) y la desoxiuridina (dUrd) son recicladas por la timidina quinasa 1 (TK1). La desoxicitidina quinasa (dCK) fosforila desoxicitidina (dCyd) y la uridina-citidina quinasa (UCK) fosforila uridina (Urd) y citidina (Cyd). Además, la citidina y la desoxicitidina pueden ser desaminadas por la citidina desaminasa (CDA) a uridina y desoxiuridina respectivamente, para ser fosforiladas por la quinasa correspondiente. Esta vía de recuperación a partir de los nucleósidos es la principal ruta de reciclaje de pirimidinas, mientras que la recuperación de purinas ocurre principalmente a nivel de base (Loffler *et al.*, 2005). Cabe destacar que en condiciones normales la uridina es la principal pirimidina circulante y que las pirimidinas aportadas por la dieta son captadas por transportadores de nucleósidos (Balestri *et al.*, 2007).



**Figura A.4. Ruta de recuperación de pirimidinas.** OPRT: orotato fosforribosil transferasa; UCK: uridina-citidina quinasa; CDA: citidina desaminasa; dCK: desoxicitidina quinasa; TK1: timidina quinasa 1.

### A.1.3. Catabolismo de nucleótidos pirimidínicos

La síntesis de nucleótidos está asociada a una serie de actividades catabólicas que limitan y regulan la recuperación de nucleósidos. Los nucleótidos monofosfato (dNMPs) sintetizados por acción de las quinastas específicas son reconvertidos a desoxinucleósidos por acción de 5'-nucleotidasas (Rampazzo *et al.*, 2010). Se han descrito seis 5'-nucleotidasas diferentes en células humanas, de las cuales todas tienen localización citosólica salvo la 5'(3')-desoxinucleotidasa mitocondrial (mdN). Como ocurre con la enzima mitocondrial, las enzimas citosólicas (cN-IA, cN-IB, cN-II, cN-III y cdN) presentan una amplia especificidad de sustrato (Bianchi & Spychala, 2003). La acción simultánea de las desoxinucleósido quinastas y las 5'-nucleotidasas origina los denominados ciclos de sustrato, en los que la concentración de dNTPs se regula a expensas del consumo de ATP.

Una vez completada la síntesis del DNA los niveles requeridos de nucleótidos no son tan elevados como durante la fase de síntesis y son degradados por la nucleotidohidrolasa SAMHD1. Su función y regulación es contrapuesta a la de la RNR. Ambas enzimas son oligoméricas, con afinidad por cuatro sustratos distintos que actúan además como reguladores alostéricos que determinan la especificidad de sustrato. SAMHD1 es capaz de hidrolizar dCTP, dTTP, dATP y dGTP generando el correspondiente nucleósido y una

molécula de trifosfato (Goldstone *et al.*, 2011). Se ha descrito que SAMHD1 actúa como factor de restricción en la infección por VIH, bloqueando la replicación del virus en etapas tempranas (Laguette *et al.*, 2011).

Las fosforilasas de nucleósidos son otro tipo de enzimas metabólicas que compiten con las desoxinucleósido quinasas y limitan la expansión del *pool* de nucleótidos. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los nucleósidos, dando lugar a la base y la ribosa-1-P. En células humanas están presentes la timidina fosforilasa (TP), encargada de hidrolizar timidina y la desoxiuridina la uridina fosforilasa (UPasa) que hidroliza uridina. Para la degradación de citidina y desoxicitidina es necesario un paso previo de desaminación llevado a cabo por la CDA.

La uridina no reciclada es transportada al hígado, donde es degradada por la UPasa 1. Existe una segunda uridina fosforilasa, la UPasa 2, que se expresa predominantemente en el riñón, donde lleva a cabo su función. Por su parte, la TP tiene una expresión ubicua en los distintos tejidos y su actividad se encuentra aumentada en tumores, lo que implica que tiene un papel importante en la sensibilidad a fluoropirimidinas que se usan como agentes antitumorales (de Bruin *et al.*, 2003). Durante este proceso de degradación el anillo de pirimidinas es completamente hidrolizado hasta intermediarios metabólicos de otras vías metabólicas como la síntesis de ácidos grasos o el ciclo de Krebs.

#### **A.1.4. Regulación del metabolismo de pirimidinas**

Los desoxinucleótidos son los precursores esenciales para la síntesis de DNA. El *pool* de dNTPs es asimétrico, siendo dATP y dTTP los más abundantes seguidos por el dCTP. El dGTP es el minoritario en los distintos tipos celulares estudiados hasta la fecha (Martomo & Mathews, 2002). Tanto los niveles absolutos como relativos de los distintos nucleótidos están estrictamente regulados, ya que un exceso o defecto de alguno de ellos puede tener

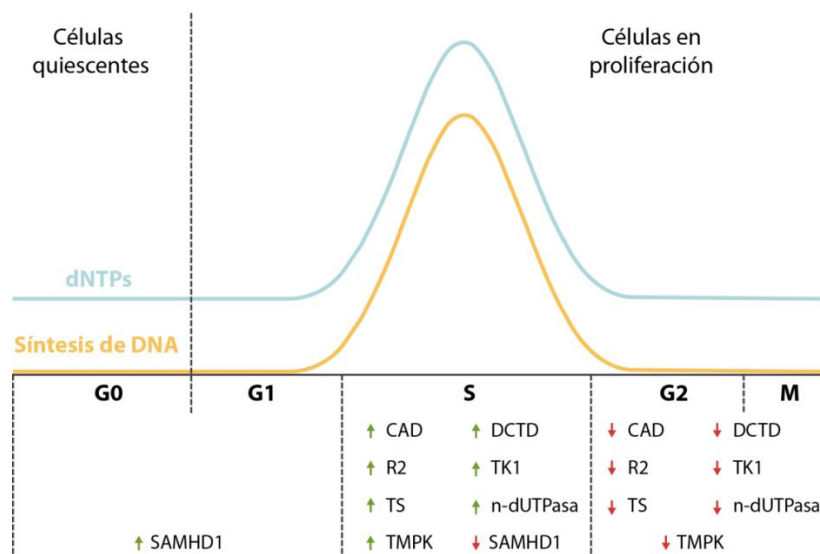
consecuencias genotóxicas. Por este motivo los niveles de proteína y actividad de las enzimas del metabolismo de dNTPs están sujetos a distintos tipos de regulación lo que permite, por ejemplo, coordinar los procesos de replicación y reparación del DNA con una mayor disponibilidad de dNTPs (Figura A.5). La pérdida o defecto en alguno de los mecanismos de control supone un desbalance del *pool* de dNTPs lo cual puede conducir a distintos tipos de daños genotóxicos como mutaciones, roturas de cadena, anomalías cromosómicas, etc. (Kunz *et al.*, 1994).

#### **A.1.4.1. Regulación a nivel de ciclo celular del metabolismo de nucleótidos**

Durante la fase de síntesis del DNA, donde se requiere un mayor aporte de dNTPs, el *pool* de nucleótidos se expande de forma drástica, llegando a niveles 20 veces por encima de los existentes en fase G1 (Hakansson *et al.*, 2006). La concentración de dNTPs en el núcleo aumenta de tal forma que los replisomas trabajan en condiciones de saturación por sustrato (Mathews & Sinha, 1982). Esta expansión del *pool* de dNTPs se debe principalmente a la RNR cuya actividad es máxima durante la fase S (Nordlund & Reichard, 2006). La RNR está sujeta a varios mecanismos de control y regulación: regulación alostérica, control de la transcripción, modificaciones post-traduccionales y regulación de la localización intracelular (Niida *et al.*, 2010). La enzima forma heterotetrámeros compuestos por dos subunidades grandes (R1) y dos subunidades pequeñas (R2). R1 contiene el sitio catalítico para la reducción de la ribosa y R2 presenta un radical libre tirosilo necesario para la catálisis. Las dos subunidades R1 y R2 se regulan de forma distinta, siendo esta última limitante para la actividad de la enzima. La subunidad R1 se expresa de forma constitutiva y estable mientras que la expresión de R2 está sometida a distintas regulaciones. Durante la fase síntesis del DNA la transcripción de R2 está activa y una vez se ha completado la replicación del DNA sufre un proceso de degradación. La



degradación de R2 está mediada por el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) y cadherina 1 (Cdh1). Cdh1 se une al dominio KEN de R2 y estabiliza la proteína durante fase S y mitosis. Durante fase S y mitosis temprana Cdh1 es fosforilada inactivando APC/C impidiendo de esta forma la degradación de R2 (Jaspersen *et al.*, 1999; Chabes *et al.*, 2003). En células quiescentes la subunidad R2 no se transcribe, en su lugar se expresa la subunidad R2 inducible por p53 (p53R2) que junto con R1 forma el complejo RRM2B (RNR formada por las subunidades R1 y p53R2). La proteína p53R2 se expresa de forma constitutiva, al carecer del dominio KEN no es degradada durante la mitosis por el complejo Cdh1-APC/C. P53R2 no solo tiene papel en proteger a la célula ante daño en el DNA, sino que juega un papel importante en la replicación del DNA mitocondrial (mtDNA) y su expresión es inducida por el gen supresor de tumores p53 en respuesta a daño en el DNA (Nordlund & Reichard, 2006; Bourdon *et al.*, 2007; Pontarin *et al.*, 2012).



**Figura A.5. Enzimas del metabolismo de pirimidinas reguladas a nivel de ciclo celular.**

SAMHD1: proteína con dominios SAM y HD; CAD: proteína multifuncional de síntesis *de novo*; R2: subunidad 2 de la ribonucleótido reductasa; TS: timidilato sintasa; DCTD: dCMP desaminasa; TK1: timidina quinasa 1; n-dUTPasa: dUTPasa nuclear; TMPK: timidilato quinasa.

Otras enzimas que participan en el metabolismo de pirimidinas también se encuentran reguladas a nivel de ciclo celular. Enzimas implicadas en la síntesis *de novo* o en la recuperación de nucleósidos presentan un aumento de su actividad en fase S. Es el

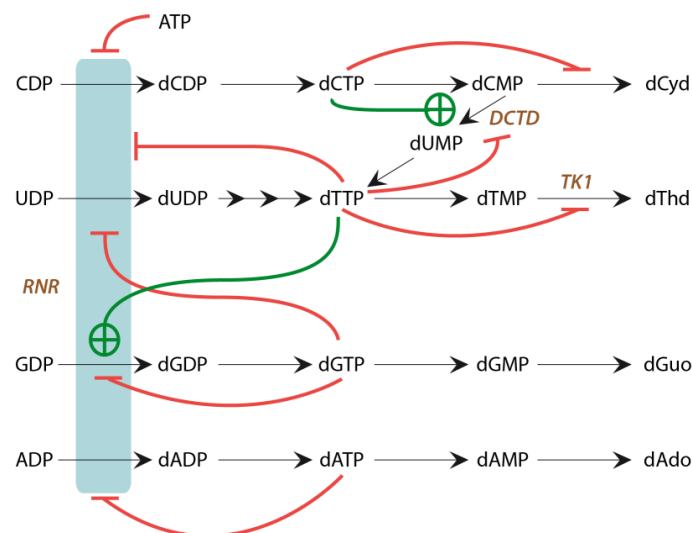
caso por ejemplo de la enzima multifuncional CAD (Sigoillot *et al.*, 2003), la dCMP desaminasa (Gelbard *et al.*, 1969), timidilato sintasa (Ayusawa *et al.*, 1986; Le Francois *et al.*, 2007), timidina quinasa 1 (Sherley & Kelly, 1988; Ke & Chang, 2004) y la isoforma nuclear de la dUTPasa (n-dUTPasa) (Ladner & Caradonna, 1997) (Figura A.5).

El caso de SAMHD1 es contrario al de las enzimas arriba mencionadas, esta enzima presenta su máxima actividad en la fase G1 hidrolizando los cuatro dNTPs cuando ya no son necesarios para la síntesis de DNA. Durante la fase S, donde los requerimientos de dNTPs son máximos, su actividad está inhibida (Goldstone *et al.*, 2011; Franzolin *et al.*, 2013). Esta regulación de SAMHD1 en distintas etapas del ciclo celular parece estar asociada a la fosforilación de la treonina 592. La fosforilación en T592 es dependiente de ciclo celular pues está mediada por las quinasas dependientes de ciclina 1 y 2 (CDKs). Se ha observado que SAMHD1 desfosforilada es la forma predominante en células quiescentes, correspondiéndose con bajos niveles de dNTPs, mientras que se fosforila al pasar de G0 a G1. Una vez finalizada la replicación del DNA, disminuye la demanda de dNTPs y muchas de las enzimas que participaban en la síntesis de nucleótidos son degradadas. Este es el caso de la subunidad R2 de la RNR, TK1 o TMPK que son degradadas por proteólisis mediadas por el APC/C al terminar la mitosis y previa entrada en G1 (Chabes *et al.*, 2003; Ke & Chang, 2004; Hu & Chang, 2007). TK1 también se regula por fosforilación por Cdk1, perturbando su estructura tetramérica activa y disminuyendo la afinidad por el sustrato (Z. F. Chang *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2004).

#### **A.1.4.2. Regulación alostérica de enzimas del metabolismo de nucleótidos**

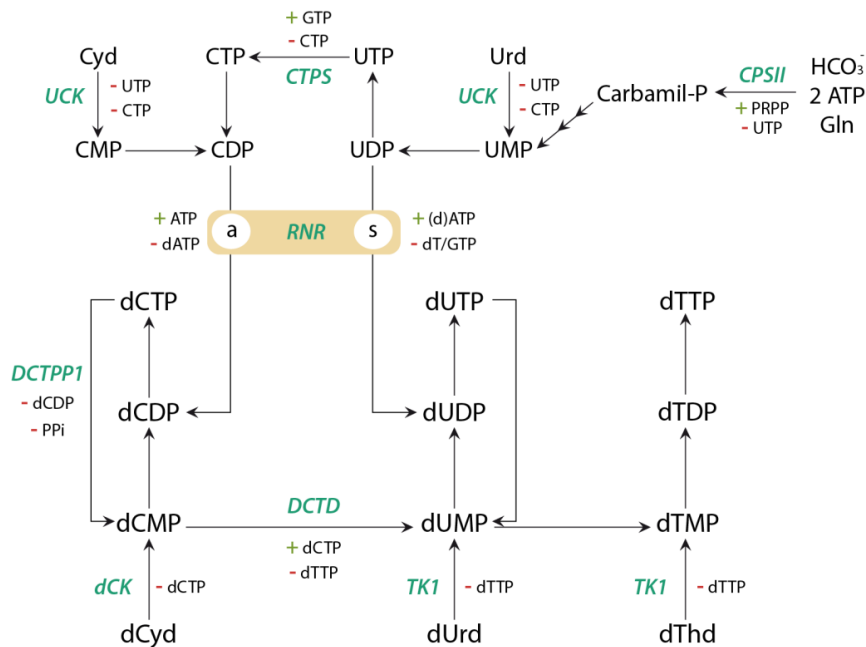
La regulación alostérica es otro mecanismo importante de control de la síntesis de dNTPs. Este tipo de control permite mantener el equilibrio del *pool* de dNTPs ante cambios repentinos en la concentración de cualquiera de los nucleótidos o de algún otro

sustrato. De nuevo la RNR es la enzima clave en mantener la homeostasis del *pool* de dNTPs a través de una precisa regulación alostérica. La subunidad R1 presenta dos sitios de regulación, el sitio de actividad (*a*) y el sitio de especificidad (*s*). Es la regulación ejercida por el sitio de especificidad lo que impide la expansión del *pool* de uno de los nucleótidos respecto a los demás. Cuando el ATP o el dATP se unen al sitio *s*, la enzima acepta UDP o CDP en el sitio catalítico. Cuando es dTTP lo que se une al sitio *s*, se favorece la reducción de GDP y cuando se une dGTP se fomenta la reducción de ADP (Nordlund & Reichard, 2006; Hofer *et al.*, 2012). El dCTP no se une de forma específica al sitio *s* por lo que su regulación tiene lugar a nivel de dCMP desaminasa. La actividad DCTD se estimula por dCTP y se inhibe por dTTP. Siendo así, altos niveles de ATP y bajos niveles de dATP favorecen la reducción de CDP y UDP por unión del ATP al sitio *a*. Un incremento en los niveles de dCTP activa la DCTD favoreciendo la desaminación de dCMP a dUMP que acaba dando lugar a dTTP. Cuando se alcanzan altos niveles de dTTP, este actúa como inhibidor de la DCTD (Maley & Maley, 1968). El dTTP actúa a la vez favoreciendo la reducción de GDP y la síntesis de dGTP que a su vez activa la reducción de ADP. Por último, un incremento en los niveles de dATP favorece su unión al sitio de regulación *a* inhibiendo la RNR (Figura A.6).



**Figura A.6. Regulación alostérica de la ribonucleótido reductasa (RNR).** RNR está regulada por cuatro efectores alostéricos: ATP, dATP, dGTP y dTTP. DCTD: dCMP desaminasa; TK1: timidina quinasa 1. Las líneas verdes indican activación y las líneas rojas indican inhibición.

Existen otras enzimas importantes en la regulación alostérica del metabolismo de pirimidinas. El primer punto de control está en la enzima multifuncional CAD, que también está regulada a nivel transcripcional y post-traduccion. CAD se activa alostéricamente por PRPP y se inhibe por UTP. Además, se activa por fosforilación en respuesta a factores de crecimiento que favorecen su transcripción. La fosforilación de CAD favorece la activación por PRPP a la vez que disminuye la inhibición por UTP (Huang & Graves, 2003). La CTP sintetasa (CTPS) es el siguiente punto de control, su regulación controla los *pools* de CTP y UTP. La CTPS se activa por GTP y se inhibe por su producto de reacción, el CTP (Pappas *et al.*, 1998) (Figura A.7).



**Figura A.7. Regulación de enzimas del metabolismo de pirimidinas.** CPSII: carbamil fosfato sintetasa II; UCK: uridina/citidina quinasa; CTPS: CTP sintetasa; RNR: ribonucleótido reductasa; DCTPP1: dCTP pirofosfatasa 1; DCTD: dCMP desaminasa; dCK: desoxicitidina quinasa; TK1: timidina quinasa 1. -; inhibidor; +; activador.

Las quinetas que participan en la ruta de recuperación de nucleósidos se inhiben alostéricamente por el producto final de la ruta, lo que permite modular su actividad en función de la necesidad de nucleótidos. UCK se inhibe por UTP y CTP (Liacouras & Anderson, 1977), TK1 se inhibe por dTTP (Ives *et al.*, 1963) y dCK por dCTP (Ives &

Durham, 1970). La dCK se regula además por fosforilación de la serina en posición 74 en respuesta a estrés genotóxico (Beyaert *et al.*, 2016).

Nuestra enzima de interés, DCTPP1, se inhibe por sus productos finales PPi y dCDP (Requena *et al.*, 2014). Cuando aumentan los requerimientos de dCTP se genera como intermediario dCDP mediante dos rutas distintas: la reducción del CDP vía RNR o a través de la recuperación de dCyd que es fosforilada a dCMP por dCK. La expansión del *pool* de dCDP no solo contribuye a la expansión del *pool* de dCTP sino que también inhibe la actividad de DCTPP1, evitando así ciclos fútiles de síntesis y degradación del dCTP.

La degradación de nucleótidos también contribuye a la regulación del *pool* (Rampazzo *et al.*, 2010). Entre las enzimas implicadas en catabolismo de dNTPs cabe destacar SAMHD1. Esta enzima se activa por GTP o dGTP cuya unión al sitio regulador 1 induce la forma tetramérica activa. La unión de cualquier dNTP al sitio 2 modula la especificidad del tetrámero (Koharudin *et al.*, 2014). Además, como se ha mencionado anteriormente, SAMHD1 está regulada a nivel post-traducciona, la fosforilación de la treonina 592 aumenta la actividad dCTP hidrolasa y no modifica la actividad respecto al resto de los sustratos (Jang *et al.*, 2016).

### **A.1.5. Metabolismo mitocondrial de nucleótidos pirimidínicos**

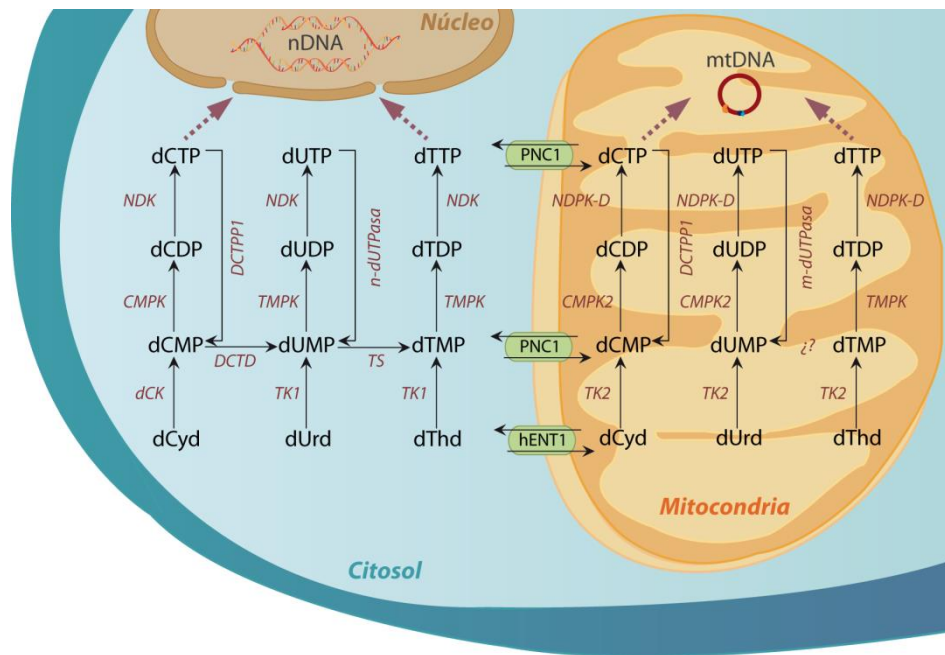
Las células eucariotas mantienen dos *pools* de nucleótidos funcionalmente distintos, un *pool* citosólico de dNTPs para la replicación del DNA y su reparación principalmente disponible en la fase S y un *pool* menor para la síntesis del mtDNA y que se encuentra disponible a lo largo de todas las fases del ciclo y en células diferenciadas. Los nucleótidos son sintetizados en el citosol y pasan al núcleo a través de los poros nucleares. Aunque las enzimas encargadas de la síntesis y el mantenimiento del *pool* de dNTPs se localizan principalmente en el citosol, se han encontrado evidencias de translocación al núcleo de

enzimas citosólicas en fase S o en respuesta a daño, como ocurre con la TS, dCK y TK1 (Y. L. Chen *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2012).

En células en proliferación el *pool* citosólico procedente de la síntesis *de novo* y de la vía de recuperación es importado a la mitocondria por transportadores específicos, contribuyendo de esta forma al *pool* mitocondrial junto con la recuperación de nucleósidos que tiene lugar en dicho orgánulo (Di Noia *et al.*, 2014; Palmieri, 2014). Los transportadores específicos entre citosol y la matriz mitocondrial conectan de forma constante ambos compartimentos. Se ha descrito la existencia de transporte de nucleósidos monofosfato, concretamente de timidilato (Ferraro *et al.*, 2006). El transportador PNC1 o SLC25A33 perteneciente a la familia de transportadores mitocondriales SLC (*solute carrier*) transporta, por orden de afinidad, UTP, dTTP y CTP (Floyd *et al.*, 2007). En un estudio llevado a cabo por Franzolin y colaboradores se ha descrito el transporte de nucleótidos de timidina por parte del transportador PNC1 (Franzolin *et al.*, 2012). Sin embargo, no se ha podido distinguir el nivel de fosforilación por lo que puede tratarse del transportador de dTMP previamente descrito (Ferraro *et al.*, 2006). En cuanto al transporte de nucleósidos purínicos y pirimidínicos, este es llevado a cabo por el transportador humano de equilibrio de nucleótidos (hENT1) perteneciente a la familia SLC29. El transportador hENT1 se localiza en la mitocondria además de en la membrana plasmática y se ha observado que su sobreexpresión aumenta la toxicidad mitocondrial a fármacos antivirales como el nucleósido fialuridina (Figura A.8) (Lai *et al.*, 2004; E. W. Lee *et al.*, 2006).

En células post-mitóticas y tejidos diferenciados no hay síntesis de DNA nuclear (nDNA), por lo que la demanda de nucleótidos se reduce. Sin embargo, la síntesis de DNA mitocondrial y la reparación de daños en el DNA ocurre de forma constante independientemente del ciclo celular, por lo que se necesita un aporte continuo de nucleótidos. En células quiescentes el aporte de dNTPs recae en la reducción en el citosol

de NDPs por RRM2B, cuya expresión es constitutiva, y en las enzimas de recuperación mitocondriales (Arner & Eriksson, 1995; Hakansson *et al.*, 2006). Tanto la timidina quinasa 2 (TK2) como la desoxiguanosina quinasa (dGK) tienen una amplia especificidad de sustrato, lo cual permite la fosforilación de los cuatro nucleósidos por las dos enzimas. La fosforilación de dNMPs a dNDPs es llevada a cabo por la UMP/CMP quinasa (CMPK2) que fosforila dUMP y dCMP y la timidilato quinasa 2 (TMPK2) que fosforila dTMP (Y. L. Chen *et al.*, 2008) (Y. Xu *et al.*, 2008). La última fosforilación hasta la forma trifosfato es catalizada por la nucleótido difosfato quinasa mitocondrial (NDPK-D). Esta enzima tiene también una amplia especificidad de sustrato y se encuentra asociada a la membrana interna de la mitocondria (Lacombe *et al.*, 2009).



**Figura A.8. Metabolismo de nucleótidos en citosol y mitocondria.** nDNA: DNA nuclear; mtDNA: DNA mitocondrial; NDK: nucleótido difosfato quinasa; DCTPP1: dCTP pirofosfatasa 1; n-dUTPasa: dUTPasa nuclear; CMPK: UMP/CMP quinasa; TMPK: timidilato quinasa; dCK: desoxicitidina quinasa; TK1: timidina quinasa ;DCTD: dCMP desaminasa; TS: timidilato sintasa; NDPK-D: nucleótido difosfato quinasa D; m-dUTPasa: dUTPasa mitocondrial; CMPK2: UMP/CMP quinasa 2; TMPK2: timidilato quinasa 2; TK2: timidina quinasa 2; PNC1: transportador de nucleótidos de pirimidina 1; hENT1: transportador humano de equilibrio de nucleótidos.

La recuperación de timidina por parte de TK2 no es suficiente para mantener la replicación del DNA mitocondrial, por lo que se requiere la conversión de dUMP en dTMP

por parte de la timidilato sintasa. Aunque se ha descrito la presencia en mitocondria de tetrahidrofolato (THF) y de las otras dos enzimas necesarias para la formación del dihidrofolato (DHF), la dihidrofolato reductasa L1 (DHFRL1) y la serina hidroximetil transferasa 2 (SHMT2), existen datos contradictorios sobre la presencia o no de TS en mitocondria (Samsonoff *et al.*, 1997; Ferraro *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2009; Kamath *et al.*, 2015).

Otras enzimas a tener en cuenta en el metabolismo de nucleótidos mitocondrial son las nucleótidohidrolasas dUTPasa y DCTPP1. La dUTPasa humana presenta dos isoformas, fruto de splicing alternativo. La isoforma nuclear, n-dUTPasa, está regulada a nivel de ciclo celular, mientras que la isoforma mitocondrial, m-dUTPasa, se expresa de forma constitutiva (Ladner & Caradonna, 1997). Por su parte DCTPP1 se expresa de forma ubicua en la célula, incluida la mitocondria, aunque aún no se ha establecido su papel en homeostasis de dNTPs mitocondriales (Requena *et al.*, 2014).

## **A.2. NTP-PIROFOSFATASAS**

Las nucleótido trifosfato (NTP) pirofosfatasas participan junto a fosforilasas, nucleotidasas y trifosfohidrolasas en las vías catabólicas que involucran la degradación de nucleótidos y nucleósidos. En su mayoría, las NTP-pirofosfatasas llevan a cabo una función “*house-cleaning*” que consiste en eliminar del *pool* nucleótidos modificados o dañados que son potencialmente mutagénicos para la célula. Por ello, la principal característica de este tipo de enzimas es la alta afinidad que presentan por sus sustratos naturales, con valores bajos de  $K_m$ , lo que permite que puedan seleccionarlos de forma preferente frente a los nucleótidos canónicos que se encuentran en exceso.



### A.2.1. Clasificación y tipos de NTP-pirofosfatasas

Se han descrito hasta la fecha cuatro superfamilias de NTP-pirofosfatasas estructuralmente distintas: hidrolasas Nudix, dUTPasas triméricas, ITPasas y NTP pirofosfatasas todo- $\alpha$  (Figura A.9).

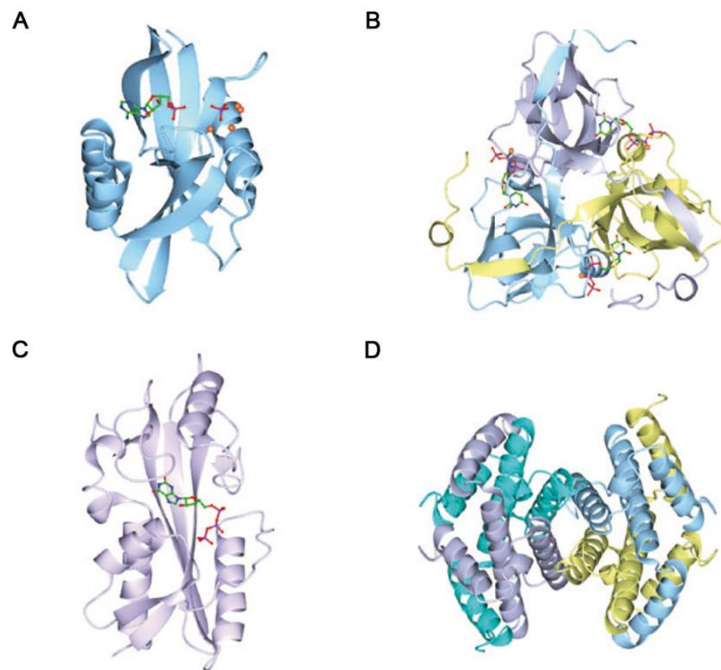
◆ **Hidrolasas Nudix.** La superfamilia Nudix se extiende a eucariotas, bacterias, arqueas y virus, y comprende principalmente pirofosfohidrolasas que actúan sobre (d)NTPs (canónicos y oxidados), estructuras de nucleótido difosfato como NDP-azúcares y CDP-alcoholes, dinucleósidos polifosfatos y mRNAs con caperuza (McLennan, 2006). También se ha descrito actividad de este tipo de enzimas frente a sustratos que no son nucleótidos como difosfoinositol polifosfatos, PRPP o tiamina pirofosfato. La catálisis depende del motivo Nudix o caja Nudix: GX(5)EX(7)REUXEEXGU, donde U es un aminoácido hidrofóbico. La caja Nudix es responsable del reconocimiento del magnesio, no de la base, lo cual explica el amplio abanico de sustratos (Galperin *et al.*, 2006). Mientras unas enzimas eliminan nucleótidos modificados otras mantienen niveles equilibrados de intermediarios metabólicos o compuestos de señalización. La primera enzima reconocida como *house-cleaning*, MutT de *E.coli*, pertenece a esta familia. La enzima humana MTH1 es funcionalmente similar a MutT y elimina 8-oxo-dGTP, 2-oxo-dATP y 8-oxo-dATP. Otra enzima de esta familia, NUDT16, además de estar implicada en la eliminación de la caperuza del extremo 5' de los mRNAs, hidroliza (d)IDP y (d)ITP (Iyama *et al.*, 2010).

◆ **dUTPasas triméricas.** El más común de los nucleótidos no canónicos es el dUTP, puesto que es un intermediario de la síntesis de pirimidinas. Debido a que la mayoría de las DNA polimerasas no pueden distinguir entre timina y uracilo, es crucial que el ratio dUTP/dTTP esté controlado. La dUTPasa se encarga de que los niveles de dUTP sean mínimos, presenta una elevada afinidad por el dUTP mientras que su actividad frente a

otros nucleótidos es baja (Galperin *et al.*, 2006). En el caso de que se produzca incorporación de uracilo, este es eliminado por mecanismos específicos de reparación iniciados por la uracil DNA glicosilasa (UNG).

◆ **ITPasas.** Las ITP pirofosfatasas son otra superfamilia de enzimas *house-cleaning*. Todas las ITPasas caracterizadas hidrolizan de forma eficiente ITP y XTP pero no nucleótidos canónicos. La enzima humana ITPA hidroliza además dITP y es completamente inactiva ante las formas monofosfato y difosfato. Junto con NUDT16 regulan los ratios dIDP/IDP y dITP/ITP, protegiendo de esta forma a la célula de la inestabilidad genómica generada por niveles anormales de dichos ratios (Iyama *et al.*, 2010).

◆ **NTP pirofosfatasas todo- $\alpha$ .** Esta superfamilia se describió tras el descubrimiento de una nueva familia de dUTPasas, las dUTPasas diméricas en los protistas *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi* (Camacho *et al.*, 1997; Harkiolaki *et al.*, 2004).



**Figura A.9. Estructura de las cuatro superfamilias de NTP-pirofosfatasas. A.** Hidrolasas Nudix. **B.** dUTPasas triméricas. **C.** ITPasas. **D.** NTP pirofosfatasas todo- $\alpha$ . (Galperin *et al.*, 2006).

### A.2.2. NTP pirofosfatasa todo- $\alpha$

A través de un análisis estructural se identificaron 4 nuevas familias de NTP pirofosfatasa todo- $\alpha$  además de las dUTPasas diméricas: las NTP-pirofosfatasa bacterianas MazG, las enzimas HisE implicadas en la síntesis de histidina, la familia DR2231 y la familia RS21-C6. La principal característica de las enzimas de esta superfamilia es que están compuestas mayoritariamente por hélices  $\alpha$ .

◆ **dUTPasas diméricas.** Este tipo de dUTPasa se ha descrito en otros kinetoplastos a parte de los ya mencionados, en bacterias y en algunos fagos (Greenberg, 1966; Bernier-Villamor *et al.*, 2002; Castillo-Acosta *et al.*, 2008; Musso-Buendia *et al.*, 2009). Difieren de las dUTPasas triméricas en su estructura y en su capacidad de hidrolizar dUDP además de dUTP.

◆ **MazG.** Esta familia de NTP-pirofosfatasa todo- $\alpha$  está ampliamente extendida en los tres dominios bacteria, arqueas y eucariotas. Se han descrito hasta 300 miembros de esta familia. Las enzimas de *E.coli* y *Thermotoga maritima* hidrolizan nucleótidos con  $K_m$  en torno a 1 mM (J. Zhang & Inouye, 2002). Diversos estudios en diferentes organismos han demostrado que el sitio de unión a sustrato de MazG no parece mostrar afinidad por NTPs canónicos (Moroz *et al.*, 2005). Por el contrario, igual que MutT y otras enzimas Nudix, las enzimas de esta familia son altamente específicas frente a nucleótidos no canónicos. En *Mycobacterium* se ha descrito que MazG hidroliza 5-OH-dCTP y protege la estabilidad genética evitando su incorporación en el DNA. Mutantes en la enzima presentan un incremento en transiciones CG a TA (Lyu *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2018).

◆ **HisE.** La histidina es un aminoácido esencial para los mamíferos (no puede ser sintetizado por las células y debe ser ingerido en la dieta), sin embargo, numerosos microorganismos, plantas y hongos presentan en su metabolismo rutas para su síntesis. La enzima HisE, también conocida como fosforribosil-ATP pirofosfatasa, cataliza la segunda

reacción de la biosíntesis de histidina (Javid-Majd *et al.*, 2008). Su estructura tridimensional conserva la organización todo- $\alpha$  y en muchos casos se encuentra fusionada con otras enzimas de la ruta de síntesis de histidina, como ocurre en *Saccharomyces cerevisiae*, donde encontramos una enzima bifuncional, o en *E.coli* y *Arabidopsis thaliana*, que presentan una HisE trifuncional (Smith & Ames, 1965; Keeseey *et al.*, 1979; Fujimori & Ohta, 1998).

◆ **DR2231.** Esta familia engloba proteínas de origen bacteriano cuya función no ha sido caracterizada hasta la fecha. Aunque presentan similitudes estructurales con la familia MazG, tienen afinidad por dUTP asemejándose funcionalmente a las dUTPasas. Estudios realizados con DR2231 de *Deinococcus radiodurans* han puesto de manifiesto una alta especificidad por dUTP frente al dTTP. Desde un punto de vista evolutivo se ha propuesto a la enzima DR2231 como un precursor de las dUTPasas diméricas (Goncalves *et al.*, 2011) (Mota *et al.*, 2016).

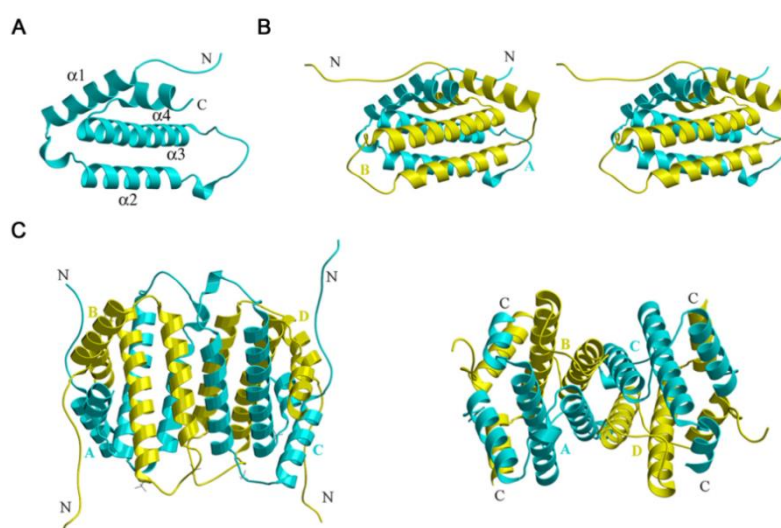
20

◆ **RS21-C6.** Se han identificado miembros de esta familia en vertebrados, plantas, el ascomiceto *Gibberella zea* y en varias bacterias (Moroz *et al.*, 2005). La primera enzima que se caracterizó de esta familia fue la proteína de ratón RS21-C6 y posteriormente el ortólogo humano DCTPP1. Esta enzima es capaz de hidrolizar dCTP y 5Me-dCTP y también presenta una alta afinidad por derivados halogenados especialmente por el 5-iodo-dCTP (5I-dCTP) y el 5-bromo-dCTP (5Br-dCTP) (Nonaka *et al.*, 2009).

Wu y colaboradores establecieron la estructura de una forma truncada de RS21-C6 unida a 5Me-dCTP (Wu *et al.*, 2007). La estructura del monómero RS21-C6 se compone principalmente de 4 hélices  $\alpha$  conectadas por lazos. La estructura tridimensional es un tetrámero formado por la unión de dos dímeros. En cada dímero las hélices  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  interactúan a través de 17 pares de residuos hidrofóbicos. Las cuatro hélices  $\alpha_2$  forman un

haz que estabiliza la formación del tetrámero. Las cuatro hélices  $\alpha$  están ampliamente conservadas en los distintos miembros de la familia (Figura A.10).

Se han identificado 7 residuos clave implicados en la unión de RS21-C6 al sustrato: los residuos His38, Trp47, Trp73 y Tyr102. Por otra parte, Glu63, Glu66, Glu95 y Asp98 son los residuos encargados de estabilizar los grupos de fosfato a través de la unión de  $Mg^{2+}$  y además participan en la reacción catalítica de manera que una mutación en cualquiera de estos aminoácidos supone la inactivación de la enzima.



**Figura A.10.** Estructura de la enzima NTP pirofosfatasa todo- $\alpha$  de ratón, RS21-C6. N: extremo amino; C: extremo carboxilo. **A.** Estructura del monómero, las 4 hélices  $\alpha$  están numeradas del 1 al 4. **B.** Estructura del dímero. Las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  interactúan entre sí mediante residuos hidrofóbicos. A y B representan los dos monómeros. **C.** A la izquierda la vista horizontal y a la derecha la vista vertical del tetrámero resultante de la unión de dos dímeros. A, B, C y D representan los cuatro monómeros. (Wu *et al.*, 2007).

La enzima forma una estructura trimérica con dos sitios activos. Cada sitio activo presenta residuos de dos monómeros distintos, a su vez localizados en diferentes dímeros. El residuo de His38 está localizado en la hélice  $\alpha 1$  y el Trp47 está en el *loop* que conecta las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Los residuos Glu63 y la Glu66 están localizados en la hélice  $\alpha 2$ , y la Glu95, el Asp98 y la Tyr102 están en la hélice  $\alpha 3$ . Sin embargo, el Trp73 está localizado en la hélice  $\alpha 2$  de una molécula perteneciente a un dímero adyacente, por lo que ambos

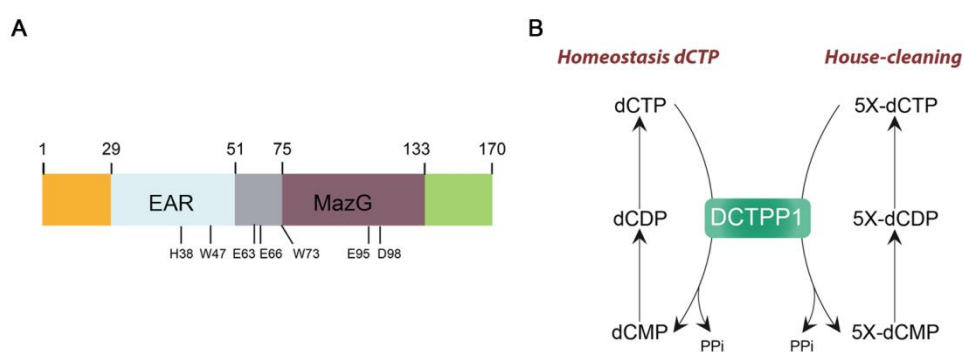
dímeros contribuyen a cada sitio de unión al sustrato. De esta forma, la estructura tetramérica resulta necesaria para la actividad nucleotidohidrolasa.

### A.2.3. DCTPP1

#### A.2.3.1. Actividad nucleotidohidrolasa de DCTPP1

La enzima humana dCTP pirofosfatasa 1 (DCTPP1), inicialmente denominada XTP3-TPA (XTP3-Transactivated Protein A), pertenece a la familia RS21-C6 de las NTP pirofosfatasas todo- $\alpha$ . DCTPP1 consta de 170 aminoácidos e incluye el típico dominio MazG presente en las proteínas de esta familia (Figura A.11.A). Además, presenta un dominio EAR (repetición asociada a epilepsia) que solapa parcialmente con el anterior y que puede estar implicado en interacciones proteína-proteína.

22



**Figura A.11. dCTP pirofosfatasa humana 1 (DCTPP1).** A. Esquema del gen DCTPP1 mostrando los dominios EAR y MazG. B. Función dual propuesta para DCTPP1.

De igual forma que el ortólogo de ratón RS21-C6, la enzima humana hidroliza dCTP de forma preferente frente a los otros nucleótidos canónicos, con un valor de  $K_m$  de 47  $\mu\text{M}$  (Requena *et al.*, 2014). Este hecho convierte a DCTPP1 en la primera enzima descrita en células humanas con actividad dCTP pirofosfatasa. La hidrólisis de dCTP genera dCMP y PPi, los productos característicos de reacciones catalizadas por pirofosfatasas.

Además de su actividad sobre dCTP, DCTPP1 presenta una alta afinidad por derivados de dCTP que presentan modificaciones en la posición C5 de la base. Los derivados por los que muestra una mayor afinidad son los halogenados, 5I-dCTP y 5-Br-dCTP y por el 5-formil-dCTP con rangos de  $K_m$  entre 9 y 35  $\mu\text{M}$ . Estas  $K_m$  son inferiores a la del dCTP, lo cual permite a DCTPP1 seleccionar específicamente estos derivados de entre el *pool* de nucleótidos y de esta forma eliminarlos y evitar su incorporación al DNA donde podrían ejercer un efecto genotóxico. Los datos cinéticos apuntan a una función dual de DCTPP1 en el mantenimiento de la homeostasis de dCTP y además una función *house-cleaning* eliminando derivados modificados de desoxicitidina (Figura A.11.B), como ya se ha descrito para otras NTP-pirofosfatasas (Requena *et al.*, 2014).

### A.2.3.2. Papel de DCTPP1 en la homeostasis de dCTP

Estudios realizados en cultivos celulares han mostrado que la ausencia de DCTPP1 induce la expansión del *pool* de dCTP. Esta observación está de acuerdo con los resultados *in vitro* de hidrólisis preferencial de dCTP frente a los otros nucleótidos canónicos y ponen de manifiesto un posible papel de la enzima en el mantenimiento de la homeostasis de este nucleótido. Además, en células deficientes en DCTPP1 se ha detectado un aumento de los niveles intracelulares de dUTP para cuyo origen se han propuesto distintas hipótesis. Por un lado, un incremento en la formación de dUMP a partir de la desaminación de dCMP a consecuencia de la activación alostérica de la DCTD por un exceso de dCTP (Maley & Maley, 1968) o bien por un incremento de los niveles de dUDP proveniente de la reducción de UDP por la RNR. Ambos intermediarios, dUMP y dUDP, aunque inicialmente destinados a elevar la síntesis de dTTP, darían lugar de forma colateral al dUTP (Requena *et al.*, 2014).

En estudios de silenciamiento transitorio de DCTPP1 y dUTPasa llevados a cabo en células HeLa se ha establecido una relación inversa entre los niveles de ambas enzimas. La inhibición de la expresión de una de ellas se compensa con un aumento en la expresión de

la otra lo que sugiere un papel complementario en la provisión de dUMP para la síntesis *de novo*. Asimismo, la supresión de las rutas de recuperación de nucleósidos mediante silenciamiento génico de TK1 o dCK induce un aumento de expresión de DCTPP1, siendo otro ejemplo claro de la estrecha coordinación y regulación de la ruta.

DCTPP1 presenta una localización intracelular ubicua, encontrándose en núcleo, citosol y mitocondria. El hecho de que la proteína presente localización mitocondrial puede implicar que DCTPP1 tenga un papel adicional en la homeostasis del *pool* de dCTP mitocondrial. En células no proliferativas, como es el caso de tejidos diferenciados, donde el salvamento mitocondrial de nucleósidos pasa a un primer plano, DCTPP1 podría jugar un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis de dNTPs y en el desarrollo de enfermedades relacionadas con síndromes de depleción mitocondrial (MDS).

### **A.2.3.3. Función *house-cleaning* de DCTPP1**

24

Los estudios de cinética *in vitro* muestran una alta actividad de DCTPP1 frente a análogos de nucleótidos de desoxicitosina con modificaciones en la posición C5 de la base indicando una posible función *house-cleaning*. En base a estos datos se evaluó la sensibilidad de células deficientes para DCTPP1 frente a derivados halogenados y metilados de desoxicitosina. Así, el silenciamiento de DCTPP1 sensibiliza las células frente al efecto citotóxico de análogos como 5I-dCyd y 5Me-dCyd. Además, en células tratadas con 5Me-dCyd y donde la expresión de DCTPP1 está inhibida se produce un aumento de la metilación global relativa lo que apoya el papel de la enzima en impedir la incorporación de 5Me-dCTP y por tanto su función *house-cleaning* (Requena *et al.*, 2016).

Otra fuente de nucleótidos no canónicos, de origen exógeno en este caso, proviene de la activación de análogos de nucleósidos empleados en terapias antitumorales y antivirales. Este tipo de compuestos interactúan con un amplio número de enzimas del metabolismo ya sea comportándose como sustratos o como inhibidores y compiten con los



sustratos canónicos por su incorporación al DNA y/o al RNA (Rampazzo *et al.*, 2016). Las actividades catabólicas pueden influenciar el metabolismo de estos análogos antitumorales y antivirales disminuyendo su eficacia. La decitabina (5-aza-desoxicitidina, 5Aza-dCyd) es un análogo de citidina que actúa como agente desmetilante del DNA y se usa como fármaco para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos y en la leucemia mieloide aguda (Santos *et al.*, 2010). Se activa metabólicamente por fosforilaciones consecutivas hasta formar 5'-aza-2'-deoxicitidina-5'-trifosfato (5Aza-dCTP) que puede incorporarse al DNA. Una vez incorporado en el DNA la decitabina actúa como sustrato suicida atrapando de forma covalente la DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) y genera una unión proteína-DNA que desencadena la maquinaria de degradación del proteasoma que provoca la restricción de las actividades de metilación del DNA. Como consecuencia se produce la hipometilación de regiones promotoras y la reactivación de genes reprimidos epigenéticamente, incluyendo la de genes supresores de tumores (Khan *et al.*, 2013).

DCTPP1 presenta actividad *in vitro* frente a 5Aza-dCTP con valores cinéticos similares a los de su sustrato canónico dCTP. Esta actividad sugiere que DCTPP1 puede estar impidiendo la incorporación de azacitosina en DNA y por lo tanto manteniendo constantes los niveles de metilación del DNA. En ausencia de DCTPP1 el tratamiento con decitabina produce una disminución moderada de los niveles de metilación global del genoma y además la ausencia de DCTPP1 sensibiliza a las células frente al fármaco. De acuerdo con estos resultados la proporción entre la actividad hidrolasa y las actividades quinasa podría tener un valor predictivo en los tratamientos con este fármaco (Requena *et al.*, 2016). Altos niveles de DCTPP1 podrían comprometer la respuesta del paciente a este tipo de terapias por lo que el uso combinado de la decitabina con inhibidores de DCTPP1 podrían ayudar a prevenir fenotipos de resistencia. Cabe destacar que tiene una importante expresión nuclear en diferentes tipos de tumores, comparado con tejidos adyacentes al tumor y se ha relacionado también con células madre cancerígenas (Y. Zhang *et al.*, 2013). Recientemente se han descrito los primeros inhibidores específicos de DCTPP1 y que estos

pueden potenciar el efecto de fármacos basados en análogos de citidina aunque es necesario profundizar en su estudio para explotar su potencial farmacológico (Llona-Minguez *et al.*, 2016; Llona-Minguez *et al.*, 2017a; Llona-Minguez *et al.*, 2017b).

### **A.3. Metabolismo de nucleótidos e inestabilidad genética**

El mantenimiento de niveles equilibrados de dNTPs para la replicación del DNA, tanto nuclear como mitocondrial, es crítico para preservar la estabilidad del genoma en las células. En estudios *in vitro* de síntesis de DNA se observó que desbalances en el pool de dNTPs provocan fallos en su incorporación causando cambios en la pauta de lectura o inserciones erróneas, por inhibición de la actividad *proofreading* de la polimerasa (Bebenek *et al.*, 1992). Es por esto que las concentraciones, tanto absolutas como relativas, de los cuatro nucleótidos deben estar estrechamente reguladas y controladas por actividades anabólicas y catabólicas. De hecho, irregularidades o defectos en el metabolismo de los precursores del DNA tienen amplias consecuencias genotóxicas, que van desde un aumento en la mutagénesis y las recombinaciones genéticas hasta la aparición de aberraciones cromosómicas, daños que pueden finalmente conducir a la muerte celular (Kunz *et al.*, 1994). Se ha observado en ensayos *in vitro* con DNA polimerasas purificadas que un desbalance en el *pool* de nucleótidos puede conducir a mutagénesis por sustitución, bien por competición entre nucleótidos canónicos y no canónicos, o bien por lo que se conoce como el efecto del siguiente nucleótido, en el que el apareamiento correcto de bases tras un apareamiento erróneo impide la actividad *proofreading* sobre el apareamiento incorrecto situado aguas arriba (Meuth, 1989; Mathews, 2006). Igualmente se han observado en ensayos *in vitro* inserciones o deleciones resultado de la estabilización de intermediarios.

La mutagénesis no solo se estimula por un desbalance en las concentraciones de uno de los dNTPs, sino también por acumulación de los cuatro (Martomo & Mathews, 2002). La

acumulación simultánea de dATP, dCTP, dGTP y dTTP puede producirse en contextos de reparación de DNA o por sobreexpresión de la RNR y es además una característica común en células tumorales. El gen que codifica para la subunidad R2 de la RNR se encuentra entre el 10% de los genes más sobreexpresados en 73 de 168 tumores analizados (Aye *et al.*, 2015) y en un modelo de ratones transgénicos que sobreexpresan R2 se ha observado el desarrollo de neoplasmas de pulmón (X. Xu *et al.*, 2008). Defectos en SAMHD1 también son origen de un alto nivel de nucleótidos y pueden conducir a procesos tumorigénicos (Kohnken *et al.*, 2015). Mutaciones que inactivan solo uno de los alelos de SAMHD1 aumentan significativamente el *pool* de dNTPs y exacerba el fenotipo por mutaciones en la reparación de errores en emparejamiento (MMR) (Rentoft *et al.*, 2016). Se ha relacionado el oncogen c-Myc con el metabolismo de nucleótidos. Por un lado, la represión de la expresión de c-Myc conlleva la reducción en la expresión de diversas enzimas del metabolismo como TS, TK1 o PRPP sintetasa (PRPS2), la reducción del *pool* y el retraso de la progresión del ciclo celular (Mannava *et al.*, 2008). Por otra parte, la sobreexpresión de c-Myc tiene el efecto contrario, lo que sugiere que un papel importante de c-Myc puede ser regular genes asociados con la síntesis de nucleótidos.

#### **A.4. Alteraciones del metabolismo de pirimidinas y su implicación en patologías humanas**

Se han descrito hasta la fecha nueve enfermedades originadas por defectos en algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos. Cabe destacar que ninguna de las enfermedades descritas implica defectos en el salvamento de uridina, lo cual sugiere que este pueda ser esencial para la supervivencia celular. La identificación de estas alteraciones es compleja debido a la heterogeneidad en la manifestación clínica entre los distintos sujetos.

El primer trastorno del metabolismo de pirimidinas descrito en un defecto congénito fue la deficiencia de tipo 1 en la UMPS, causante de la aciduria orótica. En los 17 pacientes identificados hasta la fecha se han detectado mutaciones en la orotato fosforribosil transferasa (OPRT) (Loffler *et al.*, 2005). Esta deficiencia es tratable con uridina a largo plazo mientras que no se han observado mejoras tras tratamientos con uracilo lo que evidencia que la recuperación de pirimidinas ocurre a nivel de nucleósido y no a nivel de base (Becroft *et al.*, 1969). En la deficiencia de UMPS de tipo 2 es la actividad orotidina monofosfato descarboxilasa (OMPDC) la que se encuentra alterada y se caracteriza por la acumulación de ácido orótico además de orotidina en orina en los pacientes, lo que permite diferenciarla de la deficiencia de tipo 1.

En 2015 se identificó el primer caso de mutaciones en la enzima trifuncional CAD en un niño (Ng *et al.*, 2015). Estudios metabólicos revelaron incorporación de aspartato en RNA y DNA y niveles reducidos de CTP, UTP y UDP-azúcares, defectos revertidos por la suplementación con uridina. Recientemente se han descrito nuevas mutaciones en 4 niños (Koch *et al.*, 2017). Pese a que no se han realizado estudios metabólicos en profundidad, se ha encontrado que los fibroblastos de uno de los pacientes mostraban niveles reducidos de UDP, UDP-glucosa, UDP-GlcNac, CTP y UTP, los cuales fueron restablecidos mediante la suplementación con uridina. Asimismo, el tratamiento de dos de los pacientes con uridina tuvo como resultado en una mejora de la patología.

Además de los dos desórdenes genéticos asociados a la síntesis de pirimidinas se han descrito otras enfermedades relacionadas con el catabolismo de nucleótidos pirimidínicos. La deficiencia de la UMP hidrolasa (UMPH-1) causa acumulación de nucleótidos de citidina y uridina además de CDP-etanolamina y CDP-colina (Valentine *et al.*, 1974).

La deficiencia de la CDP-colina fosfotransferasa se caracteriza por la acumulación en los glóbulos rojos de CDP-etanolamina y CDP-colina de forma similar a lo que ocurre en la deficiencia de UMPH-1 (Loffler *et al.*, 2005).

Los defectos en dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) y dihidropirimidinasa (DHP) están asociados a trastornos neurológicos y se ha observado una heterogeneidad importante en la presentación clínica de los distintos casos. La DPD es la primera enzima que participa en la hidrólisis de uracilo o timina a  $\beta$ -alanina o ácido  $\beta$ -aminoisobutírico, y deficiencias en dicha enzima causan acumulación de timina y uracilo (van Gennip & van Kuilenburg, 2000). Por otra parte, DHP hidroliza dihidrotimina y dihidrouracilo a ácido  $\beta$ -ureidopropiónico y ácido  $\beta$ -ureidoisobutírico respectivamente. Defectos en DHP resultan en la acumulación de 5,6-dihidrotimina y 5,6-dihidrouracilo (Hamajima *et al.*, 1998).

La ureidopropionasa (UP) es la enzima que cataliza la hidrólisis de ácido  $\beta$ -ureidopropiónico y ácido  $\beta$ -ureidoisobutírico a  $\beta$ -alanina y ácido  $\beta$ -aminoisobutírico. Se detecta por acumulación en orina, plasma y fluido cerebroespinal de dihidrotimina y dihidrouridina además de un aumento moderado de N-carbamil- $\beta$ -alanina y ácido N-carbamil- $\beta$ -aminoisobutírico (Loffler *et al.*, 2005).

Mutaciones en SAMHD1 también se han relacionado con patologías humanas. Por un lado, se han identificados mutaciones en SAMHD1 en pacientes del síndrome de *Aicardi-Goutières* (Rice *et al.*, 2009). El estudio sugiere que SAMHD1 tiene un papel protector en la autoactivación de la inmunidad innata. Se ha identificado una mutación en SAMHD1 en una madre y un hijo con lupus sabañón, lo cual sugiere que SAMHD1 está implicada en inmunidad innata y en inflamación (Ravenscroft *et al.*, 2011).

Existen otras deficiencias que se engloban en un conjunto de patologías mitocondriales que se conocen como síndromes de depleción mitocondrial (MDS) y se caracterizan por la reducción en el número de copias del mtDNA. En tejidos diferenciados, donde no hay replicación del DNA nuclear y por tanto la síntesis *de novo* y la vía de recuperación citosólica no son funcionales, la integridad y replicación del DNA mitocondrial depende en gran medida de la ruta de salvamento mitocondrial (Saada,

2009). La primera patología mitocondrial asociada a defectos en el metabolismo de pirimidinas descrita fue la encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE) que se caracteriza por deficiencias en la actividad timidina fosforilasa (TP). Mutaciones en la TP producen acumulación de desoxiuridina y desoxitimidina en orina y plasma. A nivel de nucleótidos trifosfato se produce una acumulación de dTTP que actúa inhibiendo alostéricamente a la timidina quinasa 2 (TK2) lo que de forma indirecta causa una depleción de dCTP puesto que esta quinasa también es la encargada de fosforilar desoxicitidina en mitocondria (Gonzalez-Vioque *et al.*, 2011). Alteraciones en la actividad de TK2 también afectan a la función mitocondrial. Los pacientes muestran graves miopatías y depleción de DNA mitocondrial en tejido muscular (Saada *et al.*, 2001). Recientemente se ha descrito que la suplementación con desoxicitidina o desoxitimidina a ratones *knockout* para TK2 retrasan el inicio de la enfermedad, prolongan la esperanza de vida y restablecen el número de copias del DNA mitocondrial (Lopez-Gomez *et al.*, 2017).

Mutaciones en los genes de la desoxiguanosina quinasa (dGK) y la subunidad 2 de la RNR inducible por p53 (p53R2) también se han asociado a inestabilidad del DNA mitocondrial y disminución del número de copias, concretamente se han relacionado con las formas hepatocerebral y muscular de MDS respectivamente (Mandel *et al.*, 2001; Bourdon *et al.*, 2007). En 2019 se ha asociado por primera vez mutaciones en el gen de la timidilato quinasa (TMPK) con la depleción del DNA mitocondrial en dos pacientes. A falta de un estudio metabólico en profundidad Lam y colaboradores proponen que se tenga en cuenta esta enzima como gen asociado al desarrollo de MDSs (Lam *et al.*, 2019). Otros MDSs son provocados por mutaciones en genes implicados en la replicación del DNA mitocondrial como son la DNA polimerasa y o la DNA helicasa Twinkle. Defectos en estos genes son responsables del síndrome denominado oftalmoplegia externa progresiva (PEO), que caracteriza por deleciones múltiples en el DNA mitocondrial (Spelbrink *et al.*, 2001; Mathews & Song, 2007).

# OBJETIVOS

---





## B. OBJETIVOS

El mantenimiento de la integridad genómica constituye un desafío continuado al que se enfrentan los seres vivos con el fin de asegurar la supervivencia celular y una correcta duplicación del material genético. Teniendo en cuenta que los desoxirribonucleótidos (dNTPs) son los precursores en la replicación del DNA, el metabolismo de dNTPs juega un papel central en el cumplimiento de esta función ya que la correcta síntesis del DNA depende de un *pool* de dNTPs equilibrado.

El propósito central de esta tesis ha sido la caracterización del papel de DCTPP1 en la homeostasis de nucleótidos pirimidínicos y su impacto en el mantenimiento de la integridad genómica. Con este fin se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Estudiar la contribución de DCTPP1 al *pool* de los nucleótidos pirimidínicos y su interacción funcional con la ruta de recuperación de nucleósidos.
- II. Analizar la implicación de DCTPP1 en la modulación del ratio dUTP/dTTP y en la incorporación errónea de uracilo en el DNA.
- III. Establecer el impacto de DCTPP1 en el mantenimiento de la integridad de los genomas nuclear y mitocondrial.
- IV. Generar un modelo de quiescencia para el estudio de la localización subcelular y los niveles de expresión génica de DCTPP1 y así establecer su papel en la homeostasis de nucleótidos mitocondrial.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## C. MATERIALES Y MÉTODOS

### C.1. MATERIALES

#### C.1.1. Líneas celulares

##### C.1.1.1. Células humanas

MCF-7 (ATCC®HTB-22™): Línea celular humana procedente de una glándula mamaria con metástasis. Se trata de células adherentes con un cariotipo que varía de triploide a tetraploide (rango de 66 a 87 cromosomas), nulisómica para el cromosoma 20 y disómica para el cromosoma X.

CCD-34Lu (ATCC®CRL-1491™): Línea celular humana derivada de fibroblastos. Células adherentes con cariotipo 46, disómica para el cromosoma X, procedente de una niña de 2 años y medio de edad.

HAP1 (Horizon): Línea celular cuasi-haploide derivada de la línea celular humana KBM-7. Se trata de células adherentes con morfología de fibroblasto, con un cariotipo haploide para todos los cromosomas excepto para 30 Mb del cromosoma 15.

HAP1 DCTPP1-knockout (HZGHC003248c012, Horizon): Línea *knockout* (KO) para DCTPP1 obtenida a partir de células HAP1 mediante la tecnología CRISPR/Cas9. La secuencia guía (sgRNA) para la edición génica es GTTTGCTGCGGAACGAGACT, está dirigida contra el exón 2 del gen y la línea resultante presenta una delección de 13 bp.

HAP1 DCTPP1-KO-Ex1: Segunda línea *knockout* para DCTPP1 generada en este trabajo (Apartado C.2.7). La secuencia sgRNA utilizada para la edición génica es GGCCGGTGGGGAGATTCGTG, está dirigida contra el exón 1.

### **C.1.1.2. Bacterias**

En este estudio se ha utilizado la siguiente cepa de *Escherichia coli*: XL1-Blue (Bullock, 1987) *Rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hdsR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*.

### **C.1.2. Medios de cultivo**

MEM (Minimum Essential Medium): Este medio se utilizó para el cultivo de las células MCF-7 y CCD-34Lu, según las recomendaciones de ATCC-LGC. El medio de cultivo se suplementó con 10% de suero bovino fetal (SBF) y con antibióticos: penicilina a 100 U/ml y estreptomycinina a 100 µg/ml (Gibco, Life Technologies). En el caso de la línea CCD-34Lu el medio además se suplementó con una solución de aminoácidos no esenciales 1X (Gibco, Life Technologies).

38

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's médium): Este medio se utilizó para el cultivo de las células HAP1 WT y DCTPP1-KO, según las recomendaciones de Horizon. El medio de cultivo se suplementó con 10% de suero bovino fetal (SBF) y con antibióticos: penicilina a 100 U/ml y estreptomycinina a 100 µg/ml (Gibco, Life Technologies).

LB Agar: El medio *lysogenic broth* se utilizó para el cultivo de bacterias, su composición es: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl. En el caso de medio sólido para placas se añade además bacto-agar a una concentración de 15 g/l. El medio se suplementó con antibióticos en función de la resistencia conferida por el plásmido que porta la bacteria: ampicilina (Amp) a 100 µg/ml (Roche) o kanamicina (Kan) a 50 µg/ml (Sigma-Aldrich).

### C.1.3. Compuestos, tampones y soluciones

#### C.1.3.1. Compuestos

Nucleótidos y nucleósidos: dCTP, dTTP, dGTP, dUTP de GE Healthcare; ATP, CTP, UTP, GTP y timidina (dThd) de Sigma-Aldrich; ITP de TriLink Biatechnologies; 6-tioguanina (6-TG) de Sigma-Aldrich; 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) (Becton Dickinson); 5-fluorouracilo (5-FU) y 5'-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd) de (Sigma-Aldrich).

Antibióticos: puromicina (Gibco Technologies), ampicilina (Roche), kanamicina (Sigma-Aldrich) y cloranfenicol (CAP) (Sigma-Aldrich).

Otros compuestos: resazurina (Sigma-Aldrich), yoduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich), RNasa (Sigma-Aldrich), *MitoTracker™ Red CMX Ros* (Invitrogen) y nocodazol (Sigma-Aldrich).

39

#### C.1.3.2. Tampones y soluciones

Todas las soluciones y tampones se prepararon en agua miliQ y se autoclavaron y/o filtraron en caso de ser necesario.

<b>Tampón fosfato salino (PBS)</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4
<b>Tampón de lisis RIPA (Sigma-Aldrich)</b>	Tris:HCl 25mM pH 7,6, NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 1%, SDS 0,1%
<b>Tampón de reacción de la dUTPasa</b>	TrisHCl 34 mM, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, pH 7,8
<b>Tampón para la determinación de NTPs por HPLC</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM, pH 3,4
<b>Tris-acetato-EDTA</b>	Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM
<b>Tampón de electroforesis SDS-PAGE</b>	Tris 250 mM, glicina 1,92 M, SDS 1%

<b>Tampón de carga SDS-PAGE</b>	Tris-HCl 67,5 mM pH 6,8, SDS 3%, glicerol 10%, $\beta$ -mercaptoetanol 5%
<b>Tampón de transferencia</b>	Tris base 25 mM, glicina 186 mM, metanol 20%
<b>Solución de bloqueo para WB</b>	PBS 1X, Tween 20® 0,1%, leche en polvo desnatada 5%
<b>Tampón TAE 1X</b>	Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 1 mM, pH 8

**Tabla C.1.** Composición de tampones y soluciones.

#### C.1.4. Anticuerpos

<b>Anticuerpos primarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Organismo</b>	<b>Referencia</b>	<b>WB</b>	<b>IF</b>
Anti-actina	Ratón	MM2/193, Sigma-Aldrich	1:10000	
Anti-Chk1 <sub>Ser345</sub>	Conejo	133D3, Cell Signaling Technology	1:1000	
Anti-Chk2 <sub>Thr68</sub>	Conejo	C13C1, Cell Signaling Technology	1:1000	
Anti-CTPS1	Conejo	Abcam	1:3000	
Anti-dCK	Ratón	H-3, Santacruz Biotechnology	1:1000	
Anti-DCTD	Ratón	F-9, Santacruz Biotechnology	1:1000	
Anti-DCTPP1	Conejo	(Requena <i>et al.</i> , 2014)	1:5000	1:1000
Anti-dUTPasa	Conejo	(Requena <i>et al.</i> , 2016)	1:10000	
Anti-p53R2	Conejo	Sigma-Aldrich	1:3000	
Anti-R2	Ratón	A-5, Santacruz Biotechnology	1:1000	
Anti-SAMHD1	Conejo	Cell Signaling Technology	1:1000	
Anti-SAMHD1 <sub>T592</sub>	Conejo	Cell Signaling Technology	1:1000	
Anti-TK1	Ratón	C-4, Santacruz Biotechnology	1:1000	
Anti-TK2	Conejo	Acris	1:1000	
Anti-TMPK	Ratón	B-8, Santacruz Biotechnology	1:1000	
Anti-TS	Conejo	H-265, Santacruz Biotechnology	1:1000	
Anti-UNG	Conejo	GeneTex	1:1000	
Anti- $\alpha$ -tubulina	Ratón	B-5-1-2, Sigma-Aldrich	1:10000	
Anti- $\gamma$ H2AX <sub>S139</sub>	Conejo	Abcam		1:400

**Tabla C.2.** Lista de anticuerpos primarios utilizados en *western blot* (WB) e inmunofluorescencia (IF).



Anticuerpos secundarios				
Nombre	Organismo	Referencia	WB	IF
Anti-Rabbit IgG, HRP Conjugate	Cabra	Promega	1:5000	
Anti-Mouse IgG, HRP Conjugate	Cabra	Promega	1:3000	
Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488 conjugate	Cabra	Sigma-Aldrich		1:400
Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 549 conjugate	Cabra	Sigma-Aldrich		1:400

**Tabla C.3.** Lista de anticuerpos secundarios utilizados en *western blot* (WB) e inmunofluorescencia (IF).

### C.1.5. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5' →3')	Uso
<b>pool siRNA DCTPP1</b>	GGCGUAACUUCUAGAUUA	RNAs dirigidos contra DCTPP1 para el silenciamiento transitorio
	CCCAGUAGGAUGUCAUGUA	
	UCUUAGAGAUUGAAGGCUG	
	CCGCAAGUAUACAGAAUUG	
<b>pool siRNA TK1</b>	GGGCCGAUGUUCUCAGGAA	RNAs dirigidos contra TK1 para el silenciamiento transitorio
	GCAUUAACCUAGCCACUGU	
	GCACAGAGUUGAUGAGACG	
	CAAAGACACUCGCUACAGC	
<b>pool siRNA dCK</b>	CCAGAGACAUGCUUACAUA	RNAs dirigidos contra dCK para el silenciamiento transitorio
	AAAGCUGGCUCUGCAUAG	
	UAUCAAGACUGGCAUGACU	
	GGA AUGUUCUUCAGAUGAU	
<b>pool siRNA UNG</b>	UUAUCAAGCUAAUGGGAUU	RNAs dirigidos contra UNG para el silenciamiento transitorio
	GAACUCGAAUGGCCUUGUU	
	GAAGCGGCACCAUGUACUA	
	UAUAGAGGGUUCUUUGGAU	
<b>pool siRNA DCTD</b>	GCAAGAAACGGGACGACUA	RNAs dirigidos contra DCTD para el silenciamiento transitorio
	CCUUGUAAUGAUGCGUA	
	UCAAUUAACAGCAGACCGA	
	GGGGUGACAUUCCGAAAAU	

Nombre	Secuencia (5' →3')	Uso
<b>DNApol Primer</b>	CCGCCTCCACCGCC	Cebador del ensayo de la DNA polimerasa
<b>Molde-det-dCTP</b>	TTTGTTTGTGGTTTGGTT	Molde del ensayo de la DNA polimerasa
	TGGGCGGTGGAGGCGG	
<b>Molde-det-dTTP</b>	TTTATTATATTATTTATT	Molde del ensayo de la DNA polimerasa
	TAGGCGGTGGAGGCGG	
<b>Molde-det-dGTP</b>	TTTCTTTCTTTCTTTCTT	Molde del ensayo de la DNA polimerasa
	TCGGCGGTGGAGGCGG	
<b>GAPDH-Forward</b>	TATCGTGGAAGGACTCATGGTATG	Uracilo en gDNA
<b>GAPDH-Reverse</b>	GGTTGAGCACAGGGTACTTTATTG	Uracilo en gDNA

**Tabla C.4.** Lista de cebadores y RNAs de interferencia (siRNAs).

Los pools de siRNAs utilizados para el silenciamiento transitorio de DCTPP1, TK1, UNG, DCTD y dCK son de Dharmacon, Horizon; los primers utilizados para el ensayo de la DNA polimerasa y para la determinación de uracilo en DNA genómico (gDNA) se sintetizaron por el servicio de Genómica del Instituto López-Neyra.

### C.1.6. Plásmidos

Nombre	Inserto	Marcador de selección en <i>E.coli</i>	Referencia	Uso
<b>pcDNA</b>		Amp	Addgene	Vector de expresión
<b>pCDNA-DCTPP1</b>	DCTPP1	Amp	Requena et al, 2016 (Requena <i>et al.</i> , 2016)	Sobreexpresión transitoria de DCTPP1
<b>pCDNA-DUT</b>	dUTPasa	Amp	Requena et al, 2016 (Requena <i>et al.</i> , 2016)	Sobreexpresión transitoria de dUTPasa
<b>pEGFP</b>		Kan	Clontech	Vector de expresión

Nombre	Inserto	Marcador de selección en		Referencia	Uso
		<i>E.coli</i>			
<b>pEGFP-DUT</b>	dUTPasa	Kan		Apartado C.2.3	Sobreexpresión transitoria de dUTPasa
<b>pCas9-Guide</b>	sgRNA DCTPP1	Amp		Origene Technologies	CRISPR/Cas9 exon 1 de DCTPP1
<b>pUC-Donor</b>	GFP y gen de Puro <sup>R</sup>	Amp		Origene Technologies	Inserción de los genes GFP y Puro <sup>R</sup> en el locus de DCTPP1

**Tabla C.5.** Lista de plásmidos y vectores. Ampicilina (Amp); kanamicina (Kan).

## C.1.7. Programas informáticos y bases de datos

### C.1.7.1. Programas informáticos

- *FIJI* (versión 1.5; Image J) (Schindelin *et al.*, 2012)
- *JACOP Image J plugin* (Bolte & Cordelieres, 2006)
- *FlowJo* (versión 7.6), Tree Star Inc.
- *Serial cloner* (versión 2.6.1) (Serial Basics)
- *Oligonucleotides Properties Calculator*, North Western University Medical School.
- *Adobe® Photoshop® CS3* (versión 10.0)
- *Adobe® Illustrator® CS3* (versión 13.0.1)
- *SigmaPlot* (versión 8.0)
- *GraphPad Prism* (versión 5)
- *IBM® SPSS® Statistics* (versión 25)
- *EndoNote X5*
- *Microsoft Office 2010* (*Microsoft Word, Microsoft Excel y Microsoft Powerpoint*)
- *Mozilla Firefox y Google Chrome*

- *Windows 7, Microsoft*

### **C.1.7.2. Bases de datos**

- *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*: Utilizada para buscar secuencias de DNA, proteínas y bibliografía.
- *EMBL-EBI*: Utilizada para el análisis de secuencias y alineamientos.
- *Human Protein Atlas*: Base de datos sobre proteínas, niveles de expresión, posible localización subcelular, en tejidos y células humanas y en líneas celulares establecidas.

### **C.1.8. Análisis estadístico**

Para comparar diferentes conjuntos de datos se calculó la media y la desviación estándar (SD) de los datos obtenidos en al menos tres experimentos independientes, y las medias se compararon mediante el test *t de Student*. En el caso de datos distribuidos de forma normal se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de test de Dunnet como análisis *post-hoc*. Los valores estadísticos se calcularon usando bien el *GraphPad Prism* software o *IBM® SPSS® Statistic*. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SD. Se consideraron como significativos aquellos resultados con  $P < 0.05$  (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ).

## C.2. MÉTODOS

### C.2.1. Manipulación y mantenimiento de líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para los estudios *in vitro* fueron las siguientes: la línea de cáncer de mama MCF-7, la línea haploide HAP1 y la línea *knockout* para DCTPP1 derivada de esta última, DCTPP1-KO y la línea de fibroblasto de pulmón CCD-34Lu. Para el mantenimiento las células se cultivaron en frascos de 25 o 75 cm<sup>2</sup> y se utilizaron placas de 100 cm<sup>2</sup>, placas multipocillo de 6, 12 o 96 pocillos de acuerdo con las necesidades del experimento. Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 95%.

El cultivo de las células MCF-7 se realizó de acuerdo con las instrucciones de ATCC, las células se subcultivaron una vez a la semana, utilizando 5 x 10<sup>5</sup> células para el nuevo cultivo. Para ello el medio de cultivo se retiró y las células adheridas se lavaron con 3 ml de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco, Life Technologies). A continuación, se despegaron del frasco utilizando 2 ml de tripsina e incubando 5 min a 37°C. La tripsina se neutralizó con 8 ml de medio y las células resuspendidas se centrifugaron a 300 g durante 3 min, tras lo cual se retiró el medio antiguo y se resuspendieron en medio nuevo libre de tripsina, diluyéndolas a la concentración deseada. El medio se renovó cada 2-3 días.

Los fibroblastos de pulmón CCD-34Lu se cultivaron de acuerdo con las indicaciones de ATCC, diluyendo los cultivos cada 4 o 7 días, con ratios de cultivo 1:2 y 1:4 respectivamente. Después de retirar el medio las células se lavaron con 4 ml de PBS 1X, y se despegaron con 1 ml de tripsina-EDTA 0,25% a 37 °C durante 5 min. Finalmente, las células se diluyeron a la concentración deseada. El medio se renovó cada 2-3 días.

Las líneas celulares HAP1 y DCTPP1-KO se diluyen 1:15 cada 2 días o 1:30 cada 3 días. Después de retirar el medio las células se lavaron con 4 ml de PBS 1X, y se despegaron con

1 ml de tripsina-EDTA 0,05% a 37 °C durante 2 min. Finalmente, las células se diluyeron a la concentración deseada.

### **C.2.2. Criopreservación y descongelación**

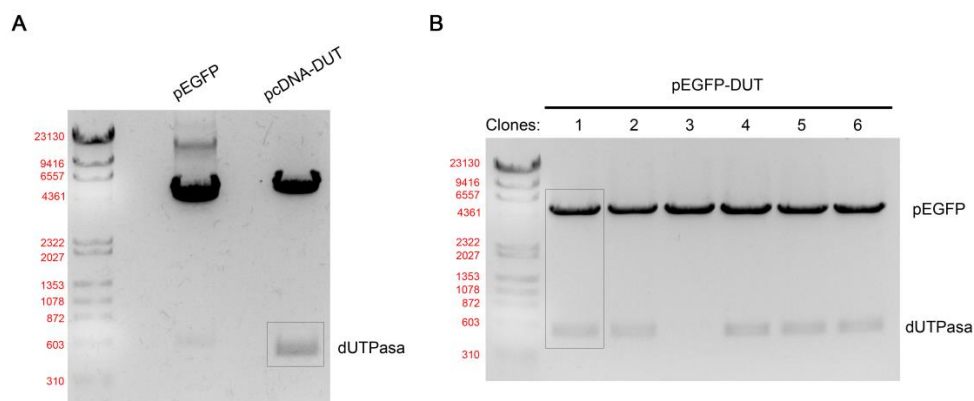
Para la criopreservación de células MCF-7 y CCD-34Lu el cultivo se centrifugó 3 min a 300 g, tras lo cual se resuspendieron las células en una mezcla de medio de cultivo completo con DMSO al 10% y se añadió 1ml con  $1 \times 10^6$  células a cada tubo de congelación. La congelación debe seguir un proceso gradual, por lo que se introdujeron los viales en una caja de congelación con isopropanol que permite que la temperatura descienda 1 °C cada minuto y se mantuvieron 24 h a -80 °C. Finalmente, los viales se guardaron en nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo. En el caso de las células HAP1 el medio de congelación consta de medio de cultivo con 20% de SBF (sin antibióticos) y con un 10% de DMSO.

46

El proceso de descongelación, contrariamente a la criopreservación, debe ser rápido para evitar la toxicidad del DMSO para las células. Para ello, los tubos procedentes del nitrógeno líquido se introdujeron en el baño a 37 °C. Para la descongelación de células MCF-7 el contenido del vial se transfirió a un tubo con 9 ml de medio y se centrifugó 3 min a 300 g. A continuación, se retiró el medio de congelación y el pellet se resuspendió en 5mL de medio con un 20% de SBF y se transfirió a un frasco de 25 cm<sup>2</sup>. En el caso de las células CCD-34Lu, HAP1 y DCTPP1-KO, una vez descongelado el vial, se transfirió el contenido a un frasco de 25 cm<sup>2</sup> con 4 ml de medio completo fresco y previamente precalentado a 37 °C. El medio se renovó 24 h después de la descongelación.

### C.2.3. Clonación de la dUTPasa humana en el vector pEGFP

La secuencia de la isoforma nuclear de la dUTPasa humana se clonó en el vector pEGFP con el objetivo de expresar la dUTPasa fusionada con EGFP en su extremo amino. La secuencia codificante de la dUTPasa se obtuvo a partir del plásmido pcDNA-DUT (Requena *et al.*, 2016). El plásmido se digirió con las enzimas BamHI y HindIII (New England Biolabs) y el inserto correspondiente a la dUTPasa se aisló por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó con el kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). El vector pEGFP (Clontech) se digirió con las mismas enzimas de restricción, se purificó y se trató con fosfatasa alcalina (Roche) (Figura C.1.A). El vector y el inserto digeridos se incubaron en presencia de la T4 DNA ligasa (Invitrogen) a 16 °C durante toda la noche. El producto de ligación se transformó en la cepa XL1B de *E.coli* y se seleccionó el plásmido pEGFP-DUT. Se digirieron 6 clones con BamHI y HindIII para comprobar que se había insertado la secuencia de la dUTPasa (Figura C.1.B). Se seleccionó el clon 1 y se secuenció.



**Figura C.1. Construcción del vector pEGFP-DUT.** A. Carril izquierdo, producto de la digestión del plásmido pEGFP con BamHI y HindIII, tamaño aproximado de 4 kb. Carril derecho, digestión del plásmido pcDNA-DUT con HindIII y BamHI para el aislamiento del inserto de la dUTPasa nuclear, recuadrado en negro, tamaño aproximado 500 pb. B. Análisis de los clones pEGFP-DUT resultantes de la ligación entre pEGFP y el inserto dUTPasa previamente digeridos con HindIII y BamHI. Dentro de un recuadro está el clon seleccionado para los experimentos de transfección.

## **C.2.4. Transfección transitoria de líneas celulares**

### **C.2.4.1. Silenciamiento génico mediante siRNA**

El silenciamiento de DCTPP1, TK1, dCK, DCTD y UNG se realizó mediante la transfección de RNAs de interferencia pequeños (siRNA). Para los tres genes se utilizó un pool de cuatro siRNA distintos y específicos para distintas regiones del mRNA (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon) (Tabla C.4). Para el control se utilizó una mezcla de siRNAs inespecíficos dirigidos contra secuencias que no se encuentran en el conjunto de mRNAs celulares.

El principio de transfección es el uso de agentes basados en lípidos catiónicos como la Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, Life Technologies) y el jetPRIME® (Polyplus transfection), que forman agregados con el ácido nucleico (siRNA o DNA plasmídico) permitiendo que atraviesen la membrana plasmática.

48

Las células MCF-7 se sembraron 24 h antes de la transfección a un 30% de confluencia en el formato de placa requerido según el experimento. Cuatro horas antes de la transfección las células se lavaron con PBS 1X y se añadió medio sin SBF ni antibióticos. La mezcla de transfección se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante de Lipofectamine® 2000. Para placas de 6 pocillos, 50 pmol de siRNA se diluyeron en 250 µl de medio sin SBF ni antibióticos. Paralelamente se preparó otra mezcla con 5 µl de Lipofectamine 2000 en 250 µl y se incubó 5 min. Se mezclaron ambas soluciones, incubándose la mezcla final de transfección durante 20 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos siRNA-Lipofectamine. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadió la mezcla de transfección (500 µl) a las células en cultivo, gota a gota y repartiéndola por todo el pocillo. Finalmente, 4 h después de la transfección se retiró el medio y se añadió medio completo fresco.



En el caso del doble silenciamiento de DCTPP1 y UNG en células MCF-7 se llevaron a cabo dos transfecciones independientes. En primer lugar, se transfectaron las células con siRNA control y siRNA DCTPP1 de acuerdo con las condiciones especificadas previamente. 4 días tras el silenciamiento de DCTPP1 las células se volvieron a transfectar con siRNA control y siRNA UNG.

Para la transfección de células HAP1 se utilizó el agente jetPRIME® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron 24 h antes de la transfección a una confluencia del 6% para que la confluencia en el momento de la transfección fuera de entre el 20 y el 30%. Para transfectar en un formato de placa de 6 pocillos se preparó una mezcla de transfección con 200 µl de tampón jetPRIME®, 110 pmol de siRNA y 4 µl de jetPRIME®, la cual se incubó 15 min a temperatura ambiente y finalmente se repartió gota a gota por el pocillo.

En todos los casos, las condiciones óptimas de transfección se determinaron probando distintas concentraciones de siRNA y/o distintos ratios de siRNA:agente de transfección, y se monitorizó la disminución o aumento de la expresión de la proteína en cuestión mediante *western blot*.

#### **C.2.4.2. Sobreexpresión de proteínas**

La sobreexpresión de proteínas en células MCF-7 y HAP1 se llevó a cabo mediante la transfección con vectores de expresión utilizando los mismos reactivos que para el silenciamiento génico, Lipofectamine® 2000 y jetPRIME® respectivamente. Debido a problemas de toxicidad para la purificación de los plásmidos se utilizó un kit de midiprep libre de endotoxinas, NucleoBond® Extra EF (Macherey Nagel).

Las células MCF-7 se sembraron 24 h antes de la transfección a una confluencia del 70%. Se cambió el medio completo por medio sin suero ni antibióticos 4 h antes de la

transfección. Las células se transfectaron con 5 µg DNA y 10 µl de Lipofectamine® 2000 y tras 20 min de incubación a temperatura ambiente se repartió la mezcla de transfección gota a gota por el pocillo. 4 h después de la transfección, se retiró el medio de transfección y se añadió medio completo.

Las células HAP1 se sembraron 24 h antes de la transfección a una confluencia del 15% y se transfectaron con un ratio de DNA:jetPRIME® 1 µg DNA:2 µl reactivo, diluidos en 200 µl de buffer jetPRIME®. La mezcla de transfección se incubó 15 min a temperatura ambiente antes de repartirla gota a gota por toda la superficie del pocillo. A las 4 h de la transfección se renovó el medio.

En todos los casos las condiciones óptimas de transfección se determinaron probando distintas concentraciones de DNA y/o distintos ratios de DNA:agente de transfección, y se monitorizó la disminución o aumento de la expresión de la proteína en cuestión mediante *western blot*.

### **C.2.5. Ensayos de proliferación celular**

El método utilizado para determinar el crecimiento celular fue la reducción de resazurina (Sigma-Aldrich). La resazurina es un colorante vital de color azul y no fluorescente que es reducida en el interior de la célula a resafurina, un colorante rojo y fluorescente.

Para los ensayos de proliferación las células se sembraron en placas de 96 pocillos 24 horas después de transfectar con siRNA. Una vez sembradas las células (2000 células/pocillo en 100 µl de medio por cuadruplicado) se añadió 20 µl de resazurina a 1,1 mg/ml en PBS 1X a cada pocillo. Tras 2 h de incubación a 37 °C se midió la fluorescencia a 570-590 nm en un lector de placas SpectraMax GEMINIEM (Molecular Device, CA, US). Para las siguientes medidas el medio de cada pocillo se renovó por 100 µl de medio fresco

previamente a la adición de resazurina. El valor de fluorescencia es directamente proporcional al número de células.

Para la determinación del porcentaje de crecimiento se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de células, para cada línea celular. Se determinó el número de duplicaciones con la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ duplicaciones} = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\ln 2}$$

Donde  $N_t$  es el número de células al día deseado de la curva y  $N_0$  es el número de células sembradas inicialmente y determinadas el primer día del ensayo. A partir del número de duplicaciones se normalizaron los datos del número de células partiendo de un número inicial de 1000 células con la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ células normalizado} = 1000 \times N^{\circ} \text{ duplicaciones}^2$$

Para los ensayos de sensibilidad a análogos de nucleósido 5-fluorouracilo (5-FU) y 5-fluorodesoxiuridina (5-FdUrd) las células MCF-7 transfectadas con el siRNA control o el siRNA frente a DCTPP1 se sembraron a una concentración de 2000 células/pocillo. Las células se sembraron 7 días después de la transfección con siRNA y 24 h después de sembrarlas se añadieron al medio de cultivo concentraciones crecientes de 5-FU y 5-FdUrd. 8 días después de la transfección y después de 24 h de exposición al correspondiente nucleósido se añadió la resazurina y se determinó el número de células. Los datos están representados como duplicación relativa de la población (RPD).

$$RPD = \frac{N^{\circ} \text{ duplicaciones tratado}}{N^{\circ} \text{ duplicaciones sin tratar}} \times 100$$

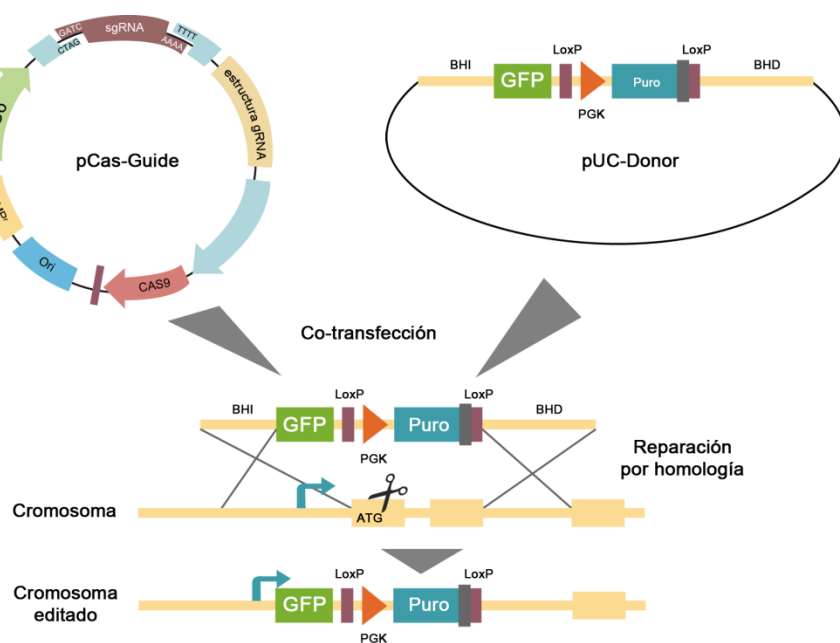
### **C.2.6. Análisis del ciclo celular mediante FACS**

Para el estudio del ciclo celular se realizaron análisis de citometría de flujo. Para la detección de células en fase S las células en cultivo se expusieron a 10  $\mu$ M de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 1 h a 37 °C. Después de la exposición a BrdU las células se lavaron con PBS 1X y se recogieron mediante tripsinización. La suspensión de células se centrifugó 5 min a 500 g o 3 min a 300 g en el caso de las células MCF-7 y se lavaron con 5 ml de PBS 1X. Se repitió el proceso de centrifugación y finalmente se resuspendieron en 1,5 ml de PBS 1X a 4 °C. Para la fijación y permeabilización se añadió 3,5 ml de etanol puro a la suspensión de células en PBS 1X, siendo la concentración final de etanol 70%, y se mantuvieron a -20 °C al menos durante 24 h. Tras la fijación, las células se lavaron con PBS 1X-Tween 20® 0,2% (PBS-T 0,2%), se incubaron con una solución HCl 4M/TritonX-100 1% durante 10 min a temperatura ambiente y se lavaron inmediatamente después con PBS-T 0,2% tres veces. Este tratamiento es clave para la desnaturalización del DNA y la disociación de las histonas para así permitir la unión del anticuerpo anti-BrdU al BrdU previamente incorporado al DNA. Las células se incubaron 16 h a 4°C con el anticuerpo anti-BrdU-FITC (Becton Dickinson) diluido 1:5 en la solución de bloqueo (*Blocking Reagent* (BR) 1% (Roche) en PBS-T 0,2%). Para la tinción del DNA, las células lavadas y resuspendidas en PBS 1X se incubaron con 0,05 mg/ml de yoduro de propidio (PI) y 0,05 mg/ml de RNAsa 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se analizaron usando el citómetro de flujo FACS Aria III (Becton Dickinson) y los datos obtenidos se procesaron mediante el software de análisis FlowJo (Tree Star Inc).

### **C.2.7. Generación de una línea *knockout* mediante el sistema CRISPR/Cas9**

A partir de la línea haploide HAP1 se generó una línea *knockout* para DCTPP1. Para ello se empleó la tecnología CRISPR/Cas9 que permite la edición dirigida del genoma

mediante el uso de unas secuencias guías o sgRNAs que van dirigidas contra el gen de interés y que son reconocidas por la nucleasa Cas9 que produce el corte de forma específica en la zona indicada por la guía. En esta tesis se utilizó el sistema de Origene que consiste en la transfección de las células con dos plásmidos distintos. El primer plásmido tiene una función dual permitiendo la expresión del sgRNA, específica contra DCCTPP1, y de la Cas9. El segundo plásmido tiene un *cassette* con la secuencia codificante de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) y la secuencia del gen de resistencia a puromicina (Puro) flanqueadas por secuencias homólogas a regiones del gen que va a ser editado (Figura C.2). Al producirse el corte por acción de la Cas9 guiada por el sgRNA, el *cassette* donador debe insertarse por recombinación homóloga en el genoma de la célula, lo que permite la selección de los clones recombinantes por resistencia a puromicina. Como la línea DCTPP1-KO adquirida de Horizon se generó con un sgRNA contra el exón 2 del gen, el sgRNA de este experimento se dirigió contra una zona diferente en el exón 1 (Tabla C.4).



**Figura C.2. Esquema de la edición mediante CRISPR/Cas9.** pCas-Guide es el plásmido que codifica para la expresión de la Cas9 y que contiene la secuencia guía dirigida contra el exón 1 de DCTPP1. pUC-Donor es el plásmido que contiene las secuencias de GFP y el gen de resistencia a puromicina, flanqueados por secuencias homólogas al gen DCTPP1. BHI: brazo de homología izquierdo; BHD: brazo de homología derecho.

Las células HAP1 se transfectaron con el agente jetPRIME® como se describe en el apartado C.2.4.2. Dos días después de la transfección se inició la selección con 0,45 µg/µl de puromicina, este proceso duró 7 días durante los que el antibiótico se renovó cada 2-3 días. Después de la selección con puromicina se aislaron clones para seleccionar distintos transfectantes, para ello se realizó una dilución límite con una concentración de células a 0,5 células/pocillo en dos placas de 96 pocillos. Se descartaron los pocillos en los que inicialmente había más de una célula y se continuó con el proceso de escalado, manteniendo en todo momento la selección con puromicina. La pérdida de expresión de DCTPP1 se comprobó mediante *western blot*, seleccionándose uno de los clones positivos para los experimentos posteriores, línea a la que nos referiremos como DCTPP1-KO-Ex1.

### **C.2.8. Inducción de quiescencia**

54

Para la sincronización de células en quiescencia se sembraron  $1 \times 10^6$  células CCD-34Lu en placas P60 y se dejaron crecer hasta alcanzar la inhibición por contacto (confluencia del 100%), momento en el que la concentración de suero (SBF) en el medio se redujo de un 10% a un 0,1%. Las células se mantuvieron en cultivo durante 15 días con cambios de medio cada 3-4 días.

### **C.2.9. Western blot**

Los extractos celulares para el análisis de la expresión de proteínas se obtuvieron lisando las células con el tampón de lisis RIPA (Tris:HCl 25mM pH 7,6, NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 1%, SDS 0,1%) (Sigma-Aldrich). Las células adheridas se lavaron previamente con PBS 1X en abundancia y se recogieron de la placa utilizando un *scraper*. La suspensión de células en PBS 1X se centrifugó y el pellet celular se resuspendió en tampón de lisis RIPA con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa 1X (Thermo-Fisher Scientific). Los extractos se incubaron 10 min en hielo antes de

centrifugarse durante 15 min a 14000 g y a 4 °C. La fracción soluble se transfirió a un tubo nuevo y se guardó a -20 °C. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

Las muestras con la concentración deseada de extracto se prepararon junto con el tampón de carga SDS-PAGE antes de proceder a su desnaturalización a 95 °C durante 5 min. La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en gel SDS de poliacrilamida al 10 o 12% según el peso molecular de las proteínas a analizar. La migración se llevó a cabo en tampón de electroforesis SDS-PAGE a un voltaje de 150 V durante 60 min. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (GE Healthcare) previamente activada 1 min en metanol 100%. La transferencia se realizó en condiciones de amperaje constante a 280 mA durante 45 min. Previo al marcaje con anticuerpos la membrana se incubó con la solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos primarios se incubaron en solución de bloqueo durante la noche (O/N) a 4 °C y las incubaciones con los anticuerpos secundarios en solución de bloqueo fueron de 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación con el anticuerpo primario y el secundario las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con PBS-T 0,1%. Finalmente, para la detección del anticuerpo se utilizó el kit de detección ECL™ (GE Healthcare) y se expuso la membrana a una película autorradiográfica Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare).

## **C.2.10. Inmunofluorescencia y microscopía confocal**

### **C.2.10.1. Detección de DCTPP1 mediante inmunofluorescencia**

5 x 10<sup>4</sup> células HAP1 o 1 x 10<sup>5</sup> células CCD-34Lu se sembraron sobre cubreobjetos esterilizados (2 h a 180 °C). Al día siguiente se llevó a cabo el marcaje de las mitocondrias con 250 nM de *MitoTracker™ Red CMX Ros* (Invitrogen) durante 30 min a 37 °C y en

oscuridad. Tras el marcaje, las células se lavaron con solución de lavado PBS-T (PBS 1X Tween 20® 0,2%) y se fijaron con *p*-formaldehído al 4% diluido en PBS-T durante 15 min. Tras la fijación se lavaron dos veces con PBS-T en agitación 5 min y se permeabilizaron con TritonX-100 0,1% durante 10 min. Una vez fijadas y permeabilizadas se incubaron con una solución de bloqueo durante 1 hora y posteriormente con el anticuerpo primario anti-DCTPP1 a una dilución 1:1000 durante 1 h. Seguidamente se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 min cada uno. A continuación, se incubó 1 min con anti-rabbit conjugado con Alexa® 488 1:400 tras lo cual se repitieron los lavados. Finalmente los cubreobjetos se lavaron con 1 ml de metanol 96% para ayudar al secado de la muestra, se dejaron secar y se montaron en los portaobjetos con 3 µl de *ProLong™ Gold antifade reagent* con DAPI (Invitrogen). Las preparaciones se sellaron con esmalte y se guardaron a 4 °C en oscuridad hasta su análisis. La toma de imágenes digitales se realizó en un microscopio confocal LEICA TCS SP5. Para el análisis y procesamiento de las imágenes se utilizó el software FIJI, concretamente el *plugin* JACOP para los análisis de colocalización.

### **C.2.10.2. Análisis de foci de $\gamma$ H2AX**

La preparación, fijación y permeabilización de la muestra se llevó a cabo como se ha descrito previamente. En los experimentos de tratamiento con timidina (dThd), la fijación se llevó a cabo 24 h después de la suplementación con dThd. Para los experimentos de sobreexpresión las células se fijaron 48 h después de la transfección. En el caso del silenciamiento de UNG las células se fijaron 4 días después del silenciamiento tanto en HAP1 como en MCF-7. Tras el bloqueo las células se incubaron con el anticuerpo primario anti- $\gamma$ H2AX (1:400) a temperatura ambiente durante 1 h y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con Alexa® 488 o con Alexa® 594 (1:400) durante 1 h. La toma de imágenes digitales se realizó en un microscopio confocal LEICA TCS SP5 y el análisis de foci se llevó a cabo utilizando el software FIJI, considerando positivas aquellas células con 5 ó más foci de  $\gamma$ H2AX en el núcleo.



### **C.2.10.3. Cuantificación de puentes de anafase**

Para la observación y cuantificación de puentes de anafase se sembraron  $1 \times 10^5$  células MCF-7 y se sincronizaron en fase G2/M incubando con 50 ng/ $\mu$ l de nocodazol (Sigma-Aldrich) durante 18 h. Tras retirar el nocodazol, se dejaron las células crecer durante 90 min en medio completo antes de ser fijadas y teñidas con DAPI. La toma de imágenes digitales se realizó en un microscopio confocal LEICA TCS SP5.

### **C.2.11. Determinación de los niveles intracelulares de nucleótidos**

#### **C.2.11.1. Ensayo de la DNA polimerasa**

El ensayo de la DNA polimerasa se basa en la incorporación por la DNA polimerasa de dATP marcado con tritio ( $^3\text{H}$ ) en oligonucleótidos de secuencia específica (Sherman & Fyfe, 1989). En presencia de un exceso del nucleótido radiactivo, la cantidad de radiactividad que se incorpora durante la síntesis es proporcional a la cantidad de los nucleótidos limitantes del extracto celular. Para la cuantificación de cada nucleótido (dCTP, dTTP/dUTP y dGTP) se utilizaron oligonucleótidos específicos y un oligo cebador descritos en la Tabla C.4.

Para la extracción de nucleótidos intracelulares se recogieron  $2,2 \times 10^6$  células y se resuspendieron en 1,2 ml de una solución metanol/agua 1:1 (v/v) a  $-20^\circ\text{C}$ . Las células en la solución metanol/agua se sometieron a dos ciclos de congelación/descongelación, 10 min en hielo seco con etanol y 10 min en hielo y finalmente los extractos se centrifugaron 20 min a 16000 g y  $4^\circ\text{C}$ . Los sobrenadantes se dividieron en 4 alícuotas de 250  $\mu$ l que se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

Los extractos procedentes de  $-80^\circ\text{C}$  se evaporaron en vacío durante 2 h utilizando un SpeedVac DNA 120 (Savant). Con el fin de diferenciar el dUTP del dTTP, una de las

muestras se trató con dUTPasa de manera que la concentración de dUTP resulta de la diferencia entre la muestra sin tratar con dUTPasa (dTTP+dUTP) y la muestra tratada con la enzima (solo dTTP). Para ello la muestra se incubó con 30 ng de dUTPasa durante 20 min a 37 °C en tampón de reacción (Tabla C.3). La reacción se detuvo en presencia de 60 µl de metanol 100% durante 30 min a -20 °C. Finalmente, las muestras se centrifugaron 20 min a 160000 g y 4 °C y el sobrenadante resultante se evaporó en el SpeedVac.

Para llevar a cabo el ensayo de la DNA polimerasa las muestras se resuspendieron en el tampón de reacción NEBuffer 2 (New England Biolabs), añadiendo 32 nM de cada primer, 0,0076 µCi/µl de <sup>3</sup>H-dATP (Moravek Inc.) y 0,3 unidades de DNA *Polymerase I, Large (Klenow) Fragment* (New England Biolabs) en un volumen final de 100 µl. La reacción se incubó 15 min a 25 °C y se detuvo con 10 mM de EDTA a 75 °C durante 20 min. La precipitación del DNA se llevó a cabo con un 10% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA) durante 30 min a 4°C. Para eliminar los nucleótidos libres las muestras se cargaron en filtros Glass Microfibre Filters GF/C (Whatman) y se lavaron mediante vacío con 30 ml de TCA al 5% y se secaron con 3 ml de etanol puro. La radiactividad se midió en un lector LS 6500 MultiPurpose Scintillation (Beckman Coulter).

### **C.2.11.2. Cromatografía de intercambio aniónico**

Los niveles de ribonucleótidos trifosfato (NTPs) se determinaron mediante cromatografía de intercambio aniónico en HPLC. Para cada ensayo se recogieron  $1 \times 10^7$  células HAP1 o DCTPP1-KO. Tras dos lavados con PBS 1X frío se resuspendieron en 50 µl de agua miliQ a 4°C y se añadieron 4 nmol de ITP como control interno. La extracción de NTPS se llevó a cabo en presencia de 50 µl de ácido perclórico 0,4 N. Las muestras con ácido perclórico se incubaron 5 min en hielo y se centrifugaron 20 min a 16000 g y 4 °C. Inmediatamente después de la extracción, la muestra se filtró en tubos Nanosep MF 0,2 µm (Pall Corporation) y 25 µl de muestra se diluyeron en 225 µl de tampón fosfato de

amonio 0,5 M pH 3,4. La muestra diluida se cargó en una columna Partisphere 5- $\mu$ m SAX (Hichrom). La discriminación de los NTPs se realizó en condiciones isocráticas de elución con tampón fosfato de amonio 0,5 M pH 3,4. Para la identificación y cuantificación de los nucleótidos se cargaron concentraciones conocidas de soluciones de cada NTP y se realizó una recta patrón para cada uno.

### **C.2.12. Determinación de uracilo en DNA genómico**

La incorporación de uracilo en el DNA genómico (gDNA) se cuantificó mediante un ensayo basado en el empleo de dos DNA polimerasas con distinta capacidad para replicar a través de uracilo y la cuantificación de sus productos de PCR en tiempo real (Horvath & Vertessy, 2010; Muha *et al.*, 2012). Por un lado, la DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) no puede procesar el uracilo, y ante la presencia de éste se detiene y no continúa con la reacción. Por otro lado, la Taq DNA polimerasa que reconoce y replica el uracilo con normalidad. La diferencia en formación de producto con las dos polimerasas nos da una relación de la presencia de bases de uracilo en nuestra muestra de genómico que se compara con una muestra control, cuyo contenido en uracilo se considera como referencia.

El DNA genómico se extrajo con el *MasterPure DNA Purification kit* (Epicentre) y se digirió con SacI-HF (New England) durante 18 h a 37 °C. Del producto de digestión se aislaron los fragmentos de entre 3 y 5 Kb que contienen el gen de interés, GAPDH (Tabla C.4). Para la PCR se prepararon diluciones seriadas 1:2 y se amplificaron con ambas polimerasas: PfuTurbo HotStart (Agilent Technologies) y Taq Polymerase (Bioline). La PCR se llevó a cabo en un CFX96 Real time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories). Los valores de  $C_q$  obtenidos se utilizaron para determinar el contenido en uracilo de acuerdo con las fórmulas previamente descritas (Horvath & Vertessy, 2010).

Todos los valores están referidos o a la línea transfectada con siRNA control, o a la línea HAP1 en el caso de la línea DCTPP1-KO.

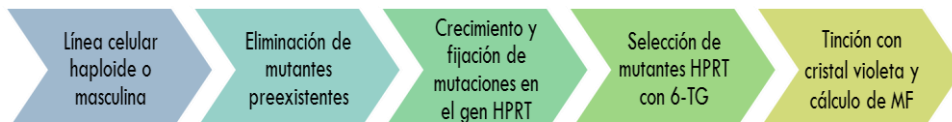
### **C.2.13. Ensayo de mutagénesis del gen HPRT**

El gen que codifica para la hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HPRT) se encuentra en el cromosoma X, por ello es esencial usar para el ensayo líneas celulares masculinas que son heterocigotas para el cromosoma X o bien líneas haploides. Para determinar la frecuencia de mutación se usó como agente de selección la 6-tioguanina (6-TG) (Sigma-Aldrich). Este análogo de nucleósido es metabolizado por la HPRT resultando tóxica su incorporación final al DNA. Mutaciones en el gen HPRT impiden que la 6-TG sea metabolizada y por lo tanto no resulta tóxica para la célula puesto que no llega a incorporarse en el DNA.

60

Inicialmente las líneas HAP1 WT y DCTPP1-KO se cultivaron durante tres días en medio completo suplementado con hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) 1X (Gibco, Life Technologies). Este paso permite eliminar del cultivo los mutantes HPRT preexistentes. La aminopterina bloquea la síntesis *de novo* de purinas, de forma que si el gen HPRT está mutado no hay salvamento de purinas y las células mueren. Después del tratamiento con HAT las células se incubaron 24 h con medio suplementado con hipoxantina-timina (HT) 1X (Gibco, Life Technologies) para restablecer el metabolismo *de novo*. Durante los siguientes 14 días las células se mantuvieron en cultivo con medio completo, se subcultivaron cada 2-3 días, para permitir la fijación de las mutaciones, tras este tiempo se inició la selección con 6-TG a una concentración 2  $\mu$ M. En este punto, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, (10000 células/pocillo) y se mantuvo la selección con 6-TG durante 14 días, renovándose el medio con 6-TG cada 2-3 días. Para poder determinar la eficiencia de plaqueo se sembraron paralelamente células en placas de 96 pocillos a una concentración de 1 célula/pocillo en medio no selectivo y se

cultivaron también durante 14 días. Tras los 14 días de selección con 6-TG las colonias formadas se fijaron con una mezcla metanol/ácido acético 3:1 (v/v) durante 5 min y se tiñeron posteriormente con cristal violeta en metanol al 0,5% durante 15 min. La figura C.3 muestra un resumen del protocolo seguido para el cálculo de la frecuencia de mutación del gen HPRT.



**Figura C.3.** Esquema del flujo de trabajo para la determinación de la frecuencia de mutación del gen HPRT.

La eficiencia de plaqueo (PE) y la frecuencia de mutación se determinaron a partir de las fórmulas previamente descritas por Johnson (Johnson, 2012):

Fórmula para la eficiencia de plaqueo (PE):

$$PE\% = -\ln\left(\frac{X_0}{N_0}\right) \times 100$$

Fórmula para la frecuencia de mutación (MF):

$$MF = \frac{-\ln(X_s/N_s)}{-\ln(X_0/N_0)} \times DF$$

Siendo DF el factor de dilución:

$$DF = \frac{N^\circ \text{ inicial de células en medio no selectivo}}{N^\circ \text{ inicial de células en medio selectivo}} = \frac{1}{10000}$$

- $X_0 = N^\circ$  de pocillos sin colonias en medio no selectivo
- $N_0 = N^\circ$  total de pocillos en medio no selectivo
- $X_s = N^\circ$  de pocillos sin colonias en medio selectivo
- $N_s = N^\circ$  total de pocillos en medio selectivo

## C.2.14. Determinación de la mutagénesis en el DNA mitocondrial mediante resistencia a cloranfenicol

La resistencia a cloranfenicol (CAP) proporciona una medida de los niveles de mutagénesis mitocondrial. El CAP es un antibiótico que bloquea la traducción mediante su unión al RNA ribosómico (rRNA) 16S, impidiendo la actividad peptidiltransferasa. La inhibición de la traducción mitocondrial impide la síntesis de enzimas tan importantes como los citocromos a y b causando toxicidad mitocondrial y, en última instancia, la muerte celular. Este ensayo permite seleccionar mutantes del gen del rRNA 16S a los que el CAP no se puede unir y por lo tanto las células sobreviven en presencia del antibiótico.

Las líneas HAP1 WT y DCTPP1-KO se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración de 300 células por pocillo. Tras 24 h se añadieron 300  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se dejaron crecer las células durante 7 días en este medio. Para poder determinar la eficiencia de plaqueo se cultivó el mismo número de células en ausencia de cloranfenicol. Tras el tratamiento con cloranfenicol se mantuvieron las células en cultivo durante otros 7 días. Para la cuantificación de colonias las células se fijaron con una mezcla metanol/ácido acético 3:1 (v/v) durante 5 min y se tiñeron con cristal violeta al 0,5% durante 15 min. En la figura C.4 hay un esquema del protocolo seguido.

62



**Figura C.1.** Esquema del flujo de trabajo para la cuantificación de colonias resistentes a CAP.

La proporción de colonias resistentes a cloranfenicol ( $\text{CAP}^{\text{R}}$ ) se calculó dividiendo el número de colonias formadas tras el tratamiento con cloranfenicol entre el número de colonias formadas en ausencia de CAP.

### C.2.15. Metabolómica

Para el análisis de metabolómica dirigida en células HAP1 WT, DCTPP1-KO y DCTPP1-KO-Ex1 se utilizó el kit *AbsoluteIDQ® p180* (Biocrates). El kit permite la identificación y la cuantificación de 188 metabolitos diferentes por cromatografía líquida (LC)- análisis por inyección de flujo (FIA)-monitorizado de reacciones múltiples (MRM).

Para la preparación de muestras se cultivaron  $3 \times 10^6$  células por cada réplica y se recogieron 4 réplicas por línea celular. Las células se lavaron con PBS 1X a 4 °C y se tripsinizaron con 1 ml de tripsina-EDTA 0,05% que se neutralizó con medio completo. La suspensión de células se centrifugó 5 min a 300 g y 4 °C y se resuspendió en PBS 1X a 4 °C. Este proceso de lavado se repitió 2 veces más. Tras el último lavado se retiró el sobrenadante y el pellet se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Los extractos se mantuvieron a -80 °C hasta el envío de las muestras.





# RESULTADOS

---



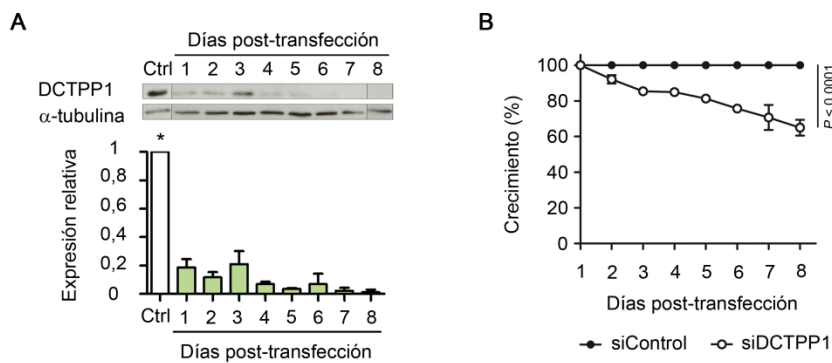
## D. RESULTADOS

### D.1. EFECTO DE LA REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE DCTPP1 EN CÉLULAS MCF-7

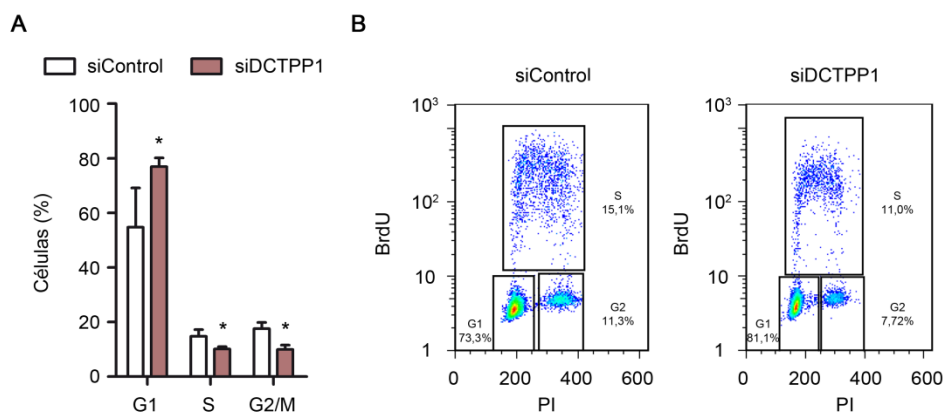
#### D.1.1. Silenciamiento transitorio de DCTPP1 mediante siRNA

Los niveles de expresión de DCTPP1 se redujeron mediante la transfección con un *pool* de pequeños RNAs de interferencia (siRNA) que promueven de forma específica la degradación del RNA mensajero que codifica DCTPP1 (siDCTPP1) (Requena *et al.*, 2014). La transfección se llevó a cabo en células MCF-7 mediante un agente lipídico de acuerdo con lo indicado en el apartado C.2.4.1 de Materiales y Métodos. Se monitorizó el crecimiento celular a lo largo del tiempo durante 8 días y se comprobaron los niveles de proteína cada 24 h mediante *western blot* (Figura D.1 panel A). Desde las primeras 24 h los niveles de proteína disminuyeron de forma significativa en un 70%, cayendo hasta más de un 90% desde el cuarto día post-transfección hasta el final del experimento. Como control negativo en todos los experimentos se utilizaron células MCF-7 transfectadas con un *pool* de siRNAs inespecíficos (siControl) (Tabla C.4).

Las células deficientes en DCTPP1 presentaron defectos en la proliferación, reduciéndose el crecimiento celular hasta un 40% a partir del séptimo día después de la transfección (Figura D.1 panel B). El análisis del ciclo celular de células MCF-7 tras 4 días de depleción de DCTPP1 mostró disminuciones de los porcentajes de células en fase S y G2/M desde un 14% y 16,2% a un 10% y 9,9% respectivamente (Figura D.2 paneles A y B), acompañadas de una parada del ciclo en la fase G1 donde el porcentaje de células aumentó desde un 54,7% en células transfectadas con siControl a un 76,9% en ausencia de DCTPP1



**Figura D.1. Células deficientes en DCTPP1 presentan defectos en proliferación.** **A.** Análisis por *western blot* de los niveles de DCTPP1 en células MCF-7 transfectadas con siRNA. Ctrl (control), células transfectadas con siControl. Los niveles de proteína se normalizaron respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. Los valores corresponden a la media de 2 experimentos independientes ( $\pm$  SD). La imagen se editó para facilitar la comparación. **B.** Curva de proliferación de células MCF-7 transfectadas con siDCTPP1 respecto a las transfectadas con siControl. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

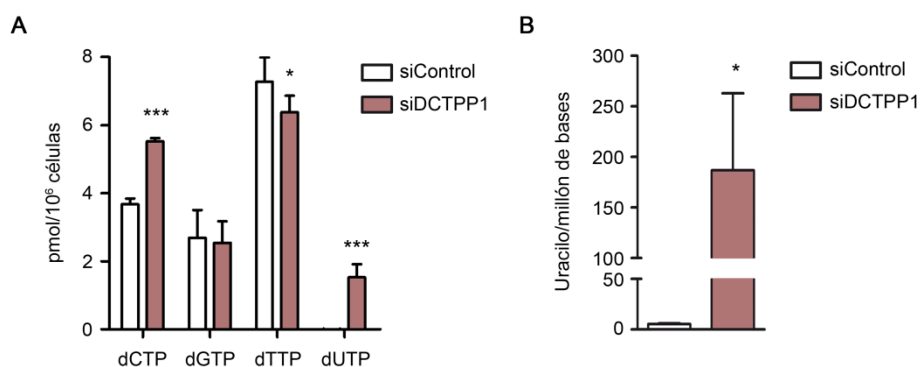


**Figura D.2. La depleción de DCTPP1 altera la progresión del ciclo celular.** **A.** Porcentaje de células en G1, S y G2/M a día 4 post-transfección. **B.** Gráficos de nubes de puntos representativos del porcentaje de células en cada fase del ciclo en células transfectadas con siControl (panel izquierdo) o con siDCTPP1 (panel derecho). Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

### **D.1.2. DCTPP1 regula el *pool* de nucleótidos pirimidínicos en células MCF-7 y mantiene un ratio dUTP/dTTP adecuado**

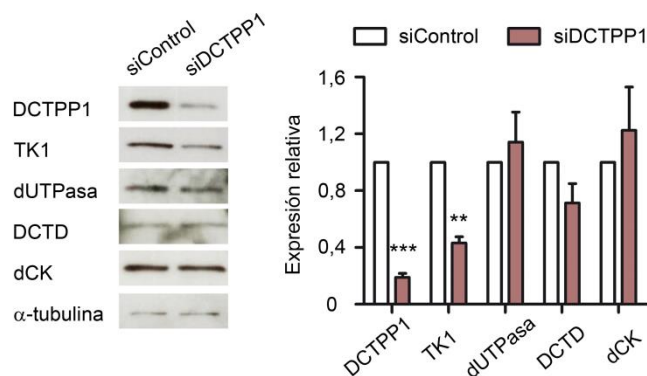
Para estudiar el papel de DCTPP1 en la homeostasis del *pool* de dNTPs se determinó la composición del *pool* de nucleótidos pirimidínicos en células MCF-7 (Figura D.3 panel A). La evaluación del *pool* se llevó a cabo al día 4 post-transfección mediante el ensayo de la DNA polimerasa (C.11.1) (Sherman & Fyfe, 1989). De acuerdo con el papel previamente propuesto para DCTPP1 en el mantenimiento de la homeostasis de dCTP (Requena *et al.*, 2014), se observó una expansión del *pool* de dCTP en ausencia de la enzima; 3,7 pmol/10<sup>6</sup> células en la línea control frente a 5,5 pmol/10<sup>6</sup> células en ausencia de DCTPP1. Además, se produjo una reducción drástica del *pool* de dTTP en las células deficientes en DCTPP1, desde 7,3 pmol/10<sup>6</sup> células a 6,4 pmol/10<sup>6</sup> células, junto con la aparición de un *pool* de dUTP (1,5 pmol/10<sup>6</sup> células) no detectado en células control. A modo de control se evaluaron los niveles de dGTP en ambas líneas, no observándose cambios significativos.

La disminución del *pool* de dTTP y la presencia de un *pool* de dUTP en células deficientes en DCTPP1 supone un aumento significativo del ratio dUTP/dTTP y un riesgo elevado de incorporación errónea de uracilo en el DNA y por lo tanto de daño genotóxico para las células. La presencia de uracilo en el DNA genómico se evaluó mediante un ensayo de PCR cuantitativa basada en el empleo de dos DNA polimerasas con distinta capacidad para replicar DNA con uracilo (C.2.12) (Horvath & Vertessy, 2010). El DNA genómico de células transfectadas con siRNA dirigido contra DCTPP1 presentó una mayor acumulación de residuos de uracilo (186 uracilos más por millón de bases) respecto a las células control (Figura D.3 panel B).



**Figura D.3. Células MCF-7 deficientes en DCTPP1 presentan un *pool* de dNTPs pirimidínicos alterado y un elevado contenido en uracilo en DNA.** **A.** Determinación del *pool* de nucleótidos tras la inhibición de la expresión de DCTPP1. La cuantificación se realizó a día 4 post-transfección con siRNA control o siDCTPP1. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). **B.** Cuantificación relativa del contenido en uracilo. Los valores obtenidos en DNA genómico procedente de células transfectadas con siControl se usaron como referencia. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

Una de las características del metabolismo de nucleótidos es la duplicidad de rutas y su gran plasticidad de manera que ante la ausencia de alguna de las enzimas implicadas se pueden producir cambios en la expresión de otras enzimas de rutas alternativas con el fin de compensar la deficiencia y así mantener un *pool* de dNTPs equilibrado. Por este motivo, se procedió a evaluar la expresión de distintas enzimas que participan en metabolismo de pirimidinas en ausencia de DCTPP1. Como se muestra en la Figura D.4, no se observaron cambios en los niveles de dCK, DCTD o dUTPasa entre las células control y las células con niveles reducidos de DCTPP1. Sin embargo, la expresión de TK1 se redujo un 50% en células deficientes en DCTPP1, si bien esta disminución puede deberse al aumento del número de células en G1 observado en ausencia de DCTPP1 (Figura D.2 panel A) y a la regulación de los niveles de TK1 a lo largo del ciclo celular. Concretamente, las células en G1 presentan bajos niveles de TK1 debido a su degradación tras la mitosis mediada por el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) (Ke & Chang, 2004).

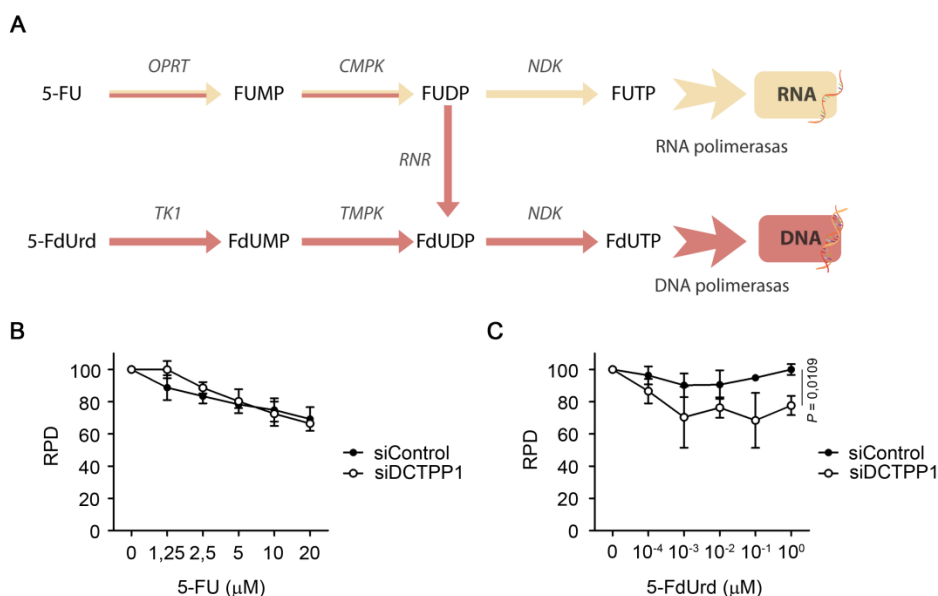


**Figura D.4. Modulación de los niveles de expresión de enzimas del metabolismo de pirimidinas.** Análisis por *western blot* de enzimas del metabolismo de pirimidinas en células MCF-7 tras la transfección con siControl y siDCTPP1. Los niveles de proteína se normalizaron respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

### D.1.3. La depleción de DCTPP1 sensibiliza al tratamiento con 5-fluorodesoxiuridina

Un ratio dUTP/dTTP elevado es el factor crítico en la citotoxicidad inducida por agentes quimioterapéuticos cuya diana es la timidilato sintasa (TS) (Wilson *et al.*, 2008). Por tanto, sería de esperar que la depleción de DCTPP1, que también estimula la expansión del *pool* de dUTP, aumentara el efecto citotóxico de inhibidores de la TS. Con el fin de comprobar esta hipótesis, células MCF-7 transfectadas con siControl o siDCTPP1 se trataron con 5-fluorouracilo (5-FU) o 5'-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd), dos compuestos con carácter genotóxico aunque con diferentes mecanismos de acción. La activación metabólica de 5-FU y 5-FdUrd se muestra en la figura D.5 (panel A). Mientras la 5-FdUrd es fosforilada a 5-FdUMP y actúa principalmente como inhibidor de la TS (Figura D.5 panel A, flechas rojas), el 5-FU puede ejercer un efecto citotóxico adicional tras ser fosforilado e incorporado al RNA (Figura D.5 panel A, flechas amarillas) donde además de interferir con la síntesis de proteínas, podría actuar inhibiendo la maduración del rRNA o la modificación post-transcripcional de tRNAs, entre otros procesos (Longley *et al.*, 2003). Los ensayos realizados no muestran diferencias significativas en el tratamiento con 5-FU

atribuibles a la depleción de DCTPP1 (Figura D.5 panel B) lo que sugiere un modo de acción para este compuesto basado principalmente en la incorporación a RNA, al menos en nuestro modelo celular. En cambio, la exposición a 5-FdUrd indujo defectos en proliferación mucho más pronunciados en células MCF-7 deficientes en DCTPP1 (Figura D.5 panel C) confirmando así un papel de DCTPP1 en la susceptibilidad celular a la inhibición de la TS y a la expansión del pool de dUTP intracelular.



**Figura D.5. Sensibilidad de células deficientes en DCTPP1 a 5-fluorouracilo (5-FU) y 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd).** **A.** Metabolismo de 5-FU y 5-FdUrd. Las flechas en amarillo muestran la incorporación de 5-FU al RNA. Las flechas en rojo indican la incorporación de 5-FU y 5-FdUrd al DNA. **B.** Exposición de células siControl y siDCTPP1 a concentraciones crecientes de 5-FU. La gráfica representa la tasa de duplicación relativa de cada población (*Relative Population Doubling*, RPD) tras 24 h en presencia de 5-FU. Los valores corresponden a la media de 2 experimentos independientes ( $\pm$  SD). **C.** La depleción de DCTPP1 sensibiliza a 5-FdUrd. Células MCF-7 transfectadas con siControl o siDCTPP1 se expusieron a 5-FdUrd durante 24 h tras 7 días de silenciamiento. Los valores proceden de 2 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

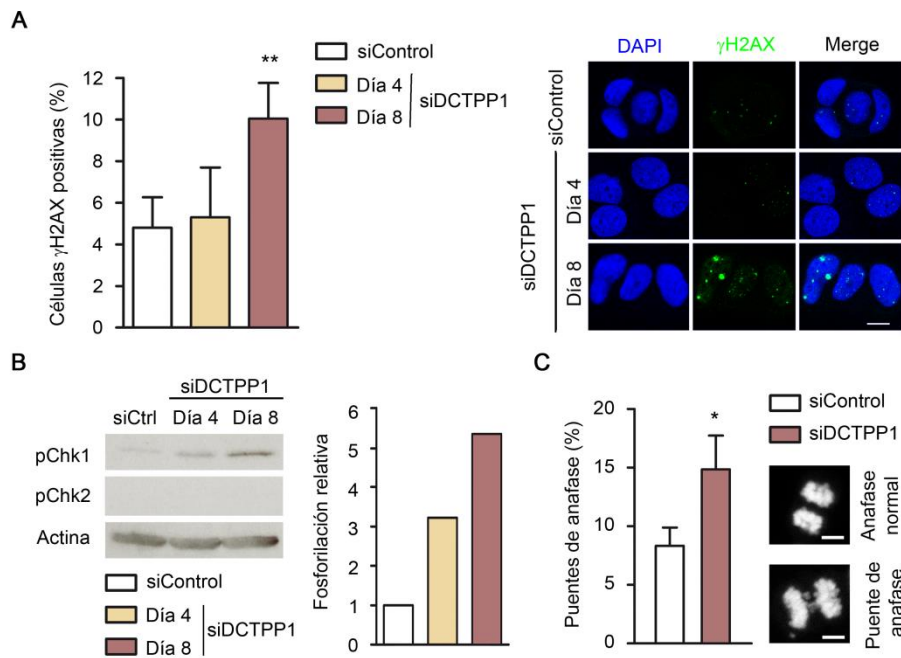
#### D.1.4. Activación de la respuesta a daños en el DNA en células deficientes en DCTPP1

Habiendo demostrado la incorporación de uracilo en el DNA de células deficientes en DCTPP1 procedimos a determinar el estado de la respuesta a daño en DNA (DDR) mediante la evaluación de distintos marcadores. En primer lugar, analizamos mediante



microscopia de fluorescencia la formación de foci correspondientes a la fosforilación de la histona H2AX que se ha descrito como un marcador prominente de roturas de cadena doble (DSBs). En un principio no se observaron diferencias entre la línea control y la línea transfectada con siDCTPP1 tras 4 días de silenciamiento, con valores de células positivas para  $\gamma$ H2AX de 4,9% y 5,3% (Figura D.6 panel A). No obstante, tras 8 días de inhibición de DCTPP1 el porcentaje de células positivas aumentó significativamente duplicándose hasta un 10%, lo que sugiere que es necesaria una inhibición más prolongada de la expresión de DCTPP1 para desencadenar una mayor activación de la DDR. Se analizaron otros componentes clave en la respuesta a daños en DNA como la fosforilación de las quinasas de checkpoint 1 y 2 (Chk1 y Chk2 respectivamente). Como se observa en el panel B de la figura D.6, en ausencia de DCTPP1 hay un incremento progresivo en la fosforilación de Chk1 a los 4 y 8 días post-transfección, de 3 y 5 veces respectivamente. Por el contrario, no se pudo detectar fosforilación de Chk2 en estas células.

La presencia de estrés durante la replicación causa inestabilidad cromosómica durante la mitosis (Chan *et al.*, 2009). Los puentes de anafase son una marca de inestabilidad cromosómica. Para su cuantificación se sincronizaron las células el día 8 post-transfección en fase G2/M como se indica en el apartado C.2.10.3. Se observó que células en mitosis deficientes en DCTPP1 presentan un aumento en el porcentaje de puentes de anafase de un 8,3% en células control hasta un 14,8% (Figura D.6 panel C) en células donde se inhibió la expresión de DCTPP1 durante 8 días. Estas observaciones ponen de manifiesto las DSBs como un daño producido como consecuencia de la depleción de DCTPP1 y refuerza la importancia de la proteína en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

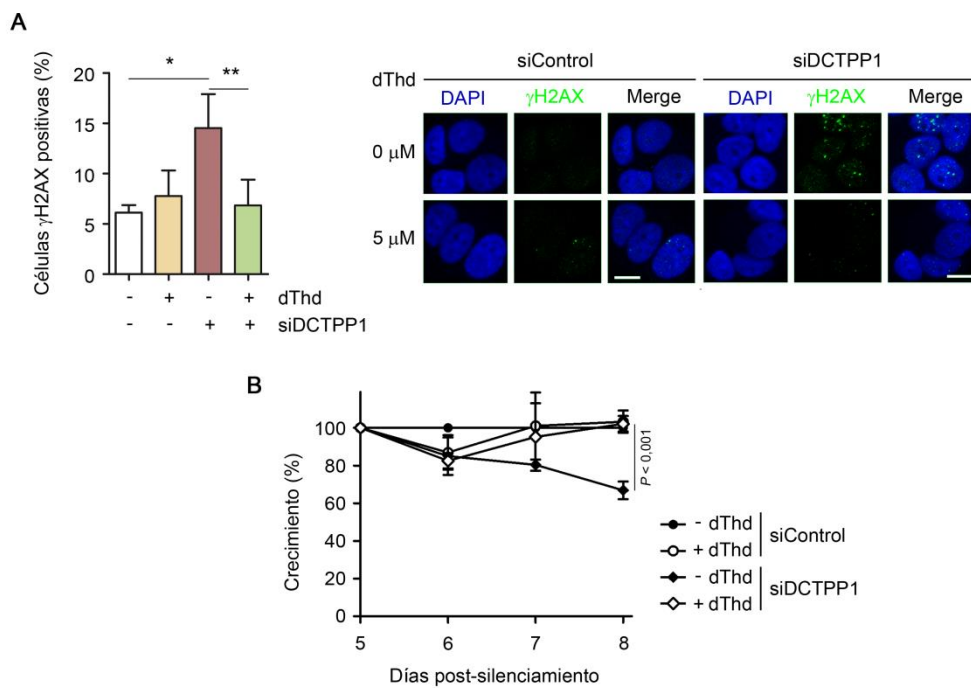


**Figura D.6. Activación de la respuesta a daños en el DNA en células deficientes en DCTPP1.** **A.** Panel izquierdo, porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX. Panel derecho, imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células transfectadas con siDCTPP1. **B.** Análisis por *western blot* de la fosforilación de las quinasas checkpoint Chk1 y Chk2 a los días 4 y 8 post-transfección. Los niveles de proteína se normalizaron respecto a los niveles de actina. **C.** Panel izquierdo, cuantificación del porcentaje de puentes de anafase en células MCF-7 mitóticas transfectadas con siControl o siDCTPP1 a día 8 post-transfección. Panel derecho, imágenes representativas de una anafase normal, y una anafase donde se ha formado un puente. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

### D.1.5. La disminución del ratio dUTP/dTTP contrarresta la activación del DDR

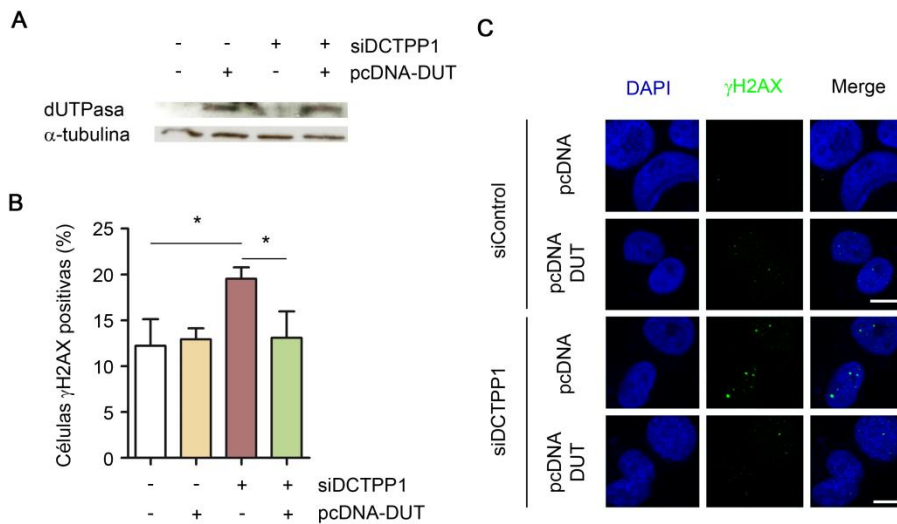
Considerando la incorporación errónea de uracilo en células deficientes en DCTPP1 como el daño inicial que origina la fosforilación de la histona H2AX nos propusimos restaurar el ratio dUTP/dTTP y evaluar de nuevo la presencia de *foci* de  $\gamma$ H2AX. Por un lado, las células previamente transfectadas con siControl o siDCTPP1 se suplementaron con 5  $\mu$ M de timidina (dThd) durante 24 h. La base de esta estrategia es conseguir la disminución del ratio dUTP/dTTP mediante la expansión del *pool* de dTTP por la fosforilación de dThd a timidilato por acción de TK1 y las subsiguientes reacciones de

fosforilación de TMPK y NDK. Las células positivas para la presencia de *foci* de  $\gamma$ H2AX se cuantificaron 8 días después de la transfección. La suplementación con dThd indujo un descenso en el porcentaje de células positivas en ausencia de DCTPP1 a niveles comparables a la línea control, desde 14,5% (-dThd) a un 6,8% (+5  $\mu$ M de dThd) (Figura D.7 panel A), indicando una relación de causa-efecto entre el ratio elevado de dUTP/dTTP y la fosforilación de H2AX observada en ausencia de DCTPP1. Asimismo, la adición al medio de cultivo de 5  $\mu$ M de dThd revirtió el defecto en crecimiento observado en células MCF-7 tras el silenciamiento de DCTPP1 (Figura D.7 panel B).



**Figura D.7. La suplementación con timidina reduce la formación de foci  $\gamma$ H2AX y restaura la proliferación de células MCF-7 deficientes en DCTPP1.** **A.** Panel izquierdo, porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX tras la suplementación durante 24 h con 5  $\mu$ M de timidina (dThd) a día 8 post-transfección. Los valores corresponden a la media de 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). Panel derecho, imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células transfectadas con siDCTPP1 sin suplementar, o suplementadas con timidina. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. **B.** Curva de proliferación de células transfectadas con siControl o siDCTPP1 en presencia de dThd. A día 5 post-transfección, el medio de cultivo se suplementó con 5  $\mu$ M de dThd, monitorizándose el crecimiento durante los 4 días posteriores. Los valores corresponden a la media de 2 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

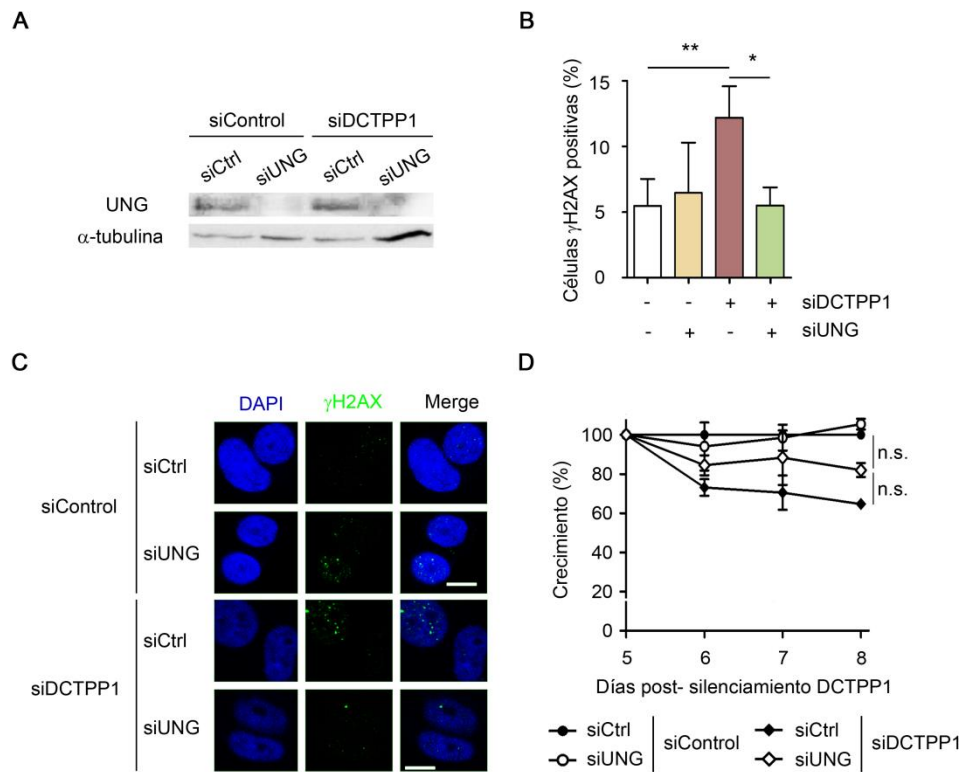
La segunda estrategia para restaurar un ratio dUTP/dTTP adecuado consistió en sobreexpresar la enzima dUTPasa con el fin de eliminar el dUTP presente en el *pool* de células deficientes en DCTPP1. Las células transfectadas con siControl o siDCTPP1 se volvieron a transfectar con los plásmidos pcDNA o pcDNA-dUTPasa (pcDNA-DUT). La formación de *foci* de  $\gamma$ H2AX se analizó 48 h después de la segunda transfección. Al igual que tras la suplementación con dThd, la sobreexpresión de dUTPasa en células sin DCTPP1 también revirtió la formación de *foci* de manera significativa (13% vs 19,5%) (Figura D.8). Por otra parte, la transfección con pcDNA o pcDNA-DUT de células control que no presentan niveles detectables de dUTP no modificó sustancialmente los niveles de *foci* (12,2% y 12,9% respectivamente).



**Figura D.8. La sobreexpresión de dUTPasa en células MCF-7 suprime la fosforilación de H2AX.** **A.** Análisis por *western* blot de los niveles de dUTPasa tras la sobreexpresión. **B.** Porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX tras 48 h de sobreexpresión de dUTPasa (pcDNA-DUT) a día 8 post-transfección. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). **C.** Imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células transfectadas con siDCTPP1 retransfectadas con pcDNA o pcDNA-DUT. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

### **D.1.6. Implicación de la uracil-DNA glicosilasa (UNG) en la activación de DDR en células deficientes en DCTPP1**

Se ha descrito en diferentes estudios que el fenotipo deletéreo asociado a un ratio dUTP/dTTP elevado es en gran medida dependiente de la escisión de uracilo por una actividad uracil-DNA glicosilasa (Warner *et al.*, 1981; Dengg *et al.*, 2006; Guillet *et al.*, 2006). En este estudio se ha analizado la relación entre la depleción de DCTPP1, la escisión de uracilo del DNA y la activación de DDR. Para ello, en primer lugar, las células MCF-7 se transfectaron con siRNA Control y siRNA DCTPP1 tal y como ya se ha descrito a lo largo de este trabajo. A continuación, una vez transcurridos 4 días tras esta primera transfección, las células se retransfectaron con siControl o siUNG con el fin de inhibir la expresión de la principal actividad uracil-DNA glicosilasa. En la figura D.9 panel A se muestra la reducción de los niveles de UNG tras 4 días de silenciamiento. La depleción de UNG en células deficientes en DCTPP1 causó una disminución significativa de la fosforilación de H2AX (Figura D.9 paneles B y C). El porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX disminuyó a un 6,3%, valores comparables a los de las células control (5,4%). Además, la inhibición de UNG restableció parcialmente el crecimiento de células deficientes en DCTPP1 hasta presentar el 80% con respecto a células control (Figura D.9 panel D). Estos resultados indican que la eliminación de uracilo y la consiguiente formación de sitios abásicos es la principal causa de formación de DSBs en células MCF-7 en ausencia de DCTPP1.



**Figura D.9. El silenciamiento de UNG previene la formación de foci  $\gamma$ H2AX y recupera parcialmente el crecimiento de células MCF-7-siDCTPP1.** **A.** Análisis por *western blot* de los niveles de UNG tras el silenciamiento génico. **B.** Porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX tras el silenciamiento de UNG durante 4 días. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). **C.** Imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células siDCTPP1 transfectadas con siControl o siUNG. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. **D.** Curva de proliferación de células MCF-7 transfectadas con siRNA DCTPP1, siControl y/o siUNG. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

## D.2. ESTUDIO DEL PAPEL BIOLÓGICO DE DCTPP1 EN CÉLULAS

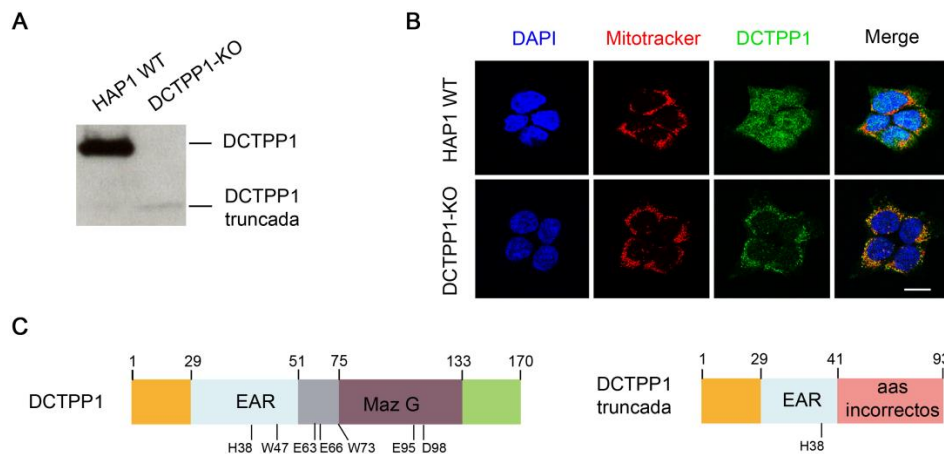
### HAP1

#### D.2.1. Caracterización de una línea celular HAP1 *knockout* para DCTPP1

El silenciamiento génico mediante siRNA es una técnica ampliamente extendida y utilizada como modelo para el estudio funcional de diferentes proteínas. Sin embargo, tiene una serie de limitaciones como son la variabilidad de la eficiencia de silenciamiento

entre experimentos, la presencia de niveles residuales de proteína durante el experimento y la inhibición de la enzima durante tiempos cortos. Es por esto que nos propusimos validar los resultados obtenidos en la línea celular MCF-7 y profundizar en el estudio utilizando como modelo una línea estable *knockout* (KO) para DCTPP1. Con este fin, empleamos la línea celular humana HAP1, una línea cuasi haploide derivada de una línea de leucemia mieloide crónica (CML) KBM-7 (Essletzichler *et al.*, 2014).

La primera línea celular *knockout* para DCTPP1 (DCTPP1-KO) caracterizada en este estudio (Horizon Discovery) se generó mediante la tecnología CRISPR/Cas9 utilizando un RNA guía (sgRNA) dirigido contra el exón 2 del gen dando como resultado de la edición con CRISPR/Cas9 un clon con una delección de 13 pb que genera un cambio en la pauta de lectura. Como resultado de la edición en el exón 2, la línea DCTPP1-KO presenta una forma truncada de la proteína de aproximadamente 10 kDa (Figura D.10 panel A).



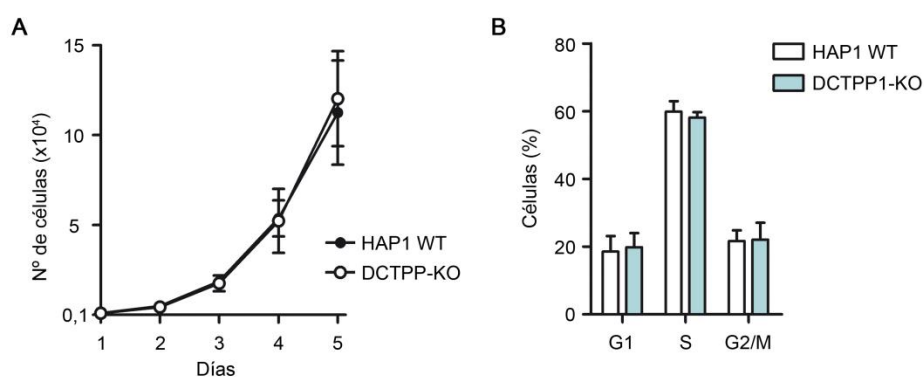
**Figura D.10. Análisis de la expresión de DCTPP1 en la línea HAP1 DCTPP1-KO.** **A.** Análisis por *western blot* de la línea *knockout* para DCTPP1 adquirida. **B.** Microscopía confocal de fluorescencia de células HAP1 WT y DCTPP1-KO. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. **C.** A la izquierda, esquema del gen DCTPP1 *wild type* con los 7 residuos catalíticos. A la derecha, esquema del gen truncado de DCTPP1 de la línea DCTPP1-KO, con solo uno de los dominios catalíticos conservados.

Este resultado se confirmó mediante microscopía de inmunofluorescencia, donde además se observó que la forma truncada de la proteína se encontraba única y exclusivamente en la mitocondria, mientras que la proteína silvestre se localiza también

en el núcleo y el citosol (Figura D.10 panel B). En el panel C de la figura D.10 se representan esquemáticamente la proteína DCTPP1 y la proteína resultante tras la edición. La proteína truncada consta de 93 aminoácidos de los cuales solo se conservan 41 aminoácidos de la proteína original. Las células DCTPP1-KO presentan una enzima que solo contiene uno de los siete dominios implicados en catálisis y carece completamente del dominio MazG (Moroz *et al.*, 2005) y del residuo E93 que es esencial en el proceso catalítico (Requena *et al.*, 2014), por lo que asumimos que la proteína resultante no es funcional.

Contrario a lo previamente observado en células MCF-7, la inactivación de DCTPP1 en células HAP1 no produce un defecto en proliferación en comparación con la línea parental (HAP1 WT), ni alteraciones en la progresión del ciclo celular (Figura D.11 paneles A y B). Numerosos estudios han puesto de manifiesto diferencias fenotípicas entre experimentos de inactivación (*knockout*) y de silenciamiento génico (*knockdown*) en distintos organismos modelo (Peretz *et al.*, 2018). Estas diferencias pueden deberse, entre otras razones, a mecanismos compensatorios desencadenados solo tras la inactivación génica y la selección clonal que se produce al generar los *knockouts*.

80

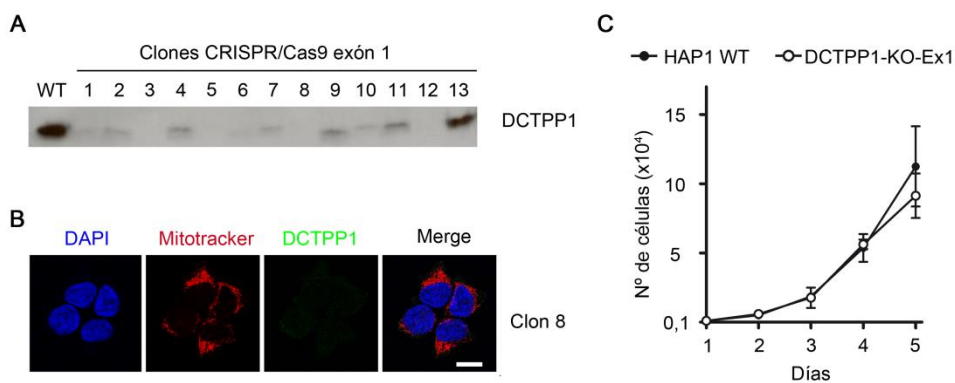


**Figura D.11. La línea HAP1 DCTPP1-KO es viable y no presenta defectos en la progresión del ciclo celular.** A. Estudio del crecimiento de células HAP1 WT y DCTPP1-KO. B. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).



## D.2.2. Generación de una segunda línea HAP1 deficiente en DCTPP1

Con el fin de confirmar los resultados de proliferación se generó en el laboratorio una segunda línea *knockout* para DCTPP1 mediante la tecnología CRISPR/Cas9 empleando las construcciones adquiridas de OriGene Technologies que se describen en el apartado C.2.7. En este caso, el sgRNA está dirigido contra la zona colindante del codón de inicio del exón 1. Las células se transfectaron con dos plásmidos distintos, un plásmido que expresa la enzima Cas9 y el sgRNA y un segundo plásmido con el gen de resistencia a puromicina, flanqueado por secuencias homólogas al gen de DCTPP1, para favorecer su inserción por recombinación homóloga. Tras la transfección se seleccionaron los clones con puromicina durante 7 días y luego se realizó una dilución mínima para aislar clones individuales. Los clones se crecieron en presencia de puromicina hasta poder ser criopreservados y se prepararon extractos de proteínas para analizar por *western blot* la expresión de DCTPP1. De los 13 clones obtenidos no se detectó expresión de DCTPP1 en 4 de ellos (Figura D.12 panel A). El análisis mediante microscopía de inmunofluorescencia del clon 8 descartó la presencia de DCTPP1 en estas células, validando así esta línea celular como un *knockout* genuino de DCTPP1. (Figura D.12 panel B). Esta segunda línea *knockout*, denominada DCTPP1-KO-Ex1, tampoco presentó defectos en proliferación en comparación con la línea parental, confirmando las diferencias fenotípicas previamente observadas entre el silenciamiento transitorio de DCTPP1 en células MCF-7 y la línea estable DCTPP1-KO.



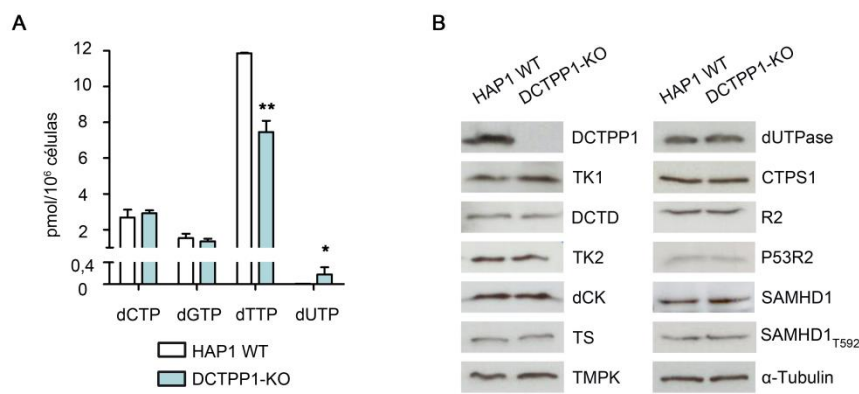
**Figura D.12. Generación y análisis de una segunda línea *knockout* para DCTPP1.**  
**A.** Comprobación por *western blot* de los clones obtenidos por edición dirigida mediante CRISPR/Cas9 contra el exón 1 de DCTPP1 en la línea HAP1. **B.** Microscopía confocal de fluorescencia en el clon 8 (DCTPP1-KO-Ex1). La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. **C.** Curva de crecimiento de las líneas HAP1 WT y DCTPP1-KO-Ex1. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

### D.2.3. Caracterización metabólica de la línea DCTPP1-KO

En primer lugar, procedimos a determinar el impacto de la pérdida de DCTPP1 en los niveles de nucleótidos intracelulares. A diferencia de lo que ocurre en células MCF-7 y en otras líneas celulares (Requena *et al.*, 2014), el *pool* de dCTP no se expande en ausencia de DCTPP1 en células HAP1. Los niveles de dCTP detectados fueron de 2,6 y 2,9 pmol/ $10^6$  células en células HAP1 WT y DCTPP1-KO respectivamente (Figura D.13 panel A). Sin embargo, se observó una disminución significativa de la concentración intracelular de dTTP desde 11,8 pmol/ $10^6$  células en la HAP1 WT a 7,4 pmol/ $10^6$  células en la línea *knockout*, junto con la aparición de cantidades detectables de dUTP en células DCTPP1-KO (0,25 pmol/ $10^6$  células). Como control se determinaron los valores del *pool* de dGTP, que se mantiene invariable en la línea *knockout*.

Así mismo, se analizó la expresión de otras enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos que pudieran estar siendo moduladas para compensar la ausencia de DCTPP1, pero no se encontraron cambios significativos entre ambas líneas (Figura D.13 panel B). Junto con la modulación de los niveles de expresión, las proteínas que participan en el

metabolismo de nucleótidos están sujetas a distintos tipos de regulación enzimática. Por ejemplo, la actividad trifosfohidrolasa de SAMHD1 es controlada alostéricamente y por modificaciones post-traduccionales (Miazzi *et al.*, 2014; E. J. Lee *et al.*, 2017). Concretamente, existen evidencias de que la fosforilación de SAMHD1 en la treonina 592 aumenta la actividad hidrolasa sobre dCTP (Jang *et al.*, 2016). Sin embargo, la fosforilación de SAMHD1 no difiere significativamente en la línea DCTPP1-KO (Figura D.13 panel B) por lo que esta actividad no parece estar reemplazando a DCTPP1 en el mantenimiento de los niveles de dCTP.



**Figura D.13. Determinación del *pool* de dNTPs y niveles de expresión de enzimas del metabolismo de pirimidinas en las líneas HAP1. A.** Análisis del *pool* de dNTPs en células HAP1 WT y DCTPP1-KO. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). **B.** Comparación mediante *western blot* de la expresión de enzimas del metabolismo de nucleótidos en células *knockout* respecto a células control.

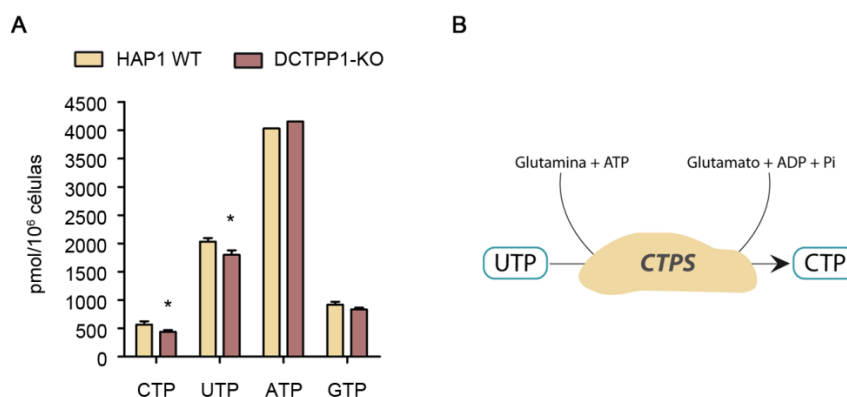
La concentración intracelular de dCTP puede ser regulada no solo mediante reacciones catabólicas, sino también a nivel de síntesis en distintas etapas bioquímicas tales como la reducción de CDP o la síntesis de CTP a partir de UTP. No obstante, hay que señalar que no se detectaron cambios en la expresión de las enzimas responsables de catalizar estas reacciones, la RNR y la CTPS1 respectivamente, cuyos niveles se mantienen constantes en ausencia de DCTPP1 (Figura D.13 panel B). No hay que olvidar, sin embargo, que ambas enzimas están sujetas a una regulación alostérica de manera que su actividad se ve modulada por la concentración de distintos efectores (Pappas *et al.*, 1998) (Niida *et al.*, 2010). En el caso de CTPS1, se activa por UTP y se inhibe por su producto final, el CTP y

por tanto la concentración de estos NTPs podría estar modificando notablemente la actividad de la enzima.

Con el fin de evaluar esta posibilidad, los niveles de ribonucleótidos (NTPs) se determinaron mediante cromatografía de intercambio aniónico en células deficientes en DCTPP1 y en células control en las condiciones que se especifican en el apartado D.2.11.2. Así, las células DCTPP1-KO presentaron niveles de CTP algo inferiores a los de células control (437 pmol/10<sup>6</sup> vs 511 pmol/10<sup>6</sup> células, respectivamente) (Figura D.14 panel A). El precursor en la síntesis del CTP, el UTP, también disminuye de forma evidente en las células DCTPP1-KO (1799 pmol/10<sup>6</sup> células) en comparación con las células HAP1 WT (2032 pmol/10<sup>6</sup> células). En conjunto, el análisis cromatográfico de NTPs en células deficientes en DCTPP1 muestra una disminución de entre un 10-15% en los niveles de CTP y UTP, que se corresponden en cifras absolutas con 74 pmol/10<sup>6</sup> y 233 pmol/10<sup>6</sup> respectivamente. El efecto de este descenso del *pool* de NTPs sobre la actividad de CTPS1 es difícil de determinar.

Con el fin de completar la caracterización de las líneas celulares estudiadas se realizó un análisis metabolómico empleando el kit *AbsoluteIDQ® p180* de Biocrates, descrito de forma más detallada en el apartado C.2.15, y que abarca distintos tipos de metabolitos: acilcarnitinas, aminoácidos, aminas biogénicas esfingolípidos, fosfatidilcolinas y lisofosfatidilcolinas. Este estudio se realizó en colaboración con la Dra. Marta Cascante de la Universidad de Barcelona. Las líneas celulares analizadas fueron HAP1 WT, DCTPP1-KO y DCTPP1-KO-Ex1. Entre los resultados obtenidos que incluyen 188 metabolitos cabe destacar los resultados obtenidos para los aminoácidos glutamina y glutamato que también participan en la reacción catalizada por la CTPS (Figura D.14 panel B). Concretamente la CTPS transfiere el grupo amino de la glutamina al UTP para generar CTP, dando lugar al mismo tiempo a la formación de glutamato. El análisis de metabolitos llevado a cabo reveló un aumento significativo de los niveles de glutamina acompañado de

una disminución en glutamato en ambas líneas *knockout* analizadas, DCTPP1-KO y DCTPP1-KO-Ex1 (Figura D.15), lo que sugiere una disminución de la conversión de UTP a CTP. También se observó una disminución de los niveles de aspartato, otro de los aminoácidos implicados en la síntesis *de novo* de nucleótidos.

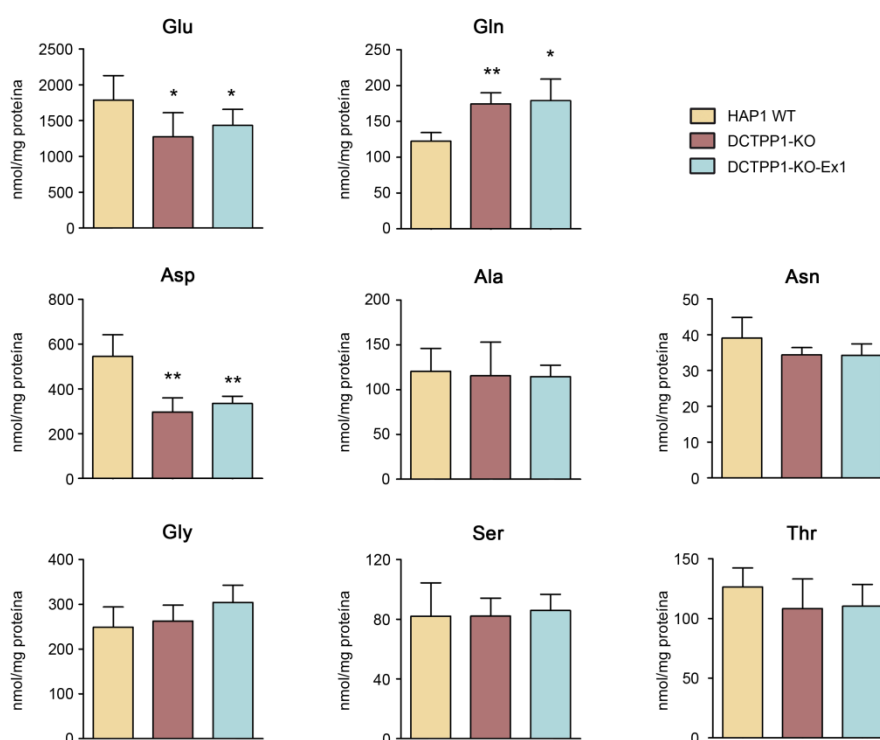


**Figura D.14. Concentración intracelular de ribonucleótidos.** A. La composición del *pool* de NTPs se cuantificó en células HAP1 WT y DCTPP1-KO mediante HPLC. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). B. Esquema de la reacción catalizada por la CTP sintetasa (CTPS).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que en células HAP1 deficientes en DCTPP1 hay una menor síntesis de CTP y por consiguiente una menor formación de CDP, sustrato de la RNR necesario para la síntesis *de novo* de dCTP. De esta forma, la baja disponibilidad de CDP permitiría un control del *pool* de dCTP en ausencia de DCTPP1.

Además de su papel en síntesis *de novo* de CTP, la CTP sintasa tiene una función esencial en la síntesis de fosfolípidos en células de mamífero y en levaduras. El CTP es el precursor inmediato del CDP-diacilglicerol, la CDP-colina y la CDP-etanolamina. La formación de CTP es crítica para la síntesis normal de esfingolípidos y fosfatidilcolinas (Kent & Carman, 1999; Y. F. Chang & Carman, 2008). Al analizar detenidamente los datos del análisis metabólico para esfingolípidos y glicerofosfolípidos observamos cómo en ausencia de DCTPP1 hay una perturbación global de las concentraciones de diferentes tipos de fosfolípidos (Tablas D.1, D.2, D.3 y D.4 del Anexo H.1). Además, los cambios detectados en la composición de fosfolípidos son en todos los casos disminuciones en la

concentración lo cual está correlacionado con una disminución en el *pool* de CTP, que es como hemos mencionado uno de los precursores esenciales de los fosfolípidos. En conjunto, los datos de cuantificación de nucleótidos junto con los del análisis metabolómico parecen indicar que la adaptación metabólica de la línea DCTPP1-KO consiste en limitar la síntesis de dCTP a través de la reducción del *pool* de CDP. Sin embargo, una de las consecuencias de esta adaptación es la perturbación de los niveles celulares de esfingolípidos y glicerofosfolípidos.

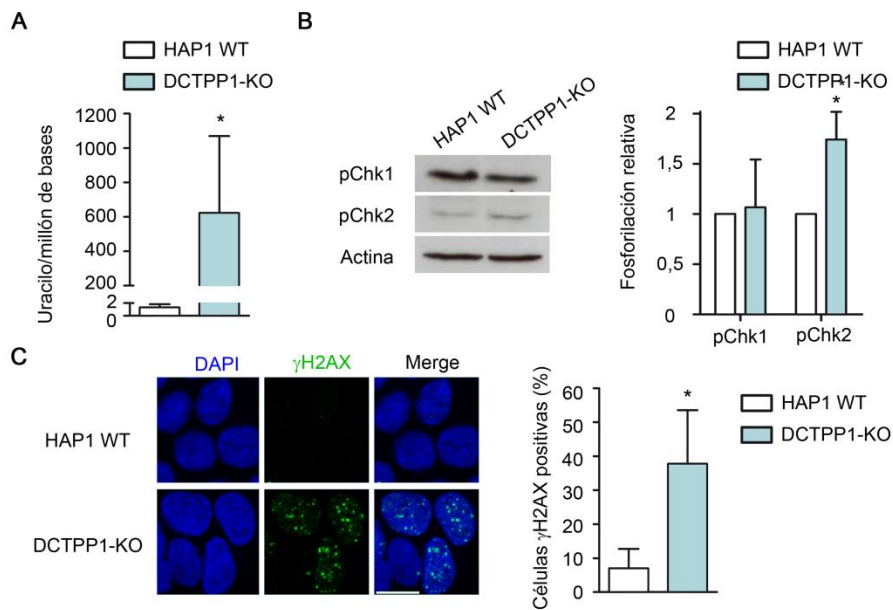


**Figura D.15. Perfil metabolómico de la concentración de aminoácidos en las líneas HAP1 WT, DCTPP1-KO y DCTPP1-KO-Ex1.** Los valores corresponden a la media de 4 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

#### D.2.4. Análisis del contenido en uracilo y de marcadores de respuesta a daño en DNA en las líneas HAP1

La línea DCTPP1-KO presenta un ratio dUTP/dTTP elevado por lo que procedimos a evaluar el contenido en uracilo en DNA genómico. Al igual que en células MCF-7, la ausencia de la actividad de DCTPP1 en la línea *knockout* provoca un incremento en los

niveles de uracilo; concretamente se detectaron 667 uracilos por millón de bases más que en la línea HAP1 control (Figura D.16 panel A). La alta incorporación de uracilo se traduce en una activación de la respuesta a daño en DNA, detectándose un aumento moderado en la fosforilación de Chk2 en células deficientes para DCTPP1. En cambio, no se detectaron cambios en la fosforilación de Chk1 si bien cabe destacar la alta fosforilación basal de esta quinasa en células HAP1 que probablemente refleja la presencia basal de daños en el DNA en este tipo celular (Figura D.16 panel B). La fosforilación de la histona H2AX también se encuentra aumentada en la línea DCTPP1-KO (Figura D.16 panel C). El porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX incrementa significativamente desde un 5,4% en células HAP1 WT hasta un 35,6% en ausencia de DCTPP1. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en la línea MCF-7 y muestran la relevancia de DCTPP1 en la preservación de la integridad genómica.



**Figura D.16. Activación de la respuesta a daño en DNA (DDR) en células DCTPP1-KO.** **A.** Determinación del contenido en uracilo en DNA genómico. Los valores del DNA genómico procedente de células HAP1 WT se usaron como referencia para la cuantificación relativa del contenido en uracilo. **B.** Análisis por *western blot* de la fosforilación relativa de las quinasas de checkpoint 1 y 2 (Chk1 y Chk2). Los niveles de proteína se normalizaron respecto a los niveles de actina. **C.** Panel derecho, porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX. Panel izquierdo, imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células DCTPP1-KO. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

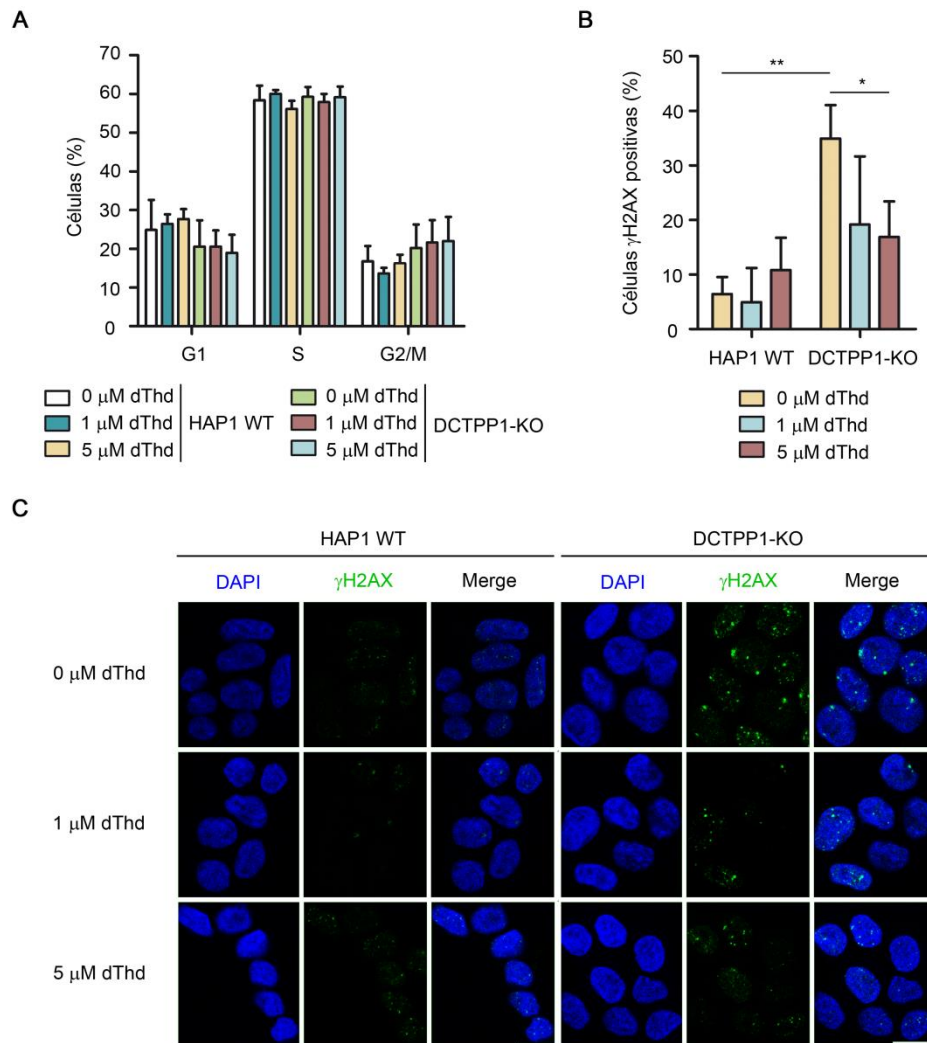
### D.2.5. Efecto de la modulación del ratio dUTP/dTTP en la activación de DDR

Previamente hemos demostrado en el presente trabajo que la alteración del ratio dUTP/dTTP es la causa subyacente del aumento de inestabilidad genética que conduce a la activación de DDR en células MCF-7 deficientes en DCTPP1. Con el fin de establecer dicha relación en el modelo celular HAP1, se analizó el efecto de la expansión del pool de dTTP sobre la aparición de daño en el DNA, para lo cual células HAP1 WT y DCTPP1-KO se suplementaron con 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M de timidina durante 24 h antes de proceder a la cuantificación de *foci* de  $\gamma$ H2AX como marcador fenotípico. Mediante análisis por citometría de flujo, se comprobó que las concentraciones de dThd utilizadas no inducían la parada en el ciclo celular, fenómeno que se denomina *thymidine block* (Schvartzman *et al.*, 1984) (Figura D.17 panel A). En la línea control HAP1 WT el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX permaneció constante tras la suplementación con timidina. Por el contrario, en células DCTPP1-KO este porcentaje se redujo de manera proporcional a la concentración de dThd empleada, desde el 34,9% al 26,3% tras incubación con 1  $\mu$ M y al 16,8% con 5  $\mu$ M (Figura D.17 paneles B y C).

Con el objetivo de promover la síntesis de timidilato a través de la hidrólisis de dCTP y de esta manera restaurar el ratio dUTP/dTTP se procedió a la sobreexpresión de DCTPP1. Para ello las células se transfectaron con un plásmido control (pcDNA) y un plásmido con el ORF correspondiente a DCTPP1 (pcDNA-DCTPP1) analizándose la presencia de *foci* de  $\gamma$ H2AX a día 2 post-transfección. Mediante *western blot* se comprobaron los niveles de expresión de DCTPP1 tras las transfecciones, observándose niveles especialmente elevados de proteína en aquellas células transfectadas con pcDNA-DCTPP1 (Figura D.18 panel A). A pesar de ello, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células positivas para  $\gamma$ H2AX entre las células DCTPP1-KO transfectadas con el plásmido



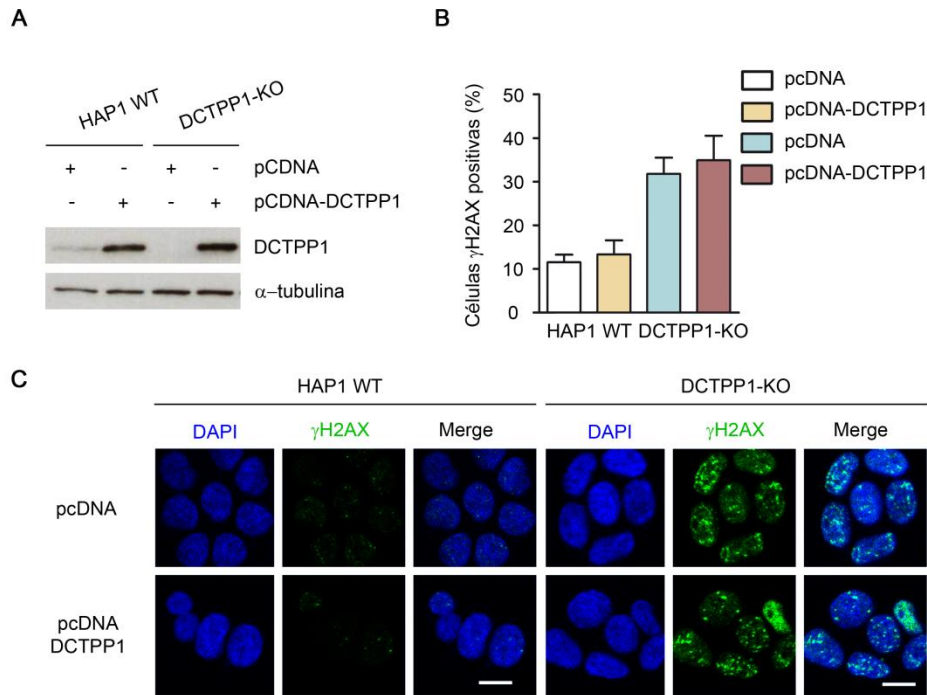
control y entre las mismas células donde se rescató la expresión de DCTPP1 (26,1% y 29,8% respectivamente) (Figura D.18 paneles B y C).



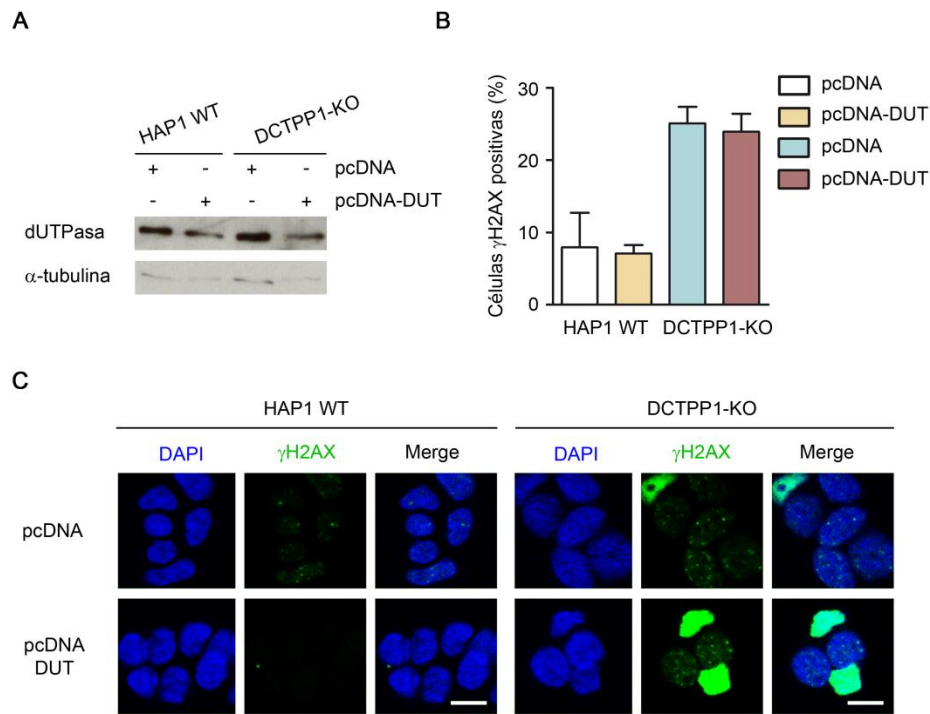
**Figura D.17. La suplementación con timidina disminuye la fosforilación de H2AX en células DCTPP1-KO.** **A.** Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de células HAP1 WT y DCTPP1-KO suplementadas con 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M de dThd durante 24h. **B.** Porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX tras la suplementación con dThd. **C.** Imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células DCTPP1-KO en ausencia y en presencia de dThd. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

Una estrategia alternativa para restaurar el ratio dUTP/dTTP en las células DCTPP1-KO y reducir así la activación de DDR consistió en la sobreexpresión de la dUTPasa que actuaría eliminando el dUTP presente en estas células. Para ello, se procedió a la transfección con pcDNA, y pcDNA-DUT, y al análisis de *foci* de  $\gamma$ H2AX a las 48 h post-

transfección. Sin embargo, la transfección con pcDNA-DUT no resultó en un incremento en los niveles de dUTPasa (Figura D.19 panel A) ni tuvo ningún impacto sobre el nivel de fosforilación de H2AX observado en el fondo DCTPP1-KO, tal y como se había observado previamente en la línea MCF-7 (Figura D.19 paneles B y C). Por otro lado, el resultado obtenido en células MCF-7 (Figura D.8) descarta que la ausencia de sobreexpresión de la dUTPasa sea debida a defectos en el vector de expresión empleado.



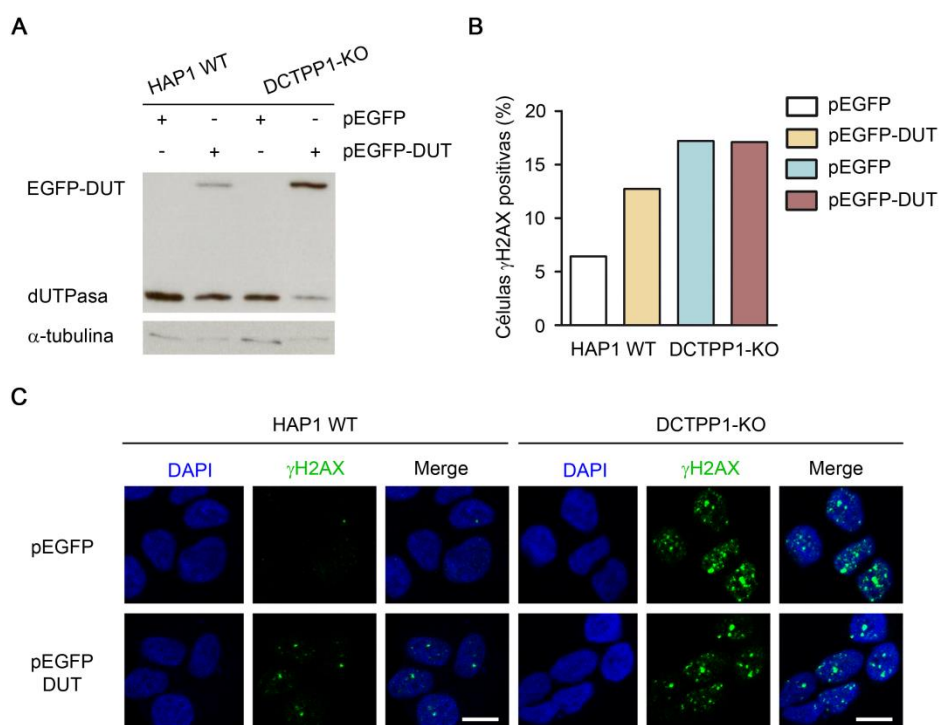
**Figura D.18. Sobreexpresión de DCTPP1 en células HAP1.** **A.** Análisis mediante *western blot* de los niveles de expresión de DCTPP1 en células HAP1 WT y DCTPP1-KO 48 h después de la transfección con pcDNA o pcDNA-DCTPP1. **B.** Porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX tras la sobreexpresión de DCTPP1. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). **C.** Imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células DCTPP1-KO transfectadas con pcDNA o con pcDNA-DCTPP1. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.



**Figura D.19. Análisis del efecto de la expresión de dUTPasa sobre la formación de foci  $\gamma$ H2AX en células HAP1.** **A.** Análisis mediante *western blot* de los niveles de dUTPasa en células HAP1 WT y DCTPP1-KO a día 2 post-transfección con pcDNA o pcDNA-DUT. **B.** Porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX tras la transfección con pcDNA-DUT. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). **C.** Imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células DCTPP1-KO transfectadas con pcDNA o con pcDNA-DUT. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

Se generó una segunda construcción para expresar la dUTPasa, en este caso fusionada a EGFP en su extremo N-terminal de forma que permitiese diferenciar la proteína endógena de la exógena y comprobar si la enzima se estaba expresando como consecuencia de la transfección. La expresión de proteína se analizó a las 48 h tras la transfección con pEGFP como plásmido control y pEGFP-DUT. Sorprendentemente, el análisis por *western blot* reveló que la sobreexpresión de la proteína fusionada a EGFP conlleva una disminución de la expresión de la proteína endógena, especialmente visible en la línea DCTPP1-KO, (Figura D.20 panel A). Así, la expresión de EGFP-dUTPasa en células DCTPP1-KO no produjo en términos globales un aumento de la cantidad total de dUTPasa expresada y por consiguiente ningún efecto sobre el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX (Figura D.20 paneles B y C). Este resultado pone de manifiesto la

posible existencia de mecanismos de regulación de los niveles máximos de dUTPasa en la célula. En este sentido, las células MCF-7 presentan un nivel de expresión basal de dUTPasa notablemente inferior al de células HAP1, lo que explicaría las diferencias encontradas.



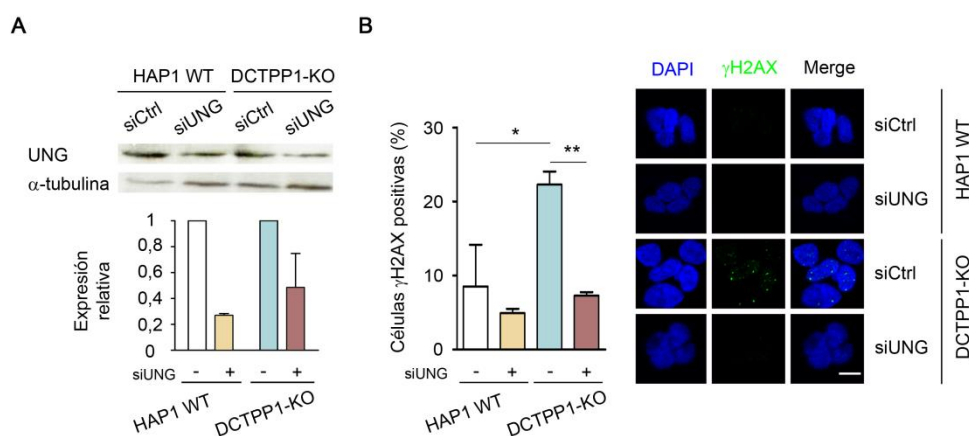
**Figura D.20. Sobreexpresión de la proteína de fusión EGFP-dUTPasa en células HAP1.** **A.** Análisis mediante *western blot* de la expresión de EGFP-dUTPasa (pEGFP-DUT) en células HAP1 WT y DCTPP1-KO a las 48h post-transfección. **B.** Porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX tras la expresión de EGFP-DUT. **C.** Imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células DCTPP1-KO transfectadas con el pEGFP o con pEGFP-DUT. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

## D.2.6. Papel de UNG en la fosforilación de H2AX en células

### DCTPP1-KO

Para confirmar que la fosforilación de H2AX es consecuencia de la incorporación y posterior escisión de uracilo procedimos al silenciamiento transitorio de UNG. Las células HAP1 WT y DCTPP1-KO se transfectaron con siRNA control y siRNA UNG y a las 96 h se comprobaron los niveles de proteína. Los niveles de UNG disminuyeron entre un 50% y un 70% en las células transfectadas con siUNG (Figura D.21 panel A). De igual forma a lo

observado en el modelo celular MCF-7, el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX disminuyó de un 22,2% a un 7,27%, similar a los niveles en la línea HAP1 WT transfectada con siControl o siUNG (8,5% y 4,9% respectivamente) (Figura D.21 paneles B y C). Estos resultados apoyan la idea de los intermediarios de reparación del uracilo como principales responsables de la activación de DDR.



**Figura D. 21. La inhibición de UNG reduce la formación de foci  $\gamma$ H2AX en células HAP1.**

**A.** Análisis mediante *western blot* de los niveles de expresión de DCTPP1 en células HAP1 WT y DCTPP1-KO 96 h después de la transfección con siControl o siUNG. Los niveles de proteína se normalizaron respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. **B.** Panel izquierdo, porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX tras el silenciamiento de UNG durante 96 h. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). Panel derecho, imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células DCTPP1-KO transfectadas con siControl o siUNG. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

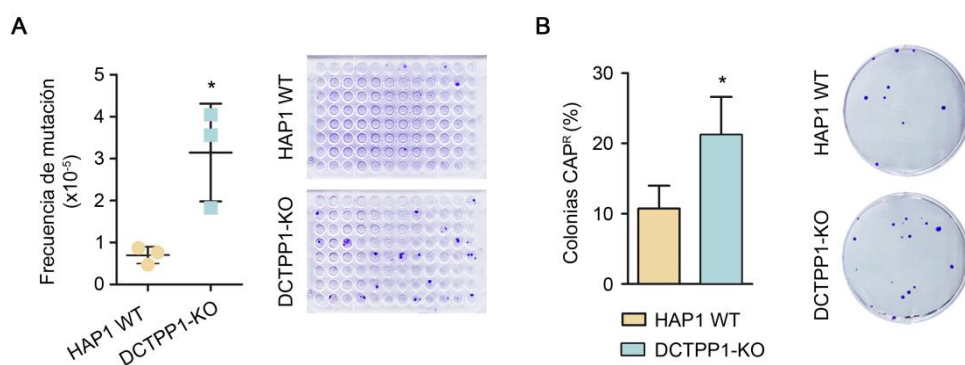
### D.2.7. Análisis de la frecuencia de mutación de células DCTPP1-KO

Los datos expuestos hasta ahora sugieren que la ausencia de la enzima DCTPP1 conlleva un daño severo en el DNA como resultado principalmente de la alteración del ratio dUTP/dTTP. Así, las células deficientes en DCTPP1 se caracterizan por un alto contenido de uracilo en DNA, defectos en el ciclo celular incluyendo un aumento de puentes de anafase y la activación de la DDR. Todo ello apunta a que estas células podrían

presentar un fenotipo hipermutador espontáneo como resultado de la fijación de mutaciones inducidas por las lesiones en el DNA referidas.

La línea haploide HAP1 posee una sola copia para el gen que codifica la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT), el cual puede ser utilizado como marcador directo de mutagénesis (Johnson, 2012). La enzima HPRT cataliza la conversión del análogo de nucleósido 6-tioguanina (6-TG) a 6-tioguanosina monofosfato (6-TGMP). Este nucleósido es fosforilado hasta 6-tioguanosina trifosfato (6-TGTP) que puede ser incorporada al DNA lo cual causa la muerte celular. Mutaciones en el gen HPRT que impiden que la 6-TG sea metabolizada evitando así su toxicidad para la célula. La frecuencia de mutación espontánea (MF) se determinó de acuerdo con lo especificado en el apartado C.2.13 a partir de la selección de mutantes para HPRT tras un tratamiento con 6-TG. Los resultados obtenidos muestran una frecuencia de mutación espontánea para la línea HAP1 es  $0,69 \times 10^{-5}$  mientras que en ausencia de DCTPP1, la frecuencia de mutación aumentó 4,5 veces hasta alcanzar la cifra de  $3,14 \times 10^{-5}$  (Figura D.22 panel A).

94



**Figura D.22. La línea DCTPP1-KO presenta un fenotipo hipermutador.** **A.** Determinación de la frecuencia de mutación del gen HPRT por resistencia a 6-tioguanina. Los valores corresponden a 3 experimentos independientes. **B.** Ensayo de resistencia a cloranfenicol. El porcentaje de colonias resistentes a cloranfenicol (CAP<sup>R</sup>) se calculó utilizando como referencia el porcentaje de colonias viables en ausencia de CAP. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

La síntesis del DNA mitocondrial (mtDNA) en células proliferativas es altamente dependiente del *pool* citosólico de dNTPs (Mathews & Song, 2007), por lo que cualquier

alteración en su composición tiene un impacto sobre la integridad del genoma mitocondrial y por tanto el fenotipo hipermutador descrito para el genoma nuclear de las células DCTPP1-KO debería reproducirse en el DNA mitocondrial. Además, DCTPP1 se localiza en la mitocondria, por lo que una deficiencia en esta enzima podría afectar de manera específica al *pool* mitocondrial de dNTPs. Para evaluar la integridad del DNA mitocondrial se usó el gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal como marcador de mutagénesis y la resistencia a cloranfenicol (CAP) como método de selección de las mutaciones en este gen. En células deficientes en DCTPP1, la proporción de colonias resistentes a CAP fue el doble que en células control (21,2% vs 10,7%) lo que indica un mayor nivel de mutagénesis en el DNA mitocondrial (Figura D.22 panel B).

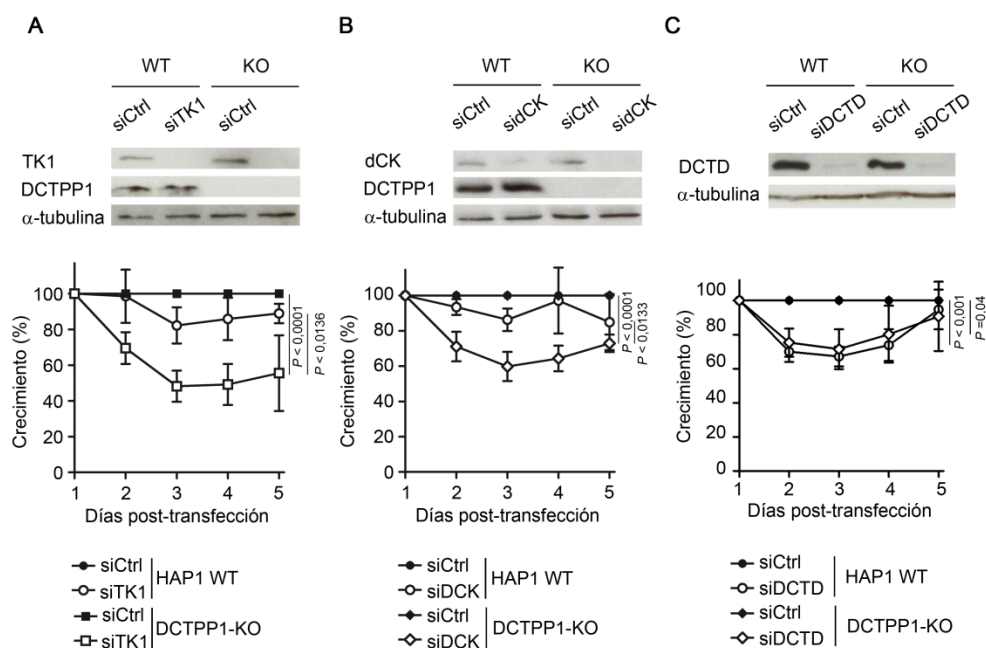
### **D.3. CONTRIBUCIÓN DE DCTPP1 A LA SÍNTESIS *DE NOVO* EN CÉLULAS HAP1**

#### **D.3.1. Contribución de DCTPP1 a la supervivencia celular en ausencia de la ruta de salvamento de nucleósidos pirimidínicos**

La disminución en el *pool* de dTTP en ausencia de DCTPP1, observada en los dos modelos empleados en este trabajo, evidencia la contribución de esta enzima a la síntesis *de novo* de dTTP. De acuerdo con nuestra hipótesis, DCTPP1 estaría proveyendo a la célula de dCMP que puede ser convertido en dTMP por las reacciones consecutivas de DCTD y la TS. De esta forma, en ausencia de DCTPP1 el salvamento de timidina y desoxicitidina, por TK1 y dCK respectivamente, tendría un papel crucial en la síntesis y homeostasis del dTTP.

Con el fin de evaluar la relevancia de TK1, dCK y DCTD en proveer a la célula de dTTP, especialmente en ausencia de DCTPP1, se procedió a inhibir transitoriamente su expresión mediante transfección con siRNA específicos. El efecto de tal inhibición en

células HAP1 WT y DCTPP1-KO se comprobó mediante *western blot* (Figura D.23 paneles A, B y C superiores). Dado que en trabajos previos desarrollados en células HeLa y MRC-5 se había observado un aumento significativo de la expresión de DCTPP1 tras el silenciamiento génico de TK1 y dCK, se comprobaron los niveles de DCTPP1 en células HAP1 WT tras el silenciamiento de dichas enzimas no observándose cambios significativos.



**Figura D.23. Las células DCTPP1-KO dependen del salvamento de dCyd y dThd para el crecimiento celular.** **A.** Panel superior, análisis mediante *western blot* del silenciamiento por siRNA de TK1 (siTK1) a día 4 post-transfección. Panel inferior, líneas HAP1 WT (WT) y DCTPP1-KO (KO) deficientes en TK1. **B.** Panel superior, análisis mediante *western blot* del silenciamiento por siRNA de dCK (sidCK) a día 4 post-transfección. Panel inferior, líneas HAP1 WT (WT) y DCTPP1-KO (KO) deficientes en dCK. **C.** Panel superior, análisis mediante *western blot* del silenciamiento por siRNA de la dCMP desaminasa (siDCTD) a día 4 post-transfección. Panel inferior, líneas HAP1 WT (WT) y DCTPP1-KO (KO) deficientes en DCTD. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

Por otra parte, se evaluó el crecimiento durante 5 días tras la transfección con los distintos *pools* de siRNAs (siControl, siTK1, sidCK y siDCTD) en las líneas HAP1 WT y DCTPP1-KO. Las células deficientes en DCTPP1 resultaron ser susceptibles a la depleción de TK1, y ante la falta de ambas enzimas el crecimiento disminuyó entre un 50-60% respecto al de la línea parental con niveles normales de DCTPP1 y TK1 (Figura D.23 panel



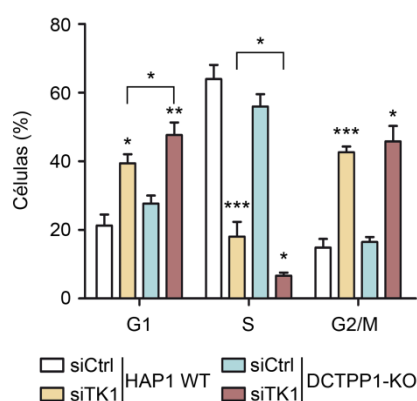
A, inferior). Este defecto en el crecimiento era también significativamente superior al que presentaba la línea HAP1 WT deficiente en TK1, indicando que la ausencia de salvamento de timidina *per se* no afecta sensiblemente al crecimiento; únicamente la ausencia de síntesis *de novo* vía DCTPP1 hace que la vía de recuperación sea esencial para la proliferación celular. Un resultado similar se encontró al inhibir la expresión de dCK en células DCTPP1-KO, donde el crecimiento celular se redujo significativamente con respecto al de las líneas control HAP1 WT y DCTPP1-KO (Figura D.23 panel B inferior). Como ocurría en el caso de la timidina, la interrupción del salvamento de desoxicitidina mediante la depleción de dCK tampoco tiene efectos significativos en el crecimiento de la línea control que expresa DCTPP1. En conjunto estos resultados ponen de manifiesto la contribución esencial de DCTPP1 a la síntesis de dTTP principalmente en ausencia de alguna de las vías de recuperación de nucleósidos pirimidínicos.

Contrariamente a lo observado cuando se elimina el salvamento de nucleósidos, las células DCTPP1-KO resultaron ser igualmente sensibles a la depleción de DCTD que las células control (Figura D.23 panel C inferior), con una pérdida de proliferación del 30% en todos los casos. Este resultado sugiere que (i) el pool de dCMP y su desaminación tienen un papel importante en la síntesis de dTTP tal y como se había puesto de manifiesto en trabajos previos (Bianchi *et al.*, 1987) y que (ii) DCTPP1 y dCK son actividades complementarias a la hora de proveer el dCMP celular.

### **D.3.2. El *pool* de dNTPs y la integridad genética dependen de DCTPP1 y del salvamento de dThd**

Para profundizar en las causas que provocan el defecto en proliferación descrito en ausencia de DCTPP1 y TK1 se procedió en primer lugar al análisis del ciclo celular a día 2 post-transfección (Figura D.24). Tanto en células control como en células DCTPP1-KO el

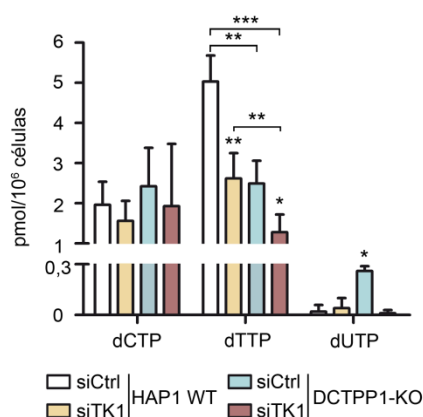
silenciamiento de TK1 causa un descenso del porcentaje de células en fase S y un aumento en las fases G1 y G2/M. Estas anomalías son aún más pronunciadas en células deficientes en DCTPP1. Mientras que el porcentaje de células en G1 fue del 20-25% en células transfectadas con siControl, este incrementó al 39,3% en células HAP1 WT y al 46,6% en células DCTPP1-KO tras el silenciamiento de TK1 en ambos fondos genéticos. Al mismo tiempo tras la depleción de TK1, las células en fase S disminuyeron desde el 50-60% (control), hasta el 18% (HAP1 WT) y 6,6% (DCTPP1-KO).



**Figura D.24. Efecto del silenciamiento de TK1 sobre el ciclo celular.** Se evaluó la progresión del ciclo celular en células HAP1 WT y DCTPP1-KO deficientes en TK1 a día 2 post-transfección. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

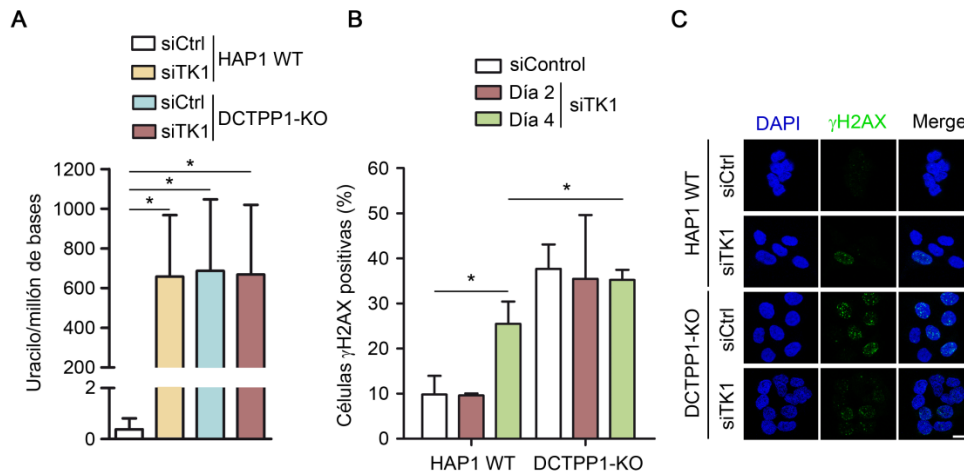
A continuación, se evaluó el impacto de la depleción de TK1 en las líneas HAP1 determinando la composición del *pool* de nucleótidos (Figura D.25). Como era de esperar, las diferencias más importantes se observaron en las concentraciones intracelulares de dTTP. El silenciamiento de TK1 en células HAP1 WT dio como resultado una reducción importante del *pool* de dTTP (de 5,0 a 2,6 pmol/10<sup>6</sup> células), comparable a la observada en células DCTPP1-KO transfectadas con el siRNA control. En células DCTPP1-KO, los niveles de dTTP disminuyeron de forma mucho drástica tras la depleción de TK1 (1,3 pmol/10<sup>6</sup> células), poniendo de manifiesto la relevancia de ambas enzimas, DCTPP1 y TK1, en la síntesis de dTTP. En cuanto al dUTP, solo se detectaron niveles significativos de 0,26 pmol/10<sup>6</sup> en células DCTPP1-KO transfectadas con el siRNA control, un valor similar

al determinado previamente en la misma línea celular no transfectada. El silenciamiento de TK1 da lugar a la desaparición de este *pool* de dUTP lo que sugiere que la fosforilación de desoxiuridina por TK1 pueda ser responsable en parte de la formación de dUTP en células DCTPP1-KO.



**Figura D.25. Impacto de TK1 en la composición de nucleótidos pirimidínicos en células HAP1.** Análisis de la composición del *pool* de dNTPs en células control y DCTPP1-KO tras el silenciamiento de TK1. La medida se llevó a cabo a día 2 post-transfección. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD).

Pese a que en células deficientes en TK1 los niveles de dUTP son extremadamente bajos o están por debajo de los límites de detección de nuestro ensayo, la severa reducción del *pool* de dTTP abre la posibilidad de que se produzca la incorporación de uracilo en el DNA genómico de estas células. Efectivamente, la depleción de TK1 en células HAP1 WT dio lugar a un fuerte incremento en los niveles de uracilo (Figura D.26 panel A) así como a un aumento del porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX analizadas a día 4 post-transfección (de 9,8% a 25,4%) (Figura D.26 paneles B y C). En cambio, en células DCTPP1-KO, cuyos niveles basales de uracilo genómico son elevados, no se detectó una mayor presencia de uracilo en ausencia de TK1, pero tampoco una disminución. En consecuencia, la fosforilación de H2AX se mantuvo constante y a niveles altos tanto en células DCTPP1-KO control como en células deficientes en TK1 (30-40%) (Figura D.26 paneles B y C).



**Figura D.26. Determinación de uracilo y foci  $\gamma$ H2AX en células deficientes en TK1.** **A.** Determinación del contenido en uracilo en DNA genómico. Los valores del DNA genómico procedente de células HAP1 WT transfectadas con siCtrl se usaron como referencia para la cuantificación relativa del contenido en uracilo. **B.** Porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX tras el silenciamiento de TK1. **C.** Imágenes de microscopía confocal representativas del marcaje con anti- $\gamma$ H2AX en células control y células DCTPP1-KO transfectadas con siCtrl o siTK1, a día 4 post-transfección. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

## D.4. ESTUDIO DEL PAPEL DE DCTPP1 EN QUIESCENCIA

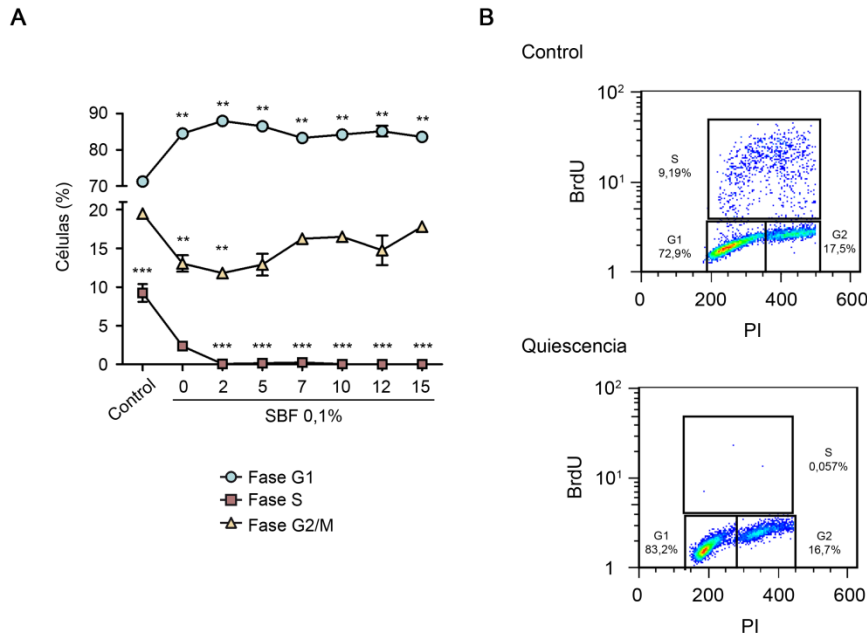
### D.4.1. CCD-34Lu como modelo celular de quiescencia

En células en división los nucleótidos citosólicos producidos por acción de la RNR no solo abastecen al DNA nuclear sino también al mitocondrial (Pontarin *et al.*, 2003). Esta situación cambia en células post-mitóticas, donde la síntesis *de novo* y el salvamento de nucleósidos citosólicos se ven reducidos a niveles mínimos puesto que no hay replicación del DNA nuclear. Sin embargo, el mtDNA se encuentra en división constante, incluso en células post-mitóticas ya diferenciadas o quiescentes, de forma que el peso de proveer de dNTPs recae plenamente en el salvamento mitocondrial de nucleósidos. La presencia de DCTPP1 en la mitocondria sugiere una función de la enzima en el metabolismo de nucleótidos en este orgánulo, función que puede ser especialmente relevante en células no proliferativas o quiescentes dadas las particularidades mencionadas.

Con el fin de estudiar el papel de DCTPP1 en la homeostasis del *pool* mitocondrial de dNTPs en células en quiescencia se empleó la línea de fibroblastos de pulmón CCD-34Lu. En primer lugar, se procedió a reproducir el protocolo de inducción de quiescencia desarrollado por Ferraro *et al.* (Ferraro *et al.*, 2005). Las células CCD-34Lu se crecieron hasta alcanzar un 100% de confluencia, es decir hasta que se produjo la inhibición por contacto de la proliferación. A continuación, se redujo el porcentaje de suero bovino fetal (SBF) en el medio de cultivo de un 10% a un 0,1% para inducir el estado de quiescencia. El estado de proliferación celular se determinó mediante análisis del ciclo celular desde el día 0 (momento en que se redujo la concentración de SBF) hasta el día 15, utilizándose como control de proliferación células que no habían alcanzado la inhibición por contacto y que se mantuvieron en un 10% de SBF. En la figura D.27 (paneles A y B) se observa como la inhibición por contacto *per se* tiene como consecuencia una disminución de las células en fase S, de un 10% a un 2%, produciéndose un acúmulo en fase G1, porcentaje que aumenta de un 70% en células proliferativas a un 84%, lo que confirma que se ha alcanzado la inhibición del crecimiento por contacto. El porcentaje de células en fase S se redujo de forma más drástica tras la reducción de SBF, hasta el 0,15%, 0,04% y 0,02% tras 5, 10 y 15 días de inducción de quiescencia respectivamente.

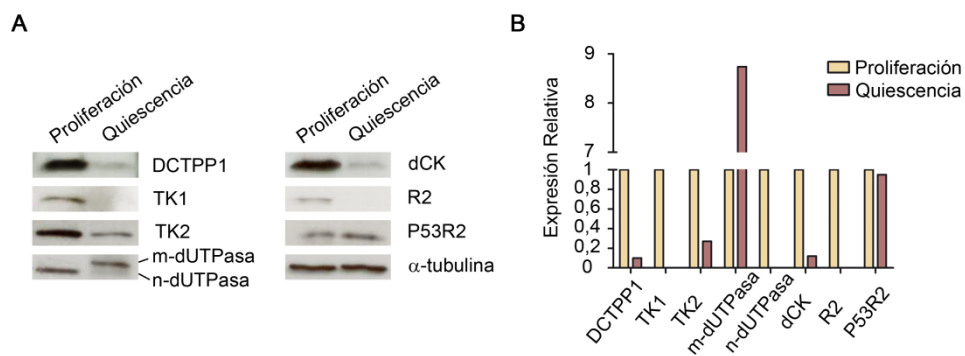
Numerosas enzimas del metabolismo de pirimidinas se encuentran reguladas a nivel de ciclo celular. Este es el caso de TK1 o de la subunidad 2 de la RNR (R2) (Sherley & Kelly, 1988; Nordlund & Reichard, 2006). Para caracterizar el modelo de quiescencia obtenido en células CCD-34Lu se analizaron por *western blot* la expresión de diferentes enzimas del metabolismo implicadas en síntesis *de novo*, en el salvamento citosólico y en el salvamento mitocondrial de dNTPs. La figura D.28 (paneles A y B) muestra la disminución de TK1, R2 y de la isoforma nuclear de la dUTPasa hasta niveles indetectables en células en quiescencia. En cambio, la dUTPasa mitocondrial (isoforma de mayor tamaño) aumentó su expresión hasta 8 veces con respecto a la de células proliferativas. También disminuyó la presencia de dCK hasta un 90% en células no replicativas mientras que los niveles de

expresión de la subunidad 2 de la RNR inducible por p53 (p53R2), implicada en reparación de DNA, permanecieron inalterados. En el caso de DCTPP1 se encontró una reducción de más de un 80% en células quiescentes.



**Figura D.27. Análisis del ciclo celular de células CCD34-Lu tras la inducción de quiescencia.** A. Se analizó la progresión del ciclo celular por citometría de flujo en células control (en proliferación), células que habían alcanzado la inhibición por contacto (día 0) y durante 15 días tras la inducción de quiescencia. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  SD). B. Perfiles de ciclo de celular representativos de células en proliferación (panel superior) y células a día 15 tras inducir en quiescencia (panel inferior).

102



**Figura D.28. Niveles de expresión de enzimas del metabolismo de nucleótidos en células proliferativas y no proliferativas.** A. Se analizaron por *western blot* los niveles de diferentes proteínas implicadas en el metabolismo de nucleótidos en células proliferativas y quiescentes. Los extractos de proteína se obtuvieron a día 15 tras la inducción de quiescencia. B. Cuantificación de los niveles de expresión de enzimas en quiescencia respecto a células en proliferación. Los datos se normalizaron con respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina.

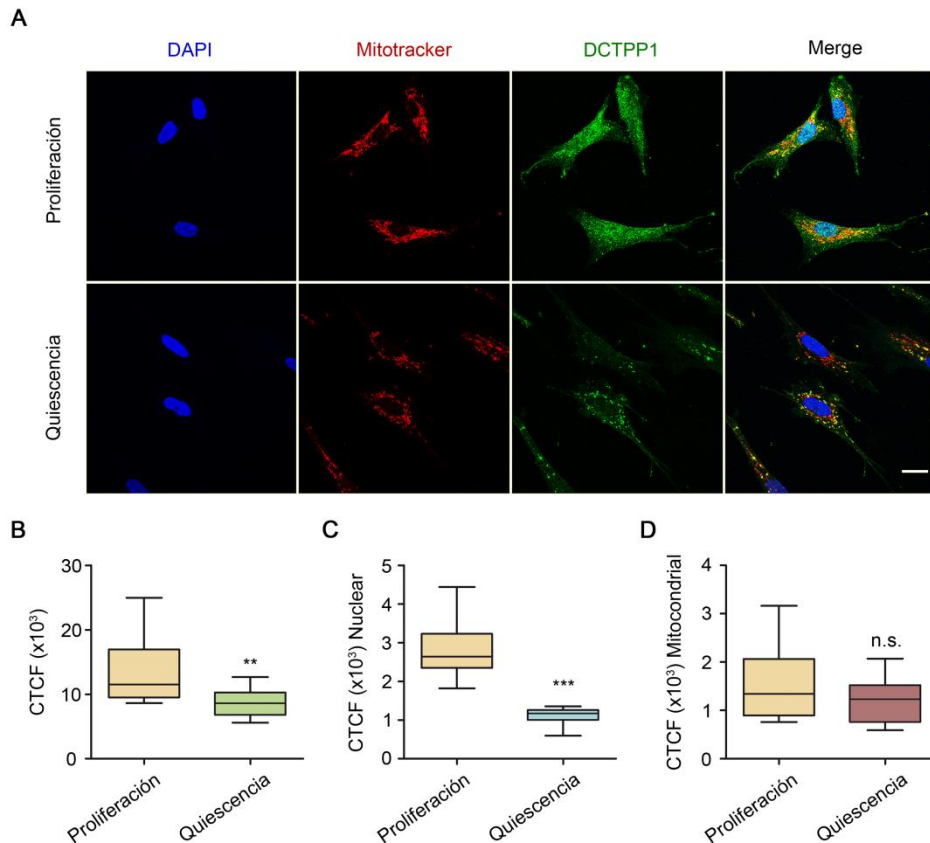
#### **D.4.2. Análisis de la localización de DCTPP1 en células quiescentes**

En células no replicativas, el metabolismo nuclear y citosólico de dNTPs se ve reducido de forma importante, tal y como muestran los bajos niveles de expresión de las enzimas implicadas, dejando en un primer plano el metabolismo mitocondrial para proveer los precursores del DNA mitocondrial. Puesto que la expresión de DCTPP1 disminuye significativamente en células no proliferativas, cabe preguntarse por su relevancia en el metabolismo de nucleótidos mitocondrial en dicho contexto celular. Con este objetivo se analizó por microscopía de fluorescencia la localización subcelular y niveles de expresión de DCTPP1 en núcleo, citosol y mitocondria de células CCD34-Lu tras 15 días de inducción de quiescencia. La disminución de expresión observada mediante *western blot* resulta también evidente en la señal de inmunofluorescencia correspondiente a DCTPP1 (figura D.29 panel A), principalmente de la señal asociada al núcleo y al citosol.

103

---

Así, el nivel total de fluorescencia en células quiescentes ( $9 \times 10^3$  CTCF) es menor comparado al de células proliferativas ( $12 \times 10^3$  CTCF) (Figura D.29 panel B). La distribución de la señal de fluorescencia se analizó en regiones de interés (ROI) del núcleo y de la mitocondria. En la figura D.29 panel C se observa como de igual forma que ocurría cuando cuantificamos la fluorescencia en la célula entera, hay una disminución de la señal de DCTPP1 en el núcleo en células quiescentes. El análisis muestra una disminución significativa de la señal de fluorescencia y por tanto de la expresión de DCTPP1 en el núcleo de células quiescentes con respecto al de células en división (desde  $2,5 \times 10^3$  CTCF a  $1 \times 10^3$  CTCF). Por el contrario, los niveles de DCTPP1 en mitocondria se mantienen similares en ambos estados proliferativos ( $1,4 \times 10^3$  CTCF y  $1,3 \times 10^3$ ) (Figura D.29 panel D).

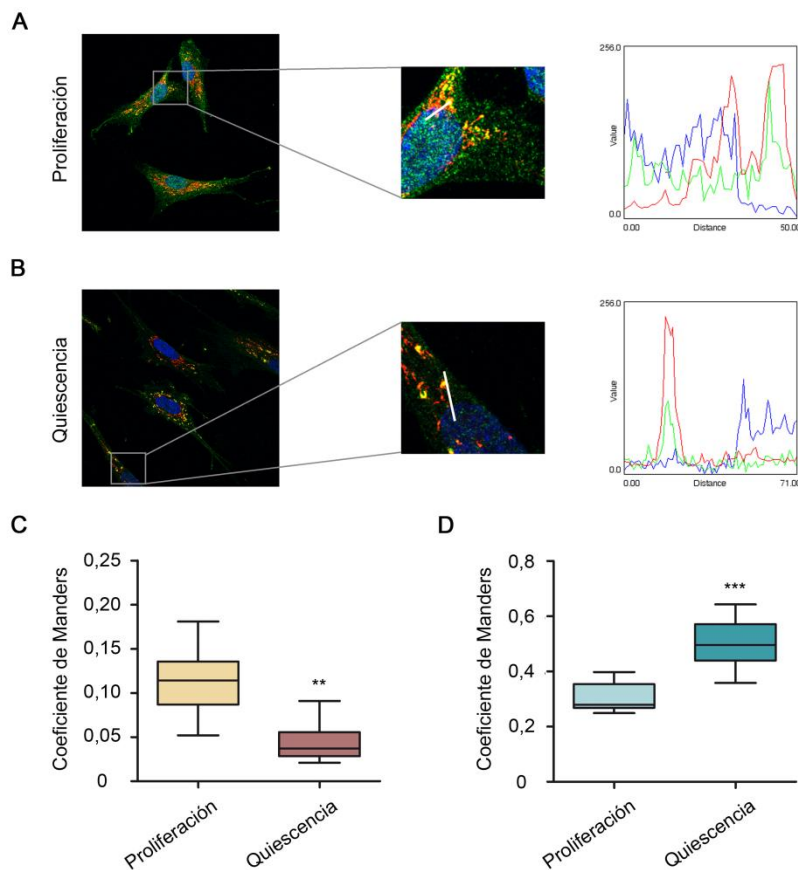


**Figura D. 29. Análisis mediante microscopía de inmunofluorescencia de los niveles de expresión de DCTPP1 en células CCD-34Lu en quiescencia.** **A.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia correspondientes a células en proliferación y células quiescentes. La barra de escala corresponde a 20  $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la fluorescencia celular total corregida (CTCF) correspondiente al marcaje con anti-DCTPP1. **C.** Cuantificación de la fluorescencia celular total corregida (CTCF) en el núcleo correspondiente al marcaje con anti-DCTPP1. **D.** Cuantificación de la fluorescencia celular total corregida (CTCF) en la mitocondria correspondiente al marcaje con anti-DCTPP1. Los valores corresponden a 25 células analizadas por condición experimental.

Para confirmar los resultados anteriores se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de la colocalización de DCTPP1 con núcleo y con mitocondria. En proliferación, la intensidad de señal correspondiente a DCTPP1 (línea verde) coincide con la de las señales correspondientes a DAPI (línea azul) y mitotracker (línea roja) (Figura D.30 panel A). En cambio, los picos de señal de DCTPP1 son mínimos en el núcleo de células quiescentes mientras que se mantiene la correlación con la señal de mitotracker (Figura D.30 panel B). Para el análisis cuantitativo se calculó el coeficiente de Manders con el plugin JaCOP de FIJI. Este coeficiente nos da valores entre 0 y 1 y es una medida del



solapamiento de dos señales en una imagen. Por un lado se determinó el coeficiente de Manders para DCTPP1 en el núcleo, es decir la señal de DCTPP1 que coincidía en el espacio con la señal correspondiente al DAPI. En este análisis el coeficiente de Manders disminuye de 0,12 en células proliferativas a 0,003 en células quiescentes (Figura D.30 panel C), indicando una menor presencia de DCTPP1 en el núcleo de estas últimas. El cálculo del coeficiente para la señal de DCTPP1 en la mitocondria revela un un incremento de los valores de solapamiento de 0,27 a 0,5 en células quiescentes (figura D.30 panel D), indicativo de que la proteína que hay en células quiescentes se encuentra predominantemente en mitocondria.



**Figura D.30. Distribución intracelular de DCTPP1 en células quiescentes.** **A.** Escáner cualitativo de la señal de fluorescencia de una sección (línea blanca) de una célula en proliferación. **B.** Escáner cualitativo de la señal de fluorescencia de una sección (línea blanca) de una célula en quiescencia. DCTPP1, línea verde; núcleo, línea azul; mitocondria, línea roja. **C.** Análisis cuantitativo de la colocalización de DCTPP1 en el núcleo. **D.** Análisis cuantitativo de la colocalización de DCTPP1 en la mitocondria. Los valores corresponden a 25 células analizadas por condición experimental.



## DISCUSIÓN

---



## E. DISCUSIÓN

Los cuatro desoxirribonucleótidos, dATP, dGTP, dCTP y dTTP, son los precursores esenciales para la síntesis del DNA durante los procesos de replicación, recombinación y reparación. Alteraciones en las concentraciones absolutas y/o relativas de cualquiera de los cuatro dNTPs tiene como consecuencia una reducción de la fidelidad de la síntesis del DNA y un aumento de la mutagénesis (Mathews, 2006). Por lo tanto, para el mantenimiento de la homeostasis celular es esencial mantener la proporción entre la síntesis y la degradación de dNTPs, de otra manera un desequilibrio en uno de estos procesos puede provocar inestabilidad genética, que a su vez puede promover procesos tumorigénicos o ser causa de enfermedades metabólicas (Buj & Aird, 2018).

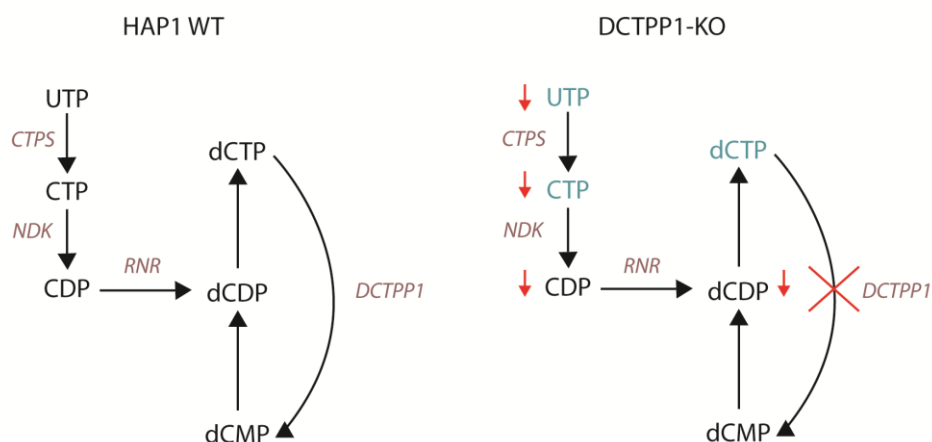
Entre los distintos tipos de actividades catabólicas que hidrolizan nucleótidos o nucleósidos encontramos enzimas fosforilasas, nucleotidasas, NTP pirofosfatasa y trifosfohidrolasas. La enzima humana DCTPP1 es una NTP pirofosfatasa todo- $\alpha$  que desempeña una de las actividades catabólicas mediante la hidrólisis de dCTP, contribuyendo de esta forma al mantenimiento de niveles adecuados de este nucleótido en el *pool* celular. Dada la importancia del mantenimiento del *pool* de dNTPs para la correcta duplicación del material genético y de las posibles consecuencias genotóxicas que un desbalance en dicho *pool* conlleva, en este trabajo hemos profundizado en el papel de DCTPP1 en la homeostasis de nucleótidos de pirimidina y en sus implicaciones en la integridad del genoma.

## E.1. PAPEL DE DCTPP1 EN LA HOMEOSTASIS DE NUCLEÓTIDOS DE PIRIMIDINA

### E.1.1. DCTPP1 participa en el mantenimiento de los niveles de dCTP

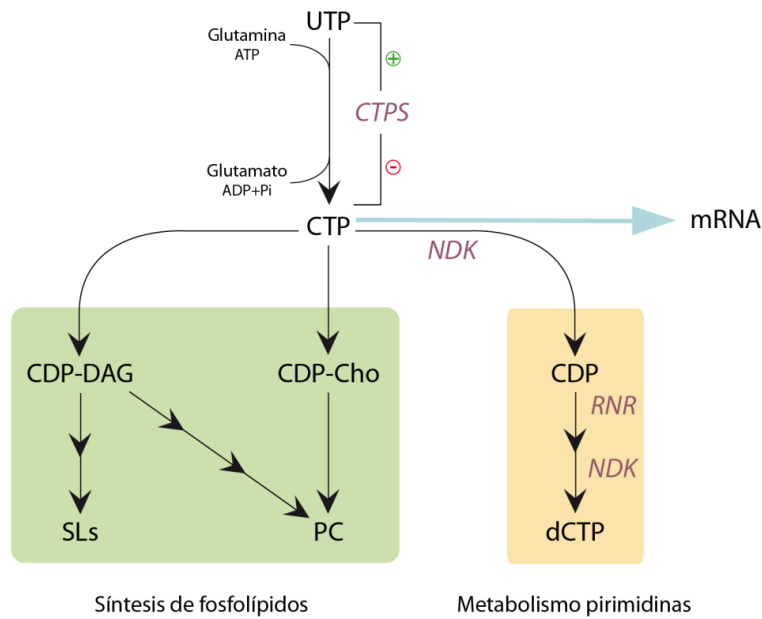
A lo largo del trabajo hemos empleado dos aproximaciones diferentes para el estudio de la función metabólica de DCTPP1: silenciamiento transitorio de la expresión mediante siRNA e inactivación génica mediante CRISPR/Cas9 usando como modelo las líneas celulares MCF-7 y HAP1 respectivamente. En el modelo de silenciamiento transitorio de DCTPP1 en MCF-7 observamos, tal y como se había descrito previamente en otros tipos celulares (Requena *et al.*, 2014), que en ausencia de DCTPP1 se produce una expansión del *pool* del nucleótido canónico dCTP lo que apoya su papel como dCTP hidrolasa. Por el contrario, los niveles de dCTP no se vieron alterados en las células HAP1 *knockout* para DCTPP1. Diferencias fenotípicas similares entre experimentos *knockout* y *knockdown* se han observado en numerosos estudios y en distintos organismos modelo, desde ratón o pez cebra hasta líneas celulares humanas (Peretz *et al.*, 2018). En algunos casos estas diferencias pueden deberse a efectos inespecíficos de los reactivos empleados, pero también pueden ser consecuencia de mecanismos compensatorios desencadenados tras la inactivación génica y la selección de clones en modelos *knockout*. En este sentido, es posible que la línea *knockout* presente una adaptación metabólica que regule los niveles de dCTP en ausencia de DCTPP1. Aunque no se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión de otras enzimas del metabolismo de pirimidinas, no se puede descartar la existencia de otros tipos de regulación. Por ejemplo, la enzima trifosfohidrolasa SAMHD1 que cuenta con el dCTP entre sus sustratos, además de estar regulada a nivel de ciclo celular está modulada por mecanismos alostéricos y modificaciones post-traduccionales (Miazzi *et al.*, 2014; E. J. Lee *et al.*, 2017). Por otro lado

podría existir una regulación de las reacciones enzimáticas previas a la síntesis de dCTP, como por ejemplo de la formación de CDP o la reducción de éste a dCDP (Figura E.1).



**Figura E.1. Modelo para la regulación de la síntesis de dCDP en células DCTPP1-KO.** En el panel izquierdo se muestra la situación normal de síntesis de dCDP en la línea control HAP1 WT y en el panel derecho en células HAP1 deficientes en DCTPP1. Las flechas rojas indican una menor disponibilidad de los correspondientes metabolitos (en azul aquellos metabolitos que han sido cuantificados experimentalmente). CTPS: CTP sintetasa; NDK: nucleótido difosfato quinasa; RNR: ribonucleótido reductasa.

La determinación del contenido del *pool* de ribonucleótidos pone de manifiesto una disminución significativa en los niveles UTP y CTP en la línea *knockout*. Esta reducción del *pool* de CTP tendría a su vez un impacto sobre los niveles de CDP, sustrato de la RNR para la formación del precursor inmediato del dCTP, es decir del dCDP. Las observaciones mencionadas apuntan pues a una adaptación metabólica encaminada a controlar la expansión del *pool* de dCTP. Un consecuencia indirecta de esta adaptación sería la alteración de la composición celular de fosfolípidos (Figura E.2) tal y como sugieren los datos del análisis metabólico.



**Figura E.2. Papel del CTP en síntesis de fosfolípidos, en síntesis *de novo* de CDP y como precursor de RNA mensajero (mRNA).** CTPS: CTP sintetasas; NDK: nucleósido difosfato quinasa; RNR: ribonucleótido reductasa; CDP-DAG: CDP diacilglicerol; CDP-Cho: CDP colina; SLs: esfingolípidos; PC: fosfatidilcolina.

### E.1.2. DCTPP1 interviene en la síntesis *de novo* de dTTP

El análisis del *pool* de nucleótidos mostró una reducción sustancial del dTTP y la presencia significativa de dUTP en los dos modelos experimentales. Estos resultados sugieren que DCTPP1 no solo está implicada en la homeostasis de dCTP sino que también contribuye de manera relevante a la síntesis *de novo* de dTTP. Esta ruta implicaría la hidrólisis de dCTP a dCMP catalizada por DCTPP1. El dCMP generado es a continuación desaminado por la dCMP desaminasa (DCTD) para producir dUMP que posteriormente es convertido en timidilato por acción de la timidilato sintasa (TS). Finalmente el dTMP es fosforilado de manera secuencial por la TMPK y la NDK hasta dTTP (Figura E.3). Las otras posibles vías para la síntesis de dUMP son la hidrólisis de dUTP por la dUTPasa, evitando así la incorporación de éste al DNA y la fosforilación de desoxiuridina (dUrd) por TK1 en el citosol y por TK2 en la mitocondria. El papel de DCTPP1 en la síntesis de dTTP resulta crucial junto con el de la recuperación de nucleósidos por dCK y TK1, siendo DCTPP1





## E.2. IMPORTANCIA DE DCTPP1 EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD GENÉTICA

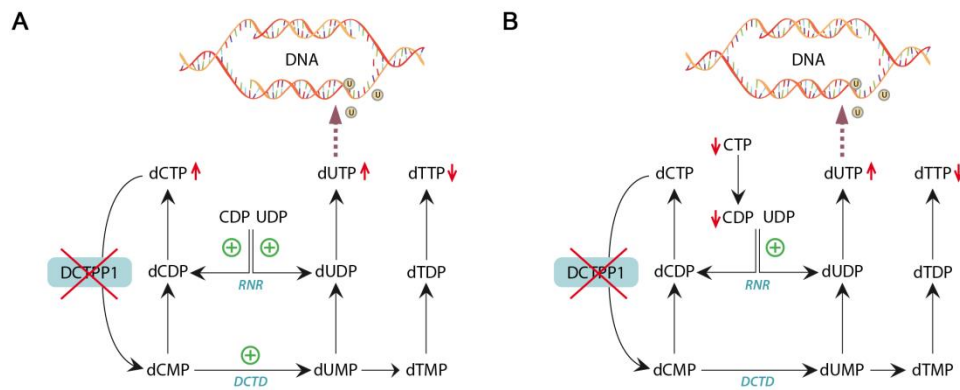
Numerosos estudios han logrado establecer una asociación entre distintos tipos de desequilibrios en el *pool* de dNTPs y procesos de estrés generados durante la replicación que conducen a inestabilidad genómica. La forma más evidente de inducir tales alteraciones en la composición de nucleótidos intracelulares es mediante la inactivación de genes implicados en su síntesis o catabolismo. Por ejemplo, mutaciones en la dCMP desaminasa en levadura tienen como consecuencia un fenotipo similar al que observamos en las células MCF-7 tras el silenciamiento de DCTPP1, caracterizado por un incremento de hasta 30 veces de los niveles de dCTP y un descenso de 4 veces en el *pool* de dTTP, la activación de *checkpoints* por daños en el DNA, la replicación incorrecta del DNA y defectos en el crecimiento celular (Sanchez *et al.*, 2012). Concretamente, el mutante *dcd1Δ* presenta una activación de Chk1 junto con *foci* de RPA y Rad52, lo que sugiere la presencia de daños en el DNA. En otro estudio llevado a cabo por Eriksson y colaboradores se observó que células de ratón S49 deficientes en DCTD también presentaban un *pool* aumentado de dCTP y un *pool* de dTTP disminuido. Además, el tiempo de duplicación de las células deficientes era casi el doble que el de células control, y mostraban un fenotipo hipermutador que era revertido mediante suplementación con timidina (Eriksson *et al.*, 1984).

Otro proceso implicado en el control del *pool* de dCTP es la desaminación de citidina. La disminución de la actividad CDA causa un aumento del *pool* de dCTP que se ha asociado con la etiología del síndrome de Bloom, una enfermedad genética rara ocasionada por mutaciones en la helicasa BLM y caracterizada por defectos en la replicación del DNA, el incremento de la frecuencia de recombinación de cromátidas hermanas, un aumento de puentes de cromatina y una fuerte predisposición al cáncer (Chabosseau *et al.*, 2011). La pérdida de actividad de CDA conduce a la formación de puentes de anafase ultrafinos entre

cromátidas hermanas durante mitosis como resultado de una replicación incompleta del DNA, un defecto similar al que observamos en células MCF-7 deficientes para DCTPP1. La suplementación con desoxiuridina, producto de reacción de CDA, restituye la velocidad de la horquilla de replicación y reduce el intercambio de cromátidas hermanas (Gemble *et al.*, 2015; Gemble *et al.*, 2016).

Además de la inestabilidad genética asociada a desequilibrios continuados en la concentración intracelular de nucleótidos, la presencia de dNTPs dañados o modificados es otro factor de gran potencial genotóxico. Una vez incorporados durante la replicación o reparación del DNA, estos nucleótidos modificados pueden inducir mutaciones e interferir con distintos procesos biológicos esenciales como la replicación o la transcripción entre otros y provocar la muerte celular. Uno de los nucleótidos no canónicos más comunes que podemos hallar en el pool intracelular es el dUTP, que se produce de forma inevitable durante la síntesis de pirimidinas tras la reducción de UDP y la fosforilación de dUDP o bien por desaminación espontánea de dCTP (Vertessy & Toth, 2009). La presencia de dUTP en el pool de nucleótidos puede provocar su incorporación errónea en el DNA ya que la mayoría de las DNA polimerasas no son capaces de distinguir entre timina y uracilo y la incorporación de uno u otro depende de los niveles relativos de dUTP y dTTP (Blount *et al.*, 1997). En los dos modelos empleados en este trabajo se produce un aumento del ratio dUTP/dTTP en ausencia de DCTPP1. Este aumento se debe no sólo a la reducción de la síntesis de dTTP sino también a un incremento de los niveles de dUTP el cual podría provenir de un aumento de la actividad RNR sobre UDP, especialmente en un contexto donde los niveles de dTTP, que actúa como inhibidor alostérico de dicha enzima, se hallan reducidos. Por otro lado, las células MCF-7 deficientes en DCTPP1 presentan un pool expandido de dCTP que como activador alostérico de la DCTD podría promover el aumento de los niveles intracelulares de dUMP, parte del cual sería fosforilado hasta dUTP antes de ser convertido en timidilato. Por último, no podemos descartar tampoco una

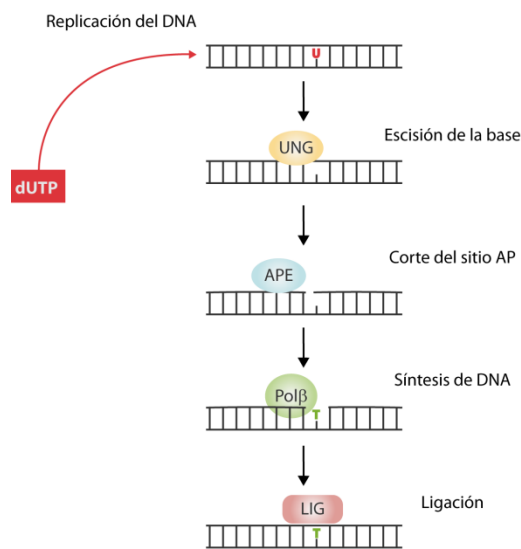
expansión del *pool* de dUMP debido a una mayor fosforilación de dUrd por actividades timidina quinasa con el fin de compensar el déficit en dTTP.



**Figura E.4. La alteración del *pool* de dNTPs en ausencia de DCTPP1 promueve la incorporación de dUTP. A.** Cambios en el *pool* de dNTPs en el modelo de silenciamiento transitorio de DCTPP1 en células MCF-7. **B.** Estado del *pool* de nucleótidos en la línea estable *knockout* para DCTPP1.

Como consecuencia del incremento del ratio dUTP/dTTP se produce un aumento de la incorporación de uracilo en el DNA de células deficientes en DCTPP1. La principal ruta implicada en la reparación de uracilo es la ruta de reparación por escisión de bases (BER). Este proceso se inicia por la actuación de la uracil-DNA glicosilasa, una enzima que reconoce y elimina la base uracilo dejando un sitio abásico (Lindahl *et al.*, 1977). Posteriormente el sitio abásico es procesado por medio de una AP endonucleasa que genera un extremo 5'-desoxirribosa fosfato y otro 3'-OH. La intervención de una DNA polimerasa y DNA ligasa completan el proceso de reparación. La incorporación errónea de uracilo provoca inestabilidad cromosómica y tiene efectos perjudiciales en procariotas y eucariotas (Ahmad *et al.*, 1998). Además, la eliminación de uracilo es potencialmente mutagénica de forma indirecta ya que el dAMP y el dCMP tienden a incorporarse de forma preferencial en los sitios abásicos que genera la uracil-DNA glicosilasa durante BER (Kunkel *et al.*, 1983; Guillet *et al.*, 2006). En células donde se mantiene un ratio dUTP/dTTP elevado de forma continuada, el dUTP se incorpora también durante el proceso de reparación lo cual lleva a ciclos fútiles de escisión y síntesis que terminan por

causar la fragmentación del DNA debido al colapso de la horquilla de replicación (Kouzminova & Kuzminov, 2008). Este fenómeno es dependiente de BER y de hecho, la inactivación de la actividad uracil glicosilasa alivia el fenotipo de mutantes de dUTPasa que presentan acumulación de dUTP tal y como se ha demostrado en diferentes organismos modelo. En *E.coli*, la mutación *ung-1* atenúa el defecto en crecimiento y reduce la muerte celular de la cepa termosensible *dut-1* (Warner *et al.*, 1981). Por otra parte, la inactivación del gen *ung1* en el mutante *dut1-1* de *S. cerevisiae* revierte el incremento en la tasa de mutación y el defecto en proliferación asociado a una baja actividad dUTPasa (Guillet *et al.*, 2006). De la misma manera la depleción de dUTPasa en *C. elegans* que produce letalidad embrionaria es compensada por la inhibición de la expresión del gen *ung-1* (Dengg *et al.*, 2006). En consonancia con estas observaciones, también en este caso la inactivación en células humanas de la ruta BER mediante el silenciamiento de UNG también atenuó los defectos en crecimiento y el aumento de fosforilación de la histona H2AX asociados a la deficiencia en DCTPP1.



**Figura E.5. Reparación de uracilo por la ruta de escisión de bases (BER).** UNG: uracil DNA glicosilasa; APE: AP-endonucleasa; Polβ; DNA polimerasa; LIG; DNA ligasa.

Es relevante señalar que la incorporación indiscriminada de uracilo en el DNA como la que observamos en los dos modelos de depleción de DCTPP1 empleados en este estudio

(Figura E.4) se ha relacionado con procesos de inestabilidad genética que podrían jugar un papel causal o funcional en la biología tumoral tales como la acumulación de roturas de cadena doble (DSBs) en sitios frágiles con secuencias ricas en A-T. En concreto, este fenómeno se ha descrito tras promover la sobreactivación de la actividad ribonucleótido reductasa en combinación con una reducción de actividad dUTPasa, factores que se correlacionan con pronósticos negativos en pacientes con cáncer colorrectal y de mama (C. W. Chen *et al.*, 2016). En el modelo celular MCF-10a experimental, el aumento de actividad RNR conllevó un incremento en los niveles de dUDP que en ausencia de niveles normales de dUTPasa se deriva principalmente hacia la producción de dUTP en lugar de dTTP. Además de la acumulación de uracilo en el genoma y de roturas en sitios frágiles de los genes FRA3B y FRA16D, estas células mostraron alteraciones en la progresión de la horquilla de replicación y un incremento de la presencia de puentes de anafase. La sobreexpresión de dUTPasa por el contrario revirtió el estrés generado por una actividad RNR exacerbada mediante el control del *pool* de dUTP (Hu *et al.*, 2012; C. W. Chen *et al.*, 2016).

Es de interés mencionar que aunque considerado tradicionalmente como una fuente mayoritaria de inestabilidad genética, evidencia reciente sugiere que la incorporación de uracilo es también una modificación específica en el DNA que puede estar implicado en la regulación de la expresión génica y que las células pueden controlar los niveles de acumulación de uracilo en el DNA nuclear. Las estrategias usadas para modular el contenido de uracilo incluyen la modificación del *pool* de dUTP por la dUTPasa u otras enzimas del metabolismo de pirimidinas y/o la regulación de BER y de la actividad uracil DNA glicosilasa. Tecnologías que permiten la secuenciación de uracilo han demostrado que efectivamente no ocurre estocásticamente en todo el genoma, sino que exhibe patrones concretos de distribución (Shu *et al.*, 2018; Owiti *et al.*, 2019). Así en el caso de células humanas, las regiones centroméricas muestra un enriquecimiento en desoxiuridina (Shu *et al.*, 2018) mientras que en levadura, niveles altos de uracilo están

asociados a una elevada tasa de transcripción (Owiti *et al.*, 2018). El posible papel de DCTPP1 en este la incorporación controlada de uracilo en el genoma está por determinar.

En nuestro caso, la adición de timidina exógena a los medios de cultivo empleados en ambos modelos experimentales también produce una reversión de los fenotipos relacionados con daño en DNA y pérdida de capacidad proliferativa. La suplementación con timidina permite la expansión del *pool* de dTTP y disminuye el ratio dUTP/dTTP en ausencia de DCTPP1. Se ha visto que la suplementación con nucleósidos reduce el estrés durante la replicación y la inestabilidad genómica (Bester *et al.*, 2011). Concretamente en el caso del dTTP, este nucleótido es un factor esencial para la reparación de DNA. Por ejemplo, la suplementación con dThd reduce la fosforilación de la histona H2AX en células expuestas a irradiación ultravioleta (UV) lo que sugiere que el dTTP resulta limitante para la etapa de síntesis de DNA durante la reparación de lesiones inducidas por luz UV (M. H. Lee *et al.*, 2014). El salvamento de dThd es esencial para la recuperación celular frente a otros tipos de daño. Así, TK1 resulta esencial para la síntesis de dTTP en respuesta a agentes genotóxicos como la doxorrubicina. Las células expuestas a este compuesto presentan una mayor expresión de TK1 en el núcleo lo que se postula que contribuye a la expansión del *pool* de dTTP necesario para la reparación de DSBs (Y. L. Chen *et al.*, 2010). El tratamiento con doxorrubicina no produce el aumento de ninguno de los otros nucleótidos lo cual apoya la importancia del dTTP en los procesos de reparación de DNA. Teniendo en cuenta estos estudios, aumentar el *pool* de dTTP no solo jugaría un papel crucial en restaurar un ratio dUTP/dTTP adecuado sino que también sería importante para la reparación de daños causados por la incorporación de dUTP en células deficientes en DCTPP1.

Por último es relevante señalar que si bien DCTPP1 resulta esencial para la proliferación celular en la mayoría de los tipos celulares estudiados, las células HAP1 *knockout* no presentan defectos significativos en el crecimiento ni en la progresión del

ciclo celular, incluso en presencia de altos niveles de daño en el DNA. A este respecto es necesario señalar que la línea KBM-7 (obtenida de un paciente con leucemia mieloide crónica (CML) (Agarwal *et al.*, 1998) de la cual derivan las líneas haploides, presenta una versión mutante de p53, con una mutación de cambio de sentido que convierte la serina 215 en una glicina (Sen *et al.*, 1995). Esta forma de p53 retiene su capacidad de unión a DNA pero no se fosforila de forma correcta tras la exposición de la células a distintos tipos de agentes genotóxicos. Además, la resistencia de las células KBM-7 a apoptosis tras irradiación gamma o tratamiento con araC se ha asociado con un defecto en la activación de Bax y expresión de Fas/APO-1 por esta versión mutante de p53 (Kobayashi *et al.*, 1998). De esta manera, las células HAP-1 son capaces de proliferar en un contexto de alta inestabilidad genómica al presentar una función *checkpoint* deficiente.

### **E.3. DCTPP1 Y CÁNCER**

120

Las células pre-cancerosas se caracterizan por una elevada tasa de mutagénesis, la estimulación de procesos de recombinación génica y la presencia de aberraciones cromosómicas. Estos marcadores de inestabilidad genética también se inducen cuando se producen desequilibrios del pool de dNTPs y estrés replicacional (Rampazzo *et al.*, 2010). Los resultados de este trabajo indican que DCTPP1, a través de su impacto en la composición del pool de nucleótidos pirimidínicos tiene un papel en la prevención de fenómenos de inestabilidad genómica y por tanto podría ser un factor a tener en cuenta en procesos como el cáncer o el envejecimiento. En este sentido es significativo que DCTPP1 se encuentre sobreexpresado en numerosos tipos de tumores incluyendo el de pulmón, el de mama o el gástrico (Y. Zhang *et al.*, 2013; Morisaki *et al.*, 2014). Además, DCTPP1 se ha relacionado con metástasis y la duplicación de células madre cancerosas y se ha identificado como un marcador de pronóstico desfavorable para la supervivencia. También se ha relacionado DCTPP1 con la progresión tumoral asociada a autofagia (Lu *et*



*al.*, 2018). La autofagia es un mecanismo de protección para la célula, sin embargo, en células cancerosas permite la eliminación de sustancias perjudiciales para el desarrollo del tumor lo cual está asociado a resistencia a las terapias antitumorales. Se ha descrito que la sobreexpresión de DCTPP1 promueve la invasión celular, la migración y la proliferación de células de cáncer de próstata e inhibe la apoptosis por activación de autofagia mediada por LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*).

Cabe destacar dos estudios que relacionan los niveles de expresión de DCTPP1 con la actividad del oncogén Myc. Por un lado, se ha observado que la transformación de células de hígado de cerdo mediante la sobreexpresión de Myc induce, entre otros, la expresión del mRNA de DCTPP1 (Aravalli *et al.*, 2015). Además, Bouvard y colaboradores, usando un modelo de células de cáncer renal, observaron que al inhibir la transcripción de Myc mediante estauprimida durante 24 horas los niveles de mRNA de DCTPP1 disminuían también de forma significativa (Bouvard *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha relacionado DCTPP1 con la vía de señalización Wnt canónica (Friese *et al.*, 2019). La vía de señalización de Wnt es una ruta fundamental para el control del crecimiento y una hiperactivación de la misma se ha relacionado con procesos de carcinogénesis (Nusse & Clevers, 2017; Cheng *et al.*, 2019). En ensayos de inmunoprecipitación y *pull-down*, DCTPP1 interacciona con la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa 7 (USP7) que es dependiente de la señalización Wnt y dicha interacción se ve debilitada en presencia de inhibidores de DCTPP1. Este estudio pone de manifiesto por primera vez la interacción de DCTPP1 y USP7 y abre la posibilidad a que los inhibidores de DCTPP1 puedan actuar de inhibidores de la ruta de señalización Wnt.

La modulación del catabolismo de nucleótidos proporciona una oportunidad para regular la homeostasis de nucleótidos en condiciones fisiopatológicas tales como cáncer e inflamación, lo que puede resultar de gran interés desde un punto de vista terapéutico para el desarrollo de nuevas terapias. Concretamente se ha descrito que la inhibición de

MTH1, implicada en la eliminación de nucleótidos no canónicos como el 8-oxo-dGTP, resulta eficaz como estrategia antitumoral. La inhibición de MTH1 causa un aumento en la incorporación de dNTPs oxidados en células cancerosas, originando daño en el DNA y muerte celular en xenotransplantes de tumores humanos en ratón (Gad *et al.*, 2014). Un mecanismo similar se podría extrapolar a DCTPP1. DCTPP1 hidroliza de forma eficiente el fármaco antitumoral decitabina (5-aza-desoxicidina), evitando su incorporación al DNA e impidiendo de esta forma la desmetilación del DNA inducida por la 5-aza-citosina (Requena *et al.*, 2016). También se han descrito una serie de inhibidores de la actividad de DCTPP1, que usados en combinación con análogos de citidina potencian el efecto citotóxico de estos últimos en células HL60 de leucemia (Llona-Minguez *et al.*, 2016). Además, se ha visto que un ratio dUTP/dTTP elevado supone un factor crítico en la citotoxicidad inducida por quimioterapéuticos dirigidos contra la timidilato sintasa (TS) (Wilson *et al.*, 2008). Efectivamente, las células deficientes en DCTPP1 cuyo ratio dUTP/dTTP es anormalmente alto, presentan una mayor sensibilidad a 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd) que es un inhibidor altamente específico de la TS. Estas observaciones en su conjunto abren la posibilidad del uso de DCTPP1 como blanco farmacológico con el fin de potenciar y mejorar los tratamientos antitumorales basados en análogos de nucleósidos como la decitabina o la 5-FdUrd.

#### **E.4. DCTPP1 Y MITOCONDRIA**

Puesto que existe un flujo de dNTPs entre el *pool* de nucleótidos citosólico y el mitocondrial, un desequilibrio en el primero puede afectar a la replicación y la integridad del DNA mitocondrial (mtDNA) (Mathews & Song, 2007). De hecho, defectos en enzimas citosólicas implicadas en metabolismo de nucleótidos pueden tener un impacto en la integridad del DNA mitocondrial. Tal es el caso de la timidina fosforilasa (TP) o de la subunidad p53R2 de la ribonucleótido reductasa, cuya pérdida de función se ha asociado

con el desarrollo de distintos síndromes de depleción mitocondrial (Bourdon *et al.*, 2007). Nuestros resultados muestran que células deficientes en DCTPP1 con alteraciones importantes del *pool* citosólico de dNTPs presentan también una mayor frecuencia de mutación en el DNA mitocondrial. Por otro lado, la presencia de DCTPP1 en este orgánulo sugiere que puede estar ejerciendo un papel *in situ* en la homeostasis del *pool* mitocondrial de dCTP y dTTP. En cualquier caso, la función mitocondrial de DCTPP1 podría tener especial relevancia en células post-mitóticas donde las rutas de síntesis *de novo* y salvamento citosólicas están inactivas y la síntesis de nucleótidos depende principalmente del salvamento mitocondrial de nucleósidos.

En el presente trabajo hemos desarrollado un modelo de quiescencia para una línea de fibroblastos de pulmón denominada CCD-34Lu que nos permitirá estudiar el papel de DCTPP1 en mitocondria en condiciones no proliferativas. En dicho modelo, las células confluentes se mantienen 15 días en medio con concentración mínima de suero, desapareciendo casi por completo las células en fase S. Estas células llevadas a quiescencia presentan una reducción casi completa en las rutas citosólicas de síntesis *de novo* y el salvamento de nucleósidos. TK1 y la subunidad 2 (R2) de la ribonucleótido reductasa son degradadas durante la mitosis por acción del complejo promotor de la anafase (APC/C) (Sherley & Kelly, 1988) (Nordlund & Reichard, 2006] mientras que la expresión de dCK también disminuye drásticamente en células quiescentes tal y como observamos en nuestro modelo experimental. Mientras que R2 es degradada durante la fase tardía de la mitosis, la subunidad p53R2 carece del motivo KEN necesario para la unión de Cdh1 y por lo tanto no es degradada, sino que se expresa de forma constitutiva a lo largo del ciclo celular (Chabes, 2003 #60). De hecho la expresión de p53R2 se mantiene constante en las células CCD-34Lu tras la reducción del suero en el medio de cultivo. Otra enzima cuya expresión se ve afectada por la inducción de quiescencia es la dUTPasa. En células replicativas, la isoforma nuclear de menor tamaño predomina sobre la isoforma mayor que contiene la señal de localización mitocondrial (Ladner & Caradonna, 1997), mientras

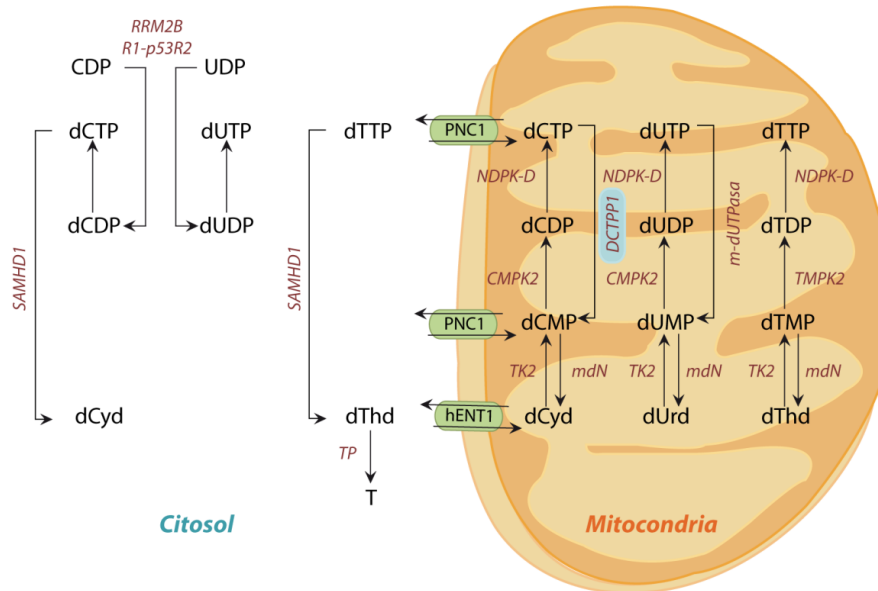
que en células quiescentes la isoforma nuclear prácticamente desaparece y la mitocondrial aumenta su expresión. Si bien la enzima mitocondrial TK2 se expresa de forma constitutiva a lo largo del ciclo celular (Priego *et al.*, 2012), los niveles de proteína disminuyen en nuestro modelo de células no proliferativas, confirmando las observaciones de Lee y colaboradores al evaluar los niveles de mRNA de esta timidina quinasa en un modelo similar de quiescencia, la línea de fibroblastos de pulmón IMR-90 (M. H. Lee *et al.*, 2014).

#### **E.4.1. Reflexiones sobre el papel de DCTPP1 en condiciones no proliferativas**

Las observaciones anteriores prueban la validez de nuestro modelo de quiescencia, el cual reproduce de manera fiel las condiciones metabólicas que se pueden hallar en células post-mitóticas de tejidos ya diferenciados. En tal escenario, se produce una disminución general de los niveles de expresión de DCTPP1, desapareciendo prácticamente por completo del núcleo y citosol y quedando su localización restringida a la mitocondria, donde los niveles de proteína apenas se ven afectados. De igual forma que ocurre con TK1, dCK o R2, la disminución de la expresión de DCTPP1 en células quiescentes pone de manifiesto su importante contribución al metabolismo de nucleótidos en condiciones replicativas. Al mismo tiempo, su presencia constante en mitocondria indica que también realiza una función mitocondrial relevante en ausencia de proliferación celular.

En células quiescentes hay un aumento de la expresión de SAMHD1 (Franzolin *et al.*, 2013) por lo que cabe esperar que este contexto celular el mantenimiento de la homeostasis de dCTP sea más dependiente de la actividad trifosfohidrolasa de SAMHD1 que de DCTPP1. Por el contrario, en células proliferativas donde SAMHD1 tiene una menor expresión, sería DCTPP1 la principal actividad encargada de controlar los niveles de este nucleótido. En cuanto al papel descrito en la síntesis *de novo* de dTTP, hay que señalar que las enzimas citosólicas que catalizarían la transformación desde dCMP hasta dTTP

tampoco se expresan en células no replicativas (Kamath *et al.*, 2015) por lo que podemos concluir que en células quiescentes DCTPP1 no tiene probablemente una función en el mantenimiento de los pools citosólicos de dCTP y dTTP.



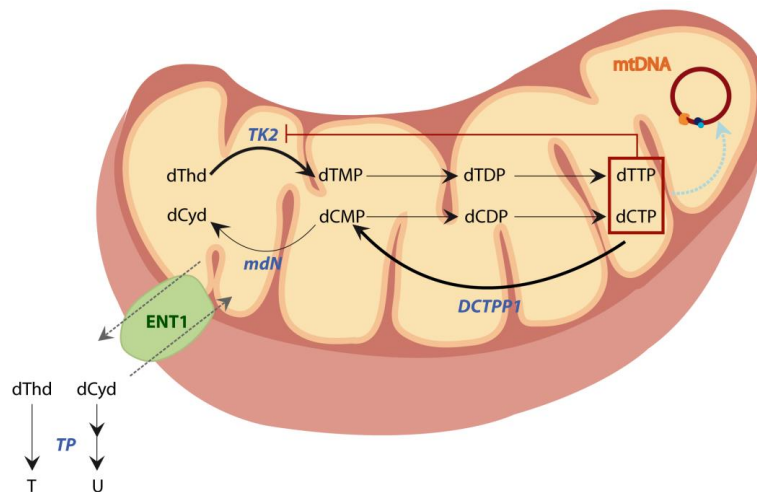
**Figura E.6. Papel de DCTPP1 en la homeostasis de dCTP en células quiescentes.** RRM2B: Ribonucleótido reductasa formada por las subunidades R1 y p53R2; SAMHD1: trifosfohidrolasa con dominios SAM y HD; TP: timidina fosforilasa; NDPK-D: nucleósido difosfato quinasa D; CMPK2: UMP/CMP quinasa 2; TMPK2: timidilato quinasa 2; TK2: timidina quinasa 2; mdN: 5'(3')-desoxinucleotidasa mitocondrial; m-dUTPasa: dUTPasa mitocondrial.

Un estricto control del *pool* de dCTP en mitocondria es vital para el mantenimiento de la integridad del DNA mitocondrial en células no proliferativas. El dCTP necesario para la síntesis y reparación del DNA mitocondrial puede provenir de dos fuentes: por un lado puede ser generado vía reducción de CDP en el citosol por R1-p53R2 para después ser transportado a la mitocondria como dCTP o bien como dCDP. Por otro lado, puede ser sintetizado directamente en la mitocondria mediante la fosforilación de desoxicitidina vía TK2. En cuanto a la regulación de los niveles de dCTP intramitocondriales, esta función reside fundamentalmente en DCTPP1 ya que SAMHD1 no se localiza en la mitocondria (Rice *et al.*, 2009). Hasta la fecha no existen evidencias de la presencia de DCTD o TS en

mitocondria (Kamath *et al.*, 2015) por lo que no se puede concluir que el dCMP generado por DCTPP1 contribuya a la síntesis de dTTP en este orgánulo.

#### **E.4.2. Implicaciones terapéuticas de DCTPP1 en MDSs**

Los síndromes de depleción mitocondrial (MDS) son un conjunto de enfermedades genéticas que se caracterizan por una reducción en la cantidad de DNA mitocondrial (Wang, 2010). Mutaciones en TK2, dGK y p53R2 afectan gravemente el aporte de nucleótidos en células diferenciadas dando lugar a distintos tipos de MDS (Mathews & Song, 2007). Como se ha mencionado previamente a lo largo de este trabajo, una de estas enfermedades es la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial o MNGIE. Esta enfermedad se caracteriza por defectos en la actividad timidina fosforilasa (TP), encargada de hidrolizar la timidina y la desoxiuridina a timina y uracilo respectivamente. Los pacientes de MNGIE presentan un *pool* de dTTP aumentado, que en un principio se pensó era la causa de la reducción del número de copias del DNA mitocondrial. Estudios de replicación *in organello* han ayudado a dilucidar el verdadero mecanismo responsable de la reducción del mtDNA en MNGIE. Los resultados obtenidos en dicho modelo experimental mostraron que mientras niveles elevados de dATP, dGTP o dCTP no reducían la tasa de replicación del DNA mitocondrial, un exceso de dTTP sí tenía un efecto perjudicial en la síntesis del mtDNA. No obstante, este efecto no es consecuencia directa del incremento en dTTP sino que está provocado por una disminución secundaria del dCTP (Gonzalez-Vioque *et al.*, 2011). Esta reducción del *pool* de dCTP es debida a la inhibición de la fosforilación de dCyd por TK2 en presencia de los altos niveles de dTTP resultantes de la deficiencia en TP. Por tanto, debemos considerar las deficiencias de dNTPs como causa y origen de los síndromes de depleción del mtDNA causados por desequilibrios en actividades anabólicas y catabólicas.



**Figura E.7. Papel de DCTPP1 en la homeostasis mitocondrial de dCTP y dTTP.** TP: timidina fosforilasa; mdN: 5' nucleotidasa mitocondrial; TK2: timidina quinasa 2; mtDNA: DNA mitocondrial.

Los tratamientos de MNGIE se han centrado en reducir la concentración en plasma de dThd y dUrd, pero mostraban baja eficacia y la mayoría de las veces la reducción resultaba temporal y subóptima (Torres-Torronteras *et al.*, 2016). Otras aproximaciones como el reemplazo de la enzima mediante administración de eritrocitos con TP o el transporte alogénico de células madre hematopoyéticas mostraron mejoras en la salud de los pacientes, aunque los efectos secundarios eran importantes, llegando a causar una alta mortalidad en el segundo caso (Halter *et al.*, 2015). En estudios preclínicos más recientes se ha utilizado la terapia génica como tratamiento de MNGIE, concretamente se ha empleado un vector lentiviral para expresar TP en células madre hematopoyéticas. La expresión de la TP funcional restaura la homeostasis de nucleósidos en el modelo animal durante toda la vida del ratón. DCTPP1 puede ser un agente clave a tener en cuenta en el desarrollo de nuevas terapias para MNGIE. La inhibición de la actividad de DCTPP1 en células deficientes en TP podría contrarrestar la disminución del *pool* de dCTP y restaurar el ratio dCTP/dTTP adecuado, ayudando a la replicación del DNA mitocondrial y al mantenimiento de la integridad genética en este organelo.

La presencia exclusiva de DCTPP1 en mitocondria en células quiescentes abre una nueva vía de estudio del papel de DCTPP1 en la homeostasis mitocondrial de nucleótidos y en la integridad del DNA mitocondrial. Actualmente existen inhibidores específicos de la actividad de DCTPP1 que podrían ser de utilidad para estudiar la función mitocondrial así como la posible implicación de DCTPP1 en síndromes de depleción mitocondrial tales como MNGIE (Llona-Minguez *et al.*, 2017a). Asimismo, aunque en el modelo de replicación *in organello* una expansión del *pool* de dCTP no afecta a la replicación mitocondrial (Gonzalez-Vioque *et al.*, 2011), será de interés determinar el papel que tendría *per se* la actividad DCTPP1 en modular la concentración mitocondrial de dCTP y dTTP y el impacto resultante sobre la actividad TK2 .



## CONCLUSIONES

---



## F. CONCLUSIONES

1. El silenciamiento de la expresión de DCTPP1 en células MCF-7 inhibe la proliferación celular. En cambio, células HAP1 *knockout* deficientes en DCTPP1 presentan una capacidad proliferativa semejante al de células parentales. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de diferencias fenotípicas fundamentales no solo entre distintas líneas celulares sino también entre distintas estrategias experimentales seguramente como resultado de un proceso adaptativo y que son inherentes al tipo celular estudiado.
2. La ausencia de DCTPP1 causa alteraciones significativas en el pool intracelular de nucleótidos. El aumento de la concentración de dCTP en células MCF-7 se suma a evidencias experimentales previas obtenidas en distintos tipos celulares que apoyan el papel de DCTPP1 como regulador de los niveles celulares de este nucleótido. Por el contrario, los niveles de dCTP permanecen constantes en células HAP1 debido probablemente a mecanismos de adaptación metabólica adquiridos durante el proceso de selección clonal.
3. El análisis de la concentración intracelular de nucleótidos nos permite concluir que DCTPP1 tiene también un papel prominente en la síntesis *de novo* de dTTP. La ruta de síntesis propuesta parte del dCMP generado como producto de la reacción que puede ser secuencialmente convertido a dTMP por la dCMP desaminasa y la timidilato sintasa.
4. Además de su impacto en los niveles de dCTP y dTTP, la supresión de la actividad de DCTPP1 conlleva el aumento de dUTP lo que contribuye al aumento del ratio dUTP/dTTP y por tanto de la tasa de incorporación de uracilo en el DNA genómico.

5. Las células deficientes en DCTPP1 presentan marcadores indicativos de inestabilidad genética: acumulación de uracilo en DNA genómico, activación de la respuesta a daños en el DNA mediante fosforilación de la histona H2AX y de las quinasas Chk1 y Chk2, y formación de puentes de cromatina.
6. Una deficiencia en DCTPP1 confiere una mayor sensibilidad a inhibidores de la timidilato sintasa (TS) como la 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd) que promueve desequilibrios en el ratio dUTP/dTTP.
7. La disminución del ratio dUTP/dTTP mediante la expansión del *pool* de dTTP por adición exógena de timidina o bien mediante la reducción del *pool* de dUTP tras la sobreexpresión de dUTPasa, reduce la fosforilación de la histona H2AX en células deficientes en DCTPP1 lo que sugiere una menor acumulación de DSBs. La suplementación con timidina también revierte el fenotipo de pérdida de proliferación observado en células MCF-7 tras el silenciamiento de DCTPP1.
8. La generación de sitios abásicos a partir de la escisión de uracilo por la uracil-DNA glicosilasa es un paso requerido para la formación de DSBs en células deficientes en DCTPP1. La reducción de la formación de foci  $\gamma$ H2AX tras el silenciamiento de UNG y la recuperación del crecimiento de células MCF-7 deficientes en DCTPP1 apoya esta idea destacando la relevancia de una reparación eficiente de sitios AP a través de la ruta BER para la prevención de daños genotóxicos posteriores.
9. El genoma nuclear y el genoma mitocondrial de células HAP-1 deficientes en DCTPP1 muestran una mayor frecuencia de mutación espontánea apoyando el papel de la enzima en el mantenimiento de la integridad genética.

10. En células HAP1, DCTPP1 es esencial para la proliferación celular en ausencia de al menos una de las enzimas que inician la recuperación de desoxicitidina y de timidina, dCK y TK1 respectivamente. Las células deficientes en DCTPP1 y TK1 presentan niveles intracelulares extremadamente bajos de dTTP lo que indica que ambas enzimas contribuyen significativamente a la síntesis de este nucleótido.
  
11. Mientras que en células proliferativas DCTPP1 se detecta en el núcleo, el citosol y la mitocondria, en células en quiescencia se localiza exclusivamente en la mitocondria, lo que sugiere un papel crucial para esta enzima en la homeostasis de dNTPs en este orgánulo específicamente en condiciones no replicativas, cuando la síntesis *de novo* de dNTPs y la recuperación de nucleósidos citosólicas es mínima.



## REFERENCIAS

---





## G. REFERENCIAS

- Agarwal, ML, Taylor, WR, Chernov, MV, Chernova, OB, & Stark, GR. (1998). The p53 network. *J Biol Chem*, 273(1), 1-4.
- Ahmad, SI, Kirk, SH, & Eisenstark, A. (1998). Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol*, 52, 591-625.
- Anderson, DD, Woeller, CF, Chiang, EP, Shane, B, & Stover, PJ. (2012). Serine hydroxymethyltransferase anchors de novo thymidylate synthesis pathway to nuclear lamina for DNA synthesis. *J Biol Chem*, 287(10), 7051-7062.
- Aravalli, RN, Talbot, NC, & Steer, CJ. (2015). Gene expression profiling of MYC-driven tumor signatures in porcine liver stem cells by transcriptome sequencing. *World J Gastroenterol*, 21(7), 2011-2029.
- Arner, ES, & Eriksson, S. (1995). Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther*, 67(2), 155-186.
- Aye, Y, Li, M, Long, MJ, & Weiss, RS. (2015). Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies. *Oncogene*, 34(16), 2011-2021.
- Ayusawa, D, Shimizu, K, Koyama, H, Kaneda, S, Takeishi, K, & Seno, T. (1986). Cell-cycle-directed regulation of thymidylate synthase messenger RNA in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate. *J Mol Biol*, 190(4), 559-567.
- Balestri, F, Barsotti, C, Lutzemberger, L, Camici, M, & Ipata, PL. (2007). Key role of uridine kinase and uridine phosphorylase in the homeostatic regulation of purine and pyrimidine salvage in brain. *Neurochem Int*, 51(8), 517-523.
- Bebenek, K, Roberts, JD, & Kunkel, TA. (1992). The effects of dNTP pool imbalances on frameshift fidelity during DNA replication. *J Biol Chem*, 267(6), 3589-3596.

- Becroft, DM, Phillips, LI, & Simmonds, A. (1969). Hereditary orotic aciduria: long-term therapy with uridine and a trial of uracil. *J Pediatr*, 75(5), 885-891.
- Bernier-Villamor, V, Camacho, A, Hidalgo-Zarco, F, Perez, J, Ruiz-Perez, LM, & Gonzalez-Pacanowska, D. (2002). Characterization of deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett*, 526(1-3), 147-150.
- Bester, AC, Roniger, M, Oren, YS, Im, MM, Sarni, D, Chaoat, M, Bensimon, A, Zamir, G, Shewach, DS, & Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell*, 145(3), 435-446.
- Beyaert, M, Starczewska, E, Van Den Neste, E, & Bontemps, F. (2016). A crucial role for ATR in the regulation of deoxycytidine kinase activity. *Biochem Pharmacol*, 100, 40-50.
- Bianchi, V, Pontis, E, & Reichard, P. (1987). Regulation of pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism by substrate cycles in dCMP deaminase-deficient V79 hamster cells. *Mol Cell Biol*, 7(12), 4218-4224.
- Bianchi, V, & Sychala, J. (2003). Mammalian 5'-nucleotidases. *J Biol Chem*, 278(47), 46195-46198.
- Blount, BC, Mack, MM, Wehr, CM, MacGregor, JT, Hiatt, RA, Wang, G, Wickramasinghe, SN, Everson, RB, & Ames, BN. (1997). Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3290-3295.
- Bolte, S, & Cordelieres, FP. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*, 224(Pt 3), 213-232.
- Bourdon, A, Minai, L, Serre, V, Jais, JP, Sarzi, E, Aubert, S, Chretien, D, de Lonlay, P, Paquis-Flucklinger, V, Arakawa, H, Nakamura, Y, Munnich, A, & Rotig, A. (2007). Mutation

of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*, 39(6), 776-780.

Bouvard, C, Lim, SM, Ludka, J, Yazdani, N, Woods, AK, Chatterjee, AK, Schultz, PG, & Zhu, S. (2017). Small molecule selectively suppresses MYC transcription in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(13), 3497-3502.

Buj, R, & Aird, KM. (2018). Deoxyribonucleotide Triphosphate Metabolism in Cancer and Metabolic Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 177.

Bullock, WOF, J.M.; Short, J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA E. coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, 5, 376-378.

Camacho, A, Arrebola, R, Pena-Diaz, J, Ruiz-Perez, LM, & Gonzalez-Pacanowska, D. (1997). Description of a novel eukaryotic deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase in *Leishmania major*. *Biochem J*, 325 ( Pt 2), 441-447.

139

---

Castillo-Acosta, VM, Estevez, AM, Vidal, AE, Ruiz-Perez, LM, & Gonzalez-Pacanowska, D. (2008). Depletion of dimeric all-alpha dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in *Trypanosoma brucei*. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(12), 2901-2913.

Cohen, SS, & Barner, HD. (1954). Studies on Unbalanced Growth in *Escherichia Coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40(10), 885-893.

Chabes, AL, Pflieger, CM, Kirschner, MW, & Thelander, L. (2003). Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3925-3929.

Chabosseau, P, Buhagiar-Labarchede, G, Onclercq-Delic, R, Lambert, S, Debatisse, M, Brison, O, & Amor-Gueret, M. (2011). Pyrimidine pool imbalance induced by BLM

helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun*, 2, 368.

Chan, KL, Palmai-Pallag, T, Ying, S, & Hickson, ID. (2009). Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol*, 11(6), 753-760.

Chang, YF, & Carman, GM. (2008). CTP synthetase and its role in phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res*, 47(5), 333-339.

Chang, ZF, Huang, DY, & Hsue, NC. (1994). Differential phosphorylation of human thymidine kinase in proliferating and M phase-arrested human cells. *J Biol Chem*, 269(33), 21249-21254.

Chen, CW, Tsao, N, Huang, LY, Yen, Y, Liu, X, Lehman, C, Wang, YH, Tseng, MC, Chen, YJ, Ho, YC, Chen, CF, & Chang, ZF. (2016). The Impact of dUTPase on Ribonucleotide Reductase-Induced Genome Instability in Cancer Cells. *Cell Rep*, 16(5), 1287-1299.

140

Chen, YL, Eriksson, S, & Chang, ZF. (2010). Regulation and functional contribution of thymidine kinase 1 in repair of DNA damage. *J Biol Chem*, 285(35), 27327-27335.

Chen, YL, Lin, DW, & Chang, ZF. (2008). Identification of a putative human mitochondrial thymidine monophosphate kinase associated with monocytic/macrophage terminal differentiation. *Genes Cells*, 13(7), 679-689.

Cheng, X, Xu, X, Chen, D, Zhao, F, & Wang, W. (2019). Therapeutic potential of targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*, 110, 473-481.

de Bruin, M, van Capel, T, Van der Born, K, Kruyt, FA, Fukushima, M, Hoekman, K, Pinedo, HM, & Peters, GJ. (2003). Role of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in fluoropyrimidine sensitivity. *Br J Cancer*, 88(6), 957-964.

Dengg, M, Garcia-Muse, T, Gill, SG, Ashcroft, N, Boulton, SJ, & Nilsen, H. (2006). Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates. *EMBO Rep*, 7(10), 1046-1051.

Di Noia, MA, Todisco, S, Cirigliano, A, Rinaldi, T, Agrimi, G, Iacobazzi, V, & Palmieri, F. (2014). The human SLC25A33 and SLC25A36 genes of solute carrier family 25 encode two mitochondrial pyrimidine nucleotide transporters. *J Biol Chem*, 289(48), 33137-33148.

Eriksson, S, Skog, S, Tribukait, B, & Jaderberg, K. (1984). Deoxyribonucleoside triphosphate metabolism and the mammalian cell cycle. Effects of thymidine on wild-type and dCMP deaminase-deficient mouse S49 T-lymphoma cells. *Exp Cell Res*, 155(1), 129-140.

Essletzbichler, P, Konopka, T, Santoro, F, Chen, D, Gapp, BV, Kralovics, R, Brummelkamp, TR, Nijman, SM, & Burckstummer, T. (2014). Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*, 24(12), 2059-2065.

141

---

Evans, DR, & Guy, HI. (2004). Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem*, 279(32), 33035-33038.

Fan, XY, Tang, BK, Xu, YY, Han, AX, Shi, KX, Wu, YK, Ye, Y, Wei, ML, Niu, C, Wong, KW, Zhao, GP, & Lyu, LD. (2018). Oxidation of dCTP contributes to antibiotic lethality in stationary-phase mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(9), 2210-2215.

Ferraro, P, Nicolosi, L, Bernardi, P, Reichard, P, & Bianchi, V. (2006). Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(49), 18586-18591.

Ferraro, P, Pontarin, G, Crocco, L, Fabris, S, Reichard, P, & Bianchi, V. (2005). Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: a possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J Biol Chem*, 280(26), 24472-24480.

Floyd, S, Favre, C, Lasorsa, FM, Leahy, M, Trigiante, G, Stroebel, P, Marx, A, Loughran, G, O'Callaghan, K, Marobbio, CM, Slotboom, DJ, Kunji, ER, Palmieri, F, & O'Connor, R. (2007). The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth. *Mol Biol Cell*, 18(9), 3545-3555.

Franzolin, E, Miazzi, C, Frangini, M, Palumbo, E, Rampazzo, C, & Bianchi, V. (2012). The pyrimidine nucleotide carrier PNC1 and mitochondrial trafficking of thymidine phosphates in cultured human cells. *Exp Cell Res*, 318(17), 2226-2236.

142

Franzolin, E, Pontarin, G, Rampazzo, C, Miazzi, C, Ferraro, P, Palumbo, E, Reichard, P, & Bianchi, V. (2013). The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(35), 14272-14277.

Friese, A, Kapoor, S, Schneidewind, T, Vidadala, SR, Sardana, J, Brause, A, Forster, T, Bischoff, M, Wagner, J, Janning, P, Ziegler, S, & Waldmann, H. (2019). Chemical Genetics Reveals a Role of dCTP Pyrophosphatase 1 in Wnt Signaling. *Angew Chem Int Ed Engl*.

Fujimori, K, & Ohta, D. (1998). Isolation and characterization of a histidine biosynthetic gene in Arabidopsis encoding a polypeptide with two separate domains for phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase and phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase. *Plant Physiol*, 118(1), 275-283.

Gad, H, Koolmeister, T, Jemth, AS, Eshtad, S, Jacques, SA, Strom, CE, Svensson, LM, Schultz, N, Lundback, T, Einarsdottir, BO, Saleh, A, Gokturk, C, Baranczewski, P, Svensson, R, Berntsson, RP, Gustafsson, R, Stromberg, K, Sanjiv, K, Jacques-Cordonnier, MC, Desroses, M, Gustavsson, AL, Olofsson, R, Johansson, F, Homan, EJ, Loseva, O, Brautigam, L, Johansson, L, Hoglund, A, Hagenkort, A, Pham, T, Altun, M, Gaugaz, FZ, Vikingsson, S, Evers, B, Henriksson, M, Vallin, KS, Wallner, OA, Hammarstrom, LG, Wiita, E, Almlof, I, Kalderen, C, Axelsson, H, Djureinovic, T, Puigvert, JC, Haggblad, M, Jeppsson, F, Martens, U, Lundin, C, Lundgren, B, Granelli, I, Jensen, AJ, Artursson, P, Nilsson, JA, Stenmark, P, Scobie, M, Berglund, UW, & Helleday, T. (2014). MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature*, 508(7495), 215-221.

Galperin, MY, Moroz, OV, Wilson, KS, & Murzin, AG. (2006). House cleaning, a part of good housekeeping. *Mol Microbiol*, 59(1), 5-19.

Gelbard, AS, Kim, JH, & Perez, AG. (1969). Fluctuations in deoxycytidine monophosphate deaminase activity during the cell cycle in synchronous populations of HeLa cells. *Biochim Biophys Acta*, 182(2), 564-566.

Gemble, S, Ahuja, A, Buhagiar-Labarchede, G, Onclercq-Delic, R, Dairou, J, Biard, DS, Lambert, S, Lopes, M, & Amor-Gueret, M. (2015). Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA. *PLoS Genet*, 11(7), e1005384.

Gemble, S, Buhagiar-Labarchede, G, Onclercq-Delic, R, Biard, D, Lambert, S, & Amor-Gueret, M. (2016). A balanced pyrimidine pool is required for optimal Chk1 activation to prevent ultrafine anaphase bridge formation. *J Cell Sci*, 129(16), 3167-3177.

Goldstone, DC, Ennis-Adeniran, V, Hedden, JJ, Groom, HC, Rice, GI, Christodoulou, E, Walker, PA, Kelly, G, Haire, LF, Yap, MW, de Carvalho, LP, Stoye, JP, Crow, YJ, Taylor,

IA, & Webb, M. (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature*, 480(7377), 379-382.

Goncalves, AM, de Sanctis, D, & McSweeney, SM. (2011). Structural and functional insights into DR2231 protein, the MazG-like nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem*, 286(35), 30691-30705.

Gonzalez-Vioque, E, Torres-Torronteras, J, Andreu, AL, & Marti, R. (2011). Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet*, 7(3), e1002035.

Greenberg, GR. (1966). New dUTPase and dUDPase activities after infection of *Escherichia coli* by T2 bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 56(4), 1226-1232.

Guillet, M, Van Der Kemp, PA, & Boiteux, S. (2006). dUTPase activity is critical to maintain genetic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 34(7), 2056-2066.

Hakansson, P, Hofer, A, & Thelander, L. (2006). Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem*, 281(12), 7834-7841.

Halter, JP, Michael, W, Schupbach, M, Mandel, H, Casali, C, Orchard, K, Collin, M, Valcarcel, D, Rovelli, A, Filosto, M, Dotti, MT, Marotta, G, Pintos, G, Barba, P, Accarino, A, Ferra, C, Illa, I, Beguin, Y, Bakker, JA, Boelens, JJ, de Coo, IF, Fay, K, Sue, CM, Nachbaur, D, Zoller, H, Sobreira, C, Pinto Simoes, B, Hammans, SR, Savage, D, Marti, R, Chinnery, PF, Elhasid, R, Gratwohl, A, & Hirano, M. (2015). Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain*, 138(Pt 10), 2847-2858.



- Hamajima, N, Kouwaki, M, Vreken, P, Matsuda, K, Sumi, S, Imaeda, M, Ohba, S, Kidouchi, K, Nonaka, M, Sasaki, M, Tamaki, N, Endo, Y, De Abreu, R, Rotteveel, J, van Kuilenburg, A, van Gennip, A, Togari, H, & Wada, Y. (1998). Dihydropyrimidinase deficiency: structural organization, chromosomal localization, and mutation analysis of the human dihydropyrimidinase gene. *Am J Hum Genet*, 63(3), 717-726.
- Harkiolaki, M, Dodson, EJ, Bernier-Villamor, V, Turkenburg, JP, Gonzalez-Pacanowska, D, & Wilson, KS. (2004). The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold. *Structure*, 12(1), 41-53.
- Hofer, A, Crona, M, Logan, DT, & Sjoberg, BM. (2012). DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47(1), 50-63.
- Horvath, A, & Vertessy, BG. (2010). A one-step method for quantitative determination of uracil in DNA by real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 38(21), e196.
- Hu, CM, & Chang, ZF. (2007). Mitotic control of dTTP pool: a necessity or coincidence? *J Biomed Sci*, 14(4), 491-497.
- Hu, CM, Yeh, MT, Tsao, N, Chen, CW, Gao, QZ, Chang, CY, Lee, MH, Fang, JM, Sheu, SY, Lin, CJ, Tseng, MC, Chen, YJ, & Chang, ZF. (2012). Tumor cells require thymidylate kinase to prevent dUTP incorporation during DNA repair. *Cancer Cell*, 22(1), 36-50.
- Huang, M, & Graves, LM. (2003). De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci*, 60(2), 321-336.
- Ives, DH, & Durham, JP. (1970). Deoxycytidine kinase. 3. Kinetics and allosteric regulation of the calf thymus enzyme. *J Biol Chem*, 245(9), 2285-2294.
- Ives, DH, Morse, PA, Jr., & Potter, VR. (1963). Feedback inhibition of thymidine kinase by thymidine triphosphate. *J Biol Chem*, 238, 1467-1474.

Iyama, T, Abolhassani, N, Tsuchimoto, D, Nonaka, M, & Nakabeppu, Y. (2010). NUDT16 is a (deoxy)inosine diphosphatase, and its deficiency induces accumulation of single-strand breaks in nuclear DNA and growth arrest. *Nucleic Acids Res*, 38(14), 4834-4843.

Jang, S, Zhou, X, & Ahn, J. (2016). Substrate Specificity of SAMHD1 Triphosphohydrolase Activity Is Controlled by Deoxyribonucleoside Triphosphates and Phosphorylation at Thr592. *Biochemistry*, 55(39), 5635-5646.

Jaspersen, SL, Charles, JF, & Morgan, DO. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol*, 9(5), 227-236.

Javid-Majd, F, Yang, D, Ioerger, TR, & Sacchettini, JC. (2008). The 1.25 Å resolution structure of phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 64(Pt 6), 627-635.

146

Johnson, GE. (2012). Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods. *Methods Mol Biol*, 817, 55-67.

Kamath, VG, Hsiung, CH, Lizenby, ZJ, & McKee, EE. (2015). Heart mitochondrial TTP synthesis and the compartmentalization of TMP. *J Biol Chem*, 290(4), 2034-2041.

Ke, PY, & Chang, ZF. (2004). Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Mol Cell Biol*, 24(2), 514-526.

Keeseey, JK, Jr., Bigelis, R, & Fink, GR. (1979). The product of the *his4* gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. A trifunctional polypeptide. *J Biol Chem*, 254(15), 7427-7433.

- Kent, C, & Carman, GM. (1999). Interactions among pathways for phosphatidylcholine metabolism, CTP synthesis and secretion through the Golgi apparatus. *Trends Biochem Sci*, 24(4), 146-150.
- Khan, H, Vale, C, Bhagat, T, & Verma, A. (2013). Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*, 50(1), 16-37.
- Kobayashi, T, Ruan, S, Jabbur, JR, Consoli, U, Clodi, K, Shiku, H, Owen-Schaub, LB, Andreeff, M, Reed, JC, & Zhang, W. (1998). Differential p53 phosphorylation and activation of apoptosis-promoting genes Bax and Fas/APO-1 by irradiation and ara-C treatment. *Cell Death Differ*, 5(7), 584-591.
- Koch, J, Mayr, JA, Alhaddad, B, Rauscher, C, Bierau, J, Kovacs-Nagy, R, Coene, KL, Bader, I, Holzhacker, M, Prokisch, H, Venselaar, H, Wevers, RA, Distelmaier, F, Polster, T, Leiz, S, Betzler, C, Strom, TM, Sperl, W, Meitingner, T, Wortmann, SB, & Haack, TB. (2017). CAD mutations and uridine-responsive epileptic encephalopathy. *Brain*, 140(2), 279-286.
- Koharudin, LM, Wu, Y, DeLucia, M, Mehrens, J, Gronenborn, AM, & Ahn, J. (2014). Structural basis of allosteric activation of sterile alpha motif and histidine-aspartate domain-containing protein 1 (SAMHD1) by nucleoside triphosphates. *J Biol Chem*, 289(47), 32617-32627.
- Kohnken, R, Kodigepalli, KM, & Wu, L. (2015). Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications. *Mol Cancer*, 14, 176.
- Kouzminova, EA, & Kuzminov, A. (2008). Patterns of chromosomal fragmentation due to uracil-DNA incorporation reveal a novel mechanism of replication-dependent double-stranded breaks. *Mol Microbiol*, 68(1), 202-215.

- Kumar, D, Abdulovic, AL, Viberg, J, Nilsson, AK, Kunkel, TA, & Chabes, A. (2011). Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Res*, 39(4), 1360-1371.
- Kunkel, TA, Schaaper, RM, & Loeb, LA. (1983). Depurination-induced infidelity of deoxyribonucleic acid synthesis with purified deoxyribonucleic acid replication proteins in vitro. *Biochemistry*, 22(10), 2378-2384.
- Kunz, BA, Kohalmi, SE, Kunkel, TA, Mathews, CK, McIntosh, EM, & Reidy, JA. (1994). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat Res*, 318(1), 1-64.
- Lacombe, ML, Tokarska-Schlattner, M, Epand, RF, Boissan, M, Epand, RM, & Schlattner, U. (2009). Interaction of NDPK-D with cardiolipin-containing membranes: Structural basis and implications for mitochondrial physiology. *Biochimie*, 91(6), 779-783.
- Ladner, RD, & Caradonna, SJ. (1997). The human dUTPase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms. Differential expression of the isoforms and characterization of a cDNA encoding the mitochondrial species. *J Biol Chem*, 272(30), 19072-19080.
- Laguette, N, Sobhian, B, Casartelli, N, Ringeard, M, Chable-Bessia, C, Segeral, E, Yatim, A, Emiliani, S, Schwartz, O, & Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*, 474(7353), 654-657.
- Lai, Y, Tse, CM, & Unadkat, JD. (2004). Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *J Biol Chem*, 279(6), 4490-4497.

Lam, CW, Yeung, WL, Ling, TK, Wong, KC, & Law, CY. (2019). Deoxythymidylate kinase, DTYMK, is a novel gene for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Clin Chim Acta*, 496, 93-99.

Le Francois, BG, Maroun, JA, & Birnboim, HC. (2007). Expression of thymidylate synthase in human cells is an early G(1) event regulated by CDK4 and p16INK4A but not E2F. *Br J Cancer*, 97(9), 1242-1250.

Lee, EJ, Seo, JH, Park, JH, Vo, TTL, An, S, Bae, SJ, Le, H, Lee, HS, Wee, HJ, Lee, D, Chung, YH, Kim, JA, Jang, MK, Ryu, SH, Yu, E, Jang, SH, Park, ZY, & Kim, KW. (2017). SAMHD1 acetylation enhances its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity and promotes cancer cell proliferation. *Oncotarget*, 8(40), 68517-68529.

Lee, EW, Lai, Y, Zhang, H, & Unadkat, JD. (2006). Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *J Biol Chem*, 281(24), 16700-16706.

149

---

Lee, MH, Wang, L, & Chang, ZF. (2014). The contribution of mitochondrial thymidylate synthesis in preventing the nuclear genome stress. *Nucleic Acids Res*, 42(8), 4972-4984.

Li, CL, Lu, CY, Ke, PY, & Chang, ZF. (2004). Perturbation of ATP-induced tetramerization of human cytosolic thymidine kinase by substitution of serine-13 with aspartic acid at the mitotic phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(3), 587-593.

Liacouras, AS, & Anderson, EP. (1977). Uridine-cytidine kinase. III. Competition between uridine and cytidine for a single enzyme. *Mol Cell Biochem*, 17(3), 141-146.

- Lindahl, T, Ljungquist, S, Siegert, W, Nyberg, B, & Sperens, B. (1977). DNA N-glycosidases: properties of uracil-DNA glycosidase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 252(10), 3286-3294.
- Loffler, M, Fairbanks, LD, Zameitat, E, Marinaki, AM, & Simmonds, HA. (2005). Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol Med*, 11(9), 430-437.
- Longley, DB, Harkin, DP, & Johnston, PG. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 330-338.
- Lopez-Gomez, C, Levy, RJ, Sanchez-Quintero, MJ, Juanola-Falgarona, M, Barca, E, Garcia-Diaz, B, Tadesse, S, Garone, C, & Hirano, M. (2017). Deoxycytidine and Deoxythymidine Treatment for Thymidine Kinase 2 Deficiency. *Ann Neurol*, 81(5), 641-652.
- Lu, J, Dong, W, He, H, Han, Z, Zhuo, Y, Mo, R, Liang, Y, Zhu, J, Li, R, Qu, H, Zhang, L, Wang, S, Ma, R, Jia, Z, & Zhong, W. (2018). Autophagy induced by overexpression of DCTPP1 promotes tumor progression and predicts poor clinical outcome in prostate cancer. *Int J Biol Macromol*, 118(Pt A), 599-609.
- Lyu, LD, Tang, BK, Fan, XY, Ma, H, & Zhao, GP. (2013). Mycobacterial MazG safeguards genetic stability via housecleaning of 5-OH-dCTP. *PLoS Pathog*, 9(12), e1003814.
- Llona-Minguez, S, Hoglund, A, Ghassemian, A, Desroses, M, Calderon-Montano, JM, Burgos Moron, E, Valerie, NCK, Wiita, E, Almlöf, I, Koolmeister, T, Mateus, A, Cazares-Korner, C, Sanjiv, K, Homan, E, Loseva, O, Baranczewski, P, Darabi, M, Mehdizadeh, A, Fayezi, S, Jemth, AS, Warpman Berglund, U, Sigmundsson, K, Lundback, T, Jenmalm Jensen, A, Artursson, P, Scobie, M, & Helleday, T. (2017a). Piperazin-1-ylpyridazine Derivatives Are a Novel Class of Human dCTP Pyrophosphatase 1 Inhibitors. *J Med Chem*, 60(10), 4279-4292.

Llona-Minguez, S, Hogleund, A, Jacques, SA, Johansson, L, Calderon-Montano, JM, Claesson, M, Loseva, O, Valerie, NCK, Lundback, T, Piedrafita, J, Maga, G, Crespan, E, Meijer, L, Moron, EB, Baranczewski, P, Hagbjork, AL, Svensson, R, Wiita, E, Almlof, I, Visnes, T, Jeppsson, F, Sigmundsson, K, Jensen, AJ, Artursson, P, Jemth, AS, Stenmark, P, Berglund, UW, Scobie, M, & Helleday, T. (2016). Discovery of the First Potent and Selective Inhibitors of Human dCTP Pyrophosphatase 1. *J Med Chem*, *59*(3), 1140-1148.

Llona-Minguez, S, Hogleund, A, Wiita, E, Almlof, I, Mateus, A, Calderon-Montano, JM, Cazares-Korner, C, Homan, E, Loseva, O, Baranczewski, P, Jemth, AS, Haggblad, M, Martens, U, Lundgren, B, Artursson, P, Lundback, T, Jenmalm Jensen, A, Warpman Berglund, U, Scobie, M, & Helleday, T. (2017b). Identification of Triazolothiadiazoles as Potent Inhibitors of the dCTP Pyrophosphatase 1. *J Med Chem*, *60*(5), 2148-2154.

Maley, GF, & Maley, F. (1968). Regulatory properties and subunit structure of chick embryo deoxycytidylate deaminase. *J Biol Chem*, *243*(17), 4506-4512.

Mandel, H, Szargel, R, Labay, V, Elpeleg, O, Saada, A, Shalata, A, Anbinder, Y, Berkowitz, D, Hartman, C, Barak, M, Eriksson, S, & Cohen, N. (2001). The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet*, *29*(3), 337-341.

Mannava, S, Grachtchouk, V, Wheeler, LJ, Im, M, Zhuang, D, Slavina, EG, Mathews, CK, Shewach, DS, & Nikiforov, MA. (2008). Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell Cycle*, *7*(15), 2392-2400.

Martomo, SA, & Mathews, CK. (2002). Effects of biological DNA precursor pool asymmetry upon accuracy of DNA replication in vitro. *Mutat Res*, *499*(2), 197-211.

Mathews, CK. (2006). DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J*, 20(9), 1300-1314.

Mathews, CK. (2014). Deoxyribonucleotides as genetic and metabolic regulators. *FASEB J*, 28(9), 3832-3840.

Mathews, CK, & Sinha, NK. (1982). Are DNA precursors concentrated at replication sites? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(2), 302-306.

Mathews, CK, & Song, S. (2007). Maintaining precursor pools for mitochondrial DNA replication. *FASEB J*, 21(10), 2294-2303.

McLennan, AG. (2006). The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci*, 63(2), 123-143.

Meuth, M. (1989). The molecular basis of mutations induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in mammalian cells. *Exp Cell Res*, 181(2), 305-316.

152

Miazzzi, C, Ferraro, P, Pontarin, G, Rampazzo, C, Reichard, P, & Bianchi, V. (2014). Allosteric regulation of the human and mouse deoxyribonucleotide triphosphohydrolase sterile alpha-motif/histidine-aspartate domain-containing protein 1 (SAMHD1). *J Biol Chem*, 289(26), 18339-18346.

Morisaki, T, Yashiro, M, Kakehashi, A, Inagaki, A, Kinoshita, H, Fukuoka, T, Kasashima, H, Masuda, G, Sakurai, K, Kubo, N, Muguruma, K, Ohira, M, Wanibuchi, H, & Hirakawa, K. (2014). Comparative proteomics analysis of gastric cancer stem cells. *PLoS One*, 9(11), e110736.

Moroz, OV, Murzin, AG, Makarova, KS, Koonin, EV, Wilson, KS, & Galperin, MY. (2005). Dimeric dUTPases, HisE, and MazG belong to a new superfamily of all-alpha NTP pyrophosphohydrolases with potential "house-cleaning" functions. *J Mol Biol*, 347(2), 243-255.



- Morris, GW, Iams, TA, Slepchenko, KG, & McKee, EE. (2009). Origin of pyrimidine deoxyribonucleotide pools in perfused rat heart: implications for 3'-azido-3'-deoxythymidine-dependent cardiotoxicity. *Biochem J*, 422(3), 513-520.
- Mota, CS, Goncalves, AM, & de Sanctis, D. (2016). Deinococcus radiodurans DR2231 is a two-metal-ion mechanism hydrolase with exclusive activity on dUTP. *FEBS J*, 283(23), 4274-4290.
- Muha, V, Horvath, A, Bekesi, A, Pukancsik, M, Hodoscsek, B, Merenyi, G, Rona, G, Batki, J, Kiss, I, Jankovics, F, Vilmos, P, Erdelyi, M, & Vertessy, BG. (2012). Uracil-containing DNA in Drosophila: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genet*, 8(6), e1002738.
- Musso-Buendia, JA, Vidal, AE, Kasinthan, G, Nguyen, C, Carrero-Lerida, J, Ruiz-Perez, LM, Wilson, K, Johansson, NG, Gilbert, IH, & Gonzalez-Pacanowska, D. (2009). Kinetic properties and inhibition of the dimeric dUTPase-dUDPase from Campylobacter jejuni. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 24(1), 111-116.
- Ng, BG, Wolfe, LA, Ichikawa, M, Markello, T, He, M, Tifft, CJ, Gahl, WA, & Freeze, HH. (2015). Biallelic mutations in CAD, impair de novo pyrimidine biosynthesis and decrease glycosylation precursors. *Hum Mol Genet*, 24(11), 3050-3057.
- Niida, H, Shimada, M, Murakami, H, & Nakanishi, M. (2010). Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Sci*, 101(12), 2505-2509.
- Nonaka, M, Tsuchimoto, D, Sakumi, K, & Nakabeppu, Y. (2009). Mouse RS21-C6 is a mammalian 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase that prefers 5-iodocytosine. *FEBS J*, 276(6), 1654-1666.

- Nordlund, P, & Reichard, P. (2006). Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*, 75, 681-706.
- Nusse, R, & Clevers, H. (2017). Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169(6), 985-999.
- Owiti, N, Stokdyk, K, & Kim, N. (2019). The etiology of uracil residues in the *Saccharomyces cerevisiae* genomic DNA. *Curr Genet*, 65(2), 393-399.
- Owiti, N, Wei, S, Bhagwat, AS, & Kim, N. (2018). Unscheduled DNA synthesis leads to elevated uracil residues at highly transcribed genomic loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*, 14(7), e1007516.
- Pai, CC, & Kearsley, SE. (2017). A Critical Balance: dNTPs and the Maintenance of Genome Stability. *Genes (Basel)*, 8(2).
- Palmieri, F. (2014). Mitochondrial transporters of the SLC25 family and associated diseases: a review. *J Inherit Metab Dis*, 37(4), 565-575.
- Pappas, A, Yang, WL, Park, TS, & Carman, GM. (1998). Nucleotide-dependent tetramerization of CTP synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 273(26), 15954-15960.
- Peretz, L, Besser, E, Hajbi, R, Casden, N, Ziv, D, Kronenberg, N, Gigi, LB, Sweetat, S, Khawaled, S, Aqeilan, R, & Behar, O. (2018). Combined shRNA over CRISPR/cas9 as a methodology to detect off-target effects and a potential compensatory mechanism. *Sci Rep*, 8(1), 93.
- Pontarin, G, Ferraro, P, Bee, L, Reichard, P, & Bianchi, V. (2012). Mammalian ribonucleotide reductase subunit p53R2 is required for mitochondrial DNA replication and DNA repair in quiescent cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(33), 13302-13307.

- Pontarin, G, Gallinaro, L, Ferraro, P, Reichard, P, & Bianchi, V. (2003). Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(21), 12159-12164.
- Priego, EM, Karlsson, A, Gago, F, Camarasa, MJ, Balzarini, J, & Perez-Perez, MJ. (2012). Recent advances in thymidine kinase 2 (TK2) inhibitors and new perspectives for potential applications. *Curr Pharm Des*, 18(20), 2981-2994.
- Rampazzo, C, Miazzi, C, Franzolin, E, Pontarin, G, Ferraro, P, Frangini, M, Reichard, P, & Bianchi, V. (2010). Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutat Res*, 703(1), 2-10.
- Rampazzo, C, Tozzi, MG, Dumontet, C, & Jordheim, LP. (2016). The druggability of intracellular nucleotide-degrading enzymes. *Cancer Chemother Pharmacol*, 77(5), 883-893.
- Ravenscroft, JC, Suri, M, Rice, GI, Szykiewicz, M, & Crow, YJ. (2011). Autosomal dominant inheritance of a heterozygous mutation in SAMHD1 causing familial chilblain lupus. *Am J Med Genet A*, 155A(1), 235-237.
- Rentoft, M, Lindell, K, Tran, P, Chabes, AL, Buckland, RJ, Watt, DL, Marjavaara, L, Nilsson, AK, Melin, B, Trygg, J, Johansson, E, & Chabes, A. (2016). Heterozygous colon cancer-associated mutations of SAMHD1 have functional significance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(17), 4723-4728.
- Requena, CE, Perez-Moreno, G, Horvath, A, Vertessy, BG, Ruiz-Perez, LM, Gonzalez-Pacanowska, D, & Vidal, AE. (2016). The nucleotidohydrolases DCTPP1 and dUTPase are involved in the cellular response to decitabine. *Biochem J*, 473(17), 2635-2643.

Requena, CE, Perez-Moreno, G, Ruiz-Perez, LM, Vidal, AE, & Gonzalez-Pacanowska, D. (2014). The NTP pyrophosphatase DCTPP1 contributes to the homeostasis and cleansing of the dNTP pool in human cells. *Biochem J*, 459(1), 171-180.

Rice, GI, Bond, J, Asipu, A, Brunette, RL, Manfield, IW, Carr, IM, Fuller, JC, Jackson, RM, Lamb, T, Briggs, TA, Ali, M, Gornall, H, Couthard, LR, Aeby, A, Attard-Montalto, SP, Bertini, E, Bodemer, C, Brockmann, K, Brueton, LA, Corry, PC, Desguerre, I, Fazzi, E, Cazorla, AG, Gener, B, Hamel, BC, Heiberg, A, Hunter, M, van der Knaap, MS, Kumar, R, Lagae, L, Landrieu, PG, Lourenco, CM, Marom, D, McDermott, MF, van der Merwe, W, Orcesi, S, Prendiville, JS, Rasmussen, M, Shalev, SA, Soler, DM, Shinawi, M, Spiegel, R, Tan, TY, Vanderver, A, Wakeling, EL, Wassmer, E, Whittaker, E, Lebon, P, Stetson, DB, Bonthron, DT, & Crow, YJ. (2009). Mutations involved in Aicardi-Goutieres syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat Genet*, 41(7), 829-832.

156

---

Saada, A. (2009). Fishing in the (deoxyribonucleotide) pool. *Biochem J*, 422(3), e3-6.

Saada, A, Shaag, A, Mandel, H, Nevo, Y, Eriksson, S, & Elpeleg, O. (2001). Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet*, 29(3), 342-344.

Samsonoff, WA, Reston, J, McKee, M, O'Connor, B, Galivan, J, Maley, G, & Maley, F. (1997). Intracellular location of thymidylate synthase and its state of phosphorylation. *J Biol Chem*, 272(20), 13281-13285.

Sanchez, A, Sharma, S, Rozenzhak, S, Roguev, A, Krogan, NJ, Chabes, A, & Russell, P. (2012). Replication fork collapse and genome instability in a deoxycytidylate deaminase mutant. *Mol Cell Biol*, 32(21), 4445-4454.

Santos, FP, Kantarjian, H, Garcia-Manero, G, Issa, JP, & Ravandi, F. (2010). Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Anticancer Ther*, 10(1), 9-22.

Schindelin, J, Arganda-Carreras, I, Frise, E, Kaynig, V, Longair, M, Pietzsch, T, Preibisch, S, Rueden, C, Saalfeld, S, Schmid, B, Tinevez, JY, White, DJ, Hartenstein, V, Eliceiri, K, Tomancak, P, & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682.

Schvartzman, JB, Krimer, DB, & Van't Hof, J. (1984). The effects of different thymidine concentrations on DNA replication in pea-root cells synchronized by a protracted 5-fluorodeoxyuridine treatment. *Exp Cell Res*, 150(2), 379-389.

Sen, S, Zhou, H, Andersson, BS, Cork, A, Freireich, EJ, & Stass, SA. (1995). p53 gene mutations with chromosome 17 abnormalities in chronic myelogenous leukemia blast crisis patients persist in long-term cell lines but may be acquired in acute myeloid leukemia cells in vitro. *Cancer Genet Cytogenet*, 82(1), 35-40.

Sherley, JL, & Kelly, TJ. (1988). Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem*, 263(17), 8350-8358.

---

157

Sherman, PA, & Fyfe, JA. (1989). Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal Biochem*, 180(2), 222-226.

Shu, X, Liu, M, Lu, Z, Zhu, C, Meng, H, Huang, S, Zhang, X, & Yi, C. (2018). Genome-wide mapping reveals that deoxyuridine is enriched in the human centromeric DNA. *Nat Chem Biol*, 14(7), 680-687.

Sigoillot, FD, Berkowski, JA, Sigoillot, SM, Kotsis, DH, & Guy, HI. (2003). Cell cycle-dependent regulation of pyrimidine biosynthesis. *J Biol Chem*, 278(5), 3403-3409.

Smith, DW, & Ames, BN. (1965). Phosphoribosyladenosine Monophosphate, an Intermediate in Histidine Biosynthesis. *J Biol Chem*, 240, 3056-3063.

Spelbrink, JN, Li, FY, Tiranti, V, Nikali, K, Yuan, QP, Tariq, M, Wanrooij, S, Garrido, N, Comi, G, Morandi, L, Santoro, L, Toscano, A, Fabrizi, GM, Somer, H, Croxen, R, Beeson, D, Poulton, J, Suomalainen, A, Jacobs, HT, Zeviani, M, & Larsson, C. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet*, 28(3), 223-231.

Torres-Torronteras, J, Cabrera-Perez, R, Barba, I, Costa, C, de Luna, N, Andreu, AL, Barquinero, J, Hirano, M, Camara, Y, & Marti, R. (2016). Long-Term Restoration of Thymidine Phosphorylase Function and Nucleoside Homeostasis Using Hematopoietic Gene Therapy in a Murine Model of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Hum Gene Ther*, 27(9), 656-667.

Valentine, WN, Fink, K, Paglia, DE, Harris, SR, & Adams, WS. (1974). Hereditary hemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *J Clin Invest*, 54(4), 866-879.

van Gennip, AH, & van Kuilenburg, AB. (2000). Defects of pyrimidine degradation: clinical, molecular and diagnostic aspects. *Adv Exp Med Biol*, 486, 233-241.

Vertessy, BG, & Toth, J. (2009). Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res*, 42(1), 97-106.

Wang, L. (2010). Deoxynucleoside salvage enzymes and tissue specific mitochondrial DNA depletion. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 29(4-6), 370-381.

Warner, HR, Duncan, BK, Garrett, C, & Neuhard, J. (1981). Synthesis and metabolism of uracil-containing deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 145(2), 687-695.

- Wilson, PM, Fazzzone, W, LaBonte, MJ, Deng, J, Neamati, N, & Ladner, RD. (2008). Novel opportunities for thymidylate metabolism as a therapeutic target. *Mol Cancer Ther*, 7(9), 3029-3037.
- Wu, B, Liu, Y, Zhao, Q, Liao, S, Zhang, J, Bartlam, M, Chen, W, & Rao, Z. (2007). Crystal structure of RS21-C6, involved in nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolysis. *J Mol Biol*, 367(5), 1405-1412.
- Xu, X, Page, JL, Surtees, JA, Liu, H, Lagedrost, S, Lu, Y, Bronson, R, Alani, E, Nikitin, AY, & Weiss, RS. (2008). Broad overexpression of ribonucleotide reductase genes in mice specifically induces lung neoplasms. *Cancer Res*, 68(8), 2652-2660.
- Xu, Y, Johansson, M, & Karlsson, A. (2008). Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria. *J Biol Chem*, 283(3), 1563-1571.
- Zhang, J, & Inouye, M. (2002). MazG, a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase, interacts with Era, an essential GTPase in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 184(19), 5323-5329.
- Zhang, Y, Ye, WY, Wang, JQ, Wang, SJ, Ji, P, Zhou, GY, Zhao, GP, Ge, HL, & Wang, Y. (2013). dCTP pyrophosphohydrolase exhibits nucleic acid accumulation in multiple carcinomas. *Eur J Histochem*, 57(3), e29.





ANEXOS

---



## H. ANEXOS

### H.1. Relación de metabolitos analizados con la plataforma

#### *AbsoluteIDQ® p180* de Biocrates

Esfingolípidos	HAP1 WT	DCTPP1-KO		DCTPP1-KO-Ex1	
	Media ± SD	Media ± SD	P	Media ± SD	P
SM (OH) C14:1	1,70 ± 0,27	1,02 ± 0,47	0,045	1,42 ± 0,52	n.s.
SM (OH) C16:1	0,72 ± 0,22	0,47 ± 0,23	n.s.	0,54 ± 0,28	n.s.
SM (OH) C22:1	0,42 ± 0,20	0,42 ± 0,33	n.s.	0,26 ± 0,14	n.s.
SM (OH) C22:2	0,98 ± 0,29	0,76 ± 0,47	n.s.	0,51 ± 0,29	n.s.
SM (OH) C24:1	0,23 ± 0,17	0,26 ± 0,21	n.s.	0,17 ± 0,10	n.s.
SM C16:0	44,72 ± 6,1	22,35 ± 7,63	0,0038	31,6 ± 15,4	n.s.
SM C16:1	3,90 ± 0,61	1,97 ± 1,31	0,037	3,54 ± 0,99	n.s.
SM C18:0	3,61 ± 1,06	0,95 ± 0,65	0,034	2,91 ± 2,31	n.s.
SM C18:1	1,07 ± 0,17	0,44 ± 0,31	0,012	0,83 ± 0,31	n.s.
SM C20:2	0,14 ± 0,14	0,07 ± 0,06	n.s.	0,04 ± 0,01	n.s.
SM C24:0	12,74 ± 4,9	4,58 ± 2,18	0,021	6,52 ± 5,57	n.s.
SM C24:1	10,61 ± 3,4	7,23 ± 4,59	n.s.	5,94 ± 5,08	n.s.
SM C26:0	0,03 ± 0,03	0,12 ± 0,04	n.s.	0,10 ± 0,04	n.s.
SM C26:1	0,19 ± 0,11	0,55 ± 0,36	n.s.	0,09 ± 0,06	n.s.

**Tabla H.1. Análisis metabolómico de las concentraciones de esfingolípidos (SM) en células HAP1 WT, DCTPP1-KO y DCTPP1-KO-Ex1.** Los valores corresponden a la media de al menos 3 muestras independientes ( $\pm$  SD). El sombreado rojo indica una disminución respecto a la línea control. n.s. No significativo. CX:Y X indica el número de átomos de carbono e Y es el número de dobles enlaces.

Glicerofosfolípidos	HAP1 WT	DCTPP1-KO	DCTPP1-KO-Ex1		
	Media ± SD	Media ± SD	P	Media ± SD	P
lysoPC a C16:0	6,67 ± 0,97	3,33 ± 1,46	0,014	2,79 ± 0,77	0,0008
lysoPC a C16:1	4,96 ± 0,87	2,03 ± 1,56	0,016	2,34 ± 0,57	0,0023
lysoPC a C17:0	0,67 ± 0,24	0,37 ± 0,19	n.s.	0,29 ± 0,08	0,022
lysoPC a C18:0	3,97 ± 0,38	2,78 ± 0,26	0,017	1,82 ± 0,42	0,0003
lysoPC a C18:1	8,97 ± 1,40	4,18 ± 2,88	0,005	4,20 ± 1,20	0,002
lysoPC a C18:2	0,85 ± 0,07	0,83 ± 0,17	n.s.	0,57 ± 0,10	0,003
lysoPC a C20:3	1,45 ± 0,09	1,05 ± 0,03	0,003	0,68 ± 0,19	0,0003
lysoPC a C20:4	2,04 ± 0,34	1,00 ± 0,59	0,023	0,92 ± 0,18	0,001
lysoPC a C24:0	14,57 ± 4,37	7,10 ± 5,01	n.s.	4,81 ± 1,65	0,005
lysoPC a C26:0	12,08 ± 3,63	5,02 ± 4,11	0,042	3,87 ± 1,30	0,005
lysoPC a C26:1	5,47 ± 1,00	2,53 ± 1,85	0,031	2,46 ± 0,44	0,001
lysoPC a C28:0	6,58 ± 1,70	3,03 ± 2,20	0,043	2,97 ± 0,91	0,009
lysoPC a C28:1	7,74 ± 1,66	3,28 ± 2,71	0,031	3,03 ± 0,77	0,002

**Tabla H.2. Análisis metabólico de las concentraciones de lisofosfatidilcolinas (lysoPC) en células HAP1 WT, DCTPP1-KO y DCTPP1-KO-Ex1.** Los valores corresponden a la media de al menos 3 muestras independientes ( $\pm$  SD). El sombreado rojo indica una disminución respecto a la línea control. n.s. No significativo. CX:Y X indica el número de átomos de carbono e Y es el número de dobles enlaces.

Glicerofosfolípidos	HAP1 WT	DCTPP1-KO		DCTPP1-KO-Ex1	
	Media ± SD	Media ± SD	P	Media ± SD	P
PC aa C24:0	2,92 ± 0,84	1,40 ± 0,94	n.s.	1,01 ± 0,31	0,005
PC aa C26:0	16,01 ± 5,10	11,08 ± 0,82	n.s.	3,93 ± 1,63	0,004
PC aa C28:1	8,95 ± 2,33	3,812 ± 2,33	0,020	3,54 ± 1,07	0,005
PC aa C30:0	26,43 ± 6,64	7,98 ± 7,37	0,009	18,6 ± 11,46	n.s.
PC aa C30:2	1,37 ± 0,11	0,51 ± 0,43	0,006	1,47 ± 0,55	n.s.
PC aa C32:0	23,92 ± 9,73	4,76 ± 2,55	0,008	10,08 ± 9,14	n.s.
PC aa C32:1	125,49 ± 23,4	43,22 ± 43,83	0,016	84,27 ± 41,3	n.s.
PC aa C32:2	15,09 ± 3,08	5,38 ± 5,34	0,019	14,72 ± 5,81	n.s.
PC aa C32:3	1,45 ± 0,23	0,53 ± 0,48	0,013	1,59 ± 0,62	n.s.
PC aa C34:1	300,21 ± 58,8	102,2 ± 103,4	0,015	139,1 ± 82,6	0,019
PC aa C34:2	70,32 ± 13,46	42,13 ± 9,20	n.s.	53,4 ± 26,5	n.s.
PC aa C34:3	6,61 ± 1,31	4,09 ± 1,05	n.s.	7,62 ± 3,53	n.s.
PC aa C34:4	0,81 ± 0,12	0,46 ± 0,30	n.s.	0,88 ± 0,37	n.s.
PC aa C36:0	2,81 ± 0,37	1,45 ± 0,23	0,020	1,78 ± 0,61	n.s.
PC aa C36:1	47,86 ± 11,83	12,55 ± 12,35	0,006	15,20 ± 11,7	0,007
PC aa C36:2	117,94 ± 23,0	40,45 ± 37,84	0,012	61,47 ± 39,4	0,048
PC aa C36:3	24,31 ± 4,62	13,50 ± 3,47	0,045	18,05 ± 11,0	n.s.
PC aa C36:4	11,89 ± 2,42	8,01 ± 2,10	n.s.	10,77 ± 2,87	n.s.
PC aa C36:5	5,04 ± 0,64	2,03 ± 1,76	0,018	3,28 ± 1,36	n.s.
PC aa C36:6	0,95 ± 0,20	0,42 ± 0,29	0,023	0,76 ± 0,25	n.s.
PC aa C38:0	3,26 ± 0,96	1,28 ± 1,02	0,029	2,13 ± 1,47	n.s.
PC aa C38:1	1,64 ± 0,67	0,36 ± 0,18	0,010	0,47 ± 0,77	0,038
PC aa C38:3	14,88 ± 3,54	3,98 ± 3,81	n.s.	5,59 ± 5,94	0,020
PC aa C38:4	15,12 ± 3,60	7,91 ± 1,44	n.s.	6,23 ± 5,04	0,024
PC aa C38:5	17,57 ± 2,79	12,04 ± 1,65	n.s.	8,53 ± 4,76	0,016
PC aa C38:6	11,64 ± 2,18	8,42 ± 1,25	n.s.	8,10 ± 2,07	n.s.
PC aa C40:1	2,02 ± 0,24	1,23 ± 1,70	0,023	0,85 ± 0,36	0,019

Glicerofosfolípidos	HAP1 WT	DCTPP1-KO	DCTPP1-KO-Ex1		
	Media ± SD	Media ± SD	P	Media ± SD	P
PC aa C40:3	2,61 ± 0,75	0,65 ± 0,53	0,005	1,10 ± 0,90	0,042
PC aa C40:4	3,84 ± 1,02	0,97 ± 0,81	0,004	1,81 ± 1,43	n.s.
PC aa C40:5	4,64 ± 1,26	1,38 ± 1,22	0,009	2,34 ± 1,63	n.s.
PC aa C40:6	11,05 ± 2,34	7,29 ± 1,56	n.s.	5,47 ± 3,09	0,028
PC aa C42:1	0,62 ± 0,21	0,20 ± 0,10	0,010	0,26 ± 0,20	0,047
PC aa C42:2	1,42 ± 0,35	0,40 ± 0,02	0,017	0,63 ± 0,51	n.s.
PC aa C42:4	0,69 ± 0,18	0,20 ± 0,09	0,002	0,29 ± 0,23	0,032
PC aa C42:5	0,90 ± 0,27	0,29 ± 0,15	0,017	0,46 ± 0,33	n.s.
PC aa C42:6	1,91 ± 0,12	1,23 ± 0,72	n.s.	0,84 ± 0,25	0,0006

**Tabla H.3. Análisis metabólico de las concentraciones de fosfatidilcolinas (PC) en células HAP1 WT, DCTPP1-KO y DCTPP1-KO-Ex1.** aa indica que las dos cadenas son ácidos grasos unidos por enlaces éster al esqueleto de glicerol. Los valores corresponden a la media de al menos 3 muestras independientes ( $\pm$  SD). El sombreado rojo indica una disminución respecto a la línea control. n.s. No significativo. CX:Y X indica el número de átomos de carbono e Y es el número de dobles enlaces.

Glicerofosfolípidos	HAP1 WT	DCTPP1-KO	DCTPP1-KO-Ex1		
	Media ± SD	Media ± SD	P	Media ± SD	P
PC ae C30:0	6,17 ± 0,95	2,38 ± 1,31	0,003	4,47 ± 2,52	n.s.
PC ae C30:1	2,27 ± 0,42	0,76 ± 0,62	0,006	1,84 ± 1,01	n.s.
PC ae C30:2	0,69 ± 0,08	0,42 ± 0,02	0,008	0,43 ± 0,13	0,011
PC ae C32:1	23,69 ± 5,18	6,89 ± 6,44	0,007	16,21 ± 8,9	n.s.
PC ae C32:2	4,66 ± 1,38	1,47 ± 1,43	0,018	3,81 ± 2,25	n.s.
PC ae C34:0	5,42 ± 1,61	1,33 ± 0,96	0,004	2,96 ± 1,95	n.s.
PC ae C34:1	41,08 ± 7,90	13,19 ± 12,9	0,010	25,2 ± 16,2	n.s.
PC ae C34:2	11,77 ± 3,05	3,80 ± 3,52	0,014	9,79 ± 5,66	n.s.
PC ae C34:3	1,59 ± 0,37	0,66 ± 0,42	0,015	1,50 ± 0,84	n.s.
PC ae C36:0	3,27 ± 0,43	1,97 ± 0,32	0,021	1,68 ± 0,57	0,004
PC ae C36:1	15,14 ± 3,35	5,15 ± 4,02	0,008	7,66 ± 5,32	n.s.
PC ae C36:2	14,18 ± 2,71	5,15 ± 4,79	0,016	9,97 ± 6,03	n.s.
PC ae C36:3	5,09 ± 1,42	1,80 ± 1,63	0,022	4,46 ± 2,87	n.s.
PC ae C36:4	5,28 ± 1,33	1,80 ± 1,47	0,012	3,41 ± 2,03	n.s.
PC ae C36:5	2,68 ± 0,62	0,99 ± 0,76	0,013	1,60 ± 0,91	n.s.
PC ae C38:0	2,23 ± 0,33	1,41 ± 0,15	0,035	1,67 ± 0,74	n.s.
PC ae C38:1	2,91 ± 0,62	0,76 ± 0,64	0,002	1,25 ± 1,02	0,031
PC ae C38:2	5,65 ± 1,09	1,78 ± 1,60	0,007	3,03 ± 0,27	n.s.
PC ae C38:3	4,83 ± 1,13	1,35 ± 1,25	0,006	2,92 ± 2,12	n.s.
PC ae C38:4	5,29 ± 1,33	1,72 ± 1,61	0,014	3,28 ± 2,27	n.s.
PC ae C38:5	6,07 ± 1,19	2,39 ± 2,07	0,021	3,98 ± 2,40	n.s.
PC ae C38:6	5,42 ± 1,33	2,09 ± 1,93	0,029	3,65 ± 2,16	n.s.
PC ae C40:1	1,73 ± 0,42	0,86 ± 0,07	0,049	1,12 ± 0,58	n.s.
PC ae C40:2	1,47 ± 0,43	0,43 ± 0,24	0,005	0,73 ± 0,58	n.s.
PC ae C40:3	1,66 ± 0,44	0,44 ± 0,31	0,004	0,81 ± 0,61	n.s.
PC ae C40:4	2,42 ± 0,62	1,14 ± 0,20	n.s.	1,41 ± 1,08	n.s.
PC ae C40:5	2,37 ± 0,51	0,75 ± 0,66	0,008	1,45 ± 1,01	n.s.

Glicerofosfolípidos	HAP1 WT	DCTPP1-KO	DCTPP1-KO-Ex1		
	Media ± SD	Media ± SD	P	Media ± SD	P
PC ae C40:6	3,61 ± 1,07	1,20 ± 1,07	0,018	1,96 ± 1,30	n.s.
PC ae C42:0	3,58 ± 0,32	2,07	n.s.	2,02 ± 0,66	n.s.
PC ae C42:1	1,22 ± 0,22	0,64 ± 0,09	0,028	0,67 ± 0,32	0,029
PC ae C42:2	1,53 ± 0,39	0,50 ± 0,35	0,007	0,89 ± 0,56	n.s.
PC ae C42:3	1,23 ± 0,24	0,45 ± 0,32	0,008	0,67 ± 0,37	0,042
PC ae C42:4	0,57 ± 0,20	0,30 ± 0,03	n.s.	0,32 ± 0,22	n.s.
PC ae C44:3	0,61 ± 0,09	0,30 ± 0,05	0,004	0,21 ± 0,08	0,0006
PC ae C44:4	0,74 ± 0,07	0,41 ± 0,02	0,008	0,41 ± 0,11	0,012
PC ae C44:5	0,66 ± 0,07	0,37 ± 0,05	0,006	0,37 ± 0,17	0,026
PC ae C44:6	0,33 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,007	0,15 ± 0,08	0,006

**Tabla H.4. Análisis metabólico de las concentraciones de fosfatidilcolinas (PC) en células HAP1 WT, DCTPP1-KO y DCTPP1-KO-Ex1.** Los valores corresponden a la media de al menos 3 muestras independientes ( $\pm$  SD). El sombreado rojo indica una disminución respecto a la línea control. n.s. No significativo. ae indica que una de las cadenas es un ácido graso unido por enlace éter al esqueleto de glicerol. CX:Y X indica el número de átomos de carbono e Y es el número de dobles enlaces.