

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 569**

21 Número de solicitud: 201431380

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.09.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.03.2016

71 Solicitantes:

SERVICIO GALEGO DE SAÚDE (SERGAS)
(50.0%)

Edificio Administrativo de San Lázaro C/ San
Lázaro s/n

15006 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
FUNDACIÓN PROFESOR NOVOA SANTOS
(50.0%)

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ GARCÍA, José Luis y
GONZÁLEZ VASCONCELLOS, Iria

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA)**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un ensayo de digestión con nucleasa acoplado con una PCR cuantitativa (qPCR) de telómero, denominado ensayo de condensación de cromatina en telómeros (TCCA), para el análisis de la integridad estructural de telómeros y la determinación del factor de protección de cromatina (CPF). La invención se refiere además a métodos de examen, métodos de diagnóstico y métodos de pronóstico.

ES 2 564 569 A1

DESCRIPCIÓN

Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA)

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece a los campos de la medicina y la genética. Particularmente, la presente invención se refiere a un método de determinación de la protección provocada por la estructura de orden superior de la cromatina, que se
10 denomina factor de protección de cromatina telomérica.

Antecedentes de la invención

Los telómeros son estructuras de cromatina especializadas en el extremo de los
15 cromosomas eucariotas lineales. Realizan una función de ocupación de los centros activos, protegiendo los cromosomas frente a la degradación y la fusión extremo con extremo. En mamíferos, la composición de ADN de telómero consiste en aproximadamente 5-40 kb de matrices en tándem en una secuencia rica en G en dúplex (5'-TTAGGG-3') y que termina en una proyección monocatenaria en 3' [1]. Varias
20 matrices de complejos de proteína que constituyen el complejo protector organizan y estabilizan la cromatina telomérica y regulan la longitud del telómero [2]. La mayor parte del ADN telomérico está estrechamente empaquetado en nucleosomas enriquecidos con modificaciones epigenéticas tales como trimetilación de H3K9 y H4K20. Adicionalmente, repeticiones de ADN subtelomérico están altamente metiladas en la posición 5 de
25 citosina. Son marcas de heterocromatina de estados de cromatina compactada "cerrada" o "silenciada" [3, 4]. ARN no codificantes largos tales como TERRA (ARN que contiene repeticiones de telómeros) y factores epigenéticos subteloméricos [5-7] también contribuyen a una función y organización de cromatina telomérica de orden superior apropiada. Resulta interesante que se encontraron proteínas implicadas en varias rutas
30 de reparación del ADN asociadas a cromatina telomérica, que influyen en la estabilidad de los telómeros [4, 5].

La combinación de eventos incompletos de replicación y procesamiento da como resultado pérdida progresiva de secuencias teloméricas con cada división celular. La
35 telomerasa restablece las repeticiones de telómeros en células germinales pero esta enzima no está activa o es deficiente en la mayoría de las células somáticas, por tanto los

telómeros se acortan progresivamente con el envejecimiento en células somáticas replicativas. Tras un número limitado de duplicaciones celulares, la matriz de secuencia telomérica puede acortarse de manera crítica, perdiendo su función de ocupación de centros activos. Esto desencadena la senescencia replicativa, provocando que la célula
5 detenga la proliferación o experimente apoptosis [4, 5]. Las células cancerosas superan la barrera de senescencia replicativa dando como resultado telómeros disfuncionales que participan en fusiones de cromosomas extremo con extremo con posterior inestabilidad genómica masiva [8].

10 El tamaño de telómeros puede ser útil como posible biomarcador para la edad biológica y factor de predicción de la longevidad [6] y habitualmente se considera que los telómeros disfuncionales son una consecuencia de pérdida excesiva de secuencias de ADN telomérico. Por tanto, la evaluación de telómeros convencional se centra esencialmente en la cuantificación de la longitud o cantidad de ADN telomérico habitualmente mediante
15 ensayo de transferencia de tipo Southern de fragmento de restricción terminal (TRF), hibridación *in situ* cuantitativa (qFISH) o flujo-FISH o mediante PCR cuantitativa (qPCR) específica [9]. No obstante, tal como se indicó anteriormente, los telómeros no son secuencias de ADN desnudo sino configuraciones de cromatina complejas, organizadas y específicas. Existen evidencias de que los telómeros pueden ser disfuncionales aunque
20 no haya una disminución significativa en el ADN telomérico, sino mediante alteración de otros componentes como proteínas de unión a telómero protectoras constitutivas y enzimas de reparación del ADN [4]. Esto da como resultado envejecimiento tisular prematuro, inducción de aberraciones cromosómicas y lesiones neoplásicas. Por consiguiente, se ha notificado un aumento en las fusiones de telómeros
25 independientemente de la longitud del ADN de telómero en células de ratones deficientes en proteínas implicadas en la ruta de reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ) de roturas bicatenarias de ADN, tales como DNA-PKcs, Ku70 y Ku86 [3,10].

A pesar de esta supuesta significación, hasta ahora no se ha evaluado la organización de
30 cromatina telomérica de orden superior en laboratorios estudiando la biología de telómeros debido a la falta de un procedimiento apropiadamente normalizado. Por ejemplo, las regiones de cromatina relativamente libres de nucleosomas se comportan como sitios hipersensibles a ADNasa, siendo un punto de referencia de promotores o secuencias reguladoras. También se ha sometido a ensayo la actividad de nucleasas
35 como sonda de conformación de cromatina *in situ* con preparaciones citogenéticas convencionales [11] y digestiones de nucleasa microcócica en núcleos aislados seguido

por transferencia de tipo Southern con una sonda telomérica han demostrado una estrecha matriz nucleosómica a lo largo de la mayor parte de la longitud de telómero [12]. Además, se ha deducido la actividad de la exonucleasa Bal 31 *in situ* en regiones teloméricas a partir de la cuantificación de la señal de FISH telomérica restante en
 5 comparación con la de cromosomas sin digerir [11].

Una estrategia anticancerígena es el desarrollo de moléculas o ligandos que compiten con proteínas asociadas con telómeros dando como resultado telómeros sin centros activos ocupados [29, 30]. Estos productos químicos reducen el crecimiento de células
 10 cancerosas y pueden inducir detención de proliferación y apoptosis [31]. Además, la alteración de telómeros también puede ser una estrategia terapéutica para infecciones por determinados patógenos tales como *Trypanosoma brucei* [32]. El método de la presente invención es de gran interés para evaluar el factor de protección de cromatina, que es útil para el diagnóstico, pronóstico y examen de agentes químicos y/o
 15 farmacológicos diseñados para alterar la estructura de telómeros, para aplicarse para terapia antioncológica o antiinfección.

Términos y abreviaturas

20	ATCC	Colección americana de cultivos tipo
	CPF	Factor de protección de cromatina
	Ct	Valores de umbral de ciclo
25	DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
	ADN	Ácido desoxirribonucleico
30	DNMT	ADN metiltransferasa
	EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
	FCS	Suero de ternero fetal
35	FISH	Hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia

	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	qPCR	PCR en tiempo real cuantitativa
5	qFISH	Hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia cuantitativa
	ARN	Ácido ribonucleico
	TCCA	Ensayo de compactación de cromatina en telómeros
10	TERRA	ARN que contiene repeticiones de telómeros
	TPE	Efecto de colocación de telómeros
15	TRF	Ensayo de transferencia de tipo Southern de fragmento de restricción terminal
	5-azaC	5-azacitidina

20 **Breve descripción de la invención**

La presente invención se refiere a un método (ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA)) para determinar el factor de protección de cromatina que comprende las etapas de:

25

a. obtener una muestra biológica que comprende células;

b. extraer cromatina de las células de la etapa a) y mezclarla con tampón de nucleasa;

30

c. extraer ADN no empaquetado de las células de la etapa a) y mezclarlo con un tampón de nucleasa;

d. añadir una nucleasa específica (Bal 31) a las muestras de la etapa b) y c) para realizar la digestión del ADN telomérico;

35

e. inactivar la enzima de la etapa d) y purificar el ADN restante;

f. cuantificar el ADN telomérico de la etapa e) usando un ensayo basado en amplificación cuantitativa en tiempo real;

g. ajustar la dinámica de digestión de ADN de telómero a una curva lineal-cuadrática

5

$$y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2,$$

en donde x es el tiempo en minutos; y

10 h. determinar el factor de protección de cromatina definido como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras la incubación con una nucleasa durante un tiempo suficiente para conseguir un valor altamente discriminativo del factor. Alternativamente, el factor de protección de cromatina puede determinarse en el punto de tiempo específico de digestión con
15 nucleasa más discriminativo entre las curvas.

Además, la presente invención se refiere a un ensayo de diagnóstico de inestabilidad genómica.

20 Además, la presente invención se refiere a un ensayo de pronóstico.

La presente invención se refiere además a un método de examen para detectar agentes antitumorales y/o antiinfecciosos que comprende las etapas de:

25 a. obtener una muestra biológica que comprende células que se han tratado mediante el posible agente antitumoral y/o antiinfeccioso y una muestra biológica de control que comprende células que no se han tratado mediante el posible agente antitumoral y/o antiinfeccioso;

30 b. extraer cromatina de las células de la etapa a) y mezclarla con un tampón de nucleasa;

c. extraer ADN no empaquetado de las células de la etapa a) y mezclarlo con un tampón de nucleasa;

35 d. añadir una nucleasa específica (Bal 31) a las muestras de la etapa b) y c) para realizar la digestión del ADN telomérico;

e. inactivar la enzima de la etapa d) y purificar el ADN restante;

f. cuantificar el ADN telomérico de la etapa e) usando un ensayo basado en amplificación cuantitativa en tiempo real;

5

g. ajustar la dinámica de digestión de ADN de telómero a una curva lineal-cuadrática

$$y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2,$$

10 en donde x es el tiempo en minutos; y

h. determinar el factor de protección de cromatina definido como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras la incubación con una nucleasa durante un tiempo suficiente para conseguir un valor altamente discriminativo del factor. Alternativamente, el factor de protección de cromatina puede determinarse en el punto de tiempo específico de digestión con nucleasa más discriminativo entre las curvas.

15
20 i. comparar el factor de protección de cromatina de células tratadas con las células de control no tratadas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Ensayo de TCCA. Ensayo basado en qPCR para medir la pérdida de cantidad telomérica tras digestión enzimática con la nucleasa Bal 31. Los gráficos muestran la comparación de la tasa de pérdida de telómero tras digestiones con Bal 31 en cromatina (círculos rellenos) y ADN no empaquetado (cuadrados rellenos) en diferentes puntos de tiempo que oscilan entre 0 minutos de control y 20 minutos tras el inicio de la digestión, en la línea celular U2OS (A), T45 (B) y fibroblastos humanos (C). Los símbolos vacíos muestran cromatina (círculos) y ADN (cuadrados) de cultivos incubados con 5-azaC. Los datos representados gráficamente son la media de tres repeticiones técnicas y las barras de error representan la D.E. Las líneas de conexión muestran el ajuste lineal-cuadrático usado para obtener la ecuación de la cinética de digestión mostrada en paneles a la derecha.

35

Descripción detallada de la invención

La descripción detallada da a conocer variantes específicas y/o preferidas de las características individuales de la invención. La presente invención también contempla como realizaciones particularmente preferidas las realizaciones que se generan combinando dos o más de las variantes específicas y/o preferidas descritas para dos o más de las características de la presente invención.

Los telómeros son regiones en el extremo de los cromosomas eucariotas lineales (estructuras de cromatina especializadas) que realizan una función de ocupación de centros activos, protegiendo a los cromosomas frente a la degradación y fusión extremo con extremo. La selección como diana de telomerasa y mecanismos de mantenimiento de telómeros representa un prometedor enfoque terapéutico para enfermedades tales como cáncer (Creese Z., *et al.*, Oligonucleotides and G-quadruplex stabilizers: targeting telomeres and telomerase in cancer therapy, *Curr Pharm Des*, 29 de junio de 2014).

La presente invención se refiere a un método para determinar el factor de protección de cromatina (ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA)).

El factor de protección de cromatina es indicativo de la organización de cromatina telomérica de orden superior, lo que significa el nivel de empaquetamiento del ADN telomérico.

En el método de la presente invención, el factor de protección de cromatina se determina mediante un ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA). El método de la presente invención comprende las siguientes etapas (a) a (h).

a. Obtener una muestra biológica que comprende células;

El experto conoce medios de obtención de una muestra biológica que comprende células. En el contexto de la presente invención, una muestra biológica significa cualquier espécimen biológico procedente de un organismo vivo. Preferiblemente, la muestra biológica pertenece a un organismo eucariota. Más preferiblemente, la muestra biológica pertenece a un vertebrado, incluso más preferiblemente a un mamífero e incluso más preferiblemente a un ser humano. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen cualquier tejido que contiene ADN eucariota disponible, por ejemplo, sangre, tejido, orina,

saliva, mucosa, etc. Por ejemplo, la muestra biológica que comprende células puede tomarse de un tumor, por ejemplo puede tomarse durante biopsia o cirugía tumoral.

b. Extraer cromatina de las células de la etapa a) y mezclarla con tampón de nucleasa;

5

El experto conoce medios de extracción de cromatina de las células. Por ejemplo, puede extraerse cromatina usando el kit de extracción de cromatina ChromaFlash (Epigenetek P2001-100) según las instrucciones del fabricante (aunque puede usarse cualquier otro kit de extracción de cromatina o método interno para esta etapa), tal como se describe en detalle a continuación en la sección de materiales y método. Una vez extraída la cromatina, se mezcla con tampón de nucleasa.

c. Extraer ADN no empaquetado, desnudo, desproteínizado de las células de la etapa a) y mezclarlo con tampón de nucleasa;

15

El experto conoce medios de extracción de ADN no empaquetado de las células (ampliamente conocidos por los usuarios, es decir, Molecular Cloning. A laboratory manual ISBN-13: 978-0879693091). Por ejemplo, puede extraerse ADN no empaquetado de células tal como se describe a continuación en la sección materiales y métodos. En resumen, se recogen células, se lavan con PBS y se lisan durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 56°C en tampón de lisis (por ejemplo Tris 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, SDS al 1% y $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$) con aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K (Roche diagnostics). Posteriormente, se añaden NaCl 6 M y etanol al 100% para la precipitación de ADN para después lavarlo con etanol al 70% y resuspenderlo adicionalmente en $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$.

25

En el contexto de la presente invención, "ADN no empaquetado" se refiere a ADN que no está condensado, por tanto está desnudo, desproteínizado, sin estructura de orden superior.

30

Para la digestión de cromatina, se mezclaron 25 μl de cromatina extraída con el kit específico con 25 μl de tampón de Bal 31 (NaCl 200 mM, CaCl_2 12 mM, MgCl_2 12 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ a pH 8) y 1,2 U de nucleasa Bal 31. Para la digestión de ADN, se mezclaron 6 μl de ADN (500 ng/ μl) con 19 μl de $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$, 25 μl de tampón de Bal 31 y 1,2 U de nucleasa Bal 31.

35

La cantidad de cromatina o ADN añadida a la reacción puede ser variable dependiendo

del método de extracción o el tejido analizado.

Un tampón de nucleasa en el contexto de la presente invención se entiende como un tampón en el que la nucleasa puede realizar su actividad nucleasa. Preferiblemente, el
 5 tampón de nucleasa es tampón de nucleasa Bal 31. Preferiblemente, el tampón de Bal 31 comprende NaCl, CaCl₂, MgCl₂, Tris-HCl, EDTA, dH₂O a un pH de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10. Más preferiblemente, el tampón de Bal 31 comprende NaCl 100-300 mM, CaCl₂ 10-14 mM, MgCl₂ 10-14 mM, Tris-HCl 10-30 mM, EDTA 0,5-1,5 mM, dH₂O a un pH de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10.
 10 Incluso más preferiblemente, el tampón de Bal 31 comprende NaCl en una concentración que permite la actividad nucleasa normal pero evita precipitados de sales que interfieren con el procesamiento posterior. Preferiblemente, esa concentración de NaCl es como máximo de aproximadamente 200 mM. Incluso más preferiblemente, el tampón de Bal 31 comprende y/o consiste en NaCl aproximadamente 200 mM, CaCl₂ aproximadamente 12
 15 mM, MgCl₂ aproximadamente 12 mM, Tris-HCl aproximadamente 20 mM, EDTA aproximadamente 1 mM, dH₂O a un pH de aproximadamente 8.

d. Añadir una nucleasa a las muestras de la etapa b) y c) para realizar la digestión de los telómeros;

20

Una nucleasa en el contexto de la presente invención es una enzima que puede escindir el enlace fosfodiéster entre las subunidades de nucleótido de ácidos nucleicos. Las nucleasas pueden dividirse en exonucleasas y endonucleasas, aunque hay algunas nucleasas que se comportan como exonucleasas y endonucleasas. En una realización
 25 preferida, la nucleasa es una exonucleasa. Más preferiblemente, la actividad de la nucleasa seleccionada sobre ADN desnudo (dentro de los tiempos y las concentraciones usados) es inicialmente evidente en las secuencias teloméricas terminales pero no dentro de las secuencias internas de ADN. En una realización preferida, la nucleasa es Bal 31. Bal 31 es una nucleasa de elección para analizar con sonda la compactación de
 30 cromatina telomérica dado que se demostró que las secuencias teloméricas humanas en ADN desnudo aislado se retiraban de manera progresiva y específica mediante esta exonucleasa [13]. La nucleasa Bal 31 procede preferiblemente de *Alteromonas espejiana*. Puede obtenerse por ejemplo de New England Biolabs Inc. Se seleccionó Bal 31 porque su actividad sobre ADN desnudo dentro de los tiempos y las concentraciones usados es
 35 inicialmente evidente en las secuencias teloméricas terminales pero no dentro de las secuencias internas de ADN [13]. La nucleasa Bal 31 de *Alteromonas espejiana* (New

England Biolabs Inc) contiene dos formas cinética y molecularmente diferenciadas, rápida y lenta, que efectúan la reducción de la longitud de ADN dúplex lineales mediante una actividad exonucleasa dirigida en sentido 3'-5' junto con una actividad endonucleasa contra las colas monocatenarias que terminan en 5' generadas por la actividad
5 exonucleasa [15].

La digestión de los telómeros se lleva a cabo mediante la nucleasa que escinde los enlaces fosfodiéster entre los nucleótidos (desoxirribonucleótidos en el caso de ADN).

10 La cantidad de nucleasa presente en la muestra depende de la nucleasa empleada y la cantidad de ADN aislado. El experto entiende que la cantidad de nucleasa/ADN debe ser similar en el caso de cromatina y ADN no empaquetado. Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de entre aproximadamente 0,3 y 5 U (unidad enzimática). Una unidad enzimática se define como la cantidad de la enzima que cataliza la conversión de
15 1 micromol de sustrato por minuto. En el caso de Bal 31: una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para retirar 200 pares de bases de cada extremo de ADN de λ X174 bicatenario linealizado (40 μ g/ml) en un volumen de reacción total de 50 μ l en 10 minutos a 30°C en tampón de reacción 1X nucleasa BAL-31.

20 Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 0,3 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 0,4 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 0,5 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 0,6 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa
25 puede ser de aproximadamente 0,7 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 0,8 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 0,9 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 1 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 1,2 U
30 (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 1,4 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 1,5 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 1,6 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 1,7 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la
35 cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 1,8 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 2 U (unidad

enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 2,5 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 3 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 3,5 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 4 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 4,5 U (unidad enzimática). Por ejemplo, la cantidad de nucleasa puede ser de aproximadamente 5 U (unidad enzimática). Preferiblemente, la cantidad de nucleasa es de aproximadamente 1,2 U (unidad enzimática). Preferiblemente, la cantidad de nucleasa es de 1,2 U (unidad enzimática).

10

El experto sabe que la digestión puede realizarse en condiciones en las que la nucleasa puede realizar su actividad (temperatura, pH, sales presentes en el medio, cofactores, etc.). En el caso de la presente invención, la nucleasa realiza su actividad de escisión en presencia de un tampón adecuado (tampón de nucleasa). Por ejemplo, la reacción puede tener lugar a temperatura ambiente. Por ejemplo, la reacción tiene lugar a una temperatura de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 45°C. Por ejemplo, la reacción tiene lugar a una temperatura de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40°C. Preferiblemente, la reacción tiene lugar a una temperatura de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 35°C. Preferiblemente, la reacción tiene lugar a aproximadamente 30°C.

20

El tiempo de reacción puede ser de desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 2 h. Por ejemplo, el tiempo de reacción puede ser de desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 1 h, tal como por ejemplo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 6 minutos, aproximadamente 7 minutos, aproximadamente 8 minutos, aproximadamente 9 minutos, aproximadamente 9,5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 10,5 minutos, aproximadamente 11 minutos, aproximadamente 12 minutos, aproximadamente 13 minutos, aproximadamente 14 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 16 minutos, aproximadamente 17 minutos, aproximadamente 18 minutos, aproximadamente 19 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 35 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 120 minutos. El tiempo de reacción puede ser de más de dos horas, tal como por ejemplo, 2,5 h, 3 h, 4 h, 5 h.

30

35

Preferiblemente, el tiempo de reacción es de al menos aproximadamente 10 minutos.

En una realización preferida, la digestión de los telómeros de muestras de las etapas b) y c) se realiza añadiendo aproximadamente 1,5 U de exonucleasa Bal 31 a las muestras
5 (que comprenden tampón de Bal 31 que comprende NaCl aproximadamente 200 mM, CaCl₂ aproximadamente 12 mM, MgCl₂ aproximadamente 12 mM, Tris-HCl aproximadamente 20 mM, EDTA aproximadamente 1 mM, dH₂O a aproximadamente pH=8) durante al menos aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30°C.

10 En una realización preferida, la digestión de los telómeros de muestras de las etapas b) y c) se realiza añadiendo 1,5 U de exonucleasa Bal 31 a las muestras (que comprenden tampón de Bal 31 que comprende NaCl 200 mM, CaCl₂ 12 mM, MgCl₂ 12 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA aproximadamente 1 mM, dH₂O a pH=8) durante al menos 10 minutos a 30°C.

15

e. Inactivar la enzima de la etapa d) y purificar el ADN;

La inactivación de la enzima puede realizarse mediante diversos métodos que conoce el experto en la técnica. Por ejemplo, la inactivación puede realizarse aumentando la
20 temperatura de modo que se inactiva la nucleasa. Dependiendo de la nucleasa empleada, la temperatura de inactivación puede ser diferente. Por ejemplo, la temperatura puede ser superior a aproximadamente 50°C. Por ejemplo, puede aumentarse la temperatura hasta al menos aproximadamente 50°C. Por ejemplo, puede aumentarse la temperatura hasta al menos aproximadamente 55°C. Por ejemplo, puede
25 aumentarse la temperatura hasta al menos aproximadamente 60°C. Por ejemplo, puede aumentarse la temperatura hasta al menos aproximadamente 65°C. Por ejemplo, puede aumentarse la temperatura hasta al menos aproximadamente 70°C. Por ejemplo, puede aumentarse la temperatura hasta al menos aproximadamente 75°C. Por ejemplo, puede aumentarse la temperatura hasta al menos aproximadamente 80°C. Por ejemplo, puede
30 aumentarse la temperatura hasta al menos aproximadamente 100°C.

El tiempo de inactivación también lo conoce el experto. El tiempo de inactivación es la cantidad de tiempo necesaria para que se inactive esencialmente la enzima (que no presente esencialmente ninguna actividad enzimática). El tiempo de inactivación puede
35 variar dependiendo de la temperatura de inactivación. Por ejemplo, si la temperatura de inactivación es alta (por ejemplo de más de 60°C), el tiempo de inactivación puede ser

más corto (por ejemplo menos de 15 minutos). Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 1 hora. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 5 minutos. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 7 minutos. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 8 minutos. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 10 minutos. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 12 minutos. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 15 minutos. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 20 minutos. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 30 minutos. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 45 minutos. Por ejemplo, el tiempo de inactivación puede ser de aproximadamente 60 minutos.

Preferiblemente, la temperatura de inactivación es de aproximadamente 65°C y el tiempo de inactivación es de aproximadamente 10 minutos.

La purificación del ADN puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto. Por ejemplo, con el fin de purificar el ADN, puede añadirse la proteinasa K (EC 3.4.21.64) a las muestras e incubarse durante al menos aproximadamente 1 hora a entre 50 y 60°C. Preferiblemente, la temperatura de incubación es de aproximadamente 56°C. La incubación con proteinasa K dará como resultado la digestión esencialmente completa de las proteínas presentes en la muestra si el tiempo de incubación es largo y la concentración de proteasa es lo bastante alta. La proteinasa K se añade en un tampón adecuado. El experto conoce tampones adecuados para la actividad de proteinasa K. En resumen, se prefiere que el tampón incluya iones calcio (Ca^{2+}), preferiblemente en presencia de EDTA, a un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12, a una temperatura de entre aproximadamente 30 y 65°C, preferiblemente entre aproximadamente 37°C y 60°C, lo más preferiblemente a aproximadamente 56°C. La proteinasa K en un tampón adecuado puede obtenerse comercialmente, tal como por ejemplo de Roche Diagnostics GmbH (Alemania). Preferiblemente, la incubación se realiza con tampón de lisis con proteinasa K (Roche Diagnostics) durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 56°C.

Después, se inactiva la proteinasa K. La inactivación de la proteinasa K (que no tiene esencialmente ninguna actividad enzimática) puede realizarse por medios conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, puede aumentarse la temperatura de modo que la

proteínasa K no muestra esencialmente actividad enzimática. De manera similar a lo anterior, el tiempo de inactivación dependerá de la temperatura de inactivación. Por ejemplo, puede inactivarse la proteínasa K aumentando la temperatura por encima de 65°C. Por ejemplo, puede inactivarse la proteínasa K aumentando la temperatura hasta
 5 aproximadamente 80°C. Preferiblemente, la inactivación de la proteínasa K puede realizarse a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 15 minutos.

Puede realizarse el aislamiento de ADN mediante técnicas conocidas por el experto. Por ejemplo, puede realizarse el aislamiento de ADN mediante precipitación con etanol o
 10 isopropanol helado, kits diseñados o cualquier otro procedimiento de extracción de ADN. Por ejemplo, puede realizarse el aislamiento de ADN mediante precipitación con etanol al 100% y aumentando la fuerza iónica, añadiendo por ejemplo NaAc (acetato de sodio, CH₃COONa). Preferiblemente, el aislamiento de ADN se realiza añadiendo NaAc aproximadamente 3 M y etanol a aproximadamente el 100%.

15 Puede precipitarse el ADN. Preferiblemente, se precipita el ADN. El experto sabe cómo precipitar ADN, por ejemplo manteniéndolo a temperaturas bajas (por ejemplo desde 0°C hasta -80°C, o desde -20°C hasta -80°C, por ejemplo a aproximadamente -20°C durante un periodo de tiempo suficiente para su precipitación, tal como 5 h, 8 h, 10 h, 15 h, 24 h,
 20 48 h o más). Por ejemplo, el ADN puede precipitarse durante la noche a aproximadamente -20°C. El sedimento puede limpiarse opcionalmente por ejemplo con etanol a aproximadamente el 70% y resuspenderse en dH₂O. Preferiblemente, el sedimento se limpia con etanol a aproximadamente el 70% y se resuspende en dH₂O.

25 f. Cuantificar el ADN de la etapa e) usando un ensayo basado en amplificación cuantitativa en tiempo real;

El ADN puede cuantificarse usando técnica conocidas en la técnica tales como por ejemplo mediante ensayo basado en amplificación cuantitativa en tiempo real. El ensayo
 30 basado en amplificación cuantitativa en tiempo real es una técnica común en biología molecular y el experto está familiarizado con la misma. Puede realizarse tal como se describe en [9] (R.M. Cawthon, Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method, Nucleic Acids Res. 37 (2009)).

35 Este método mide la razón promedio de la cantidad telomérica para un número de copias de gen individual (por ejemplo, U6) [16] y con respecto a su control en el punto de tiempo

de 0 minutos usando el método de 2^{-Ct} . Para comparaciones fiables, el C_t promedio del número de copias de telómero se relacionó con el de un gen de número de copias individual. El valor de umbral se estableció en la parte inicial de la fase exponencial de las curvas de amplificación. El cruce de esta línea con la curva define los valores de C_t para
5 todas las muestras. Se analizaron los C_t usando 2^{-Ct} . El método de 2^{-Ct} se describe en detalle por Livak *et al.* (Methods 2001, 25:402-408). (C_t = valores de umbral de ciclo). También pueden encontrarse detalles del método de cálculo de 2^{-Ct} en: boletín de usuario n.º 2 de Applied Biosystems (P/N 4303859).

10 La secuencia de número de copias individual usada para el ensayo es específica de la especie y debe seleccionarse usando bases de datos.

El ensayo de qPCR telomérico convencional se establece para medir la longitud de telómero en diferentes individuos o poblaciones de células.

15

Para comparaciones fiables, la razón promedio del número de copias de telómero puede relacionarse con un número de copias de gen individual (razón T/S) en cada muestra. Esto es un control para la cantidad de ADN.

20 Alternativamente, la evaluación de la disminución de telómero puede realizarse en la misma población de células, comenzando siempre con una cantidad similar de secuencias teloméricas en promedio. Esta opción es la preferida.

La cantidad del número de copias de gen individual (preferiblemente el gen U6, tal como
25 se describió anteriormente) no debe modificarse por la digestión. Si se usa este enfoque, no se necesita la razón T/S. La evaluación del número de copias de gen individual es útil como control de la actividad nucleasa exclusivamente sobre extremos teloméricos terminales, por tanto no se degrada el ADN ni la cromatina.

30 Se obtiene una disminución relativa de secuencias teloméricas dividiendo el C_t resultante tras cada tiempo de digestión con respecto al de a tiempo 0.

El experto sabe cómo diseñar los cebadores para realizar el ensayo basado en amplificación cuantitativa en tiempo real.

35

Preferiblemente, los cebadores específicos para el telómero pueden ser los siguientes:

(i) directo: 5' CGGTTTGTGGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT 3';

(ii) inverso: 5' GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT 3',

5 o una secuencia con una identidad de más del 60%, preferiblemente más del 75%, preferiblemente más del 85%, preferiblemente más del 90%, preferiblemente más del 95% y lo más preferiblemente más del 99% con las secuencias (i) y/o (ii).

Pueden existir variantes de secuencia de telómero en otra especie de modo que los
10 cebadores deben modificarse en consecuencia.

Si el número de copias de gen individual es U6 (ARN de espliceosoma de U6, Ensembl versión ENSMEUG00000016912.1), los cebadores pueden ser los siguientes:

15 (i) directo: 5' GGAATCTAGAACATATACTAAAATTGGAAC 3';

(ii) inverso: 5' GAACTCGAGTTTGCCTGTCATCCTTGCGC 3',

o una secuencia con una identidad de más del 60%, preferiblemente más del 75%,
20 preferiblemente más del 85%, preferiblemente más del 90%, preferiblemente más del 95% y lo más preferiblemente más del 99% con las secuencias (i) y (ii).

La cuantificación del ADN (cromatina y no empaquetado) se realiza en los puntos de
tiempo seleccionados (tras la digestión con la nucleasa, tal como se describió
25 anteriormente).

g. Ajustar la dinámica de digestión de ADN de telómero a una curva lineal-cuadrática $y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2$.

30 en donde x es el tiempo en minutos.

“y” se define como el “cambio de telómero relativo”, obtenido experimentalmente para cada punto de tiempo, y B₀, B₁ y B₂ son constantes que pueden calcularse basándose en los datos obtenidos.

35

h. Determinar el factor de protección de cromatina

Puede realizarse un seguimiento de la cinética de digestión con nucleasa (por ejemplo Bal 31, tal como se describió anteriormente) en el tiempo cuantificando las secuencias teloméricas restantes usando preferiblemente el procedimiento de qPCR telomérica específica (tal como se describe por ejemplo en [9]).

5

El ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) se realiza en cromatina nativa. La accesibilidad y la tasa de digestión de ADN telomérico mediante la nucleasa (preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente) puede relacionarse con el nivel de compactación de cromatina, de modo que puede derivarse un factor de protección de cromatina telomérica específico a partir de la comparación con la cinética de digestión del mismo ADN pero desnudo, desproteínizado, sin estructura de orden superior.

Durante la reacción de qPCR un software mide normalmente para cada muestra el número de ciclos al que la fluorescencia (indicador de amplificación por PCR) cruza una línea arbitraria, el umbral. Este punto de cruce es el valor de Ct. El valor de umbral puede establecerse preferiblemente en la parte inicial de la fase exponencial de las curvas de amplificación. El cruce de esta línea con la curva define los valores de Ct para todas las muestras. Ct puede analizarse usando, por ejemplo, $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tal como se describe en [17].

20

El factor de protección de cromatina definido como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras la incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, durante un tiempo suficiente para conseguir un valor altamente discriminativo del factor. Alternativamente el factor de protección de cromatina puede determinarse en el punto de tiempo específico de digestión con nucleasa más discriminativo entre las curvas.

Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras entre 0,5 y 60 minutos (dependiendo de la especie, por tanto el tamaño telomérico de la muestra analizada), tal como por ejemplo entre 5 y 30 minutos, tal como por ejemplo entre 7 y 20 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente (cromatina/ADN).

Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a

digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 5 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

5 Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 7 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

10 Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 8 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

15 Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 9 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

20 Preferiblemente, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 10 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

25 Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 11 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

30 Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 12 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

35 Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 15 minutos de incubación

con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a
5 digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 20 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

Por ejemplo, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a
10 digestión de ADN desnudo tras por ejemplo aproximadamente 30 minutos de incubación con una nucleasa, preferiblemente Bal 31, tal como se describió anteriormente.

Además, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre la pendiente de la curva ($y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2$) en su fase lineal (B1 de
15 cromatina/B1 de ADN).

Además, el factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre la pendiente de la curva ($y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2$) en su fase cuadrática (B2 de
20 cromatina/B2 de ADN).

El factor de protección de cromatina puede definirse y calcularse como la razón entre resultados de cromatina y ADN en el punto de tiempo específico de la digestión con nucleasa más discriminativo entre las curvas, es decir 10 min tras comenzar la digestión con Bal 31.
25

El método de la presente invención puede comprender opcionalmente una etapa adicional de guardar la información obtenida en un soporte tal como un soporte de datos. Por ejemplo, puede guardarse información referente al factor de protección de cromatina en un soporte de datos (por ejemplo un medio, seleccionado para grabar y/o transportar
30 y/o comunicar datos), tal como en un soporte de datos electrónico (por ejemplo CD, pendrive, disco duro, un ordenador (hardware/software), etc.). También puede ser un soporte de datos no electrónico tal como un trozo de papel.

Preferiblemente, el método de la presente invención comprende una etapa de guardar la
35 información en un soporte, preferiblemente un soporte de datos electrónico.

El método de la presente invención (ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA)) puede ser un método de diagnóstico (ensayo) de inestabilidad genómica. El método de la presente invención tal como se describió anteriormente puede comprender además una etapa de obtener un resultado del método mediante comparación del factor de protección de cromatina con un factor de protección de cromatina de control indicativo de la estabilidad genómica y/o inestabilidad genómica, siendo el control de tal factor el tejido sano no afectado dentro de un paciente o, si no está disponible, la media de un número selectivo de donantes sanos.

5

10

El diagnóstico puede entenderse como la identificación de la naturaleza y la causa de un determinado estado, tal como estabilidad/inestabilidad genómica, una determinada enfermedad, etc.

15

El método de la presente invención (ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA)) puede ser un método de pronóstico (ensayo). El método de la presente invención tal como se describió anteriormente puede comprender además una etapa de obtener un resultado del método mediante comparación del factor de protección de cromatina con un factor de protección de cromatina de control, en el que el resultado proporciona información sobre la predicción del transcurso y desenlace de una enfermedad o un estado. El método puede predecir el envejecimiento así como la progresión o control de carcinogénesis tras un tratamiento con fármaco controlando los cambios en la estabilidad de telómeros del tejido sometido a ensayo usando como indicador los cambios en el factor de protección de cromatina. Por ejemplo, el método de la presente invención puede ayudar a predecir el transcurso de una enfermedad tal como cáncer mediante comparación del factor de protección de cromatina de un tejido afectado (por ejemplo tumor) con el factor de protección de cromatina de un tejido no afectado. Por ejemplo, el método de la presente invención puede ayudar a predecir el transcurso de una enfermedad tal como cáncer mediante comparación del factor de protección de cromatina de un paciente afectado (por ejemplo en líquidos biológicos tales como sangre, orina, etc.) con el factor de protección de cromatina del tejido circundante no afectado o mediante comparación del mismo con un paciente no afectado (preferiblemente en el mismo líquido biológico). Por ejemplo, el método de la presente invención puede ayudar a predecir el transcurso de una enfermedad tal como una infección comparando el factor de protección de cromatina de un paciente afectado (infectado) (por ejemplo en líquidos biológicos tales como sangre, orina, etc., tejido, mucosa, saliva, etc.) con el factor de protección de cromatina de un paciente no afectado (no infectado). Por ejemplo, el

20

25

30

35

método de la presente invención puede ayudar a predecir el transcurso de un estado tal como el envejecimiento.

Además, la presente invención proporciona el método de la presente invención como un
5 método de examen, preferiblemente para examinar agentes antitumorales y/o agentes antiinfecciosos.

Por ejemplo, el agente antitumoral puede ser un agente de alteración de la estructura de telómero. Por tanto, estudiando la estabilidad del telómero al nivel de organización
10 superior puede predecirse cuánto está afectando el agente antitumoral o antiinfeccioso a la estructura telomérica y por tanto puede ser un indicador de la inestabilidad o envejecimiento de esas células. El aumento de la inestabilidad telomérica puede desencadenar la senescencia y por tanto afectar a la progresión tumoral o afectar al transcurso de la infección.

15 El posible agente antitumoral o antiinfeccioso puede incubarse con células/tejido antes de realizar el método (ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA)) de la presente invención. Las condiciones de incubación dependen del agente usado, y puede ser necesario optimizar las condiciones de incubación para cada agente. Puede haber un
20 control negativo (células/tejidos no tratados) con el que debe compararse el factor de protección de cromatina obtenido. Realizando el método de la presente invención, puede obtenerse información referente a la influencia de los posibles agentes (por ejemplo si previenen la degradación de los telómeros, o si aceleran la degradación de los telómeros, o si no tienen ninguna influencia sobre la tasa de degradación de los telómeros). Esta
25 información puede ser útil para determinar si un posible agente tiene influencia en el empaquetamiento de los telómeros, y puede considerarse como un agente anticancerígeno y/o antiinfeccioso.

“Uno o más”, tal como se usa en el presente documento, incluye uno y la especificación
30 individualizada de cualquier número que es mayor que uno, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc. “Más de uno” o “varios”, tal como se usan en el presente documento, incluye la especificación individualizada de cualquier número que es mayor que uno, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc.

35 A menos que se especifique expresamente lo contrario, el término “que comprende” se usa en el contexto de este documento para indicar que opcionalmente pueden estar

presentes miembros adicionales además de los miembros de la lista introducida por “que comprende”. Sin embargo, se contempla como una realización específica de la presente invención que el término “que comprende” abarca la posibilidad de que no esté presente ningún miembro adicional, es decir con los fines de esta realización, se entiende que “que
5 comprende” tiene el significado de “constituido por”.

Ejemplos

1. Material y métodos

10

1.1. Cultivos celulares

15

20

25

30

Se usaron dos líneas celulares de cáncer, U-2 OS humana (ATCC® HTB-96™) de la colección ATCC y T45 de ratón, y fibroblastos humanos primarios. T45 se derivó de osteoblastos de ratón primarios transformados espontáneamente *in vitro* que volvieron a inyectarse en un ratón BALB/c como un explante. Tras la formación del tumor, se explantó de nuevo el tumor maligno en una placa de cultivo tisular y se estableció como una línea celular osteoblástica maligna de ratón. Se explantaron fibroblastos humanos primarios de una amputación en osteoartritis de un hombre de 80 años de edad en el Complejo Hospitalario Universitario A Coruña con procedimientos convencionales actuales. Se obtuvo el consentimiento informado. Se aprobó el estudio por el Comité Ético de la Administración Sanitaria gallega y todas las muestras se obtuvieron en el Hospital Universitario A Coruña. Se realizó la explantación a partir de piel cultivada en DMEM complementado con FCS al 10% con placas de 6 pocillos hasta que se alcanzó la
confluencia celular se realizó el pase posterior. Se comprobó el linaje fibroblástico con anticuerpos anti-fibroblásticos, alcanzando una tinción del 90%. Se mantuvieron los cultivos en medio DMEM (Gibco, Life Technologies) con FCS al 10% (Biowest SAS) sin antibióticos, incubándose los cultivos apropiados durante 24 h con 5-azaC 0,4 μ M antes de la recogida.

1.2. Extracción de cromatina y ADN

35

Se extrajo la cromatina de $1,5 \times 10^6$ células usando el kit de extracción de cromatina. Se extrajo la cromatina de $1,5 \times 10^6$ células usando el kit de extracción de cromatina ChromaFlash (Epigenetek P2001-100) según las instrucciones del fabricante. Se aisló el ADN no empaquetado de $1,5 \times 10^6$ células lisadas durante 1 hora a 56°C en tampón de

lisis (Tris 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, SDS al 1% y d_2H_2O) con 50 μ g/ml de proteinasa K (Roche diagnostics). Posteriormente, se precipitó ADN en sal/etanol y se lavó en etanol al 70% y se resuspendió adicionalmente en d_2H_2O .

5 **1.3. Digestión enzimática con Bal 31**

La nucleasa Bal 31 de *Alteromonas espejiana* (New England Biolabs Inc) contiene dos formas cinética y molecularmente distintas, rápida y lenta, que efectúan la reducción de la longitud de los ADN dúplex lineales mediante una actividad exonucleasa dirigida en
 10 sentido 3'-5' junto con una actividad endonucleasa contra las colas monocatenarias que terminan en 5' generadas por la actividad exonucleasa [15]. Se seleccionó Bal 31 porque su actividad sobre el ADN desnudo dentro de los tiempos y las concentraciones usados es evidente inicialmente en las secuencias teloméricas terminales pero no dentro de las secuencias internas de ADN [13]. De hecho, el Ct del gen U6 no resultó afectado por la
 15 digestión con Bal 31 en cada experimento. Se diseñó un tampón de Bal 31 interno, que era similar al recomendado por el fabricante con la excepción de que se redujo la concentración de NaCl hasta 200 mM. Esto permitió la actividad exonucleasa normal pero evitando precipitados de sal que interfieren con el procesamiento posterior.

20 Se usaron dos configuraciones diferentes para o bien la cromatina o bien el ADN no empaquetado.

Para la cromatina: se mezclaron 25 μ l de la cromatina extraída con 25 μ l de tampón de Bal 31 interno (NaCl 200 mM, $CaCl_2$ 12 mM, $MgCl_2$ 12 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM,
 25 d_2H_2O a pH=8). Se diseñó un tampón de Bal 31 interno, que era similar al recomendado por el fabricante con la excepción de que se redujo la concentración de NaCl hasta 200 mM. Esto permitió la actividad exonucleasa normal pero evitando precipitados de sal que interfieren con el procesamiento posterior.

30 Para el ADN: se mezclaron 6 μ l de ADN (500 ng/ μ l) con 19 μ l de d_2H_2O y 25 μ l de tampón de Bal 31 interno.

Tras estas configuraciones, se añadió la nucleasa Bal 31 (1,2 U) a cada muestra. Se realizó la digestión a 30°C durante los tiempos deseados (es decir, para las líneas
 35 celulares sometidas a ensayo: 0, 5, 10, 15 y 20 minutos). Se realizó la inactivación enzimática a 65°C durante 10 minutos y posteriormente se añadió el tampón de lisis con

proteínasa K (Roche diagnostics) a las muestras y se incubaron 1 hora a 56°C. Se realizó la inactivación de la proteínasa K a 80°C durante 15 minutos. Se realizó la purificación del ADN añadiendo NaAc 3 M y etanol al 100%. Se realizó la precipitación de ADN durante la noche a -20°C. Se limpió el sedimento con etanol al 70% y se resuspendió en dH_2O .

5

1.4. Cuantificación de telómeros

Se realizó la amplificación en tiempo real de la secuencia de telómeros usando un ensayo de base cuantitativa (qPCR) [9]. Este método mide la razón promedio de la cantidad telomérica con respecto a un número de copias de gen individual (U6) [16] y en relación con su control de punto de tiempo de 0 minutos usando el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$. El método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ se describe en detalle por Livak *et al.* (Methods 2001, 25:402-408). (Ct = Valores de umbral de ciclo). También pueden encontrarse detalles del método de cálculo de $\Delta\Delta\text{Ct}$ en el boletín de usuario n.º 2 de Applied Biosystems (P/N 4303859).

15

Se estableció el ensayo de qPCR telomérico convencional para medir la longitud del telómero en diferentes individuos o poblaciones de células. Entonces, para obtener comparaciones fiables, se relacionó la razón promedio del número de copias de telómero con un número de copias de gen individual (razón T/S) en cada muestra. Esto es un control de la cantidad de ADN. En este estudio, aunque la razón T/S podía establecerse de manera similar, se realiza la evaluación de la disminución de telómero en la misma población de células, comenzando siempre con una cantidad similar de secuencias teloméricas en promedio. La cantidad del gen U6 no se modificó por la digestión. Entonces, la razón T/S no es necesaria aunque la evaluación del gen U6 sea útil como control de la actividad de Bal 31 exclusivamente en los extremos teloméricos terminales, por lo que no se degrada ni el ADN ni la cromatina. Se obtiene una disminución relativa de secuencias teloméricas dividiendo el Ct resultante tras cada tiempo de digestión con respecto al de a tiempo 0.

30

Esto se realizó usando un termociclador LightCycler (LightCycler 480, Roche Diagnostics, Werk Penzberg, Alemania). Se amplificaron las muestras de ADN por duplicado en reacciones de PCR de 10 μl que incluían 2,5 μl de ADN de muestra, 5 μl del kit de ADN master SYBR Green I (LightCycler® 480 Sybr Green I Master, Roche Diagnostics) y 5 mM de cebadores específicos para el telómero (directo: 5'CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT 3'; inverso 5' GGCTTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT 3') y 10 mM para el U6

35

(directo: 5' GGAATCTAGAACATATACTAAAATTGGAAC 3'; inverso: 5' GAACTCGAGTTTGCGTGTGCATCCTTGCGC 3'). La ciclación térmica de 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos fue seguida por 40 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 62°C durante 1 minuto y 75°C durante 15 segundos.

5

1.5. Manejo de datos y análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron tres veces. Se analizaron los datos de PCR usando el software GraphPad Prism de Graph Pad Software, Inc. y el software SPSS de IBM. Durante la reacción de qPCR, un software normalmente mide para cada muestra el número de ciclos al que la fluorescencia (indicador de amplificación de PCR) cruza una línea arbitraria, el umbral. El punto de cruce es el valor de Ct. El valor de umbral se estableció en la parte inicial de la fase exponencial de las curvas de amplificación. El cruce de esta línea con la curva define los valores de Ct para todas las muestras, tal como se explicó anteriormente. Los Ct se analizaron usando $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [17].

Se ajustó la dinámica de digestión de ADN de telómero a una curva lineal-cuadrática $y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2$ ($R^2 \geq 0,90$) en donde "x" es el tiempo en minutos. El factor de protección de cromatina se estableció como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras 10 minutos de incubación con Bal 31. Se compararon los coeficientes de las curvas usando la prueba de F en Graph Pad. La significación se definió como $p < 0,05$.

Todos los experimentos se realizaron usando tres repeticiones técnicas. Se analizaron los datos de qPCR usando el software GraphPad Prism de Graph Pad Software, Inc. y el software SPSS de IBM. Para comparaciones fiables, se relacionó el C_t promedio del número de copias de telómero con el de un gen de número de copias individual. El valor de umbral se estableció en la parte inicial de la fase exponencial de las curvas de amplificación. El cruce de esta línea con la curva define los valores de Ct para todas las muestras. Los Ct se analizaron usando $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [17].

Se ajustó la dinámica de digestión de ADN de telómero a una curva lineal-cuadrática $y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2$ ($R^2 \geq 0,90$) en donde x es el tiempo de la digestión con Bal 31 en minutos, B0 es la constante, B1 es la componente lineal y B2 es la componente cuadrática de tal ecuación. El factor de protección de cromatina se estableció como la razón entre la digestión de cromatina frente a la digestión de ADN desnudo tras 10

minutos de incubación con Bal 31. Se compararon los coeficientes de las curvas usando la prueba de F en Graph Pad. La significación se definió como $p < 0,05$.

2. Resultados

5

La figura 1 muestra las curvas cinéticas de la digestión con Bal 31 de secuencias de ADN telomérico en ADN aislado y en cromatina de U2OS, T45 y fibroblastos humanos. Debe indicarse que mientras que el ADN telomérico disminuyó, el gen de control interno U6 no apareció significativamente digerido con el tiempo de incubación. Los datos se ajustaron notablemente a una curva descendente lineal-cuadrática, aunque también fue adecuado el ajuste a una curva lineal descendente, principalmente para cromatina.

10

En el caso del ADN desnudo, la componente lineal fue inicialmente predominante y una componente cuadrática baja fue más evidente en puntos de tiempo posteriores. Por tanto, la tasa de digestión del ADN no empaquetado fue inicialmente rápida, pero tendió a ralentizarse progresivamente en los momentos finales. No fueron evidentes diferencias significativas entre U2OS y T45 ($p = 0,072$). Los fibroblastos humanos parecieron digerirse significativamente más rápido sólo cuando se compararon con T45 ($p < 0,0001$). La adición de 5-azaC a los cultivos no modificó significativamente la cinética de digestión de ADN de telómero cuando no estaba empaquetado, tal como se esperaba.

15

20

La digestión de ADN telomérico en cromatina organizada se ajustó predominantemente a una línea recta descendente lineal, siendo insignificante la componente cuadrática, en los tres tipos de células examinados. Las curvas de digestión de cromatina fueron significativamente más lentas cuando se compararon con las del ADN respectivo no empaquetado ($p < 0,0001$). El factor de protección de cromatina establecido a los 10 min de actividad de Bal 31 mostró que la organización de cromatina del telómero disminuyó la tasa de digestión de secuencias de ADN telomérico 2,3 veces en la línea celular U2OS, 1,7 veces en la línea celular T45 y 1,9 veces en los fibroblastos.

25

30

En la figura 1 se muestran las curvas cinéticas de la digestión con Bal 31 de secuencias de ADN telomérico tanto en cromatina como en ADN aislado de U2OS, T45 y fibroblastos humanos. Debe hacerse hincapié en que el ADN del gen de control interno U6 permaneció estable, mientras que el contenido del ADN telomérico disminuyó. Los datos cinéticos se ajustaron a una curva descendente lineal-cuadrática, aunque también fue adecuada una curva lineal descendente, principalmente para cromatina. En el caso de

35

ADN desnudo, la componente lineal fue inicialmente predominante haciéndose evidente una componente cuadrática en los puntos de tiempo posteriores. Por tanto, la tasa de digestión del ADN no empaquetado fue inicialmente rápida, pero tendió a ralentizarse progresivamente en los momentos finales. No fueron evidentes diferencias significativas entre U2OS y T45 ($p=0,072$) en ADN desnudo. Los fibroblastos humanos se digirieron significativamente más rápido sólo cuando se compararon con la línea celular de ratón T45 ($p<0,0001$). La cinética no fue significativamente diferente de la de la línea celular U2OS. La adición de 5-azaC a los cultivos no modificó significativamente la cinética de digestión de ADN de telómero cuando no estaba empaquetado, tal como se esperaba.

10

En los tres tipos de células examinados, la digestión de ADN telomérico en cromatina organizada pudo describirse mediante una relación lineal con una componente cuadrática insignificante. La digestión de cromatina fue significativamente más lenta cuando se comparó con la de muestras respectivas de ADN no empaquetado ($p<0,0001$). El factor de protección de cromatina establecido tras 10 min de actividad de Bal 31 mostró que la presencia de organización de cromatina disminuyó la tasa de digestión de secuencias de ADN telomérico 2,3 veces en la línea celular U2OS, 1,7 veces en la línea celular T45 y 1,9 veces en los fibroblastos.

15

Cuando se añadió 5-azaC al cultivo durante 24 horas, la componente lineal de la curva de digestión de cromatina se mantuvo predominante, pero fue evidente una componente cuadrática en los puntos de tiempo posteriores. El factor de protección de cromatina registrado tras el tratamiento con fármaco fue significativamente inferior al de la cromatina nativa sin 5-azaC cuando se comparó con ADN no empaquetado, para U2OS (aumento de 1,6 veces), T45 (aumento de 1,2 veces) y fibroblastos humanos (aumento de 1,4 veces).

20

25

Las curvas cinéticas del ADN telomérico aislado sugieren una tasa de digestión rápida inicial que disminuye ligeramente en los momentos finales. Cuando el ADN telomérico se organiza en la cromatina nativa, la tasa de digestión es prácticamente homogénea durante todo el tiempo de incubación, lo que sugiere que no hay diferencias claras en la organización de cromatina a lo largo del telómero, dentro de la sensibilidad del ensayo. Comparando la digestión de las secuencias de ADN telomérico en conformación o bien no empaquetada o bien empaquetada, se obtiene el factor de protección de cromatina. Esto corresponde al efecto obstructivo ejercido por la organización de cromatina de orden superior del telómero en la actividad de Bal 31 en las secuencias de ADN secuencias

30

35

donde se localiza. La restricción de la accesibilidad y la actividad de exonucleasa es una medida indirecta del nivel de empaquetamiento de la cromatina telomérica. Los valores fueron los más discriminativos a los 10 min de digestión, por lo que se estableció el factor de protección en este punto de tiempo específico.

5

Tratamiento con 5-azaC

Para demostrar la capacidad discriminativa del ensayo, se incubaron los cultivos con el agente desmielinizante de ADN, 5-azaC, un inhibidor de la actividad ADN metiltransferasa (DNMT). La metilación de ADN en la posición 5 de la citosina en los sitios CpG es una modificación epigenética predominante en el genoma eucariota [18–20]. En cultivo celular, a niveles de dosis suficientemente bajos como para evitar desencadenar la muerte celular, la incorporación de 5-azaC en el ADN conduce a la pérdida rápida de actividad DNMT ya que la enzima se une irreversiblemente a residuos de 5-azaC en el ADN [24, 25]. La pérdida de metilación de ADN puede dar como resultado entonces la activación transcripcional asociada a una conformación de cromatina más abierta.

En los cultivos celulares sometidos a ensayo en esta invención, 24 h tras la exposición al fármaco, los niveles de digestión telomérica aumentaron de manera espectacular en el caso de los ensayos de cromatina, mientras que no se encontró variación significativa en las preparaciones de ADN desnudo cuando se comparó con sus homólogos no tratados. La cromatina extraída de los cultivos expuestos al fármaco tuvo cinética de digestión más rápida cuando se comparó con los homólogos no tratados en los tiempos sometidos a ensayo. El efecto protector de la organización de la cromatina, medido por el factor de protección de cromatina, disminuyó tras el tratamiento con el fármaco, reduciéndose en 1,4 veces con respecto a sus homólogos de cromatina de tipo natural. Tales valores fueron significativamente inferiores a los encontrados para la cromatina de tipo natural. Esto demuestra que la desmetilación de los residuos de citosina transformaba la cromatina cerrada compacta en un estado más abierto haciéndola más accesible para la exonucleasa.

Aunque el dinucleótido CpG está ausente en las secuencias teloméricas, las repeticiones subteloméricas son ricas en sitios CpG altamente metilados [21]. Esto podría reforzar el efecto de colocación de telómeros, en el que el telómero muestra la capacidad de silenciar genes que están ubicados en regiones subteloméricas circundantes [22]. La

metilación de ADN subtelomérico disminuye junto con el acortamiento de telómeros en ratones deficientes sin telomerasa. Por tanto, la cromatina telomérica y subtelomérica pierde características heterocromáticas lo que conduce a un estado de cromatina más abierto con el envejecimiento [23].

5

La hipometilación inducida por 5-azaC en linfocitos T humanos normales activados con PHA se asocia con una alta frecuencia de asociaciones de telómero [27]. El TCCA evidenció una disminución significativa del CPF frente a la digestión con Bal 31 tras la incubación con 5-azaC en todos los tipos de células analizados. Por tanto, tras el tratamiento con 5-azaC, la cromatina telomérica pareció ser más accesible a la nucleasa, por lo que presumiblemente no está tan estrechamente organizada como en el estado de cromatina nativa. Esto podría ser potencialmente la causa principal de las asociaciones de telómero aumentadas notificadas en linfocitos.

10

15 En conjunto, estos resultados apoyan la capacidad del TCCA para evidenciar diferencias en los niveles de empaquetamiento del ADN telomérico y confirman la influencia de los niveles de metilación del ADN subtelomérico en la conformación de la cromatina telomérica.

20 Por consiguiente, puede establecerse una evaluación de la compactación de cromatina de orden superior en los telómeros comparando la cinética de la digestión con exonucleasa Bal 31 del ADN de telómero en cromatina aislada con la del ADN desnudo cuantificadas por qPCR. El CPF refleja la limitación de la accesibilidad y la actividad de la exonucleasa por la estructura de la cromatina telomérica. Este factor se reduce tras la incubación con el agente desmetilante 5-azaC, lo que verifica el papel de la metilación del ADN subtelomérico en la conformación de la cromatina telomérica. Por tanto, el ensayo TCCA de la presente invención es de interés, entre otras cosas, para evaluar el efecto de agentes terapéuticos diseñados para alterar la estructura del telómero. Pueden aplicarse potencialmente variaciones del ensayo en cualquier región genómica dada.

25

30

Bibliografía

[1] J.M. Zijlmans, U.M. Martens, S.S. Poon, A.K. Raap, H.J. Tanke, R.K. Ward, *et al.*, Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 7423–8.

35

- [2] S.M. Bailey, J.P. Murnane, Telomeres, chromosome instability and cancer., *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 2408–2417. doi:10.1093/nar/gkl303.
- [3] A. Galati, E. Micheli, S. Cacchione, Chromatin structure in telomere dynamics., *Front. Oncol.* 3 (2013) 46. doi:10.3389/fonc.2013.00046.
- [4] S. Schoeftner, M.A. Blasco, A “higher order” of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs., *EMBO J.* 28 (2009) 2323–2336. doi:10.1038/emboj.2009.197.
- [5] M.A. Blasco, The epigenetic regulation of mammalian telomeres., *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 299–309. doi:10.1038/nrg2047.
- [6] S. Gonzalo, I. Jaco, M.F. Fraga, T. Chen, E. Li, M. Esteller, *et al.*, DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells., *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 416–24. doi:10.1038/ncb1386.
- [7] E. Cusanelli, P. Chartrand, Telomeric noncoding RNA: telomeric repeat containing RNA in telomere biology., *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 5 (2014) 407–19. doi:10.1002/wrna.1220.
- [8] C. Frias, J. Pampalona, A. Genesca, L. Tusell, Telomere dysfunction and genome instability., *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 17 (2012) 2181–96.
- [9] R.M. Cawthon, Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method., *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) e21. doi:10.1093/nar/gkn1027.
- [10] A. Sfeir, T. de Lange, Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem., *Science.* 336 (2012) 593–7. doi:10.1126/science.1218498.
- [11] J.L. Fernández, V.J. Goyanes, J. Ramiro-Díaz, J. Gosálvez, Evidence of a differential organization of chromatin containing terminal or interstitial (TTAGGG)_n repeats by in situ digestion with nucleases., *Cytogenet. Cell Genet.* 82 (1998) 195–8.
- [12] P. Wu, T. de Lange, No overt nucleosome eviction at deprotected telomeres., *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 5724–35. doi:10.1128/MCB.01764-07.

- [13] R.K. Moyzis, J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, *et al.*, A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 6622–6.
- 5
- [14] K. Ghoshal, J. Datta, S. Majumder, S. Bai, H. Kutay, T. Motiwala, *et al.*, 5-Azadeoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal., *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 4727–41.
doi:10.1128/MCB.25.11.4727-4741.2005.
- 10
- [15] X.G. Zhou, H.B. Gray, Mechanism of exonuclease action of BAL 31 nuclease., *Biochim. Biophys. Acta.* 1049 (1990) 83–91.
- 15
- [16] G. Zheng, H. Wang, X. Zhang, Y. Yang, L. Wang, L. Du, *et al.*, Identification and validation of reference genes for qPCR detection of serum microRNAs in colorectal adenocarcinoma patients., *PLoS One.* 8 (2013) e83025.
doi:10.1371/journal.pone.0083025.
- 20
- [17] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method., *Methods.* 25 (2001) 402–8.
doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [18] J.A. Hackett, J.P. Reddington, C.E. Nestor, D.S. Dunican, M.R. Branco, J. Reichmann, *et al.*, Promoter DNA methylation couples genome-defence mechanisms to epigenetic reprogramming in the mouse germline., *Development.* 139 (2012) 3623–32.
doi:10.1242/dev.081661.
- 25
- [19] S. Feng, S.E. Jacobsen, W. Reik, Epigenetic reprogramming in plant and animal development., *Science.* 330 (2010) 622–7. doi:10.1126/science.1190614.
- 30
- [20] A. Bird, DNA methylation patterns and epigenetic memory., *Genes Dev.* 16 (2002) 6–21. doi:10.1101/gad.947102.
- [21] R. Benetti, S. Gonzalo, I. Jaco, G. Schotta, P. Klatt, T. Jenuwein, *et al.*, Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination., *J.*
- 35

Cell Biol. 178 (2007) 925–36. doi:10.1083/jcb.200703081.

[22] J.A. Baur, Y. Zou, J.W. Shay, W.E. Wright, Telomere position effect in human cells., Science. 292 (2001) 2075–7. doi:10.1126/science.1062329.

5

[23] R. Benetti, M. García-Cao, M.A. Blasco, Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres., Nat. Genet. 39 (2007) 243–50. doi:10.1038/ng1952.

10

[24] J.K. Christman, 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy., Oncogene. 21 (2002) 5483–95. doi:10.1038/sj.onc.1205699.

15

[25] J.K. Christman, N. Mendelsohn, D. Herzog, N. Schneiderman, Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60)., Cancer Res. 43 (1983) 763–9.

20

[26] K. Ghoshal, J. Datta, S. Majumder, S. Bai, X. Dong, M. Parthun, *et al.*, Inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter by activating the transcription factor MTF-1 and forming an open chromatin structure., Mol. Cell. Biol. 22 (2002) 8302–19.

25

[27] E. Viegas-Péquignot, B. Dutrillaux, Segmentation of human chromosomes induced by 5-ACR (5-azacytidine)., Hum. Genet. 34 (1976) 247–54.

[28] B.O. Farnung, E. Giulotto, C.M. Azzalin, Promoting transcription of chromosome ends., Transcription. 1 (2010) 140–143. doi:10.4161/trns.1.3.13191.

30

[29] Z. Crees, J. Girard, Z. Rios, G.M. Botting, K. Harrington, C. Shearrow, *et al.*, Oligonucleotides and G-quadruplex Stabilizers: Targeting Telomeres and Telomerase in Cancer Therapy., Curr. Pharm. Des. (2014).

35

[30] M. Ruden, N. Puri, Novel anticancer therapeutics targeting telomerase., Cancer Treat. Rev. 39 (2013) 444–56. doi:10.1016/j.ctrv.2012.06.007.

[31] T. Miyazaki, Y. Pan, K. Joshi, D. Purohit, B. Hu, H. Demir, *et al.*, Telomestatin impairs

glioma stem cell survival and growth through the disruption of telomeric G-quadruplex and inhibition of the proto-oncogene, c-Myb., *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 1268–80. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1795.

- 5 [32] B. Li, Telomere components as potential therapeutic targets for treating microbial pathogen infections., *Front. Oncol.* 2 (2012) 156. doi:10.3389/fonc.2012.00156.

REIVINDICACIONES

1. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) para determinar el factor de protección de cromatina que comprende las etapas de:

5

a. obtener una muestra biológica que comprende células;

b. extraer cromatina de las células de la etapa a) y mezclarla con tampón de Bal 31;

10

c. extraer ADN no empaquetado de las células de la etapa a) y mezclarlo con un tampón de Bal 31;

15

d. añadir la nucleasa Bal 31 a las muestras de la etapa b) y c) para realizar la digestión de los telómeros;

e. inactivar la enzima de la etapa d) y purificar el ADN;

20

f. cuantificar el ADN telomérico de la etapa e) así como la secuencia de copia individual elegida presente en el ADN de la etapa e) usando un ensayo basado en amplificación cuantitativa en tiempo real;

g. ajustar la dinámica de digestión de ADN de telómero una vez corregida mediante el método de χ^2 a una curva lineal-cuadrática

25

$$y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2,$$

en donde x es el tiempo en minutos; y

30

h. determinar el factor de protección de cromatina definido como la razón entre los valores de cambio de telómero relativo de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras la incubación con Bal 31 durante un tiempo suficiente para conseguir un valor altamente discriminativo del factor o alternativamente el factor de protección de cromatina puede determinarse

35

en el punto de tiempo específico de digestión con nucleasa más discriminativo entre las curvas.

2. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 1, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras entre 0,5 y 60 minutos de incubación con Bal 31 (cromatina/ADN).
5
3. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 1, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras entre 5 y 30 minutos de incubación con Bal 31 (cromatina/ADN).
10
4. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 1, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras entre 7 y 20 minutos de incubación con Bal 31 (cromatina/ADN).
15
5. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 1, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras aproximadamente 10 minutos de incubación con Bal 31 (cromatina/ADN).
20
6. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 1, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre la pendiente de la curva ($y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2$) en su fase lineal (B_1 de cromatina/ B_1 de ADN).
25
7. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 1, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre la pendiente de la curva ($y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2$) en su fase cuadrática (B_2 de cromatina/ B_2 de ADN).
30
8. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 1, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la
35

razón entre el valor obtenido en cromatina frente a ADN desnudo en el punto de tiempo específico de digestión con nucleasa más discriminativo entre las curvas.

- 5 9. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la etapa de guardar la información referente al factor de protección de cromatina en un soporte de datos.
- 10 10. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el tampón de Bal 31 comprende NaCl 100-300 mM, CaCl₂ 10-14 mM, MgCl₂ 10-14 mM, Tris-HCl 10-30 mM, EDTA 0,5-1,5 mM, d₂O a un pH de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10.
- 15 11. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 10, en el que el tampón de Bal 31 comprende NaCl aproximadamente 200 mM, CaCl₂ aproximadamente 12 mM, MgCl₂ aproximadamente 12 mM, Tris-HCl aproximadamente 20 mM, EDTA aproximadamente 1 mM, d₂O a un pH de aproximadamente 8.
- 20 12. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el ensayo es un ensayo de diagnóstico de la inestabilidad genómica, que comprende además la etapa de obtener un resultado del método mediante comparación del factor de protección de cromatina con un factor de protección de cromatina de control indicativo de estabilidad genómica y/o inestabilidad genómica.
- 25 13. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 12, en el que el ensayo es un ensayo de diagnóstico de cáncer.
- 30 14. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el ensayo es un ensayo de pronóstico.
- 35 15. Método de examen de agentes antitumorales y/o antiinfecciosos que comprende las etapas de:

a. obtener una muestra biológica que comprende células que se han tratado mediante el posible agente antitumoral y/o antiinfeccioso y una muestra biológica de control que comprende células que no se han tratado mediante el posible agente antitumoral y/o antiinfeccioso;

5

b. extraer cromatina de las células de la etapa a) y mezclarla con tampón de Bal 31;

10

c. extraer ADN no empaquetado de las células de la etapa a) y mezclarlo con un tampón de Bal 31;

d. añadir la nucleasa Bal 31 a las muestras de la etapa b) y c) para realizar la digestión de los telómeros;

15

e. inactivar la enzima de la etapa d) y purificar el ADN;

f. cuantificar el ADN de la etapa e) usando un ensayo basado en amplificación cuantitativa en tiempo real;

20

g. ajustar la dinámica de digestión de ADN de telómero a una curva lineal-cuadrática

$$y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2,$$

25

en donde x es el tiempo en minutos; y

h. determinar el factor de protección de cromatina definido como la razón entre los valores de cambio de telómero relativo de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras la incubación con Bal 31 durante un tiempo suficiente para conseguir un factor de protección de cromatina fiable y reproducible;

30

g. comparar el factor de protección de cromatina de células tratadas con las células de control no tratadas.

35

16. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la

reivindicación 15, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras entre 0,5 y 60 minutos de incubación con Bal 31 (cromatina/ADN).

5

17. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 16, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras entre 5 y 30 minutos de incubación con Bal 31 (cromatina/ADN).

10

18. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 17, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras entre 7 y 15 minutos de incubación con Bal 31 (cromatina/ADN).

15

19. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 18, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina frente a digestión de ADN desnudo tras aproximadamente 10 minutos de incubación con Bal 31 (cromatina/ADN).

20

20. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 15, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre la pendiente de la curva ($y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2$) en su fase lineal (B1 de cromatina/B1 de ADN).

25

21. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 15, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre la pendiente de la curva ($y^2 = B_0 + B_1x + B_2x^2$) en su fase cuadrática (B2 de cromatina/B2 de ADN).

30

22. Ensayo de compactación de cromatina en telómeros (TCCA) según la reivindicación 1, en el que el factor de protección de cromatina se calcula como la razón entre el valor obtenido en cromatina frente a ADN desnudo en el punto de

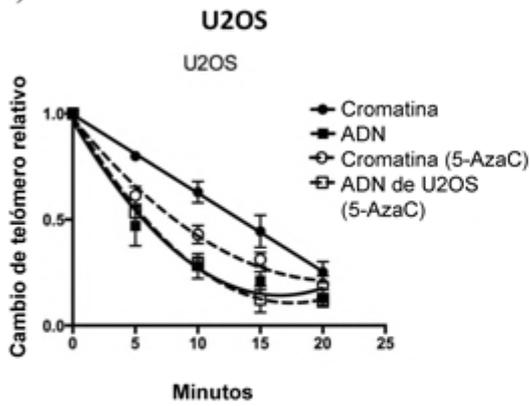
35

tiempo específico de digestión con nucleasa más discriminativo entre las curvas.

23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, que comprende además la etapa de guardar la información referente al factor de protección de cromatina en un soporte de datos.
- 5
24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, en el que el tampón de Bal 31 comprende NaCl 100-300 mM, CaCl₂ 10-14 mM, MgCl₂ 10-14 mM, Tris-HCl 10-30 mM, EDTA 0,5-1,5 mM, d₂H₂O a un pH de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10.
- 10
25. Método según la reivindicación 24, en el que el tampón de Bal 31 comprende NaCl aproximadamente 200 mM, CaCl₂ aproximadamente 12 mM, MgCl₂ aproximadamente 12 mM, Tris-HCl aproximadamente 20 mM, EDTA aproximadamente 1 mM, d₂H₂O a un pH de aproximadamente 8.
- 15
26. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25, en el que el agente antitumoral o antiinfeccioso es un agente de alteración de la estructura de telómero.
- 20

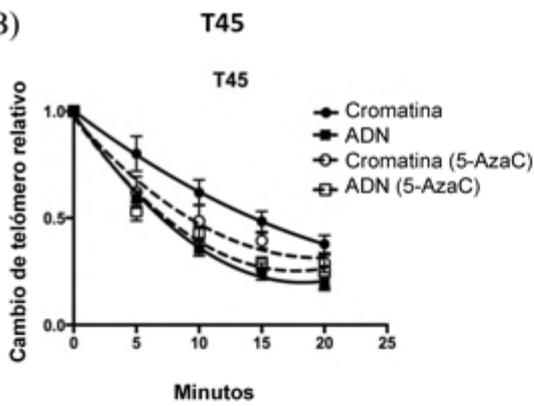
Figura 1

A)



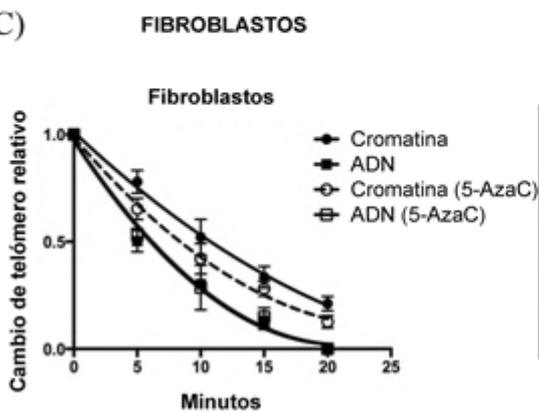
Valores de mejor ajuste	Cromatina	ADN	Cromatina (5-AzaC)	ADN (5-AzaC)
B0	0,99 ±0,02	0,96±0,04	0,98±0,02	0,99±0,02
B1	-0,037±0,005	-0,099±0,01	-0,073±0,006	-0,100±0,004
B2	1,1x10 ⁶ ±0,0002	0,003±0,0005	0,001±0,0002	0,003±0,0002
R cuadrado	0,97	0,95	0,98	0,99

B)



Valores de mejor ajuste	Cromatina	ADN	Cromatina (5-AzaC)	ADN (5-AzaC)
B0	1,00±0,03	0,99±0,01	0,97±0,03	0,97±0,03
B1	-0,044±0,006	-0,086±0,004	-0,067±0,008	-0,081±0,008
B2	0,0006±0,0003	0,002±0,0002	0,001±0,0003	0,002±0,0003
R cuadrado	0,96	0,98	0,94	0,96

C)



Valores de mejor ajuste	Cromatina	ADN	Cromatina (5-AzaC)	ADN (5-AzaC)
B0	1,01 ±0,03	0,97±0,03	0,98±0,03	0,99±0,02
B1	-0,055±0,006	-0,090±0,006	-0,069±0,007	-0,100±0,004
B2	0,0007±0,0003	0,002±0,0003	0,001±0,0003	0,003±0,0002
R cuadrado	0,97	0,98	0,98	0,99

Lista de Secuencias

<110>	Telomere Chromatin	Servizo Galego de Saúde - SERGAS	
<120>	Telomere Chromatin Compaction Assay (TCCA)		
<130>	900420		
<160>	4		
<170>	Patent		In version 3.5
<210>	1		
<211>	39		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Telomere primer forward		
<400>	1		
		cggtttggtt gggtttgggt ttgggtttgg gtttgggtt	39
<210>	2		
<211>	39		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Telomere primer reverse		
<400>	2		
		ggcttgccctt acccttacc ttacccttac ccttaccct	39
<210>	3		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	U6 primer forward		
<400>	3		
		ggaatctaga acatatacta aaattggaac	30
<210>	4		
<211>	29		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	U6 primer reverse		
<400>	4		
		gaactcgagt ttgcgtgtca tccttgcg	29



- ②① N.º solicitud: 201431380
②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.09.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FERNÁNDEZ, J.L. et al., 'Evidence of a differential organization of chromatin containing terminal or interstitial (TTAGGG) _n repeats by in situ digestion with nucleases', CYTOGENETICS AND CELL GENETICS, 1998, Vol. 82, Nos. 3-4, Págs 195-198, ISSN: 0301-0171, todo el documento.	1-26
A	WU, P. et al., 'No overt nucleosome eviction at deprotected telomeres', MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 2008, Vol. 28, No. 18, Págs 5724-5735, ISSN: 1098-5549 (Electronic), doi: 10.1128/MCB.01764-07, todo el documento.	1-26
A	SCHOEFTNER, S. et al., 'A 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs', THE EMBO JOURNAL, 2009, Vol. 28, No. 16, Págs 2323-2336, ISSN: 1460-2075 (Electronic), doi:10.1038/emboj.2009.197, todo el documento.	1-26
A	BAILEY, S.M. et al., 'Telomeres, chromosome instability and cancer', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2006, Vol. 34, No. 8, Págs 2408-2417, ISSN: 0305-1048 (print), ISSN: 1362-4962 (electronic), todo el documento.	1-26
A	TAMAYO, M. et al., 'Differing patterns of peripheral blood leukocyte telomere length in rheumatologic diseases', MUTATION RESEARCH, 2010, Vol. 683, Nos. 1-2, Págs 68-73, ISSN: 0027-5107 (Print), doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.10.010, todo el documento.	1-26
A	KIMURA, M. et al., 'Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths', NATURE PROTOCOLS, 2010, Vol. 5, No. 9, Págs. 1596-1607, ISSN: 1750-2799 (Electronic), doi: 10.1038/nprot.2010.124, todo el documento.	1-26

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.04.2015

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.04.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FERNÁNDEZ, J.L. et al., <i>Cytogenet. Cell. Genet.</i> , (1998), 82(3-4): 195-8.	1998
D02	WU, P. et al., <i>Mol. Cell. Biol.</i> , (2008), 28(18): 5724-35.	2008
D03	SCHOEFTNER, S. et al., <i>EMBO J.</i> , (2009), 28(16): 2323-36.	2009
D04	BAILEY, S.M. et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> , (2006), 34(8): 2408-17.	2006
D05	TAMAYO, M. et al., <i>Mutat. Res.</i> , (2010), 683(1-2): 68-73.	2010
D06	KIMURA, M. et al., <i>Nat. Protoc.</i> , (2010), 5(9): 1596-607.	2010

En D01-D04 se analiza la estructura especializada de cromatina en telómeros y su función.

En D05-D06 se divulgan diferentes procedimientos para determinar la longitud de los telómeros.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicación independiente 1 y 15.

1.1.1. El objeto de las reivindicación independiente 1 consiste en un procedimiento para determinar el factor de protección de cromatina en telómeros que comprende la extracción de cromatina y de ADN no empaquetado de una muestra biológica y su digestión con exonucleasa *Bal* 31, cuantificar el ADN telomérico, ajustar la dinámica de la reacción de digestión del ADN telomérico mediante una curva lineal-cuadrática y, finalmente, determinar el factor de protección de cromatina mediante el cociente entre los valores de las curvas ajustadas de digestión de cromatina y de ADN no empaquetado en un intervalo o en un punto específico de tiempo en el que las curvas de digestión muestran una mayor diferenciación, siendo dicho factor de protección de cromatina indicativo de la estabilidad y/o inestabilidad genómica (reivindicaciones 12 y 13). La reivindicación 15 trata de un procedimiento de identificación de agentes antitumorales y/o antiinfecciosos basado en la determinación del factor de protección de cromatina según la reivindicación 1 en células tratadas y no tratadas con dichos agentes.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D06, se ha caracterizado la estructura especializada de cromatina en telómeros y su función de protección de los cromosomas. Además, se han divulgado diferentes procedimientos para determinar la longitud de los telómeros como un biomarcador relacionado con la edad biológica y como factor de predicción de la longevidad. Sin embargo, ninguno comparte las características técnicas del procedimiento reivindicado en la solicitud. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia de la información descrita previamente en este campo de la técnica. Por consiguiente, el método reivindicado en la solicitud de patente se considera nuevo e inventivo sobre la base de los documentos D01-D06.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-26 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.