

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MECANISMOS  
FISIOPATOLÓGICOS EN EL SÍNDROME DE KINDLER

Elisabeth Zapatero Solana  
Madrid, 2015



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

# IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS EN EL SÍNDROME DE KINDLER

VºBº directores de tesis

Dra. Marcela del Río Nechaevsky

Dra. Sara Guerrero Aspizua

Elisabeth Zapatero Solana  
Licenciada en Biología  
Madrid, 2015



**El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en la División de Biomedicina Epitelial del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), bajo la dirección de las Dras. Marcela del Río Nechaevsky y Sara Guerrero Aspizua.**



**A mis padres y hermano. A César.  
“Dicen que existimos porque alguien  
piensa en nosotros”. A mis abuelos, que siempre existirán.**





## ***AGRADECIMIENTOS***



El primer agradecimiento va para mi directora de tesis, Marcela, por darme la oportunidad de formar parte de tu grupo durante estos años. Por todo lo que he aprendido y por confiarme un tema tan bonito como este.

A mi otra directora, Sara. Gracias por tanto. A la Sara compañera, mil gracias por tu ayuda, aguantando marea y por ayudarme a sacar esto adelante. Y a la Sara amiga, ¿qué decirte que no sepas? ¡¡Que te quiero un montón!! Gracias por las cañas, las fiestas, las conversaciones, las cenas, las trencitas tan preciosas que me has hecho y sobre todo, gracias por apoyarme y creer en mí.

A Fer, por tu ayuda en el laboratorio y con el artículo, y ¡por esos alfajores tan ricos que nos traes para alegrarnos de vez en cuando! Y como no, por el último empujón, tan valioso y tan agradecido. A Rodolfo, por ser como eres. Por tu ayuda en los clonajes y las conversaciones con cervecita o pacharán en mano. A Claudio. ¿Qué decirte, Claudio? Que desde que apareciste todo fluyó y fue más fácil. Porque claro, con esa alegría que transmites todo es mejor...eres un *upper*, ¡y lo sabes! Claudio *for president*!!

El agradecimiento más sincero va para mis chicas del labo. Las que están y las que un día estuvieron. De las que he aprendido tanto, tanto profesional como personalmente. A Blanqui. Es difícil decidir si tengo que agradecerte más a nivel personal o profesional. Cada experimento que he hecho, ahí has estado. Ayuda incondicional. Porque me has enseñado más que cualquier otra persona. Porque siempre estás dispuesta a ayudar y a escuchar, dos cualidades que muy pocas personas tienen a la vez. A nivel personal me quedo con tu forma de ser, tu alegría, las risas, los cafés, las cervezas, tu sinceridad, las conversaciones de política, de la vida y con tu amistad. A Rosa, mi Rosa Mono. ¿Sabes que todavía me sigo riendo cuando me acuerdo? En fin, que voy a contarte. Que te quiero mucho. Que en todos estos años he conseguido una amistad sólida, honesta, de apoyo mutuo continuo. Por las risas, las conversaciones, las alegrías y las penas, las fiestas, los paseos por el Retiro, los viajes, los audios, por escucharme y apoyarme, por ayudarme, por todo y ¡por lo que venga! A Carol, por ser tan transparente y tan buena amiga. Porque es imposible aburrirse contigo, por las confidencias, los momentazos dentro y fuera del labo, porque sigamos tomando cañas y contándonos aventuras. A mi Garci, por ser tan fácil estar contigo. Lo haces todo más llevadero, es un lujo. Te quiero mucho! A Nuria, por todos estos años compartidos, por las risas en el labo, que han sido muchas y por las cervezas y cenitas juntas. A Carre, por toda la ayuda que me has brindado, por enseñarme a ser más profesional y por las risas de los cafés. A Adela, por estar siempre dispuesta a ayudar, ¡y por tener ese salero que alegra el día! A Mariajo, por las conversaciones de apoyo, por animarme y por convencerme de que todo acaba saliendo. A Lucía, por las risas en los cafés, por compartir buenos momentos y estar siempre dispuesta a ayudar. A la Mari, por los buenos momentos que hubo. A Almu, por ser la mejor profe en cultivos. Por toda tu ayuda, las conversaciones y el apoyo moral. A Carlos por su inestimable ayuda con los arrays, ¿cómo se hace para ser así de buena gente? ☺ A Ángeles, por su sabiduría infinita sobre genética, por ayudarme siempre que te he necesitado y por esa gracia innata y ese humor irónico que me encanta. A Cristina, por los momentos en cultivos y por compartir todos los papeleos académicos. ¡Ánimo, tu eres la siguiente! A Victoria, que con esa dulzura y forma de ser nos ha conquistado a todas; ¡mucho ánimo y a por ello! A Isa, ha sido poquito tiempo, pero encantada de conocerte, ¡porque eres genial! A Esteban, Chema,

Sergio, Ross, Stephanie, Lara, Kenny, Laura, y todos los demás compañeros de labo con los que en algún momento he compartido cosas. Buenas, siempre buenas. A todas/os, por enseñarme cada día algo nuevo y por hacerme mejor persona.

También me gustaría agradecer a la gente de otros grupos del Ciemat que han contribuido en esta tesis, en todos los sentidos. Especialmente a Rebe y Jose Carlos por la gran ayuda que me han dado con el citómetro y ¡por conseguir que ahora sea mi técnica favorita! A María García, por ser un amor. A los chicos/as de Oncología: Mónica, la Jose, el Jose, Cristina, Cristian, Olga, Cloti, a los mayores ¡y a los demás que me dejo en el tintero! A los chicos/as hematopoyéticos (Rocío, Javi, Vicky, Fátima, Bego, MJ, Diego, María,...), que siempre tienen una sonrisa para regalar. A los chicos del animalario. Especialmente a Jesús y Edi, ¡que son unos soles enormes! A los chicos de la uni: Guille, Angélica, Diego y Miguel ¡que os hacéis querer! Al personal de histología: Kiko (por nuestras conversaciones de viajes y pelis) y Pilar. A Sole, Aurora, Mamen y Sergio, por ser tan apaños, y por ayudarme siempre y siempre con una sonrisa. A los que siempre voy con prisas y aún así me han correspondido con cariño, gracias. Al personal de limpieza y apoyo del edificio 70, en especial a Marijose, que hacen que el día a día sea más fácil. También agradecer a mi tutora, Ángeles, y a Carlos Sentís y Yolanda, por su ayuda y por hacer estos últimos momentos más fáciles y llevaderos.

A los chicos de Valencia. Fede y Jose Luis, los auténticos ideólogos, a los que tanto he dado la brasa con mis mil millones de preguntas. Por ayudarnos tantísimo a sacar esto adelante y por ser siempre tan optimistas y majetes. A Verdugo y a María, por el durísimo trabajo que hicieron con nuestras muestras. A Gemma y Joan, por su ayuda con las delecciones mitocondriales. A Rosario e Isabel, por la enorme ayuda que nos han brindado con las HaCaT silenciadas y por tener siempre una sonrisa (a Isabel, especialmente, por aguantar mis mails ;). A los dermatólogos que nos consiguen las biopsias y a los pacientes que se prestan a ello, sin los que nada de esto sería posible.

A todos aquellos que me ayudaron en la estancia en Düsseldorf, empezando por Marta. Pel seu suport i ajuda des del primer moment. S'agraeix tant quan et donen això en una ciutat que no és la teva... per ensenyar-me la ciutat i com moure'm en ella. I per les bones estones que hem passat juntes! Et desitjo tot el millor, t'ho mereixes, gràcies! To Julia, thanks for helping me so much with everything, for being as excited with my experiments than me, or more. For everything I've learnt from you. And for fighting together against the "Black Lady". To Thomas, for all your help with Dot Blots and to Karin, for helping me with qPCR and being such a charming woman. To Maxi, Katha, Martin, Farina, Stephan, for good moments in the *kaffee pause*! También quería agradecer al Volksgarten por haber sido una especie de "retiro espiritual" durante mi estancia.

Por supuesto, no quiero olvidarme de mis nuevos compañeros de trabajo del CNIO, con los que llevo poco tiempo compartido, pero que me han acogido como si fuera una más. A Mónica y María, especialmente por su enseñanza constante. Y a todos los demás, con los que espero compartamos buenos momentos ☺.

A las chicas de Escosura 14 o 19. Garfield y Tomaimon, ¿cuántos buenos ratos y risas nos hemos pasado? Podría empezar y no parar nunca. Gracias por ese año de mi vida, que fue genial. Por las bodas en Galicia o en Miami...nunca se sabe ;). A las niñas del máster, Vir y

Soraya. Gracias por ser tan geniales, por ser amigas y por los grandes momentos que pasamos y seguimos pasando (Malta bella! Barcelona más!).

En el ámbito personal querría empezar a agradecer a las primeras personas con las que comenzó todo esto de la "ciencia". En especial, a mi profe de Biología del instituto, Manuela, porque gracias a sus clases decidí dedicarme a esto. En la uni, conocí a unas personitas muuuy especiales. Irene, mi pequeño pony, ¿¿cuánto cosas hemos pasado juntas?? Cafés en las escaleras, cerves, fiestas, viajes, alegrías y penas, ¡momentazos increíbles que espero sigamos viviendo! Sabes escuchar y transmites paz, eres una de mis personas preferidas. Te quieroooo. Nuria, mi uvichu, ¿qué decirte pequeña? Grandes momentos con una gran persona. Esa forma de ser, esa tranquilidad y buena onda que desprendes son difíciles de igualar. Pau!! Conocernos y entendernos fue complicado, pero tienes un "algo" especial que atrapa! Por todas las cañas y cafés de las escaleras, esas escaleras que tantas historias han escuchado y por las que quedan por venir. Almu, guapa!! Carisma y dulzura comprimidos en ti, gran amiga y mejor persona! Mery, que eres "casi" bióloga. Por las conversaciones y las cañas y los momentos vividos y por vivir, ¡me encantas! También quiero agradecer a las nuevas incorporaciones de las "Súper nenas": Lúa y Elia, porque aunque pequeñajas, ya nos conocen a todas un poquito y son la alegría de la casa. A los chicos, Fran y Sebas, por querernos y aguantarnos☺.

A los chicos de la uni. En especial a Álvaro y a Fer. A Álvaro, porque pasan los años y te sigo queriendo igual. Porque creo que eres la persona con la que más me he reído en la universidad y por ser mi "hermano de la uni". ¡Corre plátano! A Fer, por tantas cosas. Por ser un gran amigo, compañero de uni y tesis. Por ser totalmente honesto y sincero, y por las cerves al sol del Paraninfo. Por las risas, las historias, las fiestas, las penas, las caídas, las copas y los triunfos compartidos, los huevos rotos con vinito y las amistades especiales. Y como dice la canción: "Clowns to the left of me, Jokers to the right, here I am, Stuck in the middle with you".

Seguir agradeciendo a mis chicas de Getafe. A Vero, porque ¿cuántos años llevamos juntas? ¡Jajaja! Por todo, absolutamente todo. Es difícil mantener amistades y contigo es todo fácil. Por todos los viajes, momentos e historias vividas. Y porque creo que eres la persona más constante y apasionada en lo que hace que conozco. Te vas a convertir en algo grande, porque lo mereces. Next station: Bodorrioooo! A Déborah, porque ¿qué sería mi día a día sin ti y tus locuras? Porque siempre estás ahí cuando se te necesita y porque como tú dices: hemos sabido comprendernos y respetarnos completamente, sea cual sea la situación y el momento de nuestras vidas. Por tu elevado umbral al dolor, ¡brindemos por ello! (pobrecita....). Lossss u baby! A Marta, porque eres la persona más valiente que conozco. Así, sin más. Hay pocas "Princesas Guerreras" en esta vida y tú eres una de ellas. ¡Por todos los momentazos geniales que hemos compartido! A Euge, ponyboy, ¿qué decirte que no sepas? Jejeje, tenía que escribirlo. Por las risas que nos pasamos, porque generas un ambiente propicio al buen rollo y por tu sinceridad. A Pilar, por tu transparencia, por las cerves, por los grandes momentos y por ser siempre tan cariñosa y atenta con todos, por preocuparte de todos y por tu fuerza interior, es inmensa. A Raquel, mi Raquel. Te echo de menos pequeña. ¡Pero siempre nos quedarán los cumpleaños y las fiestas de Getafe para ponernos al día! A Rubén, Chino, Carlos, con los que siempre me echo unas risas y por las historias vividas juntos.

Un agradecimiento muy especial va para la *Familia*. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible. A mis padres, por haberme educado como lo han hecho. Por haberme enseñado tantas cosas buenas y seguir enseñándonos mutuamente. Por apoyarme en todo. Porque siempre me han dejado decidir y por sentirse orgullosos de mi. Yo también lo estoy de vosotros. A Víctor por ser único y especial y ¡por darme una cuñada, una Sirita y un Mateo tan guapos y tan majos! ¡Por todos los momentos compartidos con vosotros y los que vendrán! A Eva, por ser como eres y por cuidarles tan bien. A Sirita, ¡porque sólo pensar que voy a verte me alegra el día! Y mención especial a la nueva incorporación de la familia, el pequeño que nos da la vida y la alegría, como un sol☺. El bollito que hace que cuando le coges, se te olviden todas las cosas malas de este mundo y sólo exista la paz y la tranquilidad... A mis abuelas, que las quiero con locura. Por todo lo que me han enseñado y por todo lo que me cuidan, por tantos refranes y tanta sabiduría de la vida. A mis abuelos, que les hubiera encantado vivir este momento. Cuántas historias vividas con ellos: los veranos en el pueblo, las navidades, los cumpleaños, las historias de cuando pequeños...¡Tanto que aprender de los abuelos...! A mis primos. A Sara, por ser una alegría de persona y por ser la constancia en vivo! A Jorge, por los concis y por ser tan genial. A Lidia, por ser original y única. A Daniela, por el cariño especial e infinito hacia ella, por ser una persona especial a la que quiero muchísimo. Que se me hace mayor....aysss! A Diego, a Jaime, a mis tíos. A Ángel y Marifé, por todo el cariño que me dais. A Sonia, Bea, Leo, Miguel, Rosi, Domingo, Primi,...a todos, ¡gracias! A mi “otra familia”. Tere y Jose, por que sois encantadores y por lo bien que me cuidáis. Porque siempre os habéis preocupado por mí, desde el primer momento. A Lorena, Eva, Arturo, Javi, Paco y Mariángeles por ser tan geniales como sois, y a los sobris: Sergio y Mariete, ¡que son dos soles que dan alegría allá donde van!

Un agradecimiento profundo va para César. Por todo, básicamente. Por ser mi amigo, mi compañero, mi pareja y por ser como eres. Por quererme y cuidarme tanto día a día. Por todo lo compartido, lo bueno y lo malo. Por apoyarme, por hacerme reír tantísimo, por hacerme la vida más fácil. Por aguantarme en los malos momentos y ayudarme cuando lo he necesitado. Por las historias, viajes y momentos vividos, por habernos hecho mayores juntos, aprendiendo el uno del otro, conociéndonos. Sabiendo respetarnos y querernos, por tener una relación completa. No sé dónde acabar mis agradecimientos hacia ti, así que simplemente gracias y besos, siempre besos.

Agradecer a la música, que hace las cosas más llevaderas. A la banda sonora de Amelié, por conseguir relajarme en los momentos de estrés. A la Vela Puerca, por haber hecho una canción taaaan buena: “Va a escampar”, tatuado a fuego, literalmente. Y por último, agradecer el haber escrito una tesis para poder escribir unos agradecimientos. ¡Es una cosa que sienta taaaan bien! Deberíamos agradecer más a menudo, es saludable.

Gracias a todos.

***RESUMEN/ABSTRACT***





El Síndrome de Kindler (SK), es una genodermatosis caracterizada clínicamente por la presencia de ampollas acrales, fotosensibilidad y envejecimiento prematuro, atrofia extensiva de la piel y una elevada predisposición a desarrollar carcinomas de la piel y mucosas. La proteína afectada es la kindlina-1 (codificada por el gen *FERMT1*), un componente de las adhesiones focales de los queratinocitos basales. Las mutaciones en este gen pueden explicar las características clínicas provocadas por la falta de adhesión entre la dermis y la epidermis, pero no aquellas no relacionadas con la fragilidad cutánea (envejecimiento prematuro, fotosensibilidad y predisposición a padecer tumores de piel). El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio de las bases patológicas de estas manifestaciones, que están firmemente asociadas con alteraciones en el estado redox celular, generado principalmente por las especies reactivas de oxígeno (ROS). Al caracterizar el papel del estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad, se observó que los queratinocitos de pacientes con SK presentaban un desequilibrio importante en su estado redox. Por un lado, exhibían un estado pro-oxidativo observable mediante el ratio GSSG/GSH (glutati6n oxidado/glutati6n reducido), así como una menor capacidad de sntesis *de novo* de este glutati6n, que es una de las principales defensas celulares frente a las ROS. Por otra parte, las células SK mostraban un daño oxidativo acentuado en los lípidos de membrana, lo que sugiere la cronicidad del fenómeno. Este estado pro-oxidativo también lo presentaba la línea celular de queratinocitos HaCaT sh*FERMT1*, en la que se ha silenciado parcialmente el gen *FERMT1*, comportándose de forma análoga a los queratinocitos de pacientes SK respecto a la gesti6n de las ROS. Además, los análisis de la ultraestructura y funci6n de los principales orgánulos productores de ROS, las mitocondrias, revelaron en los pacientes SK pronunciadas anormalidades morfológicas y funcionales. Al evaluar la fotosensibilidad a la luz ultravioleta, se observó que tanto los queratinocitos de pacientes SK como la línea celular HaCaT sh*FERMT1* presentaban una mayor fotosensibilidad que sus respectivos controles, la cual se evidenció a través de una menor viabilidad celular. Los análisis transcriptómicos realizados, apoyaron estos datos al revelar la expresi6n aberrante de algunos genes implicados en la replicaci6n y la reparaci6n del daño al ADN en células SK, eventos que alterados y en paralelo potencian la disminuci6n de la tasa de viabilidad celular. Además de estas alteraciones, los análisis transcriptómicos mostraron múltiples genes desregulados en rutas oncogénicas que podrían favorecer el desarrollo de cáncer de piel en los pacientes SK. Estos datos, en conjunto, señalan bases patológicas novedosas implicadas en las manifestaciones clínicas no relacionadas, a priori, con adhesi6n presentes en esta genodermatosis. Por último, se generó un modelo de rat6n humanizado de SK, que reproducía las principales características histopatológicas de la enfermedad. Además, en este modelo se llevó a cabo la correcci6n de la enfermedad mediante terapia génica,

demostrando que al restaurar la expresión de la proteína kindlina-1 se restauraba el fenotipo fisiológico de la piel.

Kindler Syndrome (KS) is a rare heritable skin disorder clinically characterized by acral skin blisters, atrophy of skin, photosensitivity, premature ageing and a high risk of mucocutaneous malignancies. KS results from recessive loss-of-function mutations in the *FERMT1* gene that encodes the protein Kindlin-1, a component of the focal adhesions in epithelial cells. However the complex phenotype of KS cannot be exclusively explained based on the adhesive function of Kindlin-1. Therefore, the mechanisms responsible for its clinical features such as photosensitivity, premature ageing and cancer are still unknown. The main goal of this study was to analyze the pathological basis of these clinical features of KS that are not related to cutaneous fragility but to the altered cellular redox state, produced mainly by reactive oxygen species (ROS). Our results, obtained with patient derived keratinocytes and HaCaT sh*FERMT1* (a keratinocyte cell line with *FERMT1* partially silenced), followed a clear trend regarding their oxidative status and mitochondrial alterations. On one hand, they exhibited a pro-oxidative status pointed out by the GSSG/GSH ratio (oxidized glutathione/reduced glutathione), a lower capability to synthesize this glutathione (one of the main cellular defenses against ROS) and also, a high oxidative damage of membrane lipids in KS cells, which suggests a chronic phenomenon. On the other hand, mitochondria were studied, since they are the main source of endogenous ROS. KS patients' cells showed morphological and functional alterations which are consistent with dysfunctional mitochondria. Our results suggest that alterations of the redox balance and mitochondria in KS may be a potential explanation of the premature skin ageing, photosensitivity and cancer prone phenotype of these patients. Furthermore, our viability assays showed a decrease after ultraviolet light exposure in KS keratinocytes and HaCaT sh*FERMT1* viability. Using transcriptomic analysis we observed that KS keratinocytes also have a number of altered genes involved in DNA replication and in damage repair. Taking together these data, with the fact that UVB is the main exogenous ROS source and that KS keratinocytes have dysfunctional mitochondria and alterations in the redox balance, we have a possible explanation for the higher risk to develop skin cancer in KS patients. Besides, in the transcriptomic analysis we found that there are several oncogenic genes altered in KS keratinocytes. Finally, we were able to generate a humanized mouse model for KS, which reproduces the main histopathological features of the disease. Also, we could restore collagen IV expression and the physiological phenotype of skin by gene therapy when *FERMT1* was reestablished in KS keratinocytes.

## **ÍNDICE**



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1. La piel</b>	<b>9</b>
1.1. Estructura de la piel	9
1.2. Unión dermo-epidérmica. Membrana basal	11
<b>2. Enfermedades genéticas de la piel: Epidermólisis Bullosa (EB)</b>	<b>12</b>
<b>3. Síndrome de Kindler (SK; OMIM 173650; ORPHA 2908)</b>	<b>14</b>
3.1. Características clínicas	14
3.2. Diagnóstico	14
3.3. Bases moleculares del SK	17
3.4. Heterogeneidad en SK (correlación genotipo-fenotipo)	18
3.5. Señalización en SK	19
3.6. Senescencia en SK	20
<b>4. Estrés oxidativo y piel</b>	<b>20</b>
4.1. Las ROS y su reactividad	22
4.2. Sistemas de defensa antioxidante en la piel	23
4.2.1. Mecanismos reparadores antirradicales	23
4.2.2. Mecanismos reparadores genéticos	25
4.3. Mitocondria, estrés oxidativo y envejecimiento	25
4.4. Radiación UV y fotoenvejecimiento cutáneo	26
<b>5. Modelos animales en Síndrome de Kindler</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>1. Pacientes y biopsias cutáneas</b>	<b>35</b>
<b>2. Cultivos celulares</b>	<b>35</b>
2.1. Líneas celulares	35
2.2. Cultivo primario de queratinocitos y fibroblastos humanos	36
2.2.1. Queratinocitos	36

2.2.2. Fibroblastos	36
<b>3. Obtención y caracterización de la línea HaCat shFERMT1</b>	<b>36</b>
<b>4. Diseño y producción de vectores retrovirales</b>	<b>37</b>
4.1. Fabricación del vector retroviral pLZR-FERMT1-ires-GFP	37
4.2. Generación de líneas estables productoras de partículas retrovirales y transducción celular	38
<b>5. Animales de experimentación</b>	<b>38</b>
<b>6. Bioingeniería de equivalentes cutáneos humanos y trasplante</b>	<b>39</b>
6.1. Preparación de equivalentes dermo-epidérmicos	39
6.2. Trasplantes de equivalentes cutáneos	40
<b>7. Extracción de ácidos nucleicos</b>	<b>41</b>
7.1. ADN genómico (ADNg)	41
7.2. ARN	42
<b>8. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR para el análisis de las mutaciones de FERMT1</b>	<b>42</b>
8.1. Secuenciación automática	43
<b>9. PCR de Transcripción Reversa (RT-PCR)</b>	<b>43</b>
<b>10. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)</b>	<b>45</b>
<b>11. Extracción de proteínas celulares</b>	<b>46</b>
<b>12. Western-blot</b>	<b>46</b>
<b>13. Inmunofluorescencia (IF), Histología e Inmunohistoquímica (IHQ)</b>	<b>46</b>
13.1. IF	46
13.1.1. Células	46
13.1.2. Tejidos	48
13.2. Histología e Inmunohistoquímica (IHQ)	48
<b>14. Microscopía electrónica</b>	<b>49</b>
14.1. Células	49
14.2. Biopsias	49
<b>15. Medición del ratio GSSG/GSH</b>	<b>50</b>
<b>16. Medición de los peróxidos lipídicos</b>	<b>50</b>

<b>17. Irradiación de células con luz ultravioleta-B</b>	<b>50</b>
<b>18. Citometría de flujo</b>	<b>51</b>
18.1. Biosensores de estrés oxidativo: roGFP2	51
18.2. Viabilidad celular con DAPI	52
18.3. Ensayo de apoptosis con ioduro de propidio (IP)	52
18.4. Medida de ROS con dihidroetidio (DHE)	53
18.5. Medida del potencial de membrana mitocondrial con JC-1	53
<b>19. Análisis transcriptómicos</b>	<b>53</b>
<b>20. Predicción de estructuras de ARN</b>	<b>54</b>
<b>21. Análisis estadísticos</b>	<b>54</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>1. Caracterización de pacientes SK y controles</b>	<b>57</b>
1.1. Características clínicas	57
1.2. Caracterización de las mutaciones	58
1.3. Generación de una línea de queratinocitos humanos con expresión reducida de <i>FERMT1</i> (HaCaT shFERMT1)	64
1.4. Caracterización de la morfología de queratinocitos SK	65
<b>2. Estudio del estrés oxidativo en el Síndrome de Kindler</b>	<b>68</b>
2.1. Ratio GSSG/GSH	68
2.2. Gamma Glutamyl Cisteína Ligasa (GCLc y GCLm)	69
2.3. Malondialdehído (MDA)	70
2.4. Estudio del potencial redox del glutatión mediante biosensores redox	71
2.5. Dihidroetidio (DHE)	72
<b>3. Alteraciones mitocondriales en SK</b>	<b>73</b>
3. 1. Alteraciones estructurales	73
3.2. Alteraciones funcionales	75
<b>4. Efectos de la luz UVB en el Síndrome de Kindler</b>	<b>76</b>
<b>5. Análisis transcriptómico en Síndrome de Kindler</b>	<b>77</b>
<b>6. Modelo de ratón humanizado de Síndrome de Kindler</b>	<b>80</b>

6.1. Corrección de Síndrome de Kindler mediante terapia génica	81
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
1. Caracterización de los pacientes de SK	85
2. Alteraciones morfológicas y de adhesión en queratinocitos de SK	87
3. Estrés oxidativo en SK	88
4. Alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias de SK	90
5. Posible relación entre adhesión, mitocondrias y ROS en SK	91
6. Efectos de la luz UVB en SK: fotosensibilidad, fotoenvejecimiento y cáncer	93
7. Modelo de ratón humanizado para Síndrome de Kindler	94
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>111</b>
1. Publicación desarrollada durante el periodo predoctoral	113
2. Informe del Comité Ético de Investigación Clínica	123
3. Rutas metabólicas alteradas en los análisis transcriptómicos (Advanced Pathway Painter v2.29)	124



## ***ABREVIATURAS***



6-4 PPs	Lesiones 6-4 pirimidina-pirimidina
ADN	Ácido <u>D</u> esoxirribo <u>N</u> ucleico
ADNc	Ácido <u>D</u> esoxirribo <u>N</u> ucleico <u>c</u> omplementario
AF	<u>A</u> dhesiones <u>f</u> ocales
ARN	Ácido <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleico
ARNm	Ácido <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleico <u>m</u> ensajero
ATCC	Colección americana de cultivos celulares ( <u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection)
BER	Reparación por escisión de bases ( <u>B</u> ase <u>E</u> xcision <u>R</u> epair)
BSA	Seroalbúmina bovina ( <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine)
CAT	Catalasa
col I, IV, VII	Colágeno I, IV, VII
CPD	Dímeros de pirimidina ciclobutano ( <u>C</u> yclobutane <u>P</u> yrimidine <u>D</u> imer)
DAB	3,3' <u>D</u> iamino <u>b</u> encidina
DAPI	4,6 diamidino-2-fenil-indol 4 ( <u>6</u> <u>D</u> i <u>A</u> midin- <u>2</u> - <u>P</u> henyl- <u>I</u> ndole)
DBS	Ruptura de dos cadenas ( <u>D</u> ouble <u>S</u> trand <u>B</u> reak)
DHE	<u>D</u> ihidro <u>e</u> tidio
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco ( <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	<u>E</u> pidermolisis <u>B</u> ullosa
EBD	<u>E</u> pidermoilisis <u>B</u> ullosa <u>D</u> istrófica
EBJ	<u>E</u> pidermoilisis <u>B</u> ullosa <u>J</u> untural
EBS	<u>E</u> pidermoilisis <u>B</u> ullosa <u>S</u> imple
ECM	Matriz extracelular ( <u>E</u> xtra <u>C</u> ellular <u>M</u> atrix)
EDTA	<u>E</u> tilén- <u>D</u> iamino- <u>T</u> etra- <u>A</u> cetato
EGF	Factor de crecimiento epidérmico ( <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
F	Dirección 5' ( <u>F</u> orward)
FACS	Citometría de flujo ( <u>F</u> luorescence- <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting)
FBS	Suero fetal bovino ( <u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum)
FERM	<u>F</u> ilopodina/ <u>E</u> rzina/ <u>R</u> adixina/ <u>M</u> oesina

FERMT1	Miembro 1 de la familia fermitina ( <i>Fermitin family member 1</i> )
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein IsoThiCyanate</i> )
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GCL	<u>G</u> lutamato <u>C</u> isteína <u>L</u> igasa
GCLc	Subunidad <u>C</u> atalítica de la GCL
GCLm	Subunidad <u>M</u> etabólica de la GCL
GFP	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescence Protein</i> )
GPx	<u>G</u> lutati <u>o</u> n <u>P</u> eroxi <u>d</u> asa
Grx1	<u>G</u> lutare <u>d</u> oxina- <u>1</u>
GSSG/GSH	Glutati <u>o</u> n oxidado/Glutati <u>o</u> n reducido
GST	<u>G</u> lutati <u>o</u> n- <u>S</u> - <u>T</u> ransferasa
GTP	Guanosina trifosfato ( <i>Guanosine Triphosphate</i> )
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanosulfónico
HPLC	Cromatografía de alta afinidad ( <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
HS	Suero de caballo ( <i>Horse Serum</i> )
IF	<u>I</u> munofluorescencia
IP	<u>I</u> oduro de <u>P</u> ropidio
MB	<u>M</u> embrana <u>B</u> asal
MDA	<u>M</u> alondialdehido
MMR	Reparación de bases erróneas ( <i>Mismatch Repair</i> )
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato ( <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
NER	Reparación por escisión de nucleótido ( <i>Nucleotide Excision Repair</i> )
O/N	Periodo de incubación superior a 12 horas ( <i>Over Night</i> )
PB	Tampón fosfato ( <i>Phosphate Buffer</i> )
PBS	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> orma <u>l</u> dehido
PH	Homólogo a pleckstrina ( <i>Pleckstrin Homologe</i> )

q-PCR	PCR Cuantitativa
R	Dirección 3' ( <i>Reverse</i> )
RT	Temperatura ambiente ( <i>Room Temperature</i> )
Rho/Rac GTPasas	Proteínas GTP asociadas a las proteínas Rho o Rac
RNS	Especies reactivas de nitrógeno ( <i>Reactive Nitrogen Species</i> )
roGFPs	GFPs sensibles a cambios redox ( <i>reduction-oxidation-sensitive GFPs</i> )
ROS	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RT-PCR	PCR de <u>T</u> ranscripción <u>R</u> eversa
SCC	Carcinoma escamoso celular ( <i>Squamous Cell Carcinoma</i> )
SK	Síndrome de <u>K</u> indler
SOD	<u>S</u> uperóxido <u>D</u> ismutasa
SSB	Ruptura de una cadena ( <i>Single Strand Break</i> )
TBA	Ácido tiobarbitúrico ( <i>Thiobarbituric Acid</i> )
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orato- <u>E</u> DTA
TBS	Tampón Tris salino ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
TE	<u>T</u> ris-HCl, <u>E</u> DTA
TGFβ	Factor de crecimiento transformante Beta ( <i>Transforming Growth Factor Beta</i> )
Tm	Temperatura de fusión ( <i>melting Temperature</i> )
UV	Ultravioleta
XP-C	<u>X</u> eroderma <u>P</u> igmentosum <u>C</u>



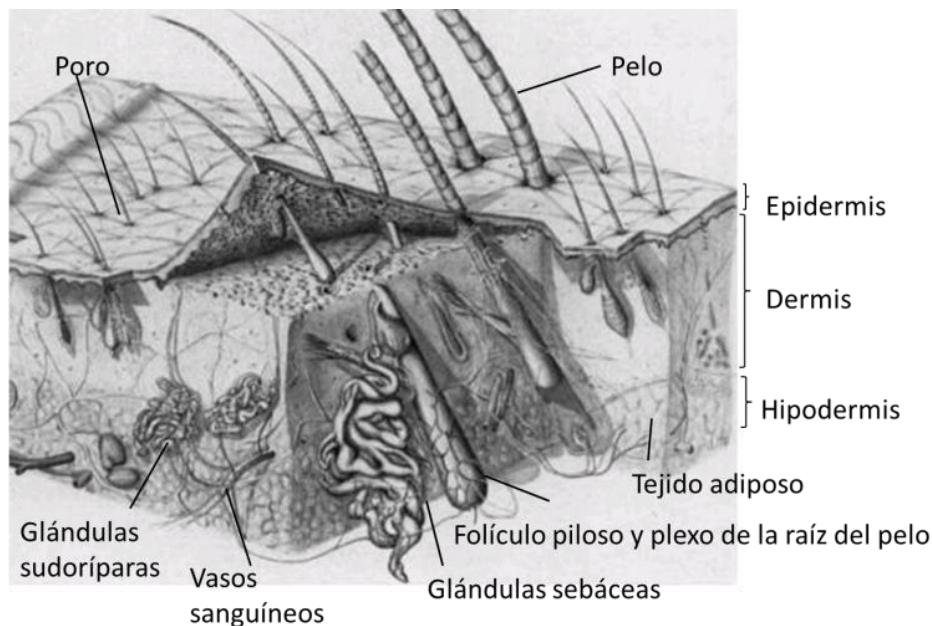
## ***INTRODUCCIÓN***





## 1. La piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y constituye la principal barrera física del organismo frente a las agresiones externas. Junto con sus anejos (pelo, uñas, glándulas sudoríparas y sebáceas) conforma el sistema tegumentario; además desempeña funciones importantes como la termorregulación, secreción, percepción sensorial y funciones inmunológicas y metabólicas. Estructuralmente, la piel consta de tres capas bien diferenciadas, la epidermis, la dermis y la hipodermis (figura 1) (Ross, Kaye et al. 2007; Fawcett and Jensch 1999; Junqueira 2005).



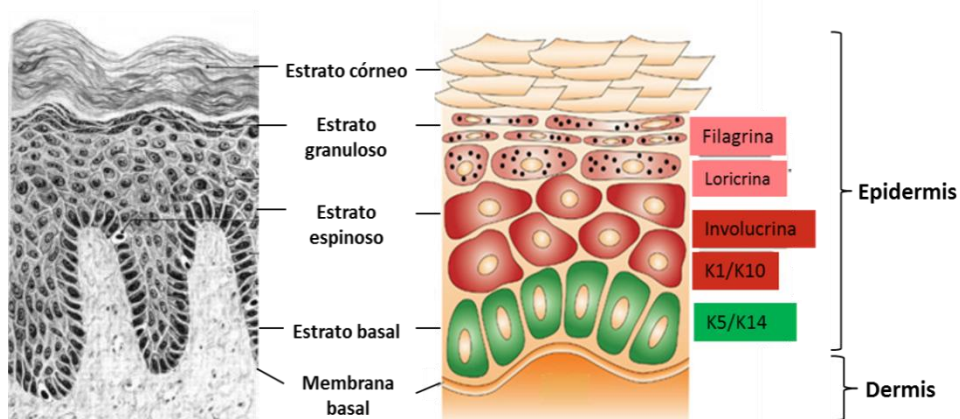
**Figura 1. La piel.** Esquema general de la estructura de la piel y sus anejos. Modificado de Montagna 1974.

### **1.1. Estructura de la piel**

La **epidermis** es la capa más externa. Su estructura es muy dinámica y con gran capacidad regenerativa. Histológicamente, la epidermis es un epitelio estratificado, escamoso y queratinizado en el que las células epiteliales o queratinocitos se disponen de forma ordenada, dependiendo de su grado de diferenciación, pudiéndose reconocer cuatro estratos: basal, espinoso, granular y córneo (figura 2) (Segre 2006). El estrato basal lo forman mayoritariamente queratinocitos con alto potencial proliferativo. Dentro de esta capa existe una subpoblación de células madre epiteliales responsables de la renovación epidérmica. También están presentes otros tipos celulares como las células de Merkel que tienen función sensorial (Ogawa 1996), las células de Langerhans que tienen función inmunológica (Kimber,

Cumberbatch et al. 2000) y los melanocitos, responsables de la producción de melanina, pigmento esencial en la coloración de la piel y la protección frente a las radiaciones ultravioletas (Visser, Palstra et al. 2014). Cuando los queratinocitos basales detienen su actividad proliferativa, comienzan un complejo proceso de diferenciación en el que migran hacia la superficie de la piel, dando lugar a los estratos espinoso y granuloso. Finalmente, forman el estrato córneo donde las células epidérmicas se caracterizan por ser escamosas, enucleadas y completamente queratinizadas (Kalinin, Kajava et al. 2002). Este tipo de células se desprenden continuamente de la piel y son reemplazadas por nuevas que provienen del estrato basal y que son generadas gracias al proceso de renovación celular, que en condiciones fisiológicas, se completa en un periodo de 4 a 6 semanas (Watt 1989).

La expresión génica durante el proceso de diferenciación epidérmica se encuentra estrictamente regulada. Entre los genes cuya expresión responde a un patrón dependiente de diferenciación se encuentran las queratinas, proteínas que constituyen los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células epiteliales (figuras 2 y 3). Así, en el estrato basal se expresan las queratinas K5 y K14 (Roop, Hawley-Nelson et al. 1983), mientras que cuando los queratinocitos se diferencian pasando a formar el estrato espinoso, la expresión de estas queratinas se sustituye por las queratinas K1 y K10 (Fuchs and Green 1980). Otro gen que se suele utilizar como marcador epitelial es la involucrina, que es sintetizada en las capas superiores del estrato espinoso (Rice and Green 1979). El estrato granuloso, se caracteriza porque se inicia la producción de otras proteínas como filagrina y loricrina, consideradas como marcadores de diferenciación terminal (figura 2) (Dale, Holbrook et al. 1985; Mehrel, Hohl et al. 1990).



**Figura 2. Esquema general de la epidermis.** Se representan los estratos epidérmicos y las proteínas marcadoras específicas que se expresan en cada uno de ellos. Modificado de Radtke and Raj 2003.

La **dermis** se define como un tejido conectivo de soporte, ya que aporta vascularización e inervación a la epidermis. Se compone principalmente de fibras de colágeno (fundamentalmente de tipo I (col I)) y fibras elásticas, y el tipo celular predominante es el fibroblasto dérmico. Los vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y anejos cutáneos también se encuentran alojados en la dermis (figura 1) y llevan a cabo distintas funciones esenciales, como la nutrición, termorregulación y protección del tejido (Fawcett 1999; Gawkrödger 2002).

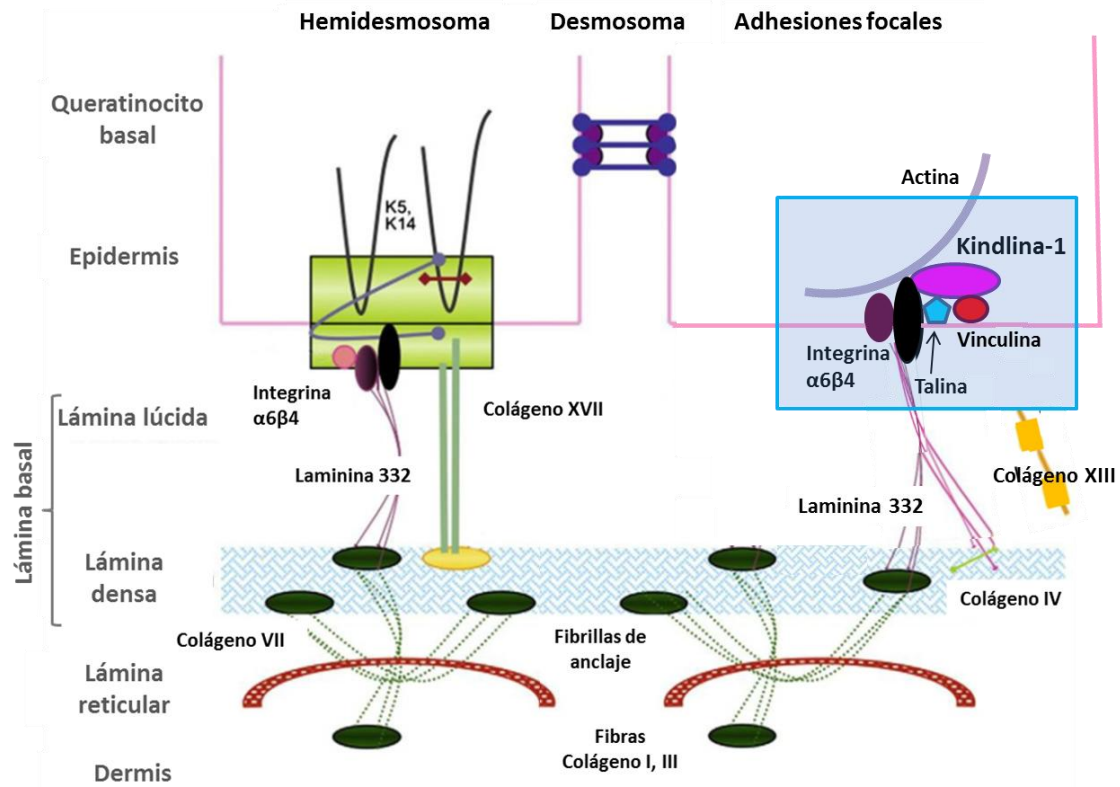
La **hipodermis** es la capa más profunda de la piel y está compuesta fundamentalmente por tejido adiposo. La grasa conforma un tejido metabólico muy activo, que además protege al organismo proporcionándole amortiguación y aislamiento térmico (figura 1) (Junqueira 2005).

### **1.2. Unión dermo-epidérmica. Membrana basal**

La membrana basal (MB) dermo-epidérmica es un conjunto complejo de proteínas situadas entre la epidermis y la dermis, encargado de la función esencial que supone la adhesión entre estas dos capas (Has and Bruckner-Tuderman 2014). Las proteínas de la MB intervienen también en otros procesos celulares importantes como son la diferenciación, la movilidad celular y la cicatrización (Hashmi and Marinkovich 2011). La MB se compone de dos zonas bien diferenciadas denominadas lámina basal, sintetizada por las células epiteliales, y lámina reticular, sintetizada por los fibroblastos de la dermis (Masunaga 2006). La lámina basal a su vez está constituida por la lámina lúcida y la lámina densa. La lámina lucida está formada principalmente por lamininas y otras proteínas fibrilares (colágenos XIII y XVII) que forman parte de los filamentos de anclaje. La lamina densa está formada por filamentos de colágeno IV (col IV) que se entrelazan con los filamentos de anclaje, conectando todos ellos para formar un fuerte ensamblaje de la lámina basal (figura 3) (Keene, Marinkovich et al. 1997). Por debajo de la lámina basal se encuentra la lámina reticular, constituida por fibrillas de anclaje (principalmente col VII), fibras reticulares (col III) y placas de anclaje (col IV). El col IV de la lámina densa continúa entrelazándose con las fibrillas de anclaje de la lámina reticular y las fibras reticulares, asegurando así la unión entre la lámina basal y la lámina reticular, del tejido conectivo (figura 3) (Leblond and Inoue 1989).

Las principales estructuras de la MB encargadas de la adhesión son los hemidesmosomas (HD) y las adhesiones focales (AF) (figura 3) (Has and Bruckner-Tuderman 2014). Los HD son complejos supramoleculares, constituidos por proteínas intracelulares y transmembrana, que se localizan en la membrana plasmática de los queratinocitos del estrato basal. Estos complejos se unen a las queratinas K5 y K14 y de ellos depende, en parte, la integridad de la unión dermo-epidérmica (figura 3). Las AF son estructuras dinámicas y

complejas, que proporcionan una cohesión adicional, y están constituidas por proteínas como las integrinas, la kindlina-1, la talina y la vinculina. Las integrinas (mediante la subunidad  $\alpha$ ) conectan la laminina 332, con otras proteínas como la kindlina-1 (que se une a la actina y activan la subunidad  $\beta$ ), desencadenando una gran variedad de mecanismos implicados en señalización, adhesión y proliferación (figuras 3 y 10) (Has and Bruckner-Tuderman 2014).



**Figura 3. Estructura de la unión dermo-epidérmica en la piel.** Se indican las estructuras de anclaje específicas de la MB (HD y AF), así como sus capas y componentes (de arriba abajo): lámina lúcida y densa que forman la lámina basal, y lámina reticular. Modificada de Intong and Murrell 2012.

Cuando se altera alguna de las proteínas que forman la MB, se puede producir la ruptura de la unión dermo-epidérmica, dando lugar clínicamente a ampollas. Los pacientes con Epidermólisis Bullosas (EB), sufren este tipo de alteraciones (Fine 2010). Así, entender la composición, estructura e interrelación de las proteínas de la MB ha permitido en gran medida comprender la fisiopatología de estos desórdenes (Hashmi and Marinkovich 2011).

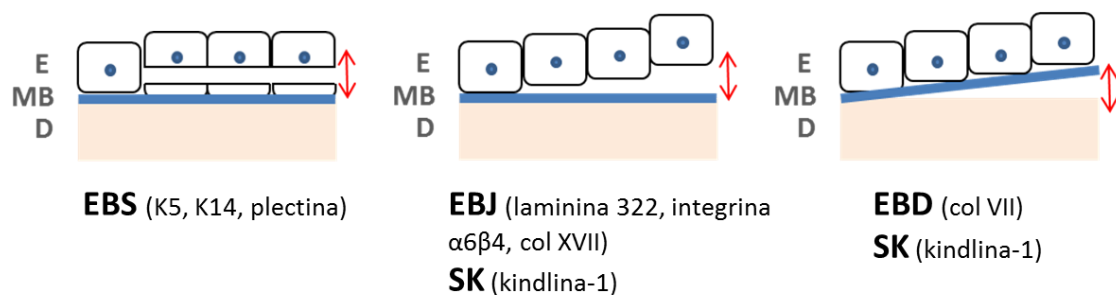
## **2. Enfermedades genéticas de la piel: Epidermólisis Bullosa (EB)**

El conjunto de las genodermatosis constituye un grupo muy heterogéneo de afecciones clínicas de origen genético, cuyas principales manifestaciones radican en la piel y sus anejos. Aunque su incidencia es en general baja, el gran número de diferentes

genodermatosis hace que su suma, represente una proporción relevante de la patología dermatológica (Fine 2010).

La Epidermolísis Bullosa (EB), representa un grupo heterogéneo de genodermatosis caracterizadas clínicamente por la aparición de ampollas en la piel y en las mucosas, de forma espontánea o como consecuencia de traumatismos mínimos. Esta fragilidad cutánea, está relacionada con mutaciones en uno o más genes, que codifican para proteínas estructurales, responsables de mantener la adhesión dermo-epidérmica (Has and Bruckner-Tuderman 2013). Las EBs integran un grupo de enfermedades raras (incidencia estimada  $<0.05\%$ ) y hasta el momento, no cuentan con un tratamiento eficaz (Bruckner-Tuderman and Has 2013).

Las EBs se clasifican en cuatro categorías principales, en función de la localización de las proteínas codificadas por los genes mutados y el nivel ultraestructural al que se forman las ampollas (figura 4) (Fine, Eady et al. 2008; Bruckner-Tuderman and Has 2012; Has and Bruckner-Tuderman 2014). La EB Simple (EBS) presenta ampollas intraepidérmicas debidas a mutaciones en los genes que codifican para la queratina K5, K14 o la plectina. En la EB Juntural (EBJ), aparecen mutaciones en los genes que codifican para las subunidades de la laminina 322, la integrina  $\alpha 6\beta 4$  o el col XVII, dando lugar a ampollas que se forman en la lámina lúcida. La EB Distrófica (EBD), la forma de EB más frecuente, se manifiesta con ampollas en la lámina densa debido a mutaciones en el gen *COL7A1* (que codifica para el col VII) (Jarvikallio, Pulkkinen et al. 1997). Por último, el Síndrome de Kindler (SK), que ha sido recientemente clasificado como un subtipo de EB, presenta mutaciones en el gen *FERMT1* (que codifica para la proteína kindlina-1). Las ampollas en SK se localizan por debajo del estrato basal de la epidermis y/o en la lámina basal (Intong and Murrell 2012; Has and Bruckner-Tuderman 2014).



**Figura 4. Formación de ampollas en cada tipo de EB.** E: epidermis, D: dermis, MB: membrana basal, EBS: Epidermolísis Bullosa Simple, EBJ: Epidermolísis Bullosa Juntural, EBD: Epidermolísis Bullosa Distrófica, SK: Síndrome de Kindler.

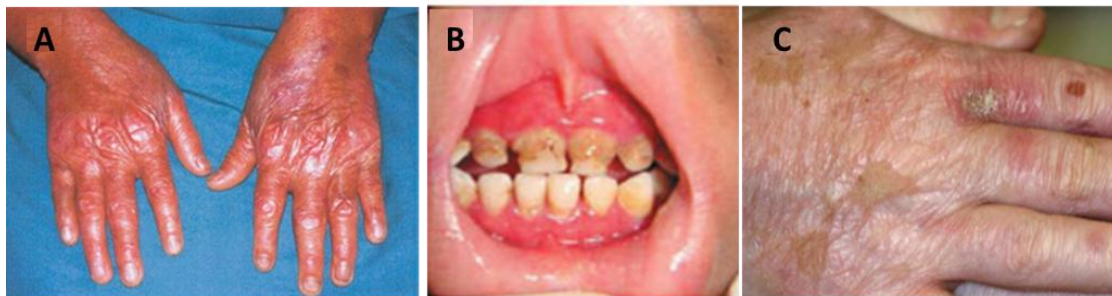
El diagnóstico diferencial empleado en las distintas EBs se basa en el mapeo antigénico de las proteínas candidatas, previamente al análisis genético mutacional. El análisis incluye a

las queratinas K5 y K14, plectina, integrina  $\alpha 6\beta 4$ , col XVII, laminina 322, col VII y col IV (Cepeda-Valdes, Pohla-Gubo et al. 2010).

### **3. Síndrome de Kindler (SK; OMIM 173650; ORPHA 2908)**

#### **3.1. Características clínicas**

El Síndrome de Kindler (SK) se considera una genodermatosis autosómica recesiva, de fenotipo complejo y cuya patogénesis todavía no se entiende completamente. Clínicamente se caracteriza por la presencia de ampollas acrales en la infancia, fotosensibilidad y envejecimiento prematuro, atrofia extensiva de la piel y poiquilodermia progresiva (figura 5) (Sharma, Mahajan et al. 2003; Ashton 2004; Ashton, McLean et al. 2004; Mahajan VK. 2005; White and McLean 2005). Otras características clínicas son la presencia de erosiones gingivales (figura 5), estenosis esofágicas y uretrales y predisposición a padecer carcinoma escamoso celular (SCC) (Lotem, Raben et al. 2001; Has, Burger et al. 2010; Lai-Cheong and McGrath 2010; Mizutani, Masuda et al. 2012).



**Figura 5. Algunas de las características clínicas del Síndrome de Kindler. A)** Marcada atrofia de la piel. Modificado de Siegel, Ashton et al. 2003. **B)** Erosiones gingivales. Modificado de Mendes, Nogueira et al. 2012. **C)** Poiquilodermia en el dorso de las manos. Modificado de Burch, Fassihi et al. 2006.

El único gen descrito asociado al Síndrome de Kindler es *FERMT1* (*fermitin family member 1*), que codifica para la kindlina-1. Hasta la fecha se han diagnosticado 171 pacientes con más de 60 mutaciones distintas en *FERMT1* (Has, Castiglia et al. 2011; Has, Chmel et al. 2014; <http://www.orpha.net>; [https://grenada.lumc.nl/LOVD2/mendelian\\_genes/home.php?slect\\_db=FERMT1](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/mendelian_genes/home.php?slect_db=FERMT1)).

#### **3.2. Diagnóstico**

Como en todas las genodermatosis, el primer paso en el diagnóstico de SK, se realiza a nivel clínico-dermatológico. Se han propuesto un conjunto de criterios diagnósticos con el fin

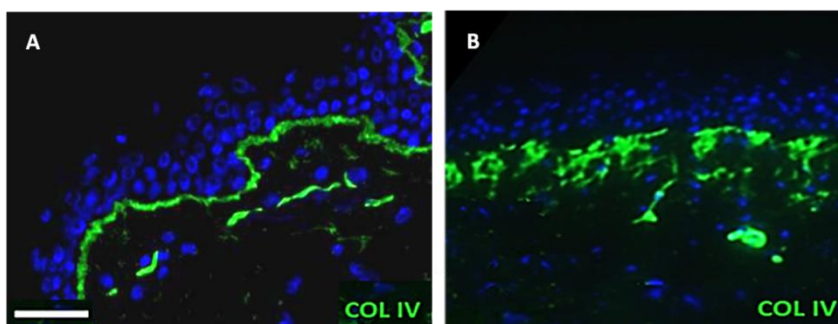


de hacer más accesible el abordaje de esta enfermedad rara al profesional clínico (tabla 1) (Fischer, Kazandjieva et al. 2005):

Criterios principales	Criterios secundarios	Características asociadas
1. Ampollas acrales en infancia y adolescencia. 2. Poiquilodermia progresiva. 3. Atrofia de la piel progresiva. 4. Fotosensibilidad anormal 5. Erosión gingival.	1. Sindactilia. 2. Implicación mucosas: estenosis uretral, anal, oral, esofágica y laríngea.	1. Distrofia en uñas. 2. Queratoderma palmoplantar. 3. Leucoqueratosis en labios. 4. Desarrollo de SCC. 5. Anormalidades esqueléticas. 6. Dentición pobre /caries / periodontitis.

**Tabla 1. Criterios clínicos diagnósticos en SK.** Modificado de Fischer, Kazandjieva et al. 2005.

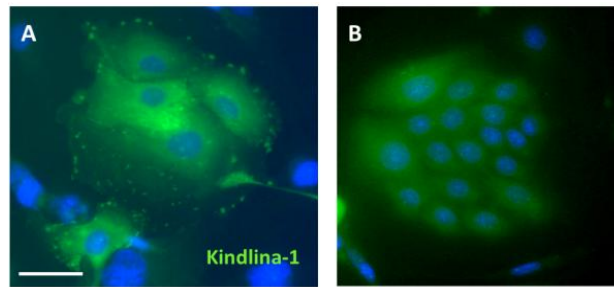
Posteriormente, se lleva a cabo el mapeo antigénico mediante IF para el col IV, col VII y/o laminina1, proteínas que presentan un patrón irregular y engrosado en la piel de pacientes SK, en comparación con la distribución lineal observada en controles sanos (Hiremagalore, Kubba et al. 2014). Este fenómeno se conoce como “reduplicación de la lámina basal” (figura 6) (Bruckner-Tuderman and Has 2013).



**Figura 6. Mapeo antigénico por IF para col IV. A)** Piel control con un patrón lineal. **B)** Piel de paciente SK (SK3) que muestra la reduplicación de la lámina basal. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

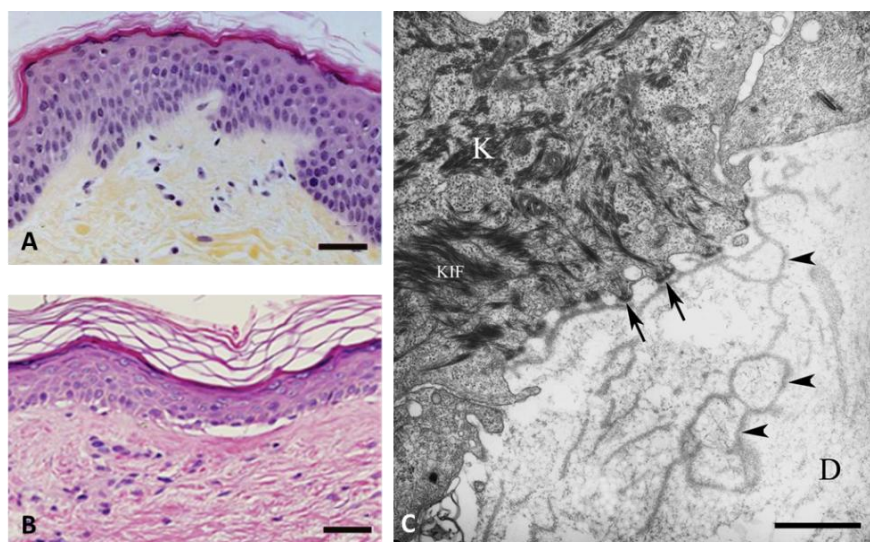
El mapeo antigénico de la biopsia para kindlina-1, principal proteína afectada en esta enfermedad, no se utiliza de forma rutinaria para el diagnóstico, debido a la falta de anticuerpos comerciales adecuados. Es posible, sin embargo estudiar la expresión de kindlina-

1 en células en cultivo (figura 7) aunque este análisis no es accesible para los servicios hospitalarios.



**Figura 7. IF para kindlina-1.** A) Queratinocitos control en los que se observa la distribución de kindlina-1 en las AF. B) Queratinocitos de paciente SK nulo para kindlina-1 (SK3): no se aprecia la proteína en las AF. Se puede observar el elevado fondo que produce la tinción. Barras de escala: 10  $\mu$ m.

Posteriormente, y tras el mapeo antigénico, es imprescindible la realización de un análisis genético para detectar y caracterizar la mutación/mutaciones que presente el gen *FERMT1* (Siegel, Ashton et al. 2003). Adicionalmente, se suele realizar un estudio histológico de una biopsia cutánea. Histológicamente, las pieles de pacientes SK se caracterizan por la presencia de una epidermis adelgazada, pérdida de las crestas interpapilares, vacuolización de la lámina basal y presencia de algunas áreas fibróticas en la dermis (figura 8.B) (White and McLean 2005; Lai-Cheong and McGrath 2010). En algunos casos, se pueden realizar estudios de microscopía electrónica de la biopsia, en los cuales se observa la reduplicación de la lámina basal y zonas de disrupción dermis/epidermis a distintos niveles (figura 8.C) (White and McLean 2005; Burch, Fassihi et al. 2006).



**Figura 8. Características histológicas de biopsias de piel SK.** A) Corte histológico teñido con hematoxilina/eosina (H/E) de una biopsia de piel control. Modificado de Bernerd, Marionnet et al. 2012. B) Corte histológico teñido con H/E de piel de paciente SK: epidermis atenuada, pérdida de las crestas interpapilares, vacuolización de la lámina basal y formación de ampollas. Modificado de Burch, Fassihi et al. 2006. C) Características ultraestructurales típicas



de SK. Reduplicación de la membrana basal característica (cabezas de fecha). Los filamentos de queratina (KIF) y los HD (flechas) son normales. K = queratinocitos basales; D = dermis. Modificado de White and McLean 2005. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  (A, B), 1  $\mu\text{m}$  (C).

Las características clínicas, junto con el diagnóstico histopatológico y genético, completan un buen diagnóstico diferencial del SK frente a otras enfermedades que cursan con síntomas y características clínicas similares tales como: Síndrome de Bloom, Síndrome de Cockayne, Disqueratosis Congénita, Síndrome de Rothmund-Thomson, Xeroderma Pigmentosum (XP) y otras EBs (Kaviarasan, Prasad et al. 2005; Kapoor 2014). El SK comparte, por ejemplo, con el XP tipo C (XP-C) la elevada fotosensibilidad, aunque en esta patología el defecto radica en una deficiente reparación del daño al ADN producido por la luz UV debida a una mutación en el gen que codifica para la proteína XPC.

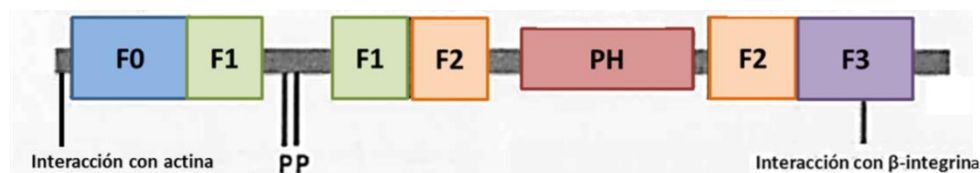
En la actualidad no existe ningún tratamiento curativo para el SK, únicamente se llevan a cabo terapias paliativas de los síntomas. En los casos en los que aparece un SCC, se requiere la resección del tumor, y en el caso de estenosis esofágica hay que llevar a cabo una dilatación del esófago (Lai-Cheong and McGrath 2010; Kapoor 2014).

### **3.3. Bases moleculares del SK**

Las kindlinas constituyen una familia de proteínas de las AF implicadas en diferentes mecanismos celulares, a través de la activación de vías de señalización mediadas por integrinas. En humanos existen tres miembros de esta familia evolutivamente muy conservados, kindlina-1, 2 y 3, con estructuras y secuencias similares (Lai-Cheong, Parsons et al. 2009). La kindlina-1 se expresa principalmente en queratinocitos del estrato basal y no se expresa en fibroblastos dérmicos. En condiciones fisiológicas en queratinocitos humanos, la kindlina-1 co-localiza con la vinculina en las AF, mientras que en los queratinocitos SK este patrón de expresión se ve alterado perdiéndose dicha co-localización (Siegel, Ashton et al. 2003; Lai-Cheong, Parsons et al. 2009). La kindlina-2 está asociada a la proteína migfilina y co-localiza con E-cadherina, expresándose en bazo, hígado, colon, cerebro, músculo esquelético y piel (dermis y epidermis). La kindlina-3 se expresa en tejidos hematopoyéticos y en células endoteliales, aunque no se expresa en queratinocitos ni en fibroblastos (Siegel, Ashton et al. 2003). Distintos estudios demuestran que kindlina-1 y -2 tienen algunas funciones solapantes y pueden compensar su función parcialmente. Además, kindlina-1 modula la regulación de kindlina-2 y viceversa (Margadant, Kreft et al. 2013), pero también tienen funciones diferenciadas, en particular en la formación de contactos célula-célula y en la migración celular (He, Esser et al. 2011; He, Sonnenwald et al. 2014).

El gen *FERMT1*, responsable del desarrollo de SK, se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 20 (*20p12.3*). Está constituido por 15 exones (14 codificantes y 1 no codificante) a lo largo de 48.5 kb de ADN genómico (White and McLean 2005). El gen codifica para la fosfoproteína kindlina-1, constituida por 677 aminoácidos, que tiene un peso molecular de 78 KDa y que pertenece a la familia de las kindlinas (Jobard, Bouadjar et al. 2003; White and McLean 2005). La kindlina-1, forma parte de las AF de los queratinocitos basales y se asocia con proteínas como la talina, la vinculina y la actina, interviniendo en procesos como migración, proliferación, adhesión y muerte celular (figuras 3 y 10) (Herz, Aumailley et al. 2006; Has, Ludwig et al. 2008; Lai-Cheong, Ussar et al. 2008; Lai-Cheong, Parsons et al. 2009; Lai-Cheong and McGrath 2011).

El extremo N-terminal de la kindlina-1 se une a la actina, mientras que por el extremo C-terminal se une al dominio citoplásmico  $\beta$  de la integrina ( $\beta_{1A}$  y  $\beta_3$ ) (Kloeker, Major et al. 2004; Has, Wessagowit et al. 2006). Contiene además un dominio FERM (filopodina y erzina/radixina/moesina, subdividido en cuatro subdominios: F0, F1, F2 y F3) dividido por un dominio PH (homólogo a pleckstrina) que media la asociación con fosfolípidos fosfatidilinositol específicos de la membrana plasmática, implicados en la señalización celular (figura 9) (Lai-Cheong, Parsons et al. 2009; Meves, Stremmel et al. 2009).



**Figura 9. Dominios de la proteína kindlina-1.** Dominio FERM dividido en 4 subdominios (F0, F1, F2 y F3) y dominio PH. Se muestran los dos residuos de serina que se fosforilan cuando se activa la proteína. Modificado de Has, Castiglia et al. 2011.

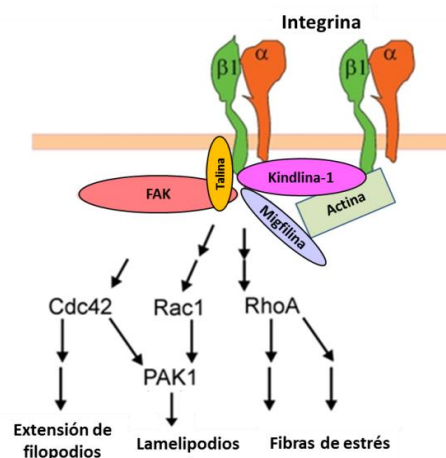
### **3.4. Heterogeneidad en SK (correlación genotipo-fenotipo)**

Las correlaciones genotipo-fenotipo son difíciles de establecer en esta enfermedad ya que se ha descrito la existencia de un alto grado de variabilidad fenotípica en cuanto a la fotosensibilidad, la edad de aparición de poiquilodermia y el grado de hiperqueratosis (Has, Castiglia et al. 2011). Algunos estudios sugieren que mutaciones que producen un cambio de aminoácido y deleciones que conservan el marco de lectura se corresponden con fenotipos menos agresivos de la enfermedad, ya que la expresión de la proteína está presente aunque reducida. Sin embargo, mutaciones nulas que no permiten expresión alguna de la proteína, desencadenan fenotipos más severos de la enfermedad (Has, Castiglia et al. 2011). Por otra

parte, se ha propuesto en varios estudios que el ambiente y los factores epigenéticos tienen un elevado impacto en el fenotipo de los pacientes SK (Lai-Cheong, Liu et al. 2007; Has, Castiglia et al. 2011). Además, se ha demostrado que el efecto acumulativo de eventos que inducen estrés celular (factores mecánicos, radiación UV, patógenos, etc.) en queratinocitos deficientes en kindlina-1, pueden tener un papel decisivo en la evolución de la enfermedad, disparando la sobreproducción de algunas citoquinas (Heinemann, He et al. 2011). Esto activaría, de manera paracrina, la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos en la dermis, pudiendo derivar en fibrosis y empeorando así la sintomatología de estos pacientes (Has, Herz et al. 2009; He, Sonnenwald et al. 2014). También existe una elevada heterogeneidad en pacientes SK respecto al desarrollo de SCC (Lai-Cheong, Tanaka et al. 2009). Varios estudios indican que la pérdida de kindlina-1 activa procesos oncogénicos y/o inhibe funciones supresoras de tumores, aunque los mecanismos propuestos no están del todo claros (Emanuel, Rudikoff et al. 2006; Rognoni, Widmaier et al. 2014).

### 3.5. Señalización en SK

En condiciones fisiológicas, la kindlina-1 modula el citoesqueleto y la adhesión de los queratinocitos, activando procesos de señalización gobernados por Rho GTPasas (Rac1, Cdc42 y RhoA). Estas proteínas inducen la formación de microfilamentos de actina, imprescindibles en proliferación y migración (figura 10). Hay evidencias de que la señalización vía Rho GTPasas es anormal en queratinocitos SK y por ello, presentan una forma celular aberrante, defectos migratorios y una adhesión y tasa de proliferación reducidas (Larjava, Plow et al. 2008; Has, Herz et al. 2009; Lai-Cheong, Parsons et al. 2010).



**Figura 10. Modelo propuesto del papel funcional de kindlina-1 en queratinocitos.** Kindlina-1 forma complejos con la subunidad  $\beta$  de la integrina y con la actina. Este complejo regula el citoesqueleto y la adhesión de los

queratinocitos activando procesos de señalización gobernados por Rho GTPasas (Rac1, Cdc42 y RhoA). Modificado de Has, Herz et al. 2009.

Por otra parte, se ha descrito en estudios *in vivo* con ratones, que la kindlina-1 controla la proliferación y diferenciación de las células madre epiteliales, teniendo así también un papel en su homeostasis al mantener un equilibrio a través de las integrinas, entre las señales inhibitorias del crecimiento mediadas por TGF $\beta$  y las señales promotoras del crecimiento mediadas por Wnt- $\beta$ catenina (Rognoni, Widmaier et al. 2014). En SK, se ha propuesto la desregulación de estos mecanismos, aumentando así la susceptibilidad a desarrollar tumores (Kloeker, Major et al. 2004; Rognoni, Widmaier et al. 2014).

### **3.6. Senescencia en SK**

Existen diversos estudios en queratinocitos SK que indican que, además de una marcada disminución de la tasa de proliferación (Herz, Aumailley et al. 2006; Lai-Cheong, Parsons et al. 2009), presentan senescencia prematura, por eso la expansión *in vitro* de las células se hace especialmente complicada en esta enfermedad. La expresión de marcadores de senescencia está aumentada, mientras que la de los marcadores de clonogenicidad y proliferación se encuentra disminuida. Los queratinocitos SK se detienen en la fase G1 del ciclo celular y existe una depleción de células madre y una disminución de su capacidad de autorenovación (Piccinni, Di Zenzo et al. 2013). Además, la producción de citoquinas proinflamatorias y el aumento de metaloproteasas, puede contribuir al envejecimiento celular observado en estos pacientes (Gilchrest 2006; Heinemann, He et al. 2011; Qu, Wen et al. 2012; Piccinni, Di Zenzo et al. 2013).

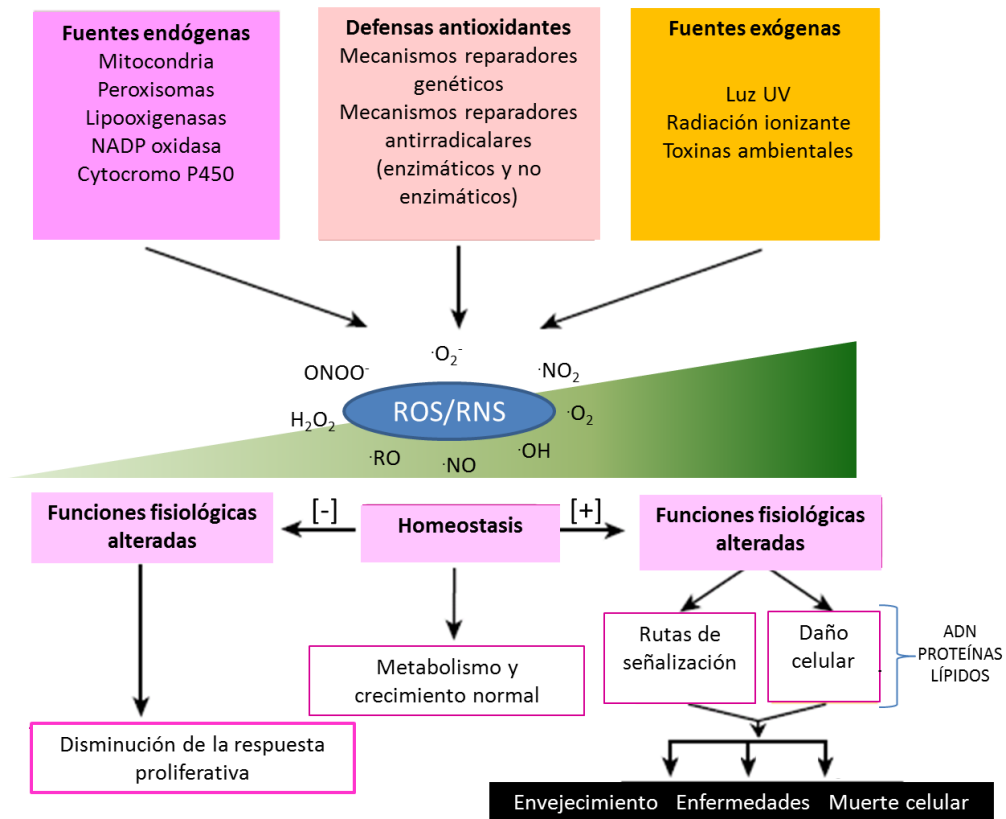
### **4. Estrés oxidativo y piel**

Aunque se ha identificado que las mutaciones en *FERMT1* son el origen de esta enfermedad, el complejo fenotipo de los pacientes SK no se puede explicar exclusivamente basándose en la función adhesiva de la kindlina-1 (White and McLean 2005). Por ello, es muy importante profundizar en los mecanismos subyacentes responsables de la fotosensibilidad, el envejecimiento prematuro y el desarrollo de cáncer. Estas características clínicas, no están relacionadas de manera directa con la fragilidad cutánea, pero están fuertemente asociadas con el estrés oxidativo (Wang, Wu et al. 2013).

El estado redox fisiológico de las células depende de un equilibrio entre la producción de radicales libres y la habilidad para detoxificar estos intermediarios reactivos. Cuando ocurre

un desequilibrio, se genera un estrés oxidativo en las células (Valko, Leibfritz et al. 2007). Los radicales libres son especies químicas, que poseen uno o más electrones desapareados, y que se producen en todas las células, incluso en condiciones fisiológicas. Tienen el potencial de reaccionar con una gran variedad de especies químicas, ya que participan en la señalización celular de un amplio rango de funciones biológicas. La mayoría de los radicales que se producen *in vivo* son originados tanto a partir de las especies reactivas de oxígeno (ROS: p.ej. superóxido, peróxido de hidrógeno, peróxidos lipídicos), como de nitrógeno (RNS: p.ej. óxido nítrico, peroxinitrito) (figura 11) (Finkel and Holbrook 2000; Lobo, Patil et al. 2010).

Las ROS son las principales moléculas implicadas en el estrés oxidativo celular y pueden ser producidas tanto por fuentes endógenas como exógenas (figura 11). Las fuentes exógenas más importantes son la luz UV, la radiación ionizante y las toxinas ambientales. Entre las endógenas se incluyen la actividad de la NADPH oxidasa de membrana, el citocromo P450, las lipo y ciclooxigenasas y el metabolismo de los peroxisomas (Bedard K. 2007). Pero la producción endógena más importante de ROS tiene lugar en la mitocondria. En ella, entre el 1-5% de los electrones transportados en la fosforilación oxidativa son desviados a la formación de superóxido, como un subproducto del metabolismo mitocondrial normal (figuras 11 y 13) (Boveris, Oshino et al. 1972; Balaban, Nemoto et al. 2005; Murphy 2009). Las ROS son intermediarias en cascadas de transducción que intervienen en procesos como proliferación, regulación del citoesqueleto, mitogénesis y diferenciación, siendo además inducidas en estrés celular, senescencia y muerte celular (Werner and Werb 2002). Las células han desarrollado diversos mecanismos de control que se encargan de mantener la homeostasis en la producción y degradación de ROS, lo que supone un estricto control de las funciones en las que intervienen (figuras 11 y 12) (Ray and Husain 2002; Chiarugi 2008).



**Figura 11. Fuentes y respuestas celulares a ROS/RNS.** Como consecuencia del desequilibrio entre las fuentes productoras de ROS/RNS y las defensas celulares, los niveles homeostáticos de ROS/RNS pueden alterarse influyendo en múltiples funciones fisiológicas como son el envejecimiento y la muerte celular (mediante daños en proteínas, lípidos y ADN). Modificado de Finkel and Holbrook 2000.

#### 4.1. Las ROS y su reactividad

La mayoría de los radicales libres suelen ser extremadamente reactivos e inestables, de manera que se pueden crear reacciones en cadena dando lugar a efectos biológicos remotos (Harman 1992; Kumar, Lim et al. 2012). Las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos son las dianas fundamentales de este tipo de reacciones pudiendo ser alterados en estructura y función.

Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, como el malondialdehído (MDA), pueden causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana celular (Sander, Chang et al. 2002; Yan, Hong et al. 2005; Marnett 1999; Del Rio, Stewart et al. 2005). Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por los radicales libres de distintas maneras. La más frecuente es la producción de rupturas de cadena simples y dobles (SSB y DBS) (Finkel and Holbrook 2000; Berg, Youdim et al. 2004; Richardson 2009).

#### 4.2. Sistemas de defensa antioxidante en la piel

Con el fin de evitar los efectos no deseados de los radicales libres, las células disponen de sistemas de protección frente a ellos. Diversas enzimas celulares y procesos metabólicos, mantienen los niveles de oxidación en valores mínimos (Young and Woodside 2001; Kohen and Nyska 2002; Pham-Huy, He et al. 2008). Cuando existe un desequilibrio, en condiciones patológicas, puede alcanzarse un daño oxidativo grave, que en última instancia desemboca en envejecimiento y muerte celular (figuras 11 y 13) (Finkel and Holbrook 2000; Berg, Youdim et al. 2004; Wang, Wu et al. 2013).

En la piel, podemos diferenciar dos mecanismos de protección, en función de si son preventivos o reparadores de la lesión. Los **mecanismos preventivos** pueden ser físicos (por la presencia de pelos y lípidos de la superficie del estrato córneo epidérmico), químicos (ácido urocánico y melanina) e inmunológicos (por las células de Langerhans) (Brenner and Hearing 2008; Seneschal, Clark et al. 2012; Pandel, Poljsak et al. 2013). Los **mecanismos reparadores** pueden ser antirradicales o genéticos.

##### 4.2.1. Mecanismos reparadores antirradicales:

El organismo dispone de toda una batería de mecanismos antirradicales para neutralizar la acción de las ROS (Mulero Abellán 2004). En la figura 12, se detallan los sistemas biológicos reparadores de defensa antioxidante y su interrelación.

El glutatión (GSH), es un componente no enzimático del sistema defensivo antioxidante que juega un papel central, neutralizando directamente los radicales libres mediante su propia oxidación (GSSG). La enzima gamma glutamil cisteína ligasa (GCL) cataliza el primer paso en la síntesis *de novo* del GSH. Está constituida por una subunidad catalítica (GCLc) y una reguladora (GCLm), controladas transcripcionalmente por una gran variedad de estímulos celulares incluido el estrés oxidativo (Krejsa, Franklin et al. 2010). El GSH tiene el papel protector más potente contra la radiación UVB (Wu, Fang et al. 2004). Así, su disminución en un cultivo de células epidérmicas humanas, las sensibiliza a las mutaciones y daños causados por luz UV aumentando la muerte celular (Jacob, Noren Hooten et al. 2013). En el sistema de fotoprotección epidérmico, la disponibilidad de suficiente glutatión reducido (GSH) es, por tanto, absolutamente esencial (Wu, Fang et al. 2004; Wang, Wu et al. 2013).

Además del GSH, existen otras moléculas no enzimáticas implicadas en la defensa antioxidante celular como son las vitaminas E, C, A y las proteínas transportadoras de metales. Las interacciones entre todos ellos, junto con los sistemas enzimáticos, hacen que se potencie

la efectividad de la defensa celular antioxidante (figura 12) (Di Mascio, Murphy et al. 1991; Finkel and Holbrook 2000).

Los sistemas defensivos antioxidantes enzimáticos incluyen una batería de enzimas que actúan sobre las ROS a distintos niveles. Por ejemplo, la superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que cataliza la reducción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) transformándolo en un producto menos reactivo como es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (figura 12). A continuación, la glutatión peroxidasa (GPx), usando GSH como cofactor (Michiels, Raes et al. 1994), y la catalasa (CAT) (Hoffschir, Daya-Grosjean et al. 1998), descomponen este  $H_2O_2$  (figura 12). La glutatión-S-transferasa (GST) es otra enzima antioxidante, que inactiva directamente los peróxidos (de los lípidos o del ADN) y detoxifica xenobióticos, los cuales son conocidos cofactores para la formación de radicales libres (figura 12) (Berhane, Widersten et al. 1994; Fedets 2014).

En las últimas décadas, se ha ido profundizando en el conocimiento de biomarcadores de estrés oxidativo específicos. La dificultad de definir adecuadamente estos marcadores radica en que no son fáciles de cuantificar al tratarse de moléculas muy inestables y altamente reactivas, y a que además, suelen estar presentes en fluidos y tejidos poco accesibles (Jacob, Noren Hooten et al. 2013). Recientemente, se desarrolló un sistema de biosensores redox mucho más específicos denominados roGFPs, que permiten una monitorización dinámica del potencial redox del glutatión en los distintos compartimentos celulares (ver apartado 18.1 de Materiales y Métodos) (Hanson, Aggeler et al. 2004; Gutscher, Pauleau et al. 2008).

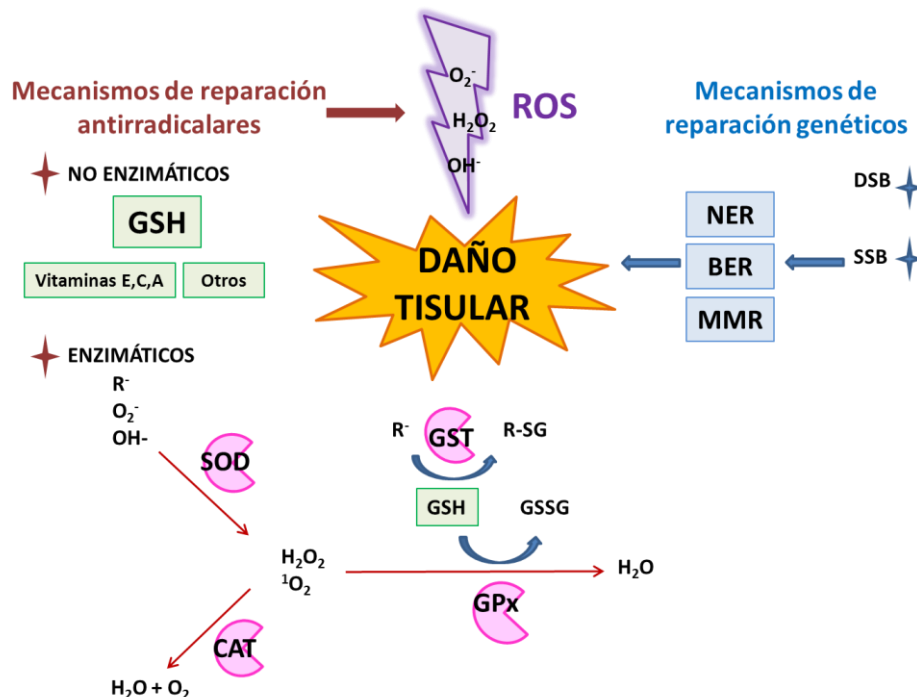


Figura 12. Sistemas de protección antioxidante. Mecanismos reparadores genéticos y antirradicales.



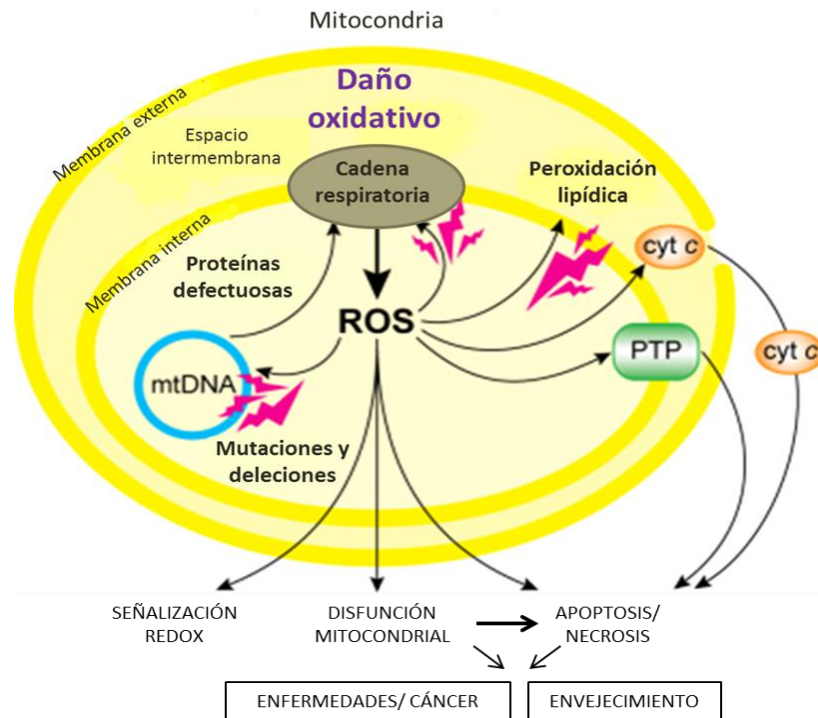
#### *4.2.2. Mecanismos reparadores genéticos:*

Estos mecanismos, reparan los daños causados en el ADN por las ROS, y se clasifican según reparen DSB o SSB (Novakova, Vysin et al. 2015). Los mecanismos encargados de las SSB son el NER (reparación por escisión de nucleótidos), BER (reparación por escisión de bases) y MMR (reparación de bases erróneas) (figura 12) (Kim and Wilson 2012; Kuper and Kisker 2013). NER se encarga de resolver los dímeros de ciclopirimidina (CPDs) provocados, principalmente, por la luz UV (Peak, Peak et al. 1987). Su importancia se evidencia en el caso del XP-C, una enfermedad que presenta deficiencias en este mecanismo y como consecuencia, los pacientes desarrollan cánceres cutáneos (Garcia, Llames et al. 2010; Rezvani, Kim et al. 2011). En general, defectos en estos mecanismos de reparación están asociados con inestabilidad genética y predisposición a padecer distintos tipos de cáncer (Hoeijmakers 2001; Slupphaug, Kavli et al. 2003; Li 2008).

#### **4.3. Mitocondria, estrés oxidativo y envejecimiento**

La variedad de respuestas inducidas por el estrés oxidativo, implicadas en la patofisiología del envejecimiento (una de las características clínicas de los pacientes SK), es complicada e interconectada y la mitocondria juega un papel central en ella (figura 13) (Balaban, Nemoto et al. 2005; Murphy 2009); (Barja 2014).

Las ROS mitocondriales aparecen como moléculas centrales en la señalización, participando en procesos tan diversos como la inducción de apoptosis o la expresión génica (figura 13) (Werner and Werb 2002; Chiarugi and Giannoni 2005; Chiarugi 2008). En condiciones patológicas, si el daño oxidante no es resuelto correctamente o se produce de manera crónica, puede derivar en la propia alteración de las funciones mitocondriales (maquinaria energética, señalización, ADNm, apoptosis...), que en última instancia se traduce en una mayor predisposición a desarrollar enfermedades (p.ej. cáncer) y envejecimiento prematuro (figura 13) (Wang, Wu et al. 2013).



**Figura 13. Representación esquemática de la producción mitocondrial de ROS y sus efectos en la célula.** La acumulación de ROS mitocondriales puede dañar proteínas, membranas y el ADN mitocondrial, alterando la síntesis de ATP y el resto de funciones que llevan a cabo las mitocondrias. Además, el daño oxidativo mitocondrial puede activar la maquinaria apoptótica. Modificado de Murphy 2009.

Se ha visto que algunas proteínas Rho GTPasas son también mediadoras de la producción de ROS mitocondriales en diversas cascadas de señalización que controlan la expresión génica y la respuesta al estrés. De este modo se establece un vínculo entre integrinas, que interactúan con Rho GTPasas, y ROS mitocondriales (Chiarugi and Giannoni 2005). Estos hallazgos son particularmente interesantes porque podrían aportar un nexo entre la kindlina-1, una proteína que conecta el citoesqueleto de actina con la ECM a través de las integrinas, y una respuesta celular relacionada con el estrés oxidativo en la mitocondria.

#### 4.4. Radiación UV y fotoenvejecimiento cutáneo

Como se ha descrito en numerosos estudios, el proceso de envejecimiento de la piel se debe tanto a factores genéticos, como epigenéticos (Heinemann, He et al. 2011; Qu, Wen et al. 2012; Vitale, Kisslinger et al. 2013). De entre todos ellos, la radiación UV tiene un papel crucial en este proceso debido principalmente al daño directo que produce sobre el ADN y que da lugar, en forma aguda, a fotoproductos como los CPDs y lesiones pirimidina-pirimidina 6-4 (6-4 PPs) con un potencial extremadamente mutagénico si no se reparan eficientemente

(Wang, Balagula et al. 2010). Por otra parte, la luz UV también genera una elevada cantidad de radicales libres que desencadenan daños en diversas biomoléculas (ver apartado 4.1) (Heck, Vetrano et al. 2003; Gilchrest 2006)

Si bien el fotoenvejecimiento cutáneo es un efecto muy importante, la consecuencia más grave del daño acumulado producido por la luz UV es el cáncer de piel (Heck, Vetrano et al. 2003). Por ello, se hace evidente la necesidad de estudiar la respuesta celular a la luz UV en una enfermedad que presenta envejecimiento prematuro, fotosensibilidad y una mayor predisposición a padecer cáncer de piel, como es el SK.

### **5. Modelos animales en SK**

El estudio de la patología de SK en un contexto *in vivo*, supone un reto indispensable. Hasta la fecha, los modelos animales nulos para kindlina-1 que se han desarrollado no recapitulan de manera completa la patología humana. En cambio, sí manifiestan otras características, que aunque no son patognomónicas del SK, resultan en graves procesos como la epiteliosis intestinal severa, causantes de mortalidad prematura (Ussar, Moser et al. 2008; Meves, Stremmel et al. 2009; Bruckner-Tuderman and Has 2013). El último modelo desarrollado (ratones con *FERMT1* deleciónado específicamente en piel), consigue recapitular algunas de las principales características histopatológicas de la enfermedad. En él se producen compartimentos de células madre hiperactivos lo que genera una epidermis alterada, desarrollo de folículos pilosos ectópicos y un aumento de la susceptibilidad a padecer tumores de piel (Rognoni, Widmaier et al. 2014). Pero aun así, este modelo dista de recapitular el fenotipo completo del Síndrome de Kindler debido, entre otros motivos, a las importantes diferencias existentes entre la piel de ratón y la humana, tanto a nivel arquitectónico como funcional (Del Rio, Larcher et al. 2002).

Nuestro laboratorio ha consolidado una amplia experiencia en el desarrollo de modelos humanizados de diversas patologías mediante una metodología basada en la ingeniería de tejidos, que permite la generación de un elevado número de ratones trasplantados que portan un área significativa de piel humanizada. Una de las ventajas de esta metodología es que, partiendo de una pequeña biopsia de piel de un donante/paciente, requerida para la amplificación de los queratinocitos y fibroblastos y la producción de una piel bioingenierizada *in vitro*, se consigue regenerar, tras su trasplante a ratones inmunodeficientes, un parche de piel de origen humano (Del Rio, Larcher et al. 2002; Llames, Del Rio et al. 2004; Garcia, Escamez et al. 2007).

Este sistema evita los problemas relacionados con la heterogeneidad de la muestra y la disponibilidad de biopsias, algo que es de especial relevancia cuando se trata de una enfermedad rara como es el SK. La piel humana regenerada mantiene todas las características arquitectónicas y funcionales de la piel normal, incluso cuando se genera a partir de queratinocitos modificados genéticamente (Del Rio, Larcher et al. 2002) (figura 15, ver apartado 6 de Materiales y Métodos).

A nivel preclínico, en nuestro laboratorio se han conseguido modelizar condiciones tanto fisiológicas como patológicas (cicatrización cutánea, enfermedades inflamatorias como la psoriasis, respuesta a luz UV y varias genodermatosis como la EB y el XP, entre otras) (Garcia, Escamez et al. 2007; Escamez, Garcia et al. 2004; Gache, Baldeschi et al. 2004; Garcia, Llamas et al. 2010; Guerrero-Aspizua, Garcia et al. 2010).

Otra ventaja asociada al modelo, es que los componentes celulares pueden ser manipulados genéticamente durante el proceso de amplificación, permitiendo así profundizar en las rutas moleculares y celulares que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad, así como permitir la terapia génica como aproximación terapéutica.

Este modelo experimental, se establece como una excelente plataforma que permite profundizar en la comprensión de los mecanismos alterados en SK en un contexto *in vivo*, característica especialmente relevante en una enfermedad rara. Adicionalmente, ofrece la posibilidad de descubrir y evaluar nuevas estrategias terapéuticas, que supongan un avance real en el tratamiento y la calidad de vida de los pacientes de SK.

## ***OBJETIVOS***



El objetivo principal de este trabajo, es el estudio de la patogénesis de SK en cuanto a las características clínicas no relacionadas con la función adhesiva de la kindlina-1, como son el **envejecimiento prematuro**, la **elevada fotosensibilidad** y una **mayor predisposición al desarrollo de tumores mucocutáneos**.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. *Caracterizar* el papel del **estrés oxidativo** en la patogénesis de la enfermedad mediante diferentes aproximaciones experimentales, en células epidérmicas de pacientes SK.
2. *Analizar* la **ultraestructura y función** de los principales orgánulos productores de ROS, las **mitocondrias**, tanto en biopsias de piel como en queratinocitos primarios en cultivo de pacientes SK.
3. *Evaluar* la respuesta a la irradiación UVB (**fotosensibilidad**) en los queratinocitos SK, mediante estudios de **viabilidad** celular.
4. *Profundizar* en las rutas metabólicas subyacentes a la sintomatología descrita en esta genodermatosis, mediante **análisis transcriptómicos** en células epidérmicas de pacientes SK.
5. *Generar* un **modelo in vivo humanizado** de SK, mediante técnicas de **Ingeniería Tisular** y su **corrección** fenotípica, mediante una aproximación basada en **terapia génica**.





## ***MATERIALES Y MÉTODOS***



### **1. Pacientes y biopsias cutáneas**

El presente estudio se realizó con muestras procedentes de cuatro pacientes SK y tres donantes sanos (apareadas por sexo y edad), además de un paciente XP-C. Las biopsias fueron tomadas de zonas no afectadas de los brazos. Los consentimientos informados se obtuvieron bajo el amparo del acuerdo con los hospitales donde se tomaron las biopsias y las muestras de sangre para el diagnóstico genético. El Comité de Ética de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España) evaluó y aprobó esta investigación, declarando que los procedimientos seguidos estaban de acuerdo con los estándares éticos institucionales en experimentación humana y que el proyecto se adhería a las directrices de la Declaración de Principios de Helsinki y a revisiones posteriores incluidas en Seul 2008 (Anexo II).

### **2. Cultivos celulares**

Todos los cultivos celulares que se describen a continuación se mantuvieron en un incubador de CO<sub>2</sub> (NAPCO, ThermoScientific), a 37°C en una atmósfera saturada de humedad compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue reemplazado cada dos o tres días, en función de la actividad metabólica celular. Todo el trabajo experimental llevado a cabo con células se realizó en condiciones de asepsia, en una cabina de flujo laminar de bioseguridad nivel II.

Para proceder al subcultivo celular, la monocapa de células adheridas se lavó con PBS (tampón fosfato salino) 1X y las células se liberaron de la superficie de crecimiento por tripsinización, utilizando una solución de tripsina/EDTA (tripsina 0,25 %, EDTA (Etilén-Diamino-Tetra-Acetato) 0.02%) (Sigma-Aldrich).

Para su preservación, las células se congelaron en nitrógeno líquido. Para ello, cultivos en fase exponencial de crecimiento se tripsinizaron y se resuspendieron en suero fetal bovino (FBS) (BioWhittaker) con dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck) al 10% (v/v) como agente criopreservante.

#### **2.1. Líneas celulares**

Las líneas celulares HEK 293-T, PA317 y HaCaT utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*) y se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (GIBCO-BRL) suplementado con 10% de FBS y antibiótico/antimicótico (1%) (Life Technologies). La línea celular HaCaT sh*FERMT1* fue generada en el laboratorio de la Dra. Rosario Perona (IIB, Instituto de Investigaciones Biomédicas, "Alberto Sols", Madrid) y cultivada con DMEM suplementado con 10%

de FBS y el antibiótico puromicina (1µg/ml) (Sigma-Aldrich), para mantener en el cultivo la selección de las células con *FERMT1* silenciado.

## **2.2. Cultivo primario de queratinocitos y fibroblastos humanos**

A partir de las biopsias cutáneas, y mediante varias rondas de digestión enzimática con Colagenasa A (Roche) y Tripsina (Tenchini, Ranzati et al. 1992), se obtuvieron los queratinocitos y fibroblastos. Las células utilizadas en todos los experimentos se mantuvieron entre el pase 3 y 5.

### **2.2.1. Queratinocitos:**

Los queratinocitos primarios fueron cultivados sobre una capa de *feeder* (fibroblastos murinos: línea 3T3-J2 cedida por el Dr. J. Garlick (Department of Oral Biology and Pathology, School of Dental Medicine, SUNY, StonyBrook, New York) letalmente irradiado (Rayos – X, 50Gy)) (Meana, Iglesias et al. 1998)).

El **medio de siembra** de los queratinocitos está formado por una mezcla en proporción 3:1 del medio DMEM y del medio HAM'S F12 (GIBCO-BRL), suplementado con un 10% de FBS, insulina (5 µg/ml), toxina colérica (0.1 nM), hidrocortisona (0,4 µg/ml), adenina (2.43 ng/ml) y tirosina triyodada (0.2 ng/ml) (Sigma Aldrich). El medio se reemplazó cada 2-3 días por **medio de crecimiento**, que se diferencia del anterior en la adición del factor de crecimiento epidérmico (EGF: *Epidermal Growth Factor*) (10 ng/ml; Sigma Aldrich) (Meana, Iglesias et al. 1998). El antibiótico utilizado en estos cultivos fue Primocín (100 µg/ml; InvivoGen).

Para los experimentos de biomarcadores de estrés oxidativo, viabilidad celular microscopía electrónica y confocal y análisis de expresión, los queratinocitos fueron cultivados en el medio definido Cnt-BM.1 Basal Medium (CellINTEC), en condiciones libres de *feeder*, para evitar interferencias de éste último en los resultados.

### **2.2.2. Fibroblastos:**

Los fibroblastos humanos fueron aislados de las mismas biopsias de las que se obtuvieron los queratinocitos. Después de su obtención mediante digestión enzimática fueron cultivados en DMEM con 10% de FBS y Primocín.

## **3. Obtención y caracterización de la línea HaCat shFERMT1**

Esta línea fue generada en el laboratorio de la Dra. Rosario Perona (IIB, Instituto de Investigaciones Biomédicas, “Alberto Sols”, Madrid). Las partículas virales para la infección se

generaron siguiendo las instrucciones del fabricante usando GIPZ Lentiviral shRNA para Mad2 y para BubR1 (ThermoScientific Open Biosystems). Se sembraron  $4.5 \times 10^6$  células HEK293-T en medio DMEM suplementado con 10% de FSB y se transfectaron con lipofectamina 2000 (Invitrogen) con 15  $\mu\text{g}$  de sh*FERMT1*, 7  $\mu\text{g}$  de plásmido de la envuelta (VSV-G) y 7  $\mu\text{g}$  de plásmido Helper (pCD/NL-BH). El sobrenadante se recogió a las 48h y 72h después de la transfección y se congeló en pequeñas alícuotas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. La transducción se llevó a cabo utilizando  $50 \times 10^4$  células HaCaT por pocillo en una placa de 6 pocillos. 48h después de la transducción se examinaron las células bajo el microscopio de fluorescencia para ver la expresión de GFP como indicador de la eficiencia de la traducción. Después de 72h, las células se analizaron para comprobar la reducción de la expresión génica de *FERMT1* mediante PCR cuantitativa (qPCR) (*FERMT1* F: GGAATGTAAACTGGGAAACC; *FERMT1* R: GGACAAGAAAATGTAGCCGC, Sigma-Aldrich), comparándola con la de HaCaT que portaban shARN control. Los niveles de expresión de la *GAPDH* se midieron en todas las muestras para normalizar la expresión génica en las diferencias entre muestras, tanto en la cantidad y calidad del ARN como en la eficacia de la transcripción reversa. Las HaCaT sh*FERMT1* fueron usadas en los experimentos incluidos en esta memoria, a partir del pase número 4.

#### **4. Diseño y producción de vectores retrovirales**

##### **4.1. Fabricación del vector retroviral pLZR-*FERMT1*-ires-GFP**

El vector retroviral que fue utilizado es el pLZR-ires-GFP, modificado en nuestro laboratorio (Larcher, Del Rio et al. 2001), que porta el promotor LTR híbrido y repeticiones retrovirales terminales largas (LTR: del inglés *retroviral long-terminal repeat*) (figura 14). El ADNc que codifica para la kindlina-1 de ratón, se aisló por digestión enzimática con la enzima de restricción NotI (New England Biolabs) a partir del plásmido EGFP-C1 kindlina-1, amablemente cedido por el Dr. Emanuel Rognoni (Max-Planck Institute, Germany). Posteriormente, se hicieron romos los extremos del corte con la enzima Klenow (Roche) y después de una purificación, se llevó a cabo una digestión con la enzima BglII (New England Biolabs).

Dado que no existía ninguna estrategia de clonaje posible para introducir ese fragmento directamente en el vector retroviral pLZR-ires-GFP, utilizamos como paso intermedio, el plásmido de expresión pEGFP-N1. Este plásmido fue modificado de la siguiente manera: se digirió primero con EcoRI, en segundo lugar ambos extremos se hicieron romos y por último uno de los extremos fue digerido con BglII. De esta manera se pudo ligar el ADNc de kindlina-1 con el plásmido pEGFP-N1, para extraerla posteriormente con las enzimas de restricción BglII y Sall. Posteriormente, y previa digestión del pLZR-ires-GFP con BamHI y XhoI, se ligó con el fragmento que contenía el ADNc de

kindlina-1 obteniendo así el vector retroviral pLZR-*FERMT1*-ires-GFP (BamHI/BglII y XhoI/SalI generan extremos cohesivos). De esta manera, el ADNc de *FERMT1* se pudo co-expresar junto con ires-GFP.



Figura 14. Construcción retroviral del pLZR-ires-GFP y el gen *FERMT1*. Modificado de Larcher, Del Rio et al. 2001.

#### **4.2. Generación de líneas estables productoras de partículas retrovirales y transducción celular**

Las partículas retrovirales se generaron, mediante fosfato cálcico en la línea celular HEK 293-T, por cotransfección transitoria del plásmido que contenía el gen de interés (pLZR- *FERMT1*-ires-GFP) junto con un vector ecotrópico, que contiene los genes *Gag-Pol-Env*. Con estas partículas retrovirales, se infectó la línea empaquetadora PA317 obteniendo líneas productoras estables. La expresión de la proteína GFP, como gen marcador, permitió seleccionar la población celular infectada llevando a cabo la separación celular (*cell sorting*) (Influx™, BecktonDickinson), obteniendo un 98% de células positivas para el transgén.

Las otras dos líneas PA317, que se utilizaron en el presente trabajo para los ensayos de biosensores de estrés oxidativo (PA317-Grx1-roGFP2 y PA317-mito-Grx1-roGFP2) fueron fabricadas en colaboración con el Dr. Santiago Lamas (CIB, Madrid), a partir de los retrovirus (Grx1-roGFP2 y mito-Grx1-roGFP2).

Posteriormente, con los sobrenadantes virales de las líneas productoras, en presencia de polibreno (8 µg/ml), se infectaron cultivos de queratinocitos primarios mediante dos rondas consecutivas de infección. Entre los dos ciclos de infección de los queratinocitos se realizó un cambio de medio. El porcentaje de transducción obtenido, determinado por visualización mediante microscopía de fluorescencia, fue superior al 75% de células positivas para el transgén.

#### **5. Animales de experimentación**

Para este estudio se utilizaron hembras de ratón inmunodeficientes (fondo genético NMRI-Foxn1<sup>nu</sup> /Foxn1<sup>nu</sup> RjOrl, JanvierLabs) de 6-8 semanas de edad. Los animales fueron albergados durante la duración del experimento en las instalaciones del animalario del CIEMAT (Número de registro ES280790000183) en condiciones estériles, usando jaulas ventiladas individualmente del tipo ILL, un máximo de 6 animales por jaula, con 25 cambios de aire por hora y con viruta y pellets blandos esterilizados térmicamente que usan como cama. Tras realizar la cirugía, los animales se albergaron individualmente en jaulas separadas, manteniendo las mismas condiciones.

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a la Normativa Europea y Española, y cumpliendo con las regulaciones de la protección y el uso de animales en experimentación (Convención Europea ETS 1 2 3, sobre el uso y protección de mamíferos vertebrados utilizados en experimentación y otros propósitos científicos; y Convención Española R.D. 1201/2005 y 53/2013 sobre la protección y el uso de animales en investigación científica). Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CIEMAT, de acuerdo con todas las directrices externas e internas de bioseguridad y bioética.

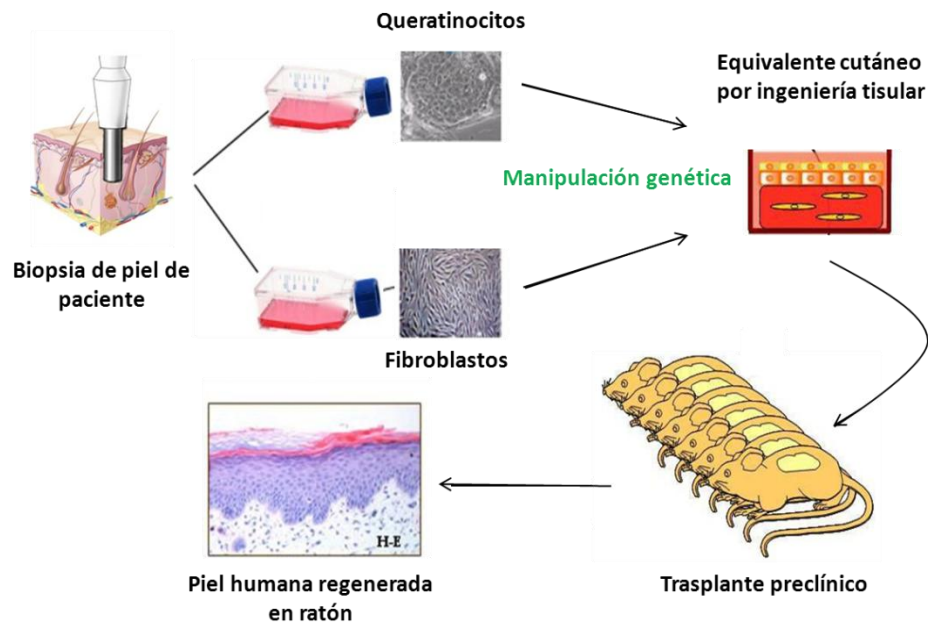
## **6. Bioingeniería de equivalentes cutáneos humanos y trasplante**

### **6.1. Preparación de equivalentes dermo-epidérmicos**

El equivalente de piel humanizada realizado por bioingeniería se basa en el uso de fibrina, utilizando como fuente de ésta, el fibrinógeno procedente de crioprecipitado de plasma de cerdo. El plasma fue proporcionado por la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid). El plasma se sometió a 3 ciclos de congelación-descongelación para obtener el crioprecipitado, que se centrifugó a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el sedimento se resuspendió en NaCl al 0.9% y se incubó a 37°C para disolver completamente el fibrinógeno (Meana, Iglesias et al. 1998).

Para la producción de los geles de fibrina, se mezclaron 1.5 ml de la solución de fibrinógeno (crioprecipitado) con 5 ml de DMEM suplementado con 10% FBS que contenía aproximadamente  $2 \times 10^5$  fibroblastos humanos (de donante sano o de paciente con Síndrome de Kindler). Inmediatamente después, se añadieron 0.5 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.025 mM (Sigma Aldrich) y 5.5 UI de trombina bovina (Sigma Aldrich) en un volumen final de 7 ml. La mezcla se añadió a dos pocillos de placas p6 (3.5 ml por pocillo) (Corning Costar Corp.), donde se dejó solidificar a 37°C durante al menos 2 horas (Meana, Iglesias et al. 1998). Posteriormente, se añadió sobre el gel el medio de siembra de queratinocitos y se dejó en el incubador a 37°C, durante un periodo de incubación superior a 12 horas (O/N).

Los queratinocitos se sembraron sobre el gel (aproximadamente 800.000 queratinocitos/gel) en ausencia de *feder* y usando el medio de siembra de queratinocitos. A las 48 horas se añadió medio de crecimiento (ver apartado 2.2.1), y cuando las células llegaron a confluencia, el equivalente cutáneo pudo ser trasplantado a ratones desnudos (ver apartado 5 y 6.2) (figuras 15 y 16).



**Figura 15. Esquema de la generación de equivalentes cutáneos humanos (ratones humanizados).** A partir de una biopsia de piel de un donante o paciente, y después de la amplificación del compartimento dérmico y epidérmico en cultivo, se generan los equivalentes dermo-epidérmicos que son trasplantados a ratones inmunodeficientes. Ambos compartimentos pueden ser modificados genéticamente en cultivo. El trasplante en el ratón genera una piel indistinguible de la humana real, como se muestra en la hematoxilina-eosina (H-E). Modificado de Guerrero-Aspizua 2015.

## 6.2. Trasplantes de equivalentes cutáneos

Nuestro grupo desarrolló un procedimiento quirúrgico optimizado que reemplaza el vendaje, y con el que se consigue una mejora en la toma del trasplante de piel ortotópico utilizando los equivalentes cutáneos generados por bioingeniería (Meana, Iglesias et al. 1998; Del Rio, Larcher et al. 2002; Llames, Del Rio et al. 2004). El método consiste en utilizar como apósito biológico, la piel del propio ratón desvitalizada mediante ciclos sucesivos de congelación (nitrógeno líquido)-descongelación (37°C).

El trasplante se realizó en la región dorsal de los ratones (figura 16), y la regeneración cutánea o toma del injerto se completó aproximadamente en un plazo de 9-12 semanas después del trasplante. Tras este periodo se considera que la piel regenerada ya es una piel madura (Del Rio, Larcher et al. 2002). Posteriormente el ratón fue sacrificado y el tejido se preparó para su procesamiento histológico.



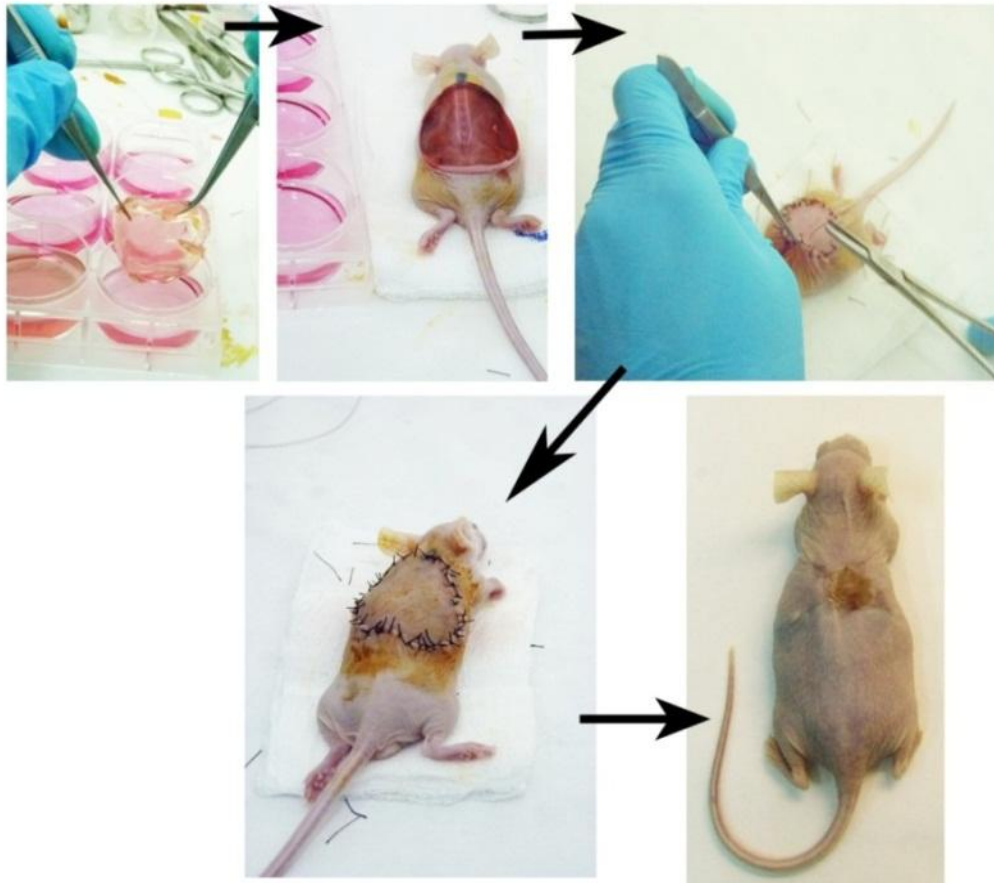


Figura 16. Proceso de trasplante en la región dorsal de los ratones inmunodeficientes.

## **7. Extracción de ácidos nucleicos**

### **7.1. ADN genómico (ADNg)**

Para la extracción del ADNg se partió de  $2 \times 10^6$  células. Éstas se lavaron con PBS 1X y fueron tripsinizadas y posteriormente centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm. Para la lisis se resuspendieron las células en 700  $\mu$ l de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8; EDTA 5 mM, NaCl 400 mM, SDS 1%) al que se le añadieron 10  $\mu$ l de proteinasa K (20  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Roche). A continuación, se incubaron a 55°C en agitación de 3 a 5 horas. Después, se añadió RNasa (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Roche) durante 30 minutos a 25°C. El ADN se precipitó mediante centrifugación con un volumen de isopropanol (Scharlau), y se lavó con etanol (Scharlau) al 75% seguido de centrifugación, para eliminar las sales residuales. El sedimento se dejó secar 10-15 minutos y se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 7,5).

## 7.2. ARN

El ARN de las células se aisló con Trizol (Gibco-BRL) y un rastrillo con el que se facilitó el despegado de las células del frasco de cultivo. Se añadió cloroformo (Merck) y, tras centrifugación de 15 minutos a 13000 rpm, se recogió la fase acuosa. Se precipitó el ARN con isopropanol y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se lavó con etanol (Scharlau) al 75% y se dejó secar al aire. Finalmente, se resuspendió en agua libre de nucleasas. El ARN obtenido se purificó usando el kit “*Turbo DNA free*” (Ambion) para la eliminación de posibles restos de ADN en las muestras.

## **8. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR para el análisis de las mutaciones de FERMT1**

Las mutaciones fueron diagnosticadas usando 15 pares de cebadores intrónicos (Metabion) diseñados para amplificar exones individuales y sitios de corte flanqueantes del gen *FERMT1* (tabla 2). Las PCR se llevaron a cabo usando 250 ng de ADNg de pacientes y controles como molde en una reacción de 25  $\mu$ l que contenía: cebadores directo (F, del inglés *forward*) y reverso (R, del inglés *reverse*) 1  $\mu$ M,  $MgCl_2$  1.5 mM, 50  $\mu$ M de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), tampón de PCR 1x y 1.25 U de *Taq* polimerasa (PE Biosystems). El programa de reacción que se usó, en el termociclador Thermal Cycler S1000 (Biorad), para la amplificación de las secuencias específicas fue el siguiente:

5 minutos 95°C	} 35 ciclos (X: temperatura específica para cada pareja de oligonucleótidos)
45 segundos 95°C	
45 segundos X°C	
45 segundos 72°C	
10 minutos 72°C	

Tras la amplificación, 5  $\mu$ l del producto de reacción fue resuelto en geles de agarosa (*agarose D-1 low EEO*, Conda) del 1% en tampón de base tris, ácido bórico y EDTA (TBE: Tris-Borato-EDTA) con 0,005% de bromuro de etidio y examinado en el transiluminador *Gel Doc XR+* (Bio Rad). El resto del producto de PCR fue secuenciado (ver apartado 8.1).

Cebador	Secuencia	Posición antes/después del exón	Tm (°C)	Tamaño del producto (bp)
KIND1F	AAATCTGCAGACTGCGCTC	-372	60	473
KIND1R	GAGGCTGCAGAAAGAAAGGG	+101		
KIND2F	ATATCTGGAACA CCGGAAC	-150	58	401
KIND2R	ATTGCTCTCCAGGGCATTAC	+116		
KIND3F	TGAGGAGCTGGAGATCAGTT	-123	58	416
KIND3R	GAAGTAGGCAGAATGCACAC	+83		
KIND4F	GACCCTGAGTCTTAGAAGGA	-67	58	343
KIND4R	GCCTTTCCTCATCACATCAG	+129		
KIND5F	CAGTGCCAGCTTGACTTAT	-144	58	455
KIND5R	ATCCCTAGGCCTACCAACTT	+97		
KIND6F	CAGTGCTCAGAAAGTGTCAG	-186	58	407
KIND6R	GCTAACAGGCGATCACACA	+118		
KIND7F	CTGAGCTGAAGTTTGCTGCA	-117	58	434
KIND7R	GTGTGTGGATTATGAGGAGC	+209		
KIND8F	AAGGAGACCTCTGTTAGGA	-133	56	404
KIND8R	CTTGTTAGGTGAAGGCATC	+139		
KIND9F	GTAGCGAGTGAAACTGAAG	-168	56	315
KIND9R	ACCTTTGAACCATGAACCTG	+109		
KIND10F	TGCAGCGTGTCCACATTTT	-60	58	257
KIND10R	GGATTACAGGTTTGAGCCAC	+72		
KIND11F	ACAGATGCCTCAGAACTCAG	-46	58	208
KIND11R	TGCTCTTAGGCTTAGGGAG	+55		
KIND12F	GCTTTGCACTTGAGCTTGCT	-43	58	375
KIND12R	GTGCTGGAATTACAGGTGTG	+110		
KIND13F	CTAACAGGGTGATCACAGAG	-66	56	269
KIND13R	CTAAATGAGAAAAGTGGGGCT	+78		
KIND14F	CTTCATTGTCCATTCCTCTG	-123	58	328
KIND14R	CAATTCTGAGGGACACACAT	+60		
KIND15F	CCAGTCCAGCAAAGCACTTT	-74	58	343
KIND15R	GTCCA GAATCTACATGCTGG	+95		

**Tabla 2. Pares de cebadores utilizados para el diagnóstico de Síndrome de Kindler.** Modificado de Siegel, Ashton et al. 2003.

### 8.1. Secuenciación automática

Los fragmentos amplificados por PCR que constituyen los 15 exones del gen *FERMT1*, fueron analizados por secuenciación automática en el Servicio de Secuenciación Sanger de la Unidad de Genómica (Fundación Parque Científico de Madrid), de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras fueron procesadas en el secuenciador automático *ABI PRISM 3730 DNA Analyzer* (AppliedBiosystems) y analizadas con los programas *Sequencher 4.8*, *Chromas Pro 1.32* y la herramienta web *Lalign Server (ExPasy Bioinformatics Resource Portal)*.

### 9. PCR de transcripción reversa (RT-PCR)

Tras verificar la integridad del ARN, mediante observación del mismo en un gel-fosfato teñido con bromuro de etidio en un transiluminador, se procedió a la reacción de transcripción reversa. Para esto, se utilizó 2 µg de ARN y se siguieron las instrucciones especificadas en el kit "*SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*" (Invitrogen). El ADN complementario (ADNc) resultante se amplificó mediante PCR, con cebadores específicos diseñados para comprobar las mutaciones de los pacientes, diagnosticados por PCR (pares 1° (I11-F, I11-R1, I11-R2) y 2° (SK2-F, E1415-R) para la

paciente SK1, par 3° (HAS-F, HAS-R) para SK2 y par 4° (SK1-F, E1415-R) para la paciente SK4) (tabla 3). Como control de carga se utilizó el gen *GAPDH* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa).

	Tamaño banda (pb)	Localización
5' I11: 5'-GTATTTGAGATGTGACCATGTGG-3' 3' I11-1: 5'-CTGTGATTGTTTGTACAAAG-3' 3' I11-2: 5'-CTTGCTTCCCCTTACCTTCC-3'	200 1000	Exón 11-Intrón 11 Intrón 11 (pre-polyA) Intrón 11 (post-polyA)
5' SK2: 5'-GCTGAAACACAGGATTTGC-3' 3' E1415: 5'-CCGGTCAATTTGTGGAACAAG-3'	1037	Exón 8 Exón 15
5' HAS: 5'-CTCCAACAGCTTCAGTTCA-3' 3' HAS: 5'-GTTCCATAAGGGAGCGTGAG-3'	270	Principio exón 5 Final exón 5
5' SK1: 5'-GCTTCCTGGGAGCTTGTGG-3' 3' E1415: 5'-CCGGTCAATTTGTGGAACAAG-3'	1980	Exón 1 Exón 15

Tabla 3. Pares de oligonucleótidos cebadores utilizados en las RT-PCR.

El primer par de cebadores de la tabla, utilizado para llevar a cabo la comprobación de la mutación de la paciente SK1, está constituido por el cebador I11-F (dirección 5'), que comprende las últimas bases del exón 11 y las cuatro primeras del intrón 11 donde se incluye la mutación (figura 17). Por otra parte, por los cebadores I11-R1 y 2 (dirección 3'), que se diseñaron para reconocer dos secuencias diferentes dentro del intrón 11 situadas, respectivamente, antes y después de una señal de poliadenilación (figura 17).

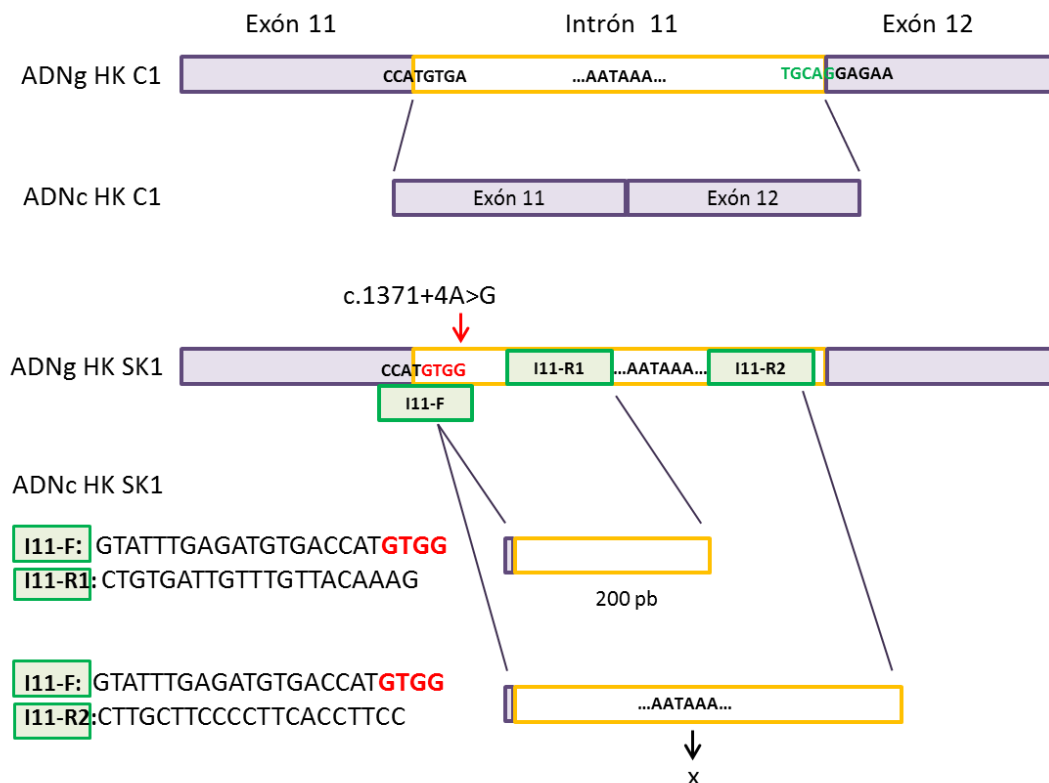


Figura 17. Esquema de la mutación de la paciente SK1 comparando su ADNc con el ADNc control y esquema de los cebadores diseñados para estudiar la mutación. F: forward, R: reverse.

Los reactivos usados para la reacción de PCR son los que se muestran a continuación (Invitrogen) (tabla 4):

Mezcla de reacción	Volumen final= 25 $\mu$ l
ADNc	1 $\mu$ l
Tampón 10X	2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,75
dNTPs (10 mM)	0,5
Oligonucleótidos cebadores (10 $\mu$ M)	0,5
Enzima Taq polimerasa (5u/ $\mu$ l)	0,25
H2O dd	19

Tabla 4. Mezcla de reacción utilizada para las RT-PCR.

El programa de reacción que se usó para la amplificación de las secuencias específicas fue el siguiente:

5 minutos 94°C	} 35 ciclos (X: temperatura específica para cada pareja de oligonucleótidos)
30 segundos 94°C	
60 segundos X°C	
60 segundos 72°C	
10 minutos 72°C	

La resolución de los productos de la PCR, se realizó en un gel de agarosa (*agarose D-1 low EEO*, Conda) al 1,5 % en tampón TBE con 0,005 % de bromuro de etidio y fueron examinados en un transiluminador.

### **10. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)**

El ARN total se aisló de las células usando el sistema de aislamiento "PARISTM Protein and RNA" (Ambion) según las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa se llevó a cabo con el kit "High-Capacity cDNA Archive" (Applied Biosystems) para el cual se utilizó 1  $\mu$ g de ARN purificado y cebadores aleatorios. Los niveles de ARNm se determinaron por PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando el sistema "ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System" (Applied Biosystems). Los pares de cebadores y las sondas específicas para los genes de interés (*GCLm*: Hs00157694\_m1, *GCLc*: Hs00155249\_m1, Assay-on-demand, Applied Biosystems) se mezclaron con 1x TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 2  $\mu$ l de las muestras de ARN transcrito. Las condiciones de la PCR fueron 10 minutos a 95°C para la activación de la enzima, seguidos de 40 ciclos de dos pasos (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C). Los niveles de expresión de la *GAPDH* se midieron en todas las muestras para normalizar la expresión génica, tanto en la cantidad y calidad del ARN como en la eficacia de la transcripción reversa. Cada muestra se analizó por triplicado calculándose su expresión según el método 2- $\Delta\Delta$ Ct.

### **11. Extracción de proteínas celulares**

Para este protocolo se partió de, aproximadamente,  $2 \times 10^6$  células. Se lavaron con PBS y se añadieron 500  $\mu$ l de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón 1,5%, EDTA 1 mM, inhibidores de proteasas 1X, ortovanadato 200 mM, pirofosfato sódico 0.1 M y fluoruro sódico 0.5 M). Se utilizó un rastrillo para despegarlas de la superficie de cultivo y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Se centrifugaron 10 minutos a 12000 rpm y 4°C y se recogió el sobrenadante. Se almacenó a -80°C para su posterior uso.

### **12. Western-blot**

La concentración de proteínas extraídas de las células se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford (BioRad) usando una curva de BSA estándar (1-20  $\mu$ g de BSA (Sigma Aldrich)). Las muestras proteicas se resolvieron en geles de acrilamida con un gradiente 4-12 % "NuPAGE Bis-Tris" (Life Technologies), usándose un total de 25  $\mu$ g de cada muestra. Se usó un voltaje constante de 100 V. Posteriormente, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) en cámara húmeda con medio de transferencia (Tris-Base 33 mM, Glicina 194 mM y Metanol (Scharlau) 20%) a un amperaje constante de 0,40 A durante 1 hora y 15 minutos. La membrana se incubó en una solución de leche desnatada 5% en TBS-Tween 0,5% (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6) durante 1 hora, para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario: anti-kindlina-1 (policlonal de conejo) (cedido amablemente por la Dra. Cristina Has, Freiburg, Alemania) utilizando una dilución 1:10.000. Posteriormente, se usó el anticuerpo secundario unido a peroxidasa: anticuerpo anti-IgG con especificidad de conejo (GE Healthcare), usando una dilución 1:5000. Como control de carga, se utilizó el anti- $\alpha$ tubulina monoclonal de ratón (Sigma), dilución 1:10.000 (anticuerpo secundario anti-IgG con especificidad de ratón (GE Healthcare)). Por último se usó un kit de detección de luminiscencia ("Prime ECL Western Blotting Detection Reagent", GE Healthcare) basado en la reacción específica de la peroxidasa, y se procedió según las instrucciones de la casa comercial.

### **13. Inmunofluorescencia (IF), Histología e Inmunohistoquímica (IHQ)**

#### **13.1. Inmunofluorescencia (IF)**

##### *13.1.1. Células:*

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal estériles, depositados en el fondo de pocillos de placas p24 (Corning Costar). Después de 48 horas, se llevaron a cabo las incubaciones

correspondientes (ver tabla 5). Después de la incubación se lavaron los cristales con PBS 1X varias veces durante 15-20 minutos y se montaron con Mowiol 4-88 (Sigma) al que se añadió DAPI (200 µg/ml) (ThermoScientific) para detectar los núcleos celulares, y 2,5% (wt/vol) 1,4-diazabicyclo-[2.2.2] octane (DABCO) (Sigma) para evitar la pérdida de la señal fluorescente. La fluorescencia se detectó, según el caso, con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot o con un microscopio confocal (A1 Confocal Laser Microscope System (Nikon)). Las imágenes que se muestran son representativas de 3 experimentos independientes.

Anticuerpo/Sonda (Casa comercial)	Antígeno/ Diana	Tipo de fijación	Incubación: dilución, tiempo, temperatura
<b>Phalloidin/Actina BODYPY FL (Invitrogen)</b>	Citoesqueleto de actina	PFA 4%, 10 min, R.T.  (previa a la sonda)	1:40, 20 min, R.T.
<b>Queratina 5 (K5) (Covance)</b>	Queratina 5	Metanol, 10 min, -20°C + Bloqueo (PBS 1X- BSA 1%-HS 5%), 1 h, R.T.  (previa al anticuerpo)	Primario policlonal anti- queratina 5 (1:1000), 1 h, R.T. + Secundario <i>Donkey anti-rabbit</i> FITC (1:50) (Jackson ImmunoResearch), 45min, R.T.
<b>Kindlina-1 (cedido por la Dra. Cristina Has)</b>	Kindlina-1	Metanol, 10 min, -20°C + Bloqueo (PBS 1X- BSA 1%-HS 5%), 1 h, R.T.  (previa al anticuerpo)	Primario policlonal anti- Kindlina-1 (1:100), 1 h, R.T. + Secundario <i>Donkey anti-rabbit</i> FITC (1:50) (Jackson ImmunoResearch), 45min, R.T.
<b>JC-1 (Invitrogen)</b>	Membrana mitocondrial	No	2.5 ug/ml, 10 min, 37°C en medio sin suero
<b>Mitotracker Red (Life Technologies)</b>	Red mitocondrial	PFA 4%, 30 min, R.T.  (posterior a la sonda)	250 nM, 30 min, 37°C en medio sin suero + Recuperación celular con medio fresco 15 min, 37°C

Tabla 5. Anticuerpos y sondas utilizadas en las IF de células.

La sonda catiónica JC-1, presenta una emisión dependiente del potencial de membrana mitocondrial, lo cual se indica por un cambio de fluorescencia que va del verde (indica despolarización) (~520 nm) al rojo (~590 nm). De esta manera, la despolarización mitocondrial se indica por una disminución en el ratio de fluorescencia rojo/verde.

### *13.1.2. Tejidos:*

Se obtuvieron secciones de criostato (Leica) de 8-10  $\mu\text{m}$  de grosor, obtenidas de muestras de tejido (adyacentes a las utilizadas en los análisis de IHQ) embebidas en OCT (Tissue-tek) (Bayer Healthcare LLC). Los criocortes se fijaron en acetona fría durante 10 minutos. Se lavaron con PBS-Tritón (Merck) 0,1% y se bloquearon durante 30 minutos (RT) con suero de caballo (HS) al 5% (Gibco, Invitrogen) y BSA 1% (Sigma-Aldrich) en PBS 1X Tritón 0,1 %. La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios (tabla 6) se realizó a RT, durante 1 hora y 45 minutos respectivamente. Entre ambas incubaciones, se realizaron al menos 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X – Tritón 0,1%. Posteriormente, los criocortes se montaron con Mowiol, DAPI y DABCO.

Por último, se visualizaron las muestras con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot.

### **13.2. Histología e Inmunohistoquímica (IHQ)**

Las muestras de tejidos se fijaron en paraformaldehído (PFA) (Sigma Aldrich) 4% y tras su procesamiento, fueron embebidas en parafina. Se realizaron cortes histológicos (4-6  $\mu\text{m}$  de grosor) utilizando un micrótopo RM2235 (Leica, Solms, Alemania). Las muestras se desparafinaron en una estufa a 60°C durante 30-60 minutos, se aclararon en xileno 3 veces durante 5 minutos y se rehidrataron en soluciones acuosas con porcentajes decrecientes de etanol. Para determinar la arquitectura tisular, las secciones se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (Gill 2 Haematoxylin, Eosin Y alcoholic; ThermoSandon) siguiendo el protocolo habitual (Lillie, Pizzolato et al. 1976).

Para el análisis IHQ, los cortes fueron tratados con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Sigma) al 3% que inactiva la peroxidasa endógena. Después, se bloquearon las uniones inespecíficas, incubando los cortes con suero de caballo (HS) al 5% (Gibco, Invitrogen) y BSA 1% (Sigma-Aldrich) en PBS 1X Tritón (Merck) 0,1 % durante al menos 30 minutos. A continuación, se utilizaron el anticuerpo primario (1 hora a RT) y secundario (45 minutos a RT) que se detallan en la tabla 6. Entre ambas incubaciones, se realizaron al menos 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X–Tritón 0,1%. La detección se realizó mediante el sistema avidina/estreptavidina-peroxidasa, utilizando el kit “Vectastain ABC” (Vector Laboratories). La reacción química que se produce en presencia del sustrato de la peroxidasa (DAB (3,3' diaminobencidina) (Vector Laboratories)) y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se detuvo con agua, controlando la exposición mediante su visualización al microscopio óptico.

Posteriormente, las muestras se contratiñeron con hematoxilina y se deshidrataron en soluciones que contenían porcentajes crecientes de etanol. Después, los cristales fueron sumergidos en Histoclear durante 15 minutos (National Diagnostics Inc.) y se montaron con Shandon Xylene Substitute Mountant (ThermoScientific). Finalmente, las muestras se visualizaron con un microscopio óptico (Olympus BX40).



Anticuerpo primario	Dilución, Casa Comercial	Anticuerpo Secundario	Dilución, Casa Comercial
Anti-Involucrina	1:100, Sigma-Aldrich	-Donkey anti-mouse FITC (IF) -Donkey anti-mouse biotina (IHQ)	-1:50, Jackson ImmunoResearch - 1:500 Jackson ImmunoResearch
Anti-Colágeno IV	1:200, Calbiochem	Donkey anti-rabbit FITC/Texas Red (IF)	1:50/1:500 Jackson ImmunoResearch
Anti-GFP	1:200, Molecular Probes Inc.	Donkey anti-mouse FITC (IF)	1:50, Jackson ImmunoResearch

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las IHQ e IF de tejidos.

## **14. Microscopía electrónica**

### **14.1. Células**

Las células en cultivo de controles y pacientes fueron tripsinizadas y posteriormente centrifugadas a 1000 rpm, durante 7 minutos. Se retiró el sobrenadante y se hizo un lavado con tampón fosfato (PB) 0.1 M (Merck) atemperado. Posteriormente se fijaron con glutaraldehído 3.5% en PB 0.2 M, durante 30 minutos, a 37°C. Después de la fijación se llevaron a cabo 5 lavados de 5 minutos cada uno, con PB 0.1 M. Posteriormente se añadió 200 µl de agar 2% (Conda) a 40°C. Una vez solidificado, se rellenaron los tubos con PB-Azida 0.1% y se enviaron al servicio de Microscopía Electrónica del Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles (Universidad de Valencia, España) donde fueron procesadas y analizadas.

### **14.2. Biopsias**

Las biopsias de pacientes y controles fueron fijadas durante 24 horas en PFA 2% y glutaraldehído 2.5% (Electron Microscopy Sciences) en PB 0.1 M. Posteriormente se realizaron varios lavados con tampón PB 0.1 M para eliminar los restos de los fijadores. Las muestras se enviaron al servicio de Microscopía Electrónica.

Posteriormente, todas las muestras fueron fijadas en osmio al 2% y deshidratadas mediante series de etanol de concentraciones ascendentes. Después, se tiñeron con acetato de uranilo 2% en etanol 70% durante dos horas y después fueron embebidas en resina Durcupan (Fluka BioChemika).

Se cortaron secciones ultrafinas (70 nm) que se tiñeron con citrato Reynolds (Sigma Aldrich) y se examinaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión (FEI Tecnai G2 Spirit) usando una cámara digital (Morada, Soft Imaging System, Olympus). Para identificar diferencias ultraestructurales entre pacientes y controles se analizaron 10 células de 10 áreas al azar, en cada cultivo. En las biopsias se analizaron 10 mitocondrias de 8 queratinocitos al azar.

### **15. Medición del ratio GSSG/GSH**

Los niveles de GSH (glutación reducido) y GSSG (glutación oxidado) se estudiaron usando el kit "Glutathione Fluorescent Detection" (Arbor Assays, Ann Arbor) siguiendo las instrucciones del fabricante para material celular. Brevemente, las células se rasparon con ácido sulfosalicílico 5% utilizando un rastrillo y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos, para separar las proteínas. El sobrenadante, que contenía el GSH y el GSSG, se mezcló con el reactivo ThioStar (molécula no fluorescente que al unirse covalentemente al grupo tiol libre del GSH genera un producto fluorescente ( $\lambda$  emisión: 510 nm,  $\lambda$  excitación: 390 nm)). Posteriormente, se añadió una mezcla de reacción que contenía NADPH y GSH reductasa que convierte todo el GSSG en GSH libre, el cual reacciona posteriormente con el exceso de ThioStar, produciendo la señal correspondiente al GSH total. La diferencia entre ambas medidas representa la cantidad de GSSG.

### **16. Medición de los peróxidos lipídicos**

Los peróxidos lipídicos se determinaron mediante medición del malondialdehído (MDA). Se hizo reaccionar el MDA de las muestras con ácido tiobarbitúrico (TBA) a 100°C para formar aductos MDA-TBA. Los extractos se separaron por HPLC (Ultimate 3000 Bionex) en una columna de gel octadecilsílice (C16, Bionex) con el fin de separar los aductos MDA-TBA de los cromógenos interferentes. Los aductos fueron eluidos de la columna con metanol 50% en tampón fosfato 50 mM pH 6.8 y cuantificados por espectrofotometría a 532 nm (Thermo Scientific).

### **17. Irradiación de células con luz ultravioleta-B**

Para llevar a cabo los estudios de viabilidad tras radiación UV-B, se sometió a las células (queratinocitos primarios y HaCaT) a diferentes dosis de irradiación, considerando la bibliografía descrita para estas células (Otto, Riou et al. 1999; D'Errico, Teson et al. 2003; Reagan-Shaw, Breur et al. 2006), según se detalla en la tabla 7:

Dosis	Queratinocitos	HaCaT
Baja	20 mJ/cm <sup>2</sup>	x
Alta	80 mJ/cm <sup>2</sup>	160 mJ/ cm <sup>2</sup>

**Tabla 7. Dosis de luz UVB utilizadas en los ensayos de viabilidad.**

Se retiró el medio de cultivo cuando las células presentaban un porcentaje de confluencia alrededor del 50% y se realizó un lavado con PBS 1x. Posteriormente, se aplicó luz UVB (Waldmann) el tiempo necesario para obtener la dosis deseada, añadiéndose medio fresco de cultivo tras finalizar la irradiación. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas a distintas horas post-irradiación (2, 48 y 120 horas) para llevar a cabo el análisis de viabilidad por citometría de flujo (ver apartado 18.2). Como control negativo se utilizaron las propias células sin irradiar y como control positivo células de un paciente de XP-C (tabla 8), cuyas células son incapaces de reparar el daño al ADN producido por la luz UV.

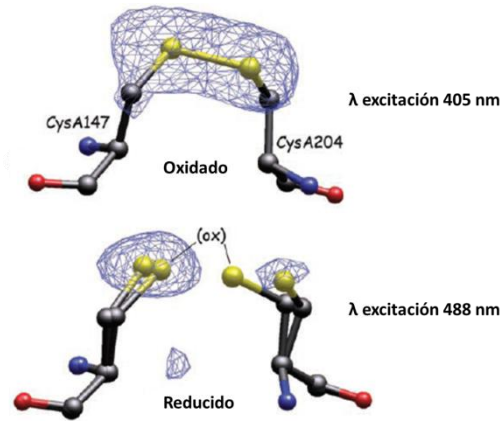
### **18. Citometría de flujo**

Para el análisis mediante citometría de flujo se utilizó un citómetro LSRFortessa (BD Biosciences). Las células analizadas eran adherentes, por ello fueron tripsinizadas y posteriormente resuspendidas en PBS 1X. Fueron analizadas, al menos, 50.000 células por cada muestra y condición experimental en triplicado. El análisis de los datos se realizó con el programa informático FlowJo versión 7.6.1.

#### ***18.1. Biosensores de estrés oxidativo: roGFP2***

Para llevar a cabo el análisis del estrés oxidativo en los distintos compartimentos celulares, se utilizaron los biosensores roGFP2. Estos biosensores, están basados en una GFP sensible a cambios redox, como consecuencia de que algunos residuos de superficie expuestos son sustituidos por cisteínas (A147 y A204) para formar puentes disulfuro (figura 18). Este enlace disulfuro, se establece en condiciones oxidantes, mientras que en condiciones reductoras, no se establece. Las roGFPs, tienen la capacidad de excitarse a dos longitudes de onda (405 y 488 nm según estén oxidadas o reducidas respectivamente) y realizan cambios reversibles en la fluorescencia, en respuesta a cambios en el potencial redox del ambiente (Hanson, Aggeler et al. 2004). A estas roGFPs se les fusionó la proteína glutaredoxina-1 (Grx1) humana (Grx1-roGFP2) (Gutscher, Pauleau et al. 2008), enzima que cataliza el equilibrio entre el par GSH/GSSG en el citoplasma. Esto permite una

monitorización dinámica del potencial redox del glutatión con alta sensibilidad y resolución temporal (Gutscher, Pauleau et al. 2008). Además, utilizamos una Grx1-roGFP2 específica para el estudio de los cambios redox que sufre el compartimento mitocondrial, que tiene fusionada la secuencia señal de la ATP sintasa mitocondrial (mito-Grx1-roGFP2).



**Figura 18. Características estructurales de las roGFP2.** Modificado de Hanson, Aggeler et al. 2004.

En nuestros experimentos, se transdujeron queratinocitos de diferentes controles y pacientes con las líneas celulares PA317-Grx1-roGFP2 y PA317-mito-Grx1-roGFP2 (ver apartado 4.2). Se analizaron posteriormente por citometría de flujo, tanto en estado basal como con un estímulo oxidante de  $H_2O_2$  ( $12.5 \mu M$ ). Las células fueron excitadas con los láseres de 405 y 488 nm, observándose la oxidación como un aumento en el ratio 405/488, mientras que una disminución indica un ambiente reductor. Posteriormente, se calculó el ratio de emisión (500/50 nm) de la población GFP positiva a partir de los datos proporcionados por el programa FlowJo.

### **18.2. Viabilidad celular con DAPI**

Los queratinocitos primarios y las HaCaT fueron irradiadas y posteriormente marcadas con DAPI ( $200 \mu g/ml$ ) (Thermo Scientific). Para tener en cuenta todas las células, se recolectaron también las que estaban en suspensión en el medio de cultivo, junto con las tripsinizadas. Las células fueron excitadas con el láser 405-450/50 nm, calculándose posteriormente el porcentaje de mortalidad.

### **18.3. Ensayo de apoptosis con ioduro de propidio (IP)**

Las HaCaT fueron analizadas 48 horas post-irradiación ( $20 \text{ mJ/cm}^2$ ) resuspendiéndolas en  $200 \mu l$  de etanol 70% frío y fijándolas así durante al menos 40 minutos. Posteriormente fueron lavadas con PBS 1X y resuspendidas en  $200 \mu l$  de PBS con RNasa  $50 \mu g/ml$  durante 20 minutos a  $4^\circ C$ . Más

tarde, se añadió ioduro de propidio (IP) (Life Technologies) a una concentración de 50 µg/ml y se incubó con las células durante 15 minutos a RT. Las células fueron excitadas con el láser de 582-610/20 nm y mediante el uso del programa Cell quest pro 1.1. se analizó el porcentaje de células apoptóticas, la población subG1.

#### ***18.4. Medida de ROS con dihidroetidio (DHE)***

La sonda DHE tiene una fluorescencia azul en el citoplasma, pero cuando se oxida intercalándose con el ADN celular emite fluorescencia roja. Las HaCaT fueron incubadas a 37°C con la sonda (1 µM) durante 15 minutos. A continuación fueron lavadas y excitadas con el láser 562-610/20 nm para analizar posteriormente la intensidad media de fluorescencia para el DHE.

#### ***18.5. Medida del potencial de membrana mitocondrial con JC-1***

Después de realizar un lavado con PBS 1X, los queratinocitos primarios fueron marcados con JC-1 (2.5 µg/ml) diluido en medio sin suero, durante 10 minutos a 37°C (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente las células fueron tripsinizadas, lavadas y analizadas con los láseres 488-530/30 y 562-582/15 nm, calculando el programa FlowJo el ratio entre ambos (nos indica el potencial de membrana mitocondrial).

### **19. Análisis transcriptómico**

Se emplearon los chips de expresión génica del genoma humano de Affymetrix, GeneChip HG U133 plus2.0 (Affymetrix® Microarray Solutions), que contienen información para el estudio de más de 25000 genes. El material de partida fue ARN total de 10<sup>6</sup> queratinocitos de controles (C1, C2 y C3) y pacientes SK (SK1, SK2 y SK4). Los datos obtenidos a partir de los *microarrays* se procesaron empleando el procedimiento propuesto en la plataforma Babelomics (Medina, Carbonell et al. 2010), que implica un preprocesamiento, normalización y análisis exploratorio de los datos, seguidos de un análisis de expresión diferencial y funcional empleando potentes herramientas estadísticas y bioinformáticas como Limma, FatiGO o Fatican. Finalmente, la visualización de los genes con expresión diferencial en sus respectivas redes metabólicas, se realizó con el programa informático Advanced Pathway Painter v2.29, integrado en la plataforma GENOM (GSA GmbH) (Anexo III). El criterio empleado para determinar si un gen está sobre expresado, o bien regulado a la baja, fue el de tener un p-valor <0.05 después de aplicar la corrección de Benjamini y Hochberg (Benjamini 1995).

Los datos crudos de los análisis transcriptómicos se pueden localizar en el repositorio *ArrayExpress* (Kolesnikov 2015) del Instituto Bioinformático Europeo (EBI, ) con el número de referencia E-MTAB-3513.

## **20. Predicción de estructuras de ARN**

Para predecir las estructuras más favorables energéticamente del ARN mutante de la paciente SK4, se utilizó el programa <http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure.html> , que generó todas las estructuras potenciales que pueden aparecer dada una determinada secuencia, ordenadas de mayor a menor estabilidad. Esta estabilidad se mide mediante la energía libre de Gibbs (G) que presenta cada estructura (energías menores implican mayor estabilidad).

## **21. Análisis estadísticos**

Para el análisis estadístico de los resultados presentados en esta memoria, se tomó como medida de la tendencia principal la media de los datos, mientras que la desviación estándar se utilizó como medida de la dispersión. La prueba Student-Newman-Keuls (t-student), se utilizó para determinar la significación de las diferencias entre las medias. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando, \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ . Los programas Microsoft office Excel y GraphPadv5.0 fueron utilizados para el análisis estadístico y la representación gráfica.

## ***RESULTADOS***





## 1. Caracterización de pacientes SK y controles

### 1.1. Características clínicas

Las características clínicas de los pacientes SK fueron descritas previamente en un trabajo en colaboración con otros grupos europeos (Has, Castiglia et al. 2011). Los pacientes 4, 8, 10 y 53 descritos en dicho estudio, se corresponden respectivamente con nuestros pacientes SK1, SK3, SK2 y SK4.

A continuación, se resumen las principales características clínicas de los pacientes utilizados durante el desarrollo de este trabajo (tabla 8, figura 19). La paciente SK1 presenta ampollas, atrofia y poiquilodermia, fotosensibilidad y alteración de la mucosa anal (figura 19.A). La paciente SK2 cursa con una clínica parecida a SK1, pero además presenta alteraciones en la mucosa oral e intestinal en lugar de anal (no disponemos de fotografías de la paciente). El paciente SK3 presenta ampollas, atrofia y poiquilodermia y alteración de la mucosa oral (figura 19.C-E). Por último, la paciente SK4 cursa con una acusada poiquilodermia y sindactilia, y aunque las mucosas oculares, orales y esofágicas se encuentran alteradas, su clínica es moderada en comparación con el resto de los pacientes descritos en la memoria (figura 19.B). La variabilidad fenotípica observada en la clínica de los pacientes que se incluyen en esta memoria, se podría explicar como consecuencia de las diferentes mutaciones que presentan, como ya se discutió anteriormente en Has, Castiglia et al., 2011.

Pacientes	Implicación de la piel				Implicación de las mucosas				
	Ampollas	Atrofia/ Poiquilodermia	Fotosensibilidad	Membrana interdigital	Oral	Esofágica	Intestinal	Anal	Ocular
SK1	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SK2	+	+	+	-	+	-	+	-	-
SK3	+	+	+	-	++	-	-	-	-
SK4	-	++	-	+	+	+	-	-	+

**Tabla 8. Principales características clínicas de los pacientes incluidos en el presente estudio.** -: no presente, no síntomas, +: presente, síntomas suaves, ++: presente, síntomas severos.



**Figura 19. Características clínicas de los pacientes SK. A) SK1:** ampolla acral y atrofia. **B) SK4:** marcada sindactilia. **C-E) SK3:** C, marcada atrofia; D, evidente poiquilodermia; E, ampollas acrales.

### **1.2. Caracterización de las mutaciones**

Los pacientes utilizados en el desarrollo del presente trabajo fueron caracterizados genéticamente por nuestro grupo, excepto la paciente SK2 que fue previamente diagnosticada por el grupo de la Dra. Cristina Has (Universitätsklinikum, Freiburg), utilizando siempre los cebadores especificados en el apartado 8 de Materiales y Métodos de esta memoria (tabla 2) (Siegel, Ashton et al. 2003). En la tabla 9, además de las mutaciones halladas en los pacientes, se describe la edad y el sexo, así como los posibles alteraciones sobre la proteína kindlina-1 producida por las mutaciones del gen. Los tres controles sanos que se usaron fueron proporcionados por el grupo del Dr. Álvaro Meana (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos, Asturias). Por otro lado, se utilizaron también células provenientes de un paciente de Xeroderma Pigmentosum (XP-C) como control positivo en los ensayos de viabilidad celular después de exposición a luz UV, debido a que estos pacientes presentan problemas en los mecanismos de reparación del ADN tras irradiación con luz UV.

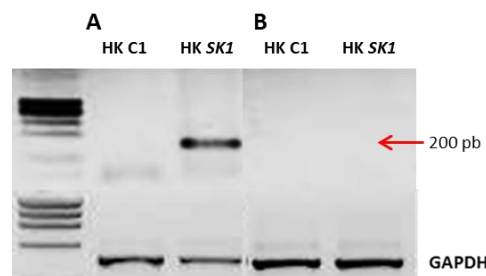
	Edad	Sexo	Mutación *	Proteína
Control 1 (HK C1)	5	Mujer	Ninguna	No afectada
Control 2 (HK C2)	89	Mujer	Ninguna	No afectada
Control 3 (HK C3)	5	Hombre	Ninguna	No afectada
Paciente 1 (SK1)	4	Mujer	(c.1371+4A>G)	Truncada (60 KDa)(corte y empalme alterado) (kindlina-1)
Paciente 2 (SK2)	11	Mujer	(c.676dupC)	Nula (p.Gln226ProfsX17) (kindlina-1)
Paciente 3 (SK3)	10	Hombre	(c.811C>T)	Nula (p.Arg271X) (kindlina-1)
Paciente 4 (SK4)	51	Mujer	(C.1198T>C)	Completa, menor expresión (p.Ser400Pro) (kindlina-1)
Paciente XP-C	2	Mujer	(c.1643_1644delTG)	No determinado (XPC)

**Tabla 9.** Descripción de la edad, el sexo, la mutación y el estado de la proteína (alterada en cada enfermedad) en cada paciente y control utilizado en el presente estudio. \* Todos los pacientes portan sus respectivas mutaciones en homocigosis.

Para llegar a una comprensión más profunda de cómo las diferencias clínicas que se observan entre los pacientes de SK, se relacionan con las distintas mutaciones que presentan (Has, Castiglia et al. 2011), se llevó a cabo la caracterización del ARNm del gen mutado (*FERMT1*) y de la proteína que codifica (kindlina-1).

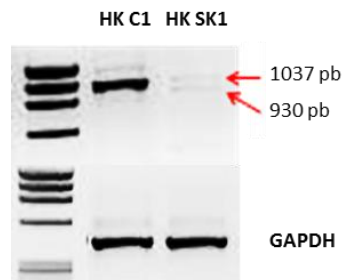
El estudio del **ARNm** de la **paciente SK1**, reveló la presencia de una mutación homocigótica en la secuencia consenso del sitio donador de corte y empalme (del inglés *splicing*) del intrón 11 (c.1371+4A>G), lo que resulta en un procesamiento aberrante del pre-ARNm del gen *FERMT1*, cuya consecuencia es un ARNm truncado. Para estudiar los distintos procesamientos incorrectos del ARNm, consecuencia de la mutación, se llevaron a cabo varias RT-PCR (cebadores detallados en la tabla 3 y figura 17).

En la RT-PCR utilizando el primer par de cebadores (I11-F y I11-R1), en los cuales el I11-F es específico para la mutación, se obtuvo una banda (aproximadamente de 200 pb) en el ADNc de la paciente, pero no en el control (figura 20.A). En cambio, cuando se utilizó el par de cebadores I11-F y I11-R2 no se obtuvo ninguna banda, ya que la señal de poliadenilación del intrón 11 que no ha sido procesado, impide que se siga transcribiendo el ARNm (figura 20.B).



**Figura 20.** RT-PCR para analizar el ARNm de la paciente SK1. **A)** RT-PCR con el par de cebadores I11-F y I11-R1. Sólo aparece banda en la paciente SK1. **B)** RT-PCR con el par de cebadores I11-F y I11-R2. No aparece banda ni en el ADNc control ni en el de la paciente. Para ambas RT-PCR se utilizó el gen constitutivo *GAPDH* como control de carga.

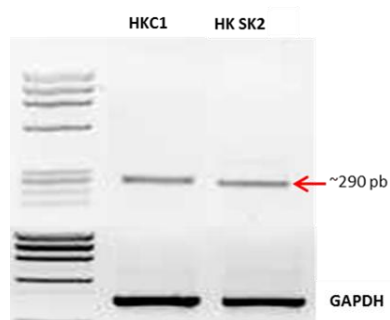
Además, se estudió la posible existencia de otros ARNm minoritarios en las células de esta paciente. Para ello se realizó una RT-PCR utilizando el segundo par de cebadores (tabla 3). Se observó que en los extractos de la paciente SK1 aparecían dos bandas minoritarias. Una aproximadamente de 1000 pb correspondiente al ARNm silvestre que amplifica del exón 8 al 15 y otra aproximadamente 100 pb menor, también minoritaria, que comprende todos los exones menos el 11. Como la mutación de la paciente tiene afectado el sitio donador del intrón 11, este último ARNm se forma al unirse el sitio donador del intrón 10 con el aceptor del 12, produciéndose un salto del exón 11 entero (107 pb) (figura 21).



**Figura 21.** RT-PCR para la paciente SK1 con el par de cebadores SK2-F y E1415-R. El gen constitutivo *GAPDH* se utilizó como control de carga.

Así, se observó que la expresión de *FERMT1* en la paciente SK1 se lleva a cabo a través de al menos, tres ARNm diferentes. El ARNm silvestre de forma minoritaria, otro transcrito también minoritario que contiene todos los exones excepto el 11 y el ARNm truncado, mayoritario.

La **paciente SK2** presentó una duplicación homocigótica en el codón 676 (c.676dupC) que supone un desplazamiento en el marco de lectura, lo que ocasiona la aparición de un codón de terminación prematuro 16 codones en dirección 3' de la mutación (p.Gln226ProfsX17) (Has, Castiglia et al. 2011). Se llevó a cabo una RT-PCR para amplificar el fragmento que contiene la duplicación (par 3°, tabla 3). La banda, de un tamaño indistinguible a su respectivo control (ya que sólo se diferencian en una base) (figura 22), fue purificada y secuenciada posteriormente. En el cromatograma se observa la duplicación de la citosina 676 (figura 23.B).



**Figura 22.** RT-PCR de la paciente SK2 con el par de cebadores HAS-F y HAS-R. El gen constitutivo *GAPDH* se utilizó como control de carga.

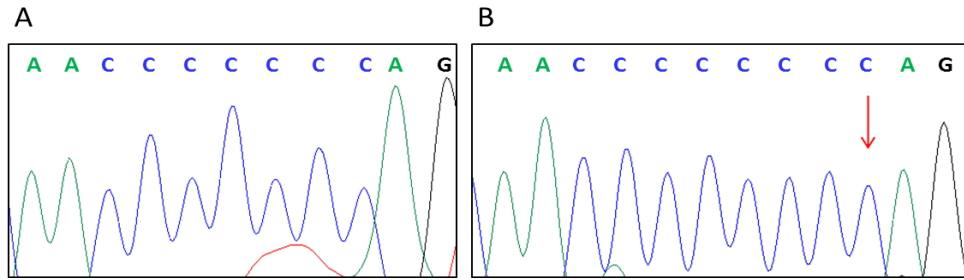


Figura 23. Cromatograma de ADNc que muestra la mutación del paciente SK2 (B) en comparación con un control (A).

El **paciente SK3** presentó una mutación homocigótica que consiste en una sustitución de un único nucleótido en la posición 811 (c.811C>T), la cual al traducirse, provoca que la arginina 271 se convierta en un codón de terminación prematuro (p.Arg271X) (figura 24.B).

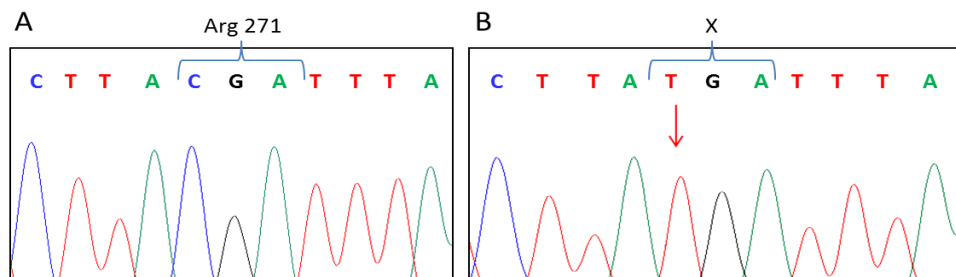


Figura 24. Cromatograma de ADNg que muestra la mutación del paciente SK3 (B) en comparación con un control (A).

La **paciente SK4** presentó una mutación homocigótica de sustitución de un único nucleótido en la posición 1198 del exón 10 (c.1198T>C) (figura 25), provocando un cambio de aminoácido (p.Ser400Pro). A nivel de ARNm, mediante RT-PCR (par 4°, tabla 3), podemos observar que existe una disminución en la cantidad de éste en la paciente en comparación con su respectivo control (figura 26).

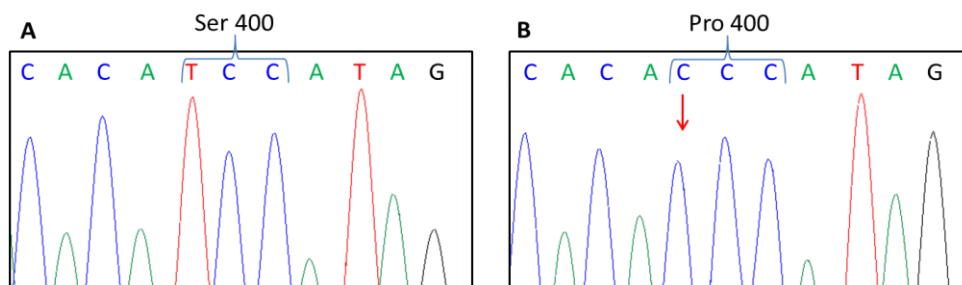
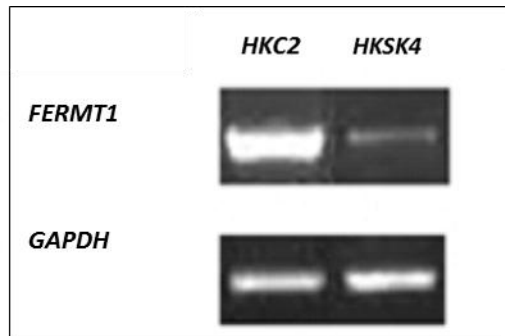
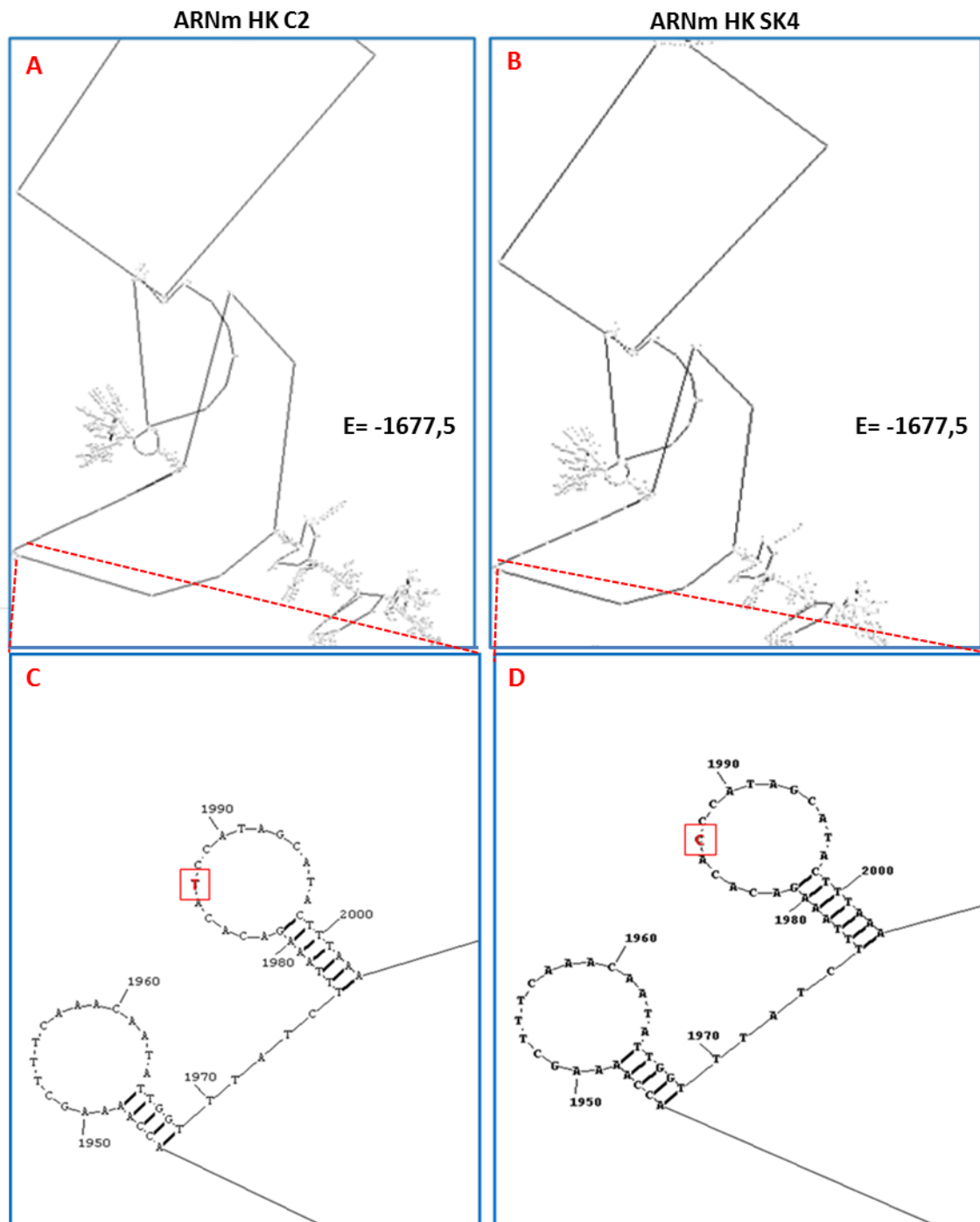


Figura 25. Cromatograma de ADNg que muestra la mutación del paciente SK4 (B) en comparación con un control (A).



**Figura 26.** RT-PCR para la paciente SK4 con el par de cebadores SK1-F y E1415-R donde se observa una menor expresión de ARNm de *FERMT1* respecto a su control. El gen constitutivo *GAPDH* se utilizó como control de carga.

Se utilizó un programa de predicción de estructuras de ARN, para comprobar si en la paciente SK4, la mutación alteraba la estructura del ARN (ver apartado 20 de Materiales y Métodos). En la figura 27, podemos observar que la estructura predicha para el ARNm mutante fue la misma que para el ARNm control en base al valor de la energía libre de Gibbs, por tanto la estabilidad de su estructura en este primer análisis no parece verse comprometida.



**Figura 27.** Predicción de la estructura del ARNm de queratinocitos control (HK C2) y de la paciente SK4. A-B) Vista panorámica del ARNm completo (A, control; B, paciente SK4). C-D) Zoom de la zona del ARNm afectada por la mutación (C, control; D, paciente SK4). E= Energía libre de Gibbs de cada estructura.

El estudio de la expresión de la **kindlina-1**, se llevó a cabo mediante Western-blot (figura 28). En la **paciente SK1**, se observó la presencia de una proteína truncada de menor peso molecular (aproximadamente 60 kDa) cuya funcionalidad, podría estar comprometida. En los **pacientes SK2** (p.Gln226ProfsX17) y **SK3** (p.Arg271X) se observó una ausencia total de proteína, al menos a niveles detectables con esta técnica. En la **paciente SK4** se observó que la proteína traducida tenía un

tamaño normal (p.Ser400Pro), aunque su cantidad apareció drásticamente reducida en comparación con los queratinocitos control, lo que correlaciona con la disminución observada en el ARNm para esta paciente (figura 26).

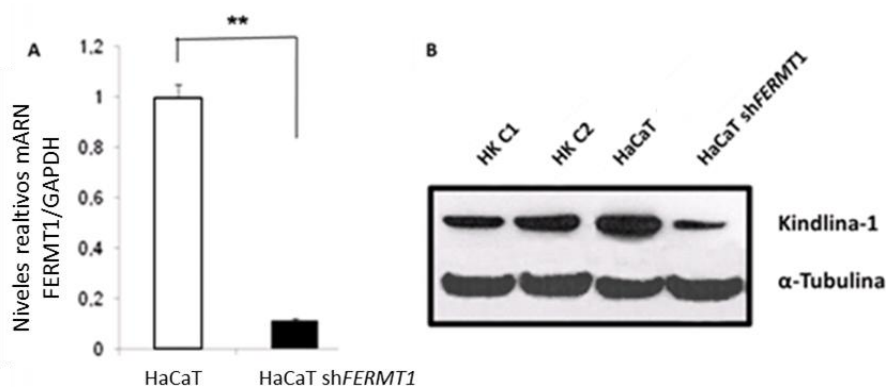


**Figura 28. Análisis de expresión de kindlina-1 en queratinocitos SK mediante Western-blot.** Las células de cada paciente mostraban un patrón de expresión de proteína diferente debido a las diferentes mutaciones que presenta cada uno.  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control de carga.

### 1.3. Generación de una línea de queratinocitos humanos con expresión reducida de *FERMT1* (*HaCaT shFERMT1*)

Debido a que los queratinocitos primarios de pacientes con Síndrome de Kindler, presentan una baja tasa de proliferación junto con una senescencia prematura, es difícil llevar a cabo experimentos más complejos con estas células primarias. Por ese motivo, desarrollamos una herramienta complementaria que permitiera eludir estas limitaciones. Para ello, se generó una línea a partir de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Rosario Perona (IIB, Madrid), en la cual se redujo la expresión del gen *FERMT1* mediante interferencia de su ARN (ver apartado 3 de Materiales y Métodos).

En la figura 29 se puede observar que la expresión del gen *FERMT1* tanto a nivel de ARNm en ensayos de q-PCR (figura 29.A), como a nivel de proteína mediante Western-blot (figura 29.B), estaba reducida aproximadamente en un 85% en la línea HaCaT sh*FERMT1* en comparación con las células HaCaT control.

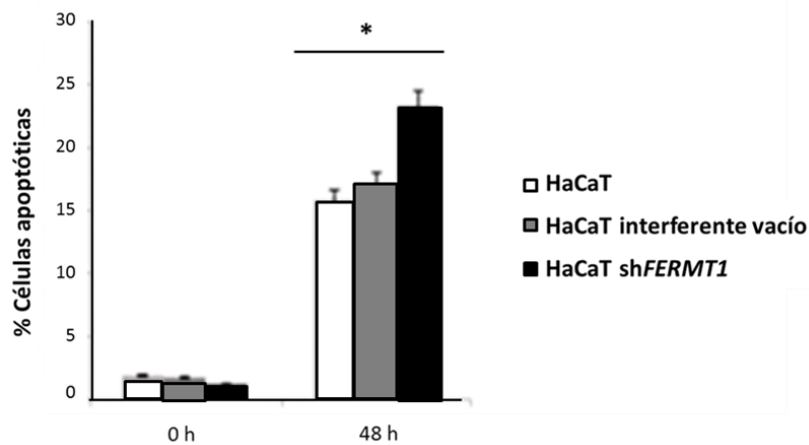


**Figura 29. Niveles de expresión de kindlina-1.** A) q-PCR del gen *FERMT1* en HaCaT control frente a HaCaT sh*FERMT1*.



El gen constitutivo *GAPDH* se utilizó como control de carga. **B)** Western-blot de kindlina-1 en el cual se comparan queratinocitos control y la línea HaCaT control, frente a la línea HaCaT *shFERMT1*.  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control de carga.

Como parte de la caracterización funcional de esta línea con la expresión del gen *FERMT1* mermado, se llevó a cabo un ensayo de apoptosis (figura 30, ver apartado 18.3 de Materiales y Métodos), dado que este proceso se encuentra alterado en los queratinocitos primarios SK (Lanschuetzer, Muss et al. 2003; Herz, Aumailley et al. 2006). De manera similar a lo reportado en las células de pacientes, en las HaCaT *shFERMT1* se observó una tasa apoptótica significativamente mayor después de recibir irradiación, con respecto a su respectivo control y también con respecto a las HaCaT transducidas con un ARN interferente inespecífico (vacío).



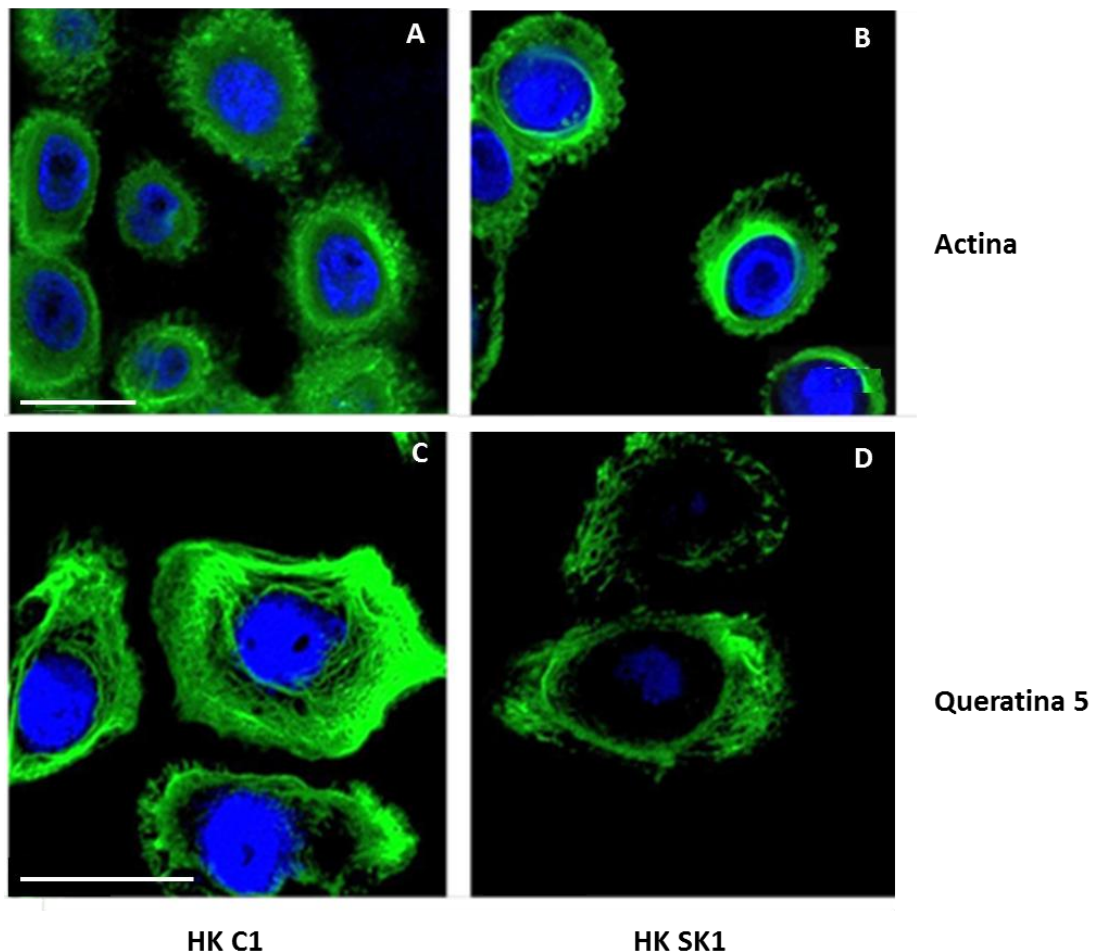
**Figura 30. Análisis del porcentaje de células apoptóticas con IP por citometría de flujo (FACS).** Se observa que las HaCaT *shFERMT1* presentan un mayor porcentaje de células apoptóticas a las 48 horas post irradiación ( $20 \text{ mJ/cm}^2$ ) que las HaCaT control y las silenciadas con un interferente vacío.

#### 1.4. Caracterización de la morfología de queratinocitos SK

Se ha descrito que los queratinocitos de los pacientes de SK presentan una morfología alterada, como resultado de alteraciones en kindlina-1 (Herz, Aumailley et al. 2006). Esta proteína, como se comentó anteriormente, es un componente importante de las adhesiones focales (AF) y por tanto su alteración influye directamente en la adhesión y morfología celular.

Como parte de esta caracterización, analizamos la morfología de los queratinocitos SK a través de la expresión y distribución de distintos componentes del citoesqueleto mediante microscopía confocal. En la figura 31.A-B, puede observarse como los filamentos de actina aparecen de forma difusa y desestructurada en los queratinocitos SK, característica asociada a una morfología más redondeada que la presentada por queratinocitos control, y característica de células que presentan menor adhesión al sustrato. En este punto, se estudió el patrón de distribución de la

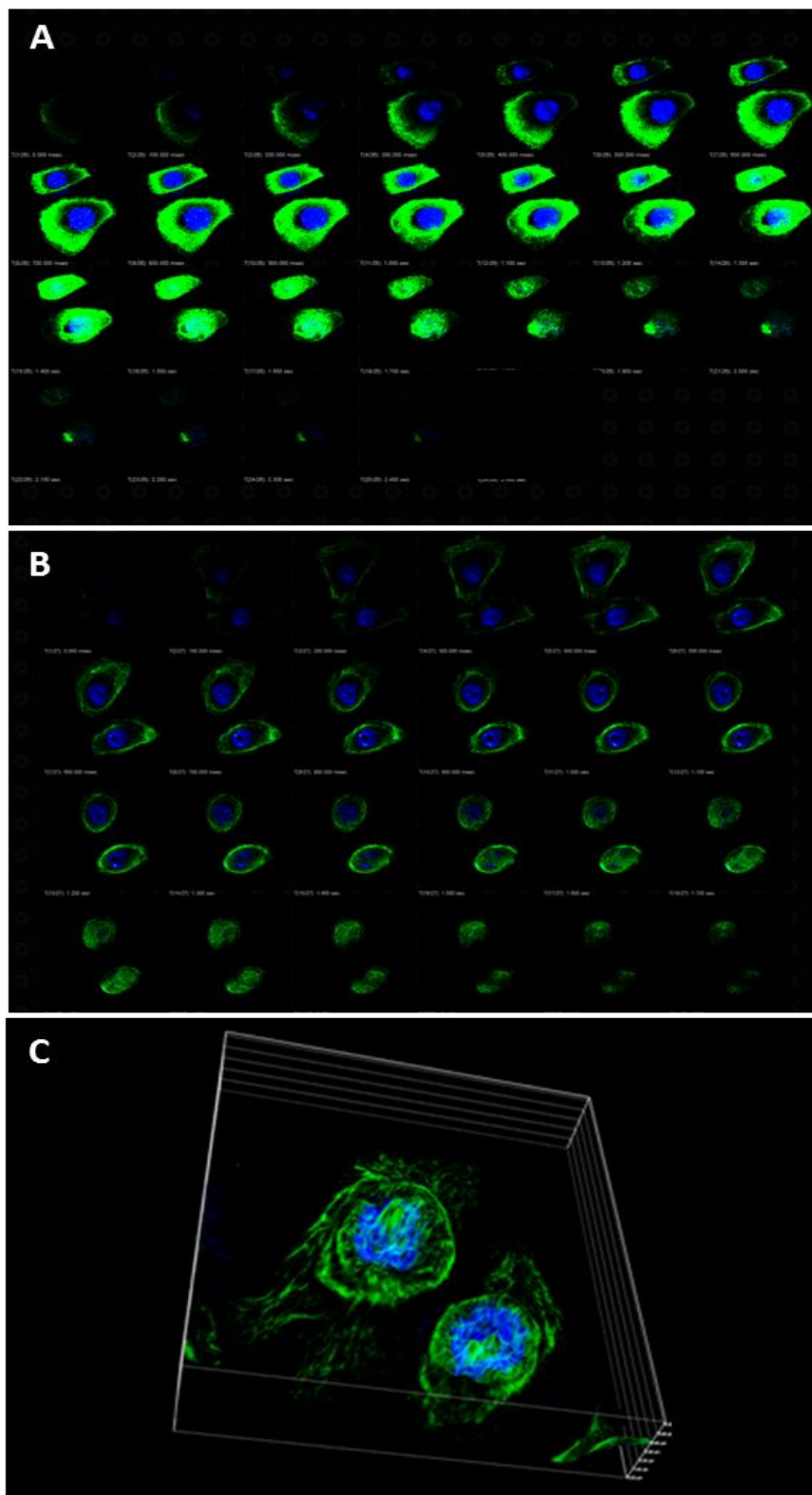
queratina K5, una proteína estructural implicada en la función adhesiva celular al estar involucrada en la integridad de la unión dermo-epidérmica a través de los hemidesmosomas. Su expresión no se vio afectada por la presencia/ausencia de kindlina-1, resultado esperable ya que ambas proteínas no interactúan directamente. En la figura 31.C-D se observa un marcaje filamentoso para K5 similar al control, que sin embargo evidenció la morfología aberrante de los queratinocitos SK, como se pudo observar más claramente en la reconstrucción tridimensional (3D) (figura 32.C).



**Figura 31. Estudio de la distribución de los filamentos de actina y de la queratina 5 mediante microscopía confocal. A-B)** Marcaje para actina en queratinocitos control (HK C1) y de la paciente SK1. **C-D)** Marcaje para queratina 5 en queratinocitos control (HK C1) y de la paciente SK1. Barras de escala: 10  $\mu\text{m}$  (A, B), 1  $\mu\text{m}$  (C,D).

Al analizar la expresión de la K5 en el eje Z, se pudo observar que mientras los queratinocitos control se encontraban bien adheridos al sustrato con el citoplasma y el núcleo en el mismo plano (figura 32.A), en los queratinocitos SK el núcleo aparecía por encima del plano citoplasmático, lo que evidenció la adhesión aberrante de las células SK (figura 32.B-C). Las imágenes obtenidas de la expresión de K5 en el eje z de los queratinocitos SK, fueron reconstruidas en 3D para mostrar con mayor claridad la adhesión alterada de dichas células (figura 32.C), la cual puede explicar la aparente

disminución de tamaño que fue reportada usando microscopía convencional (Herz, Aumailley et al. 2006).



**Figura 32. Estudio de la distribución de la queratina 5 mediante microscopía confocal. A)** Serie del eje z en queratinocitos control 1 (HK C1). **B)** Serie del eje z en queratinocitos de la paciente SK1. **C)** Reconstrucción 3D del eje z de queratinocitos

SK1: se aprecian claramente las alteraciones en la adhesión de los queratinocitos de pacientes SK que provocan alteraciones citoplasmáticas y morfológicas.

## **2. Estudio del estrés oxidativo en el Síndrome de Kindler**

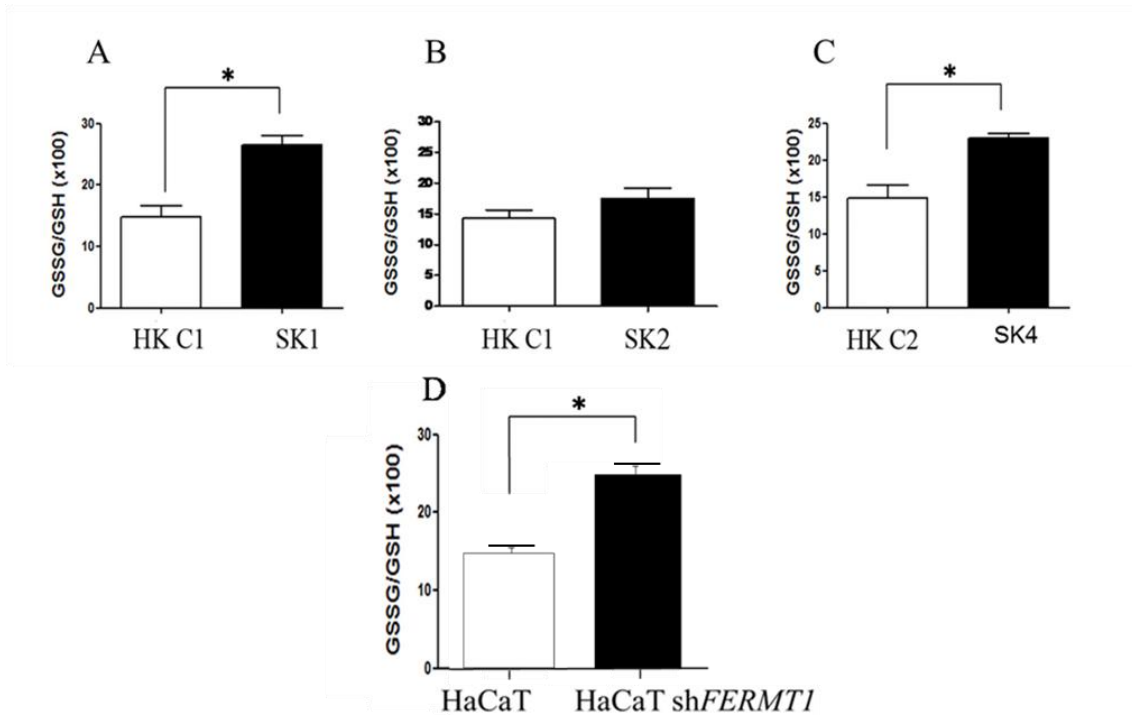
El fenotipo pleiotrópico de SK no puede ser explicado completamente por la pérdida de adhesión que conlleva la ausencia de la kindlina-1. Por ello, nos adentramos en el estudio de mecanismos responsables del fenotipo de los pacientes de SK como son, la fotosensibilidad, el envejecimiento prematuro y el cáncer. Todas estas características clínicas se encuentran fuertemente asociadas con los mecanismos de estrés oxidativo (Wang, Wu et al. 2013), cuyo estudio en los pacientes SK es uno de los principales objetivos de esta memoria.

El estrés oxidativo que sufre una célula, se puede medir en distintos compartimentos celulares a través de las alteraciones producidas en distintas macromoléculas. Las ROS, principales responsables del estrés oxidativo, son difícilmente cuantificables directamente debido a su alta inestabilidad y reactividad (Jacob, Noren Hooten et al. 2013). Por ello, para determinar el estado oxidativo de las células se estudia el efecto de estas ROS a través de los cambios en diversos biomarcadores, como los que se describen a continuación en esta tesis doctoral. Estos resultados forman también parte de una publicación reciente de nuestro grupo (Zapatero-Solana, Garcia-Gimenez et al. 2014) (Anexo I).

### **2.1. Ratio GSSG/GSH**

El GSH es una de las defensas antioxidantes primarias de la célula que actúa neutralizando directamente los radicales libres mediante su propia oxidación (GSSG). Se estudió el ratio del glutatión oxidado frente al reducido (GSSG/GSH) en queratinocitos de pacientes SK, observándose que en las células de los pacientes SK1 y SK4 el ratio es mayor que en sus respectivos controles (figura 33.A y C). En los queratinocitos de la paciente SK2, aunque siguen la misma tendencia, las diferencias no son estadísticamente significativas (figura 33.B).

Estos experimentos fueron también llevados a cabo en la línea celular HaCaT sh*FERMT1*, observando el mismo resultado que en las células de pacientes. Las HaCaT sh*FERMT1* presentaban un ratio mayor que su correspondiente control (figura 33.D), lo cual nos indica que tanto en queratinocitos primarios de pacientes SK, como en una línea celular con la expresión de *FERMT1* reducida, existe una alteración en el principal mecanismo de defensa frente a ROS.

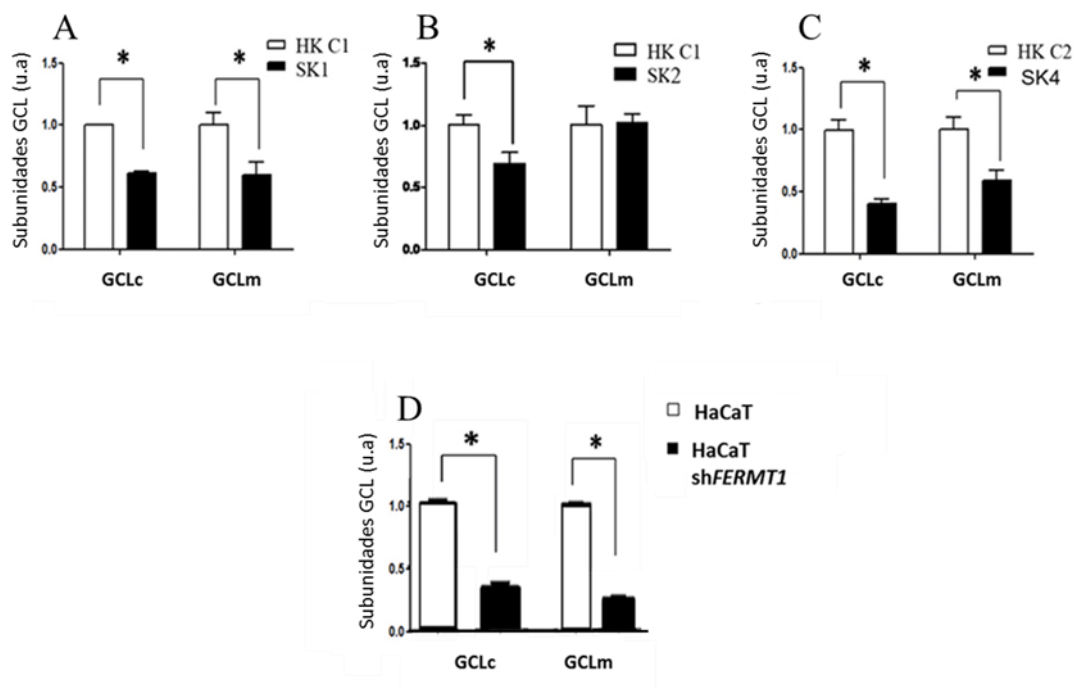


**Figura 33. Ratio GSSG/GSH medido por fluorimetría en células SK. SK1 (A), SK2 (B), SK4 (C), HaCaT shFERMT1 (D) y sus respectivos controles.** Los resultados representan las medias y desviaciones estándar de dos experimentos independientes con muestras triplicadas. \* $p < 0.05$ : diferencia estadísticamente significativa frente al valor control después de realizar la prueba t-Student.

## 2.2. Gamma Glutamil Cisteína Ligasa (GCLc y GCLm)

La cantidad de GSH está directamente relacionada con la actividad de la GCL, ya que ésta es una de las principales enzimas implicadas en su síntesis *de novo*. Los resultados que se muestran en la figura 34, indicaron que los niveles de ARNm de la subunidad catalítica de la GCL (GCLc) se encuentran significativamente reducidos en queratinocitos SK en comparación con sus respectivos controles. Respecto a la subunidad metabólica (GCLm), se observó también una disminución en los pacientes SK1 y SK4 (figura 34.A y 34.C). Consistentemente con lo observado en células primarias, las células HaCaT shFERMT1 mostraron niveles significativamente reducidos de ambas subunidades (figura 34.D).

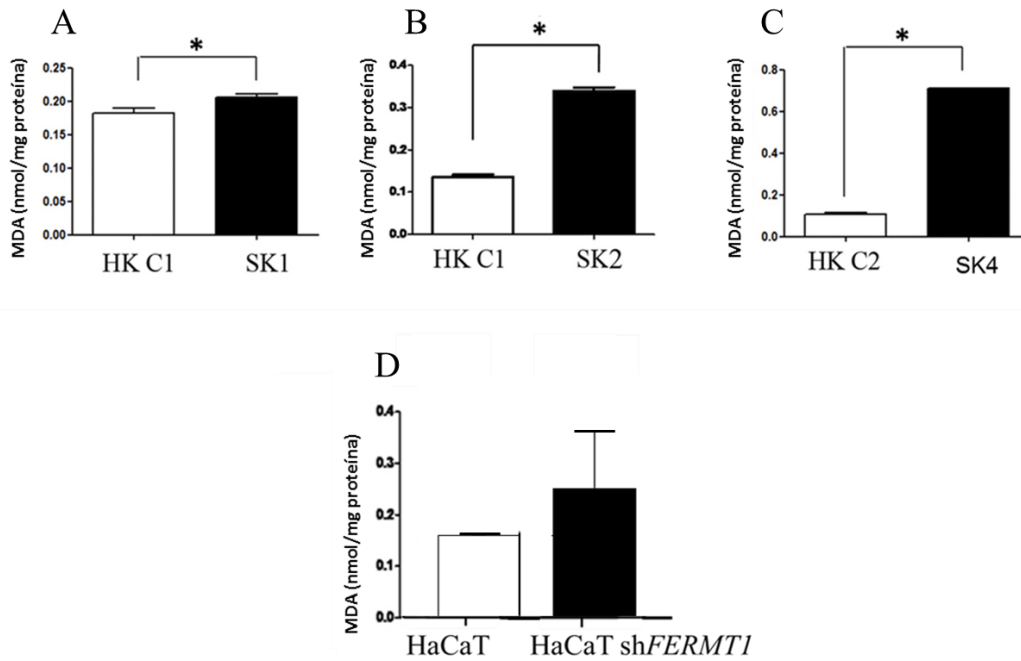
El conjunto de los resultados mostrados en los apartados 2.1 y 2.2 indica que, tanto los queratinocitos de pacientes SK como la línea celular HaCaT shFERMT1, presentan una menor capacidad de síntesis de GSH mediada, en parte, por una menor expresión de las enzimas involucradas en esa función.



**Figura 34.** Expresión de las subunidades enzimáticas GCLc y GCLm analizada por q-PCR en células SK. SK1 (A), SK2 (B), SK4 (C), HaCaT shFERMT1 (D) y sus respectivos controles. GAPDH se utilizó como gen de referencia. Los resultados representan las medias y desviaciones estándar de dos experimentos independientes con muestras triplicadas. \* $p < 0.05$ : diferencia estadísticamente significativa frente al valor control después de realizar la prueba t-Student.

### 2.3. Malondialdehído (MDA)

Para estudiar si el estrés oxidativo observado era un fenómeno persistente, se analizaron los niveles de MDA, indicadores de un daño sostenido sobre los lípidos de membrana (lipoperoxidación). Nuestros resultados revelaron niveles significativamente mayores en los queratinocitos SK y en la línea celular HaCaT shFERMT1, en comparación con sus respectivos controles (figura 35). Estos niveles elevados de MDA, son consistentes con un estado oxidativo crónico de las células de SK asociado con fotoenvejecimiento de la piel (Sander, Chang et al. 2002).



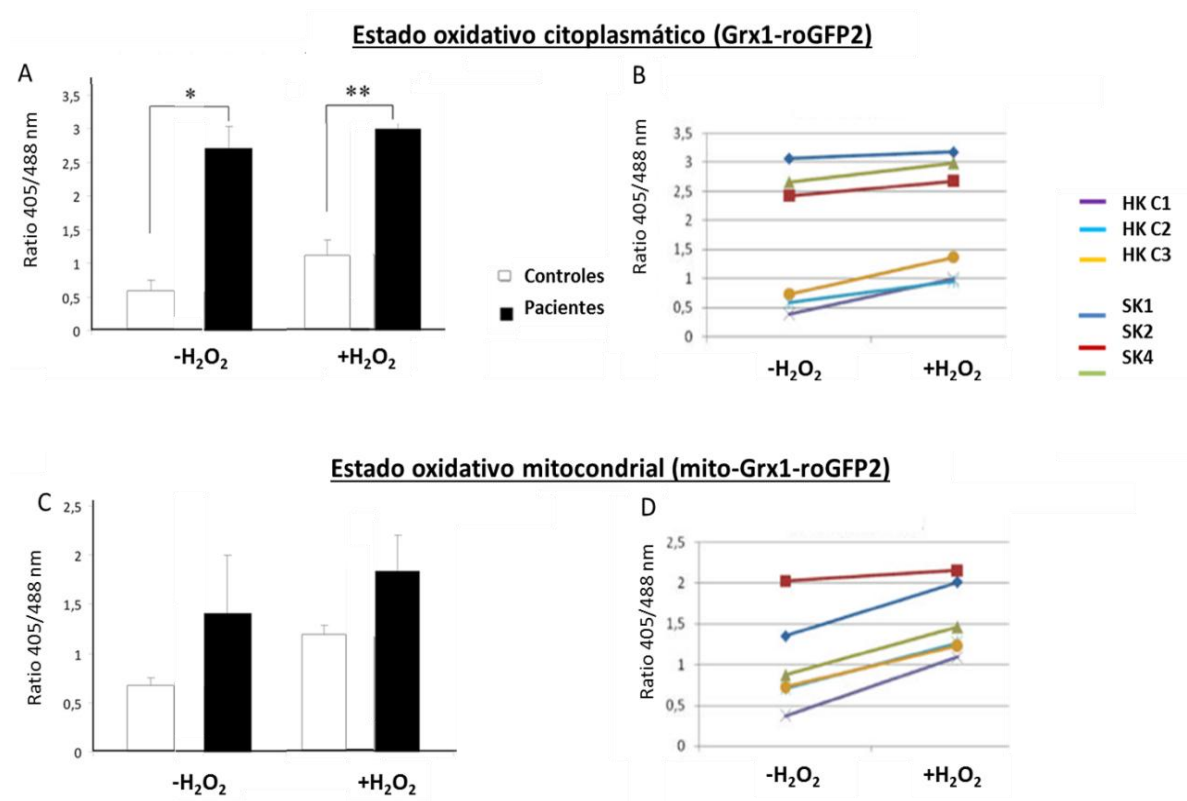
**Figura 35.** Niveles de MDA medidos por HPLC en células SK. SK1 (A), SK2 (B), SK4 (C), HaCaT shFERMT1 (D) y sus respectivos controles. Los resultados representan las medias y desviaciones estándar de dos experimentos independientes con muestras triplicadas. \* $p < 0.05$ : diferencia estadísticamente significativa frente al valor control después de realizar la prueba t-Student.

#### 2.4. Estudio del potencial redox del glutatión mediante biosensores redox

Con el objeto de profundizar en la naturaleza de los compartimentos celulares implicados en el origen del estrés oxidativo presente en los queratinocitos SK, llevamos a cabo otra aproximación experimental utilizando el sistema de biosensores redox quiméricos Grx1-roGFP2 y mito-Grx1-roGFP2 (ver apartado 18.1 de Materiales y Métodos). Los ratios de los biosensores nos indican el potencial redox del glutatión, que en última instancia informa sobre el estado oxidativo celular, tanto a nivel citoplásmico (Grx1-roGFP2) como mitocondrial (mito-Grx1-roGFP2). En ausencia de estímulos oxidativos, el ratio en el citoplasma de los queratinocitos SK ya se mostraba aumentado respecto a sus controles, manteniéndose significativamente incrementado después de añadir un estímulo oxidante ( $H_2O_2$ ). Esto indica un estado pro-oxidativo en el citoplasma de queratinocitos SK en comparación con células control incluso a nivel basal (figura 36.A y B).

Cuando se analizó el compartimento mitocondrial, se observó una respuesta similar a la que encontramos en el citoplasma (figura 36.C y D). El ratio para los queratinocitos SK es mayor que para sus respectivos controles, lo cual indica un estado pro-oxidativo exacerbado también en las mitocondrias de queratinocitos SK. Como se muestra en la figura 36.D, las células SK4 presentaban una respuesta mitocondrial más próxima a la de los controles que las células provenientes de los

otros pacientes, debido probablemente a que la mutación presente en SK4 es fenotípicamente más leve.



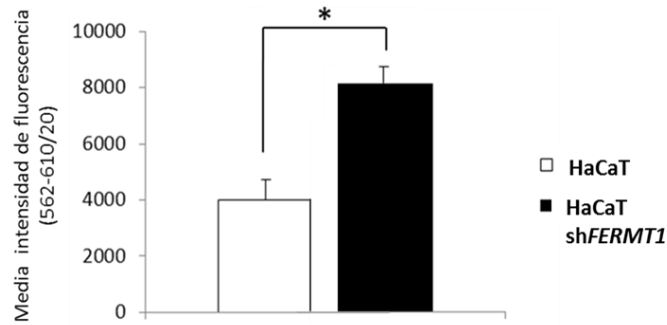
**Figura 36.** Estudio del estado oxidativo citoplasmático (A, C) y mitocondrial (B, D) mediante el uso de biosensores redox quiméricos. Retrovirus codificantes de Grx1-roGFP2 y mito-Grx1-roGFP2 se utilizaron para infectar queratinocitos control y de pacientes SK. El ratio 405/488 nm se calculó en estado basal y después de añadir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12.5 uM). Se muestran las medias de cada grupo experimental (A, B) y las medidas específicas de cada paciente (C, D). \*p<0.05, \*\*p<0.01: diferencia estadísticamente significativa frente al valor control, después de realizar la prueba t-Student.

## 2.5. Dihidroetidio (DHE)

Debido a la expresión constitutiva de GFP en la línea celular HaCaT sh*FERMT1*, y por tanto a la incapacidad de reproducir los experimentos anteriores en ella, los niveles de ROS se midieron utilizando la sonda dihidroetidio (DHE), que responde a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y otras especies reactivas de oxígeno.

Como se aprecia en la figura 37, la línea celular con la expresión del gen *FERMT1* disminuida presentó unos niveles de ROS significativamente mayores que su control. Este resultado corrobora y complementa los obtenidos en los experimentos anteriores (2.1, 2.2 y 2.3), demostrando fehacientemente que la deficiencia de la proteína kindlina-1, se asocia con un estado celular pro-oxidante.





**Figura 37. Cuantificación de ROS con DHE.** Los niveles de ROS en la línea celular HaCaT *shFERMT1* son significativamente mayores que en las HaCaT control. \* $p < 0.05$ : diferencia estadísticamente significativa frente al valor control, después de realizar la prueba t-Student.

### **3. Alteraciones mitocondriales en SK**

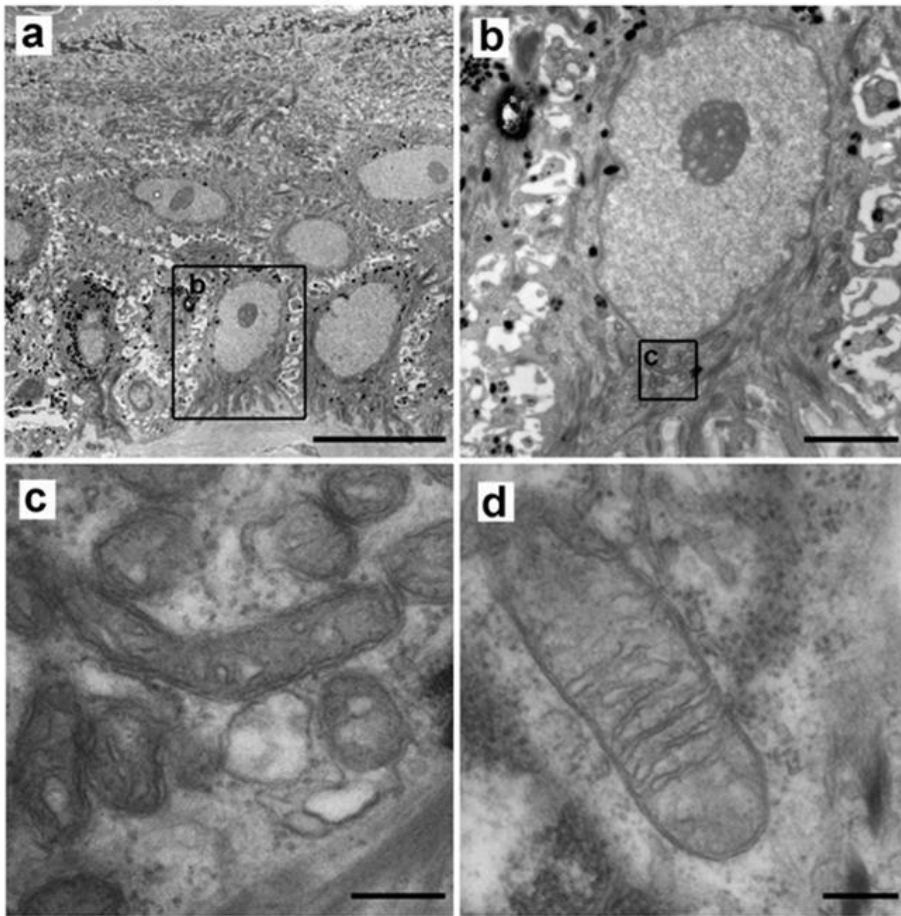
Uno de los objetivos principales de este trabajo de tesis fue determinar si las alteraciones en el estado redox que presentaban los pacientes SK estaban relacionadas con cambios en los orgánulos diana de las ROS. Para ello se analizó tanto la morfología y distribución, como la funcionalidad de las mitocondrias de los pacientes, tanto en biopsias de piel como en queratinocitos primarios en cultivo mediante diferentes aproximaciones experimentales (Zapatero-Solana, Garcia-Gimenez et al. 2014).

#### **3.1. Alteraciones estructurales**

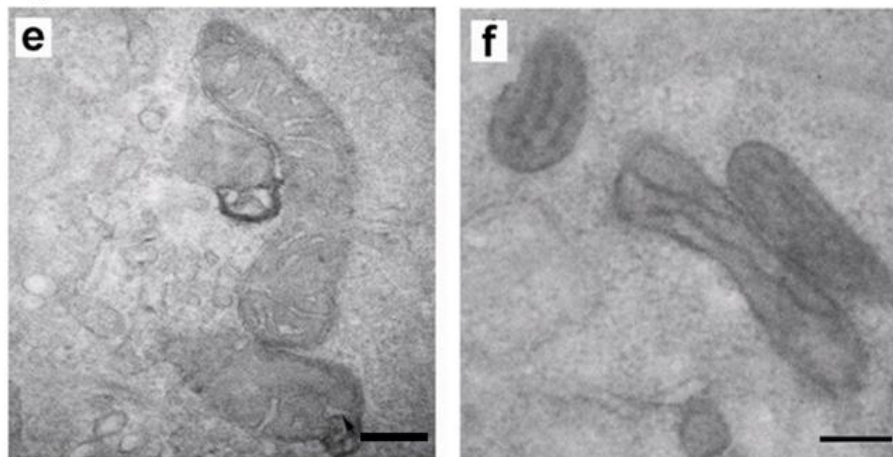
El análisis ultraestructural de las biopsias de piel de pacientes SK, por microscopía electrónica, reveló una variedad de anomalías en sus mitocondrias. Se observó que las crestas mitocondriales presentaban un grosor irregular, aparecían dilatadas y no presentaban una distribución paralela (figura 38.C), lo cual contrastaba con las crestas perfectamente organizadas que presentaban las mitocondrias de las biopsias de piel control (figura 38.D). Además, tanto las membranas mitocondriales internas como externas tenían una morfología ondulada y un grosor irregular (figura 38.C).

Cuando se estudiaron las mitocondrias de los queratinocitos en cultivo de pacientes SK se observaron las mismas alteraciones que en las biopsias, y además se observó que las crestas mitocondriales tienden a fusionarse entre ellas (figura 38.E-F), lo cual puede afectar al espacio intermembrana y a la funcionalidad del mismo.

## BIOPSIAS (EPIDERMIS)

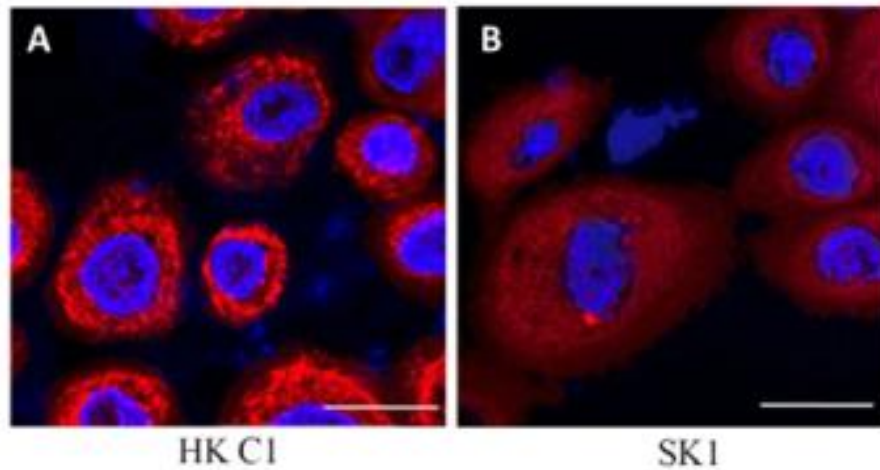


## QUERATINOCITOS EN CULTIVO



**Figura 38. Ultraestructura mitocondrial en SK.** Se estudiaron queratinocitos de biopsias cutáneas y en cultivo de controles y pacientes SK por microscopía electrónica (ME). (A) Vista panorámica del estrato basal de la epidermis de la paciente SK4. (B) Detalle de un queratinocito basal (zona encuadrada en A). (C) Detalle de las mitocondrias de la paciente SK4 (zona encuadrada en B). (D) Mitocondria de una biopsia de piel control. (E, F) Fotomicrografías de mitocondrias de queratinocitos control en cultivo (E) y de queratinocitos de la paciente SK1 en cultivo (F). Barras de escala: 10  $\mu$ m (A), 2  $\mu$ m (B), 200 nm (C, D, E, F). Las imágenes mostradas son representativas de cada grupo experimental.

Por otro lado, estudiamos la estructura de la red mitocondrial en SK utilizando la sonda Mito Tracker Red (ver apartado 13.1 de Materiales y Métodos), mediante microscopía confocal. Mientras que en queratinocitos control se observó una red mitocondrial perfectamente definida (figura 39.A), en queratinocitos SK se observó un marcaje reducido y difuso de la sonda, lo cual es consistente con una red mitocondrial desorganizada (figura 39. B).

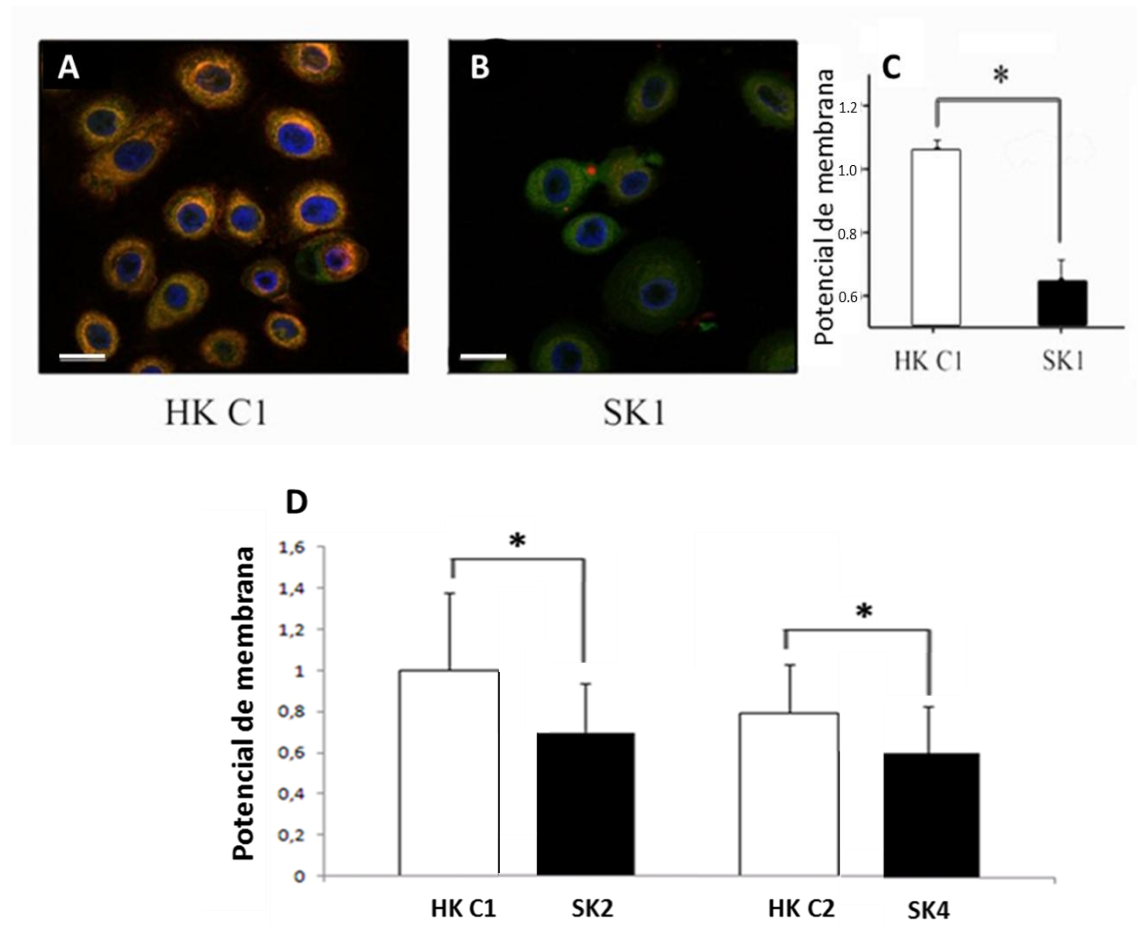


**Figura 39.** Estudio de la estructura de la red mitocondrial en queratinocitos SK con Mito Tracker Red por microscopía confocal. El marcaje en queratinocitos SK está difuminado (B) en comparación con su control (A). Barras de escala: 10  $\mu$ m.

### **3.2. Alteraciones funcionales**

Para valorar la funcionalidad de las mitocondrias se estudió el potencial de membrana mitocondrial utilizando la sonda JC-1, mediante microscopía confocal (ver apartado 13.1 de Materiales y Métodos). El análisis mostró una reducción significativa del potencial de membrana en queratinocitos SK (paciente SK1) con respecto a los controles, que es observable debido al cambio colorimétrico de la sonda (figura 40.A-C). Un resultado similar se obtuvo cuando el análisis se llevó a cabo por FACS, en células de los otros pacientes (figura 40.D) (ver apartado 18.5 de Materiales y Métodos).

Con todo ello, se puede afirmar que las mitocondrias en queratinocitos SK no solo están alteradas en su estructura y distribución, sino que también presentan una funcionalidad alterada en cuanto al potencial electroquímico y la fosforilación oxidativa.

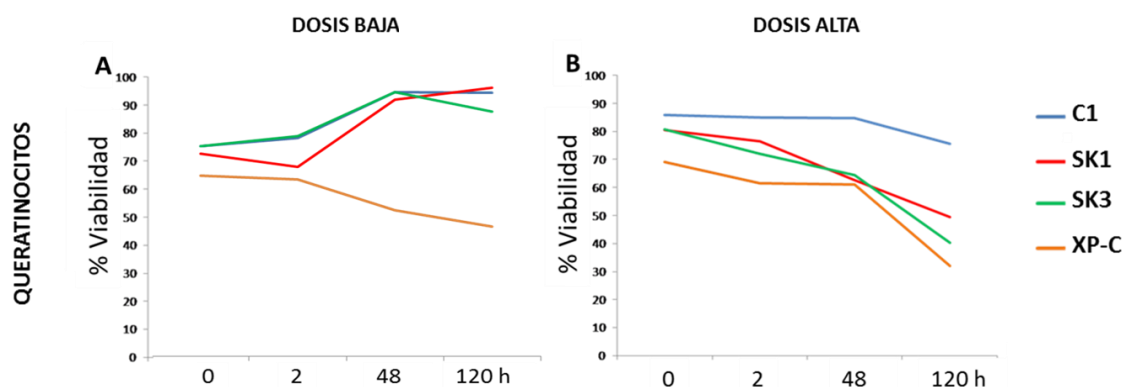


**Figura 40. Estudio funcional del potencial de membrana de las mitocondrias SK mediante marcaje con JC-1.** Se observa una disminución del ratio rojo/verde (C) en queratinocitos SK1 (B) en comparación con el control (A) utilizando microscopía confocal. (D) El mismo análisis por FACS revela también que el potencial de membrana mitocondrial es significativamente menor en queratinocitos de los pacientes SK2 y SK4. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ : diferencia estadísticamente significativa frente al valor control, después de realizar la prueba t-Student. Barras de escala:  $10\mu\text{m}$ .

#### **4. Efectos de la luz UVB en el Síndrome de Kindler**

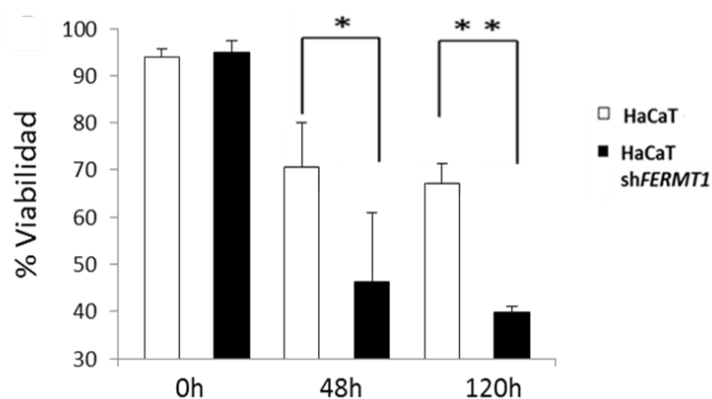
Se llevaron a cabo estudios de fotosensibilidad a la luz UVB en las células cutáneas de los pacientes SK (en queratinocitos primarios y en la línea HaCaT *shFERMT1*). Para ello, se midió la disminución en la viabilidad celular tras la irradiación a distintos tiempos.

En queratinocitos primarios, se comparó la sensibilidad a luz UVB tras la irradiación con dos dosis: alta ( $80\text{ mJ/cm}^2$ ) y baja ( $20\text{ mJ/cm}^2$ ) (ver apartado 17 y 18.2 de Materiales y Métodos). Como control positivo se utilizaron células procedentes de pacientes con XP-C, cuya sensibilidad a la luz UV es conocida (Rezvani, Kim et al. 2011). Mientras que a la dosis baja no se observaron cambios significativos en las células SK, a la dosis alta los queratinocitos de pacientes SK presentaban un descenso claro en la viabilidad que es mayor que en células control aunque no tan elevada como en las células de pacientes XP-C (figura 41.A-B).



**Figura 41.** Curvas de viabilidad en queratinocitos SK. A) Dosis baja de irradiación UVB ( $20 \text{ mJ/cm}^2$ ). B) Dosis alta de irradiación UVB ( $80 \text{ mJ/cm}^2$ ).

Para comprobar si la disminución de la viabilidad como consecuencia de la irradiación UVB estaba asociada a la disminución de kindlina-1, se llevaron a cabo estas medidas en el modelo de HaCaT sh*FERMT1*. En este caso la dosis utilizada fue de  $160 \text{ mJ/cm}^2$ , una dosis elevada necesaria para que las HaCaT, línea celular con mutaciones en el gen que codifica para la proteína p53, respondan frente a los daños que genera la irradiación UV. La disminución de la viabilidad en las HaCaT sh*FERMT1* fue muy marcada después de recibir irradiación, siendo las diferencias observadas estadísticamente significativas (figura 42). De esta forma, se plantea que las HaCaT sh*FERMT1* siguen la misma tendencia que los queratinocitos primarios de SK, al mostrar una mayor sensibilidad a la irradiación con luz UVB que sus respectivos controles.



**Figura 42.** Ensayos de viabilidad en HaCaT control y HaCaTsh*FERMT1*. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : diferencia estadísticamente significativa frente al valor control, después de realizar la prueba t-Student.

### **5. Análisis transcriptómico en Síndrome de Kindler**

Con el objeto de corroborar la hipótesis de que las células SK tienen alteraciones en la señalización, además de las alteraciones en sus propiedades adhesivas, se llevó a cabo el análisis de

la expresión génica global (ARNm) en queratinocitos aislados de pacientes con SK en comparación con sus respectivos controles (Benjamini 1995). Utilizando el programa informático *Pathway painter* (ver apartado 19 de Materiales y Métodos), el análisis se centró en los genes con expresión diferencial (en queratinocitos SK y controles). A partir de estos genes, se identificaron las rutas metabólicas que pudieran estar afectadas por la deficiencia en la expresión de *FERMT1* (Ver Anexo III).

Se estudiaron los genes implicados en la función adhesiva de la célula a todos sus niveles (uniones adherentes y oclusivas, adhesiones focales, interacción entre la membrana basal y la ECM, y aquellos implicados en la regulación del citoesqueleto de actina).

Por otro lado, se estudiaron genes implicados en la oxidación celular como son aquellos relacionados con la producción y detoxificación de ROS y con la fosforilación oxidativa. Por último se estudiaron aquellos que intervienen en la replicación y reparación del ADN y en diferentes rutas oncogénicas. Los resultados se muestran agrupados en la tabla 10 y detallados en el Anexo III.

Algunos de los genes que aparecieron alterados, son consistentes con los experimentos presentados en esta memoria y con los resultados descritos en la bibliografía (Siegel, Ashton et al. 2003; Kloeker, Major et al. 2004; Herz, Aumailley et al. 2006; Has, Herz et al. 2009; Lai-Cheong, Tanaka et al. 2009; Rognoni, Widmaier et al. 2014). En relación con las defensas antioxidantes, aparece subexpresado el gen *GCLC*. Esta regulación a la baja en células de pacientes SK, ya se había demostrado mediante q-PCR (figura 34). Por otra parte, el gen *COL4A1*, que codifica para el colágeno 4, aparece sobreexpresado en queratinocitos SK respecto a sus respectivos controles. Dicha sobreexpresión correlaciona con la reduplicación de la lámina basal que aparece en los pacientes SK, al realizar el diagnóstico por mapeo antigénico (figura 6). De la misma manera, el gen *LAMC1*, que codifica para la proteína laminina 1, aparece sobreexpresado tanto en los análisis transcriptómicos como en las biopsias de los pacientes SK cuando se lleva a cabo el mapeo antigénico (Bruckner-Tuderman and Has 2013).

En estos análisis transcriptómicos, también se observaron desregulados algunos genes que tienen un papel importante en rutas oncogénicas. Estos datos, requieren aún un estudio más profundo que pueda arrojar luz sobre los mecanismos moleculares por los que los pacientes SK presentan una mayor predisposición a desarrollar tumores.

A falta de las confirmaciones y validaciones de rigor con este tipo de datos (por ej: qPCR e inmunohistoquímica), algunos de los cambios evidentes apoyan en buena medida los resultados descritos en esta memoria obtenidos mediante otras aproximaciones experimentales. Además, estos resultados ofrecen nuevas vías de estudio, que permitan en un futuro conocer rutas moleculares patognomónicas alteradas en SK.

Ruta alterada	Genes <b>sobreexpresados</b> en queratinocitos SK vs control	Genes <b>subexpresados</b> en queratinocitos SK vs control
<b>FUNCIÓN ADHESIVA CELULAR</b>	<p><b>Adherentes:</b> RAC1P2, FGFR1, CTNND1, VCL, SMAD4, IGF1R, CDH1, ACVR1C, WASF2, PTPRM, EP300, PVRL1, RAC1.</p> <p><b>Oclusivas:</b> PTEN, MRAS, MYL5, CLDN11, CASK, MYH9, EXOC3, CTTN, YBX3, EPB41, PTENP1, PPP2R1A, CSNK2A2, CLDN7, JAM3, EXOC4, AMOTL1, CLDN4, RHOA.</p> <p><b>Comunes:</b> HMGN1P38, HMGN1P36, HMGN1P37, TJP1, HMGN1P3, CSNK2A1, HMGN1, PARD3, ACTN1, CTNNA1, ACTB.</p>	<p><b>Adherentes:</b> RAC2, SRC, LEF1.</p> <p><b>Oclusivas:</b> CLDN18, RRAS2, INADL, SRC, CRB3.</p>
Uniones adherentes y oclusivas		
Adhesiones focales	HMGN1P38, LAMA5, PTK2, HMGN1P36, DIAPH1, COL1A1, HMGN1P37, VCL, IGF1R, FLNA, COL3A1, HMGN1P3, HMGN1, PTEN, MYL5, ACTB, CRKL, TLN1, PDPK1, GSK3B, COL5A1, ACTN1, COL6A1, COL6A2, COL4A1, PTENP1, COL6A3, MYLK, PDGFRA, THBS3, FLNC, CRK, VAV3, FN1, COL1A2, TNC, LAMB2, LAMC1, RAC1P2, RAC1, RHOA.	MAP2K1, RAC2, PIK3CD, PAK1, PAK4, SRC.
Interacción ECM con receptores de membrana	LAMA5, COL1A1, COL3A1, COL5A1, COL6A1, COL6A2, COL4A1, COL6A3, THBS3, FN1, COL1A2, TNC, CD47, SDC4, LAMB2, LAMC1.	SEPT5, GP1BB.
Regulación del citoesqueleto de actina	TMSB4XP6, HMGN1P38, PTK2, HMGN1P36, DIAPH1, FGFR1, HMGN1P37, VCL, TMSB4X, TMSB4XP8, FGFR2, CFL2, HMGN1P3, HMGN1, MRAS, MYL5, ACTB, CRKL, MYH9, FGFR3, WASF2, ACTN1, MYLK, ARHGEF4, PDGFRA, CRK, VAV3, VAV3, FN1, SSH1, ARPC5, RAC1P2, RAC1, RHOA.	MAP2K1, RRAS2, PIP4K2B, RAC2, PIK3CD, PAK1, PAK4, LIMK1.
<b>OXIDACIÓN CELULAR</b>		
Estrés oxidativo	NCF2, CYBA, NFKB1, SP1, CAT, RAC1.	SOD1, NQO1, GCLC.
Fosforilación oxidativa	NDUFA10, MIR4461, MTND4P12, MT-ND1, MT-TI, MT-TM, MT-ND2, MT-CO1, MT-TD, MT-CO2, MT-ND4L, MT-ND4, ATP6V0A1, ATP6AP1, ATP6V1E1, COX7A1.	NDUFB6, ATP5E, UQCRB, ATP5J, ATP5C1.
<b>MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN Y CÁNCER</b>		
Replicación del ADN	SSBP1, LIG1, POLD4, POLA1, RNASEH1, POLE, RFC1, RPA4, RPA2, POLD1, POLD3, POLE3.	PRIM1, RFC5, MIR25, MIR93, MCM3, PCNA, POLA2, POLE4, POLD2, RNASEH2B, RFC4, RPA3, RNASEH2A, POLE2, MCM2, RFC2.
Reparación de daños en el ADN	<b>NER:</b> XPB. <b>BER:</b> MBD4.	<b>NER:</b> PCNA, ERCC1. <b>MMR:</b> PCNA. <b>BER:</b> PCNA.
Rutas en cáncer	COL4A1, NFKB1, RALBP1, GLI3, MTOR, RALB, LAMB2, STAT3, HSP90AB1, PLCG2, FOXO1, FN1, STAT1, JUP, IGF1R, LAMC1, CDH1, RELA, PTEN, RUNX1, TFG, PTK2, FZD3, FH, LAMA5, GSK3B, JAK1, PDGFRA, FGFR1, TGFB2, CRKL, FZD10, PTENP1, EP300, PAX8, ACVR1C, SMAD4, CTNNA1, RAC1P2, CRK, FGFR3, FGFR2, RAC1, RHOA.	RAC2, SKP2, WNT7B, PIK3CD, LEF1, NKX3-1, TRAF4, SUFU, BMP2, MAP2K1, CTBP2, PPAR, RRAS2.

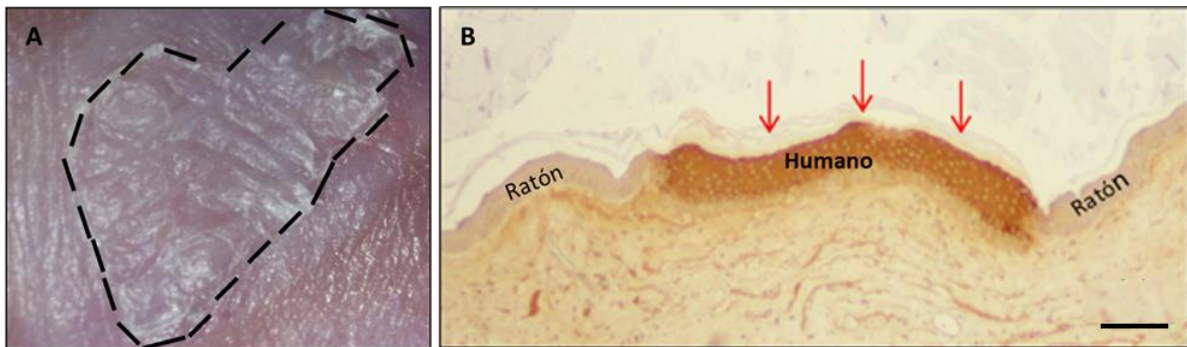
**Tabla 10. Análisis transcriptómico para queratinocitos SK en comparación con sus respectivos controles.** Se muestran agrupados por rutas, los genes sobreexpresados (rojo) y subexpresados (verde) diferencialmente en SK con respecto a queratinocitos control ( $p < 0.05$  aplicando la corrección de Benjamini y Hochberg) (Benjamini 1995).



### **6. Modelo de ratón humanizado de Síndrome de Kindler**

Con objeto de generar un modelo fidedigno de Síndrome de Kindler, seguimos la línea desarrollada en nuestro laboratorio para la obtención de modelos humanizados de enfermedades de piel (Guerrero-Aspizua, Conti et al. 2015), utilizando la metodología previamente descrita basada en el trasplante de equivalentes cutáneos desarrollados por bioingeniería de tejidos y trasplantados a ratones inmunodeficientes (Del Rio, Larcher et al. 2002; Llames, Del Rio et al. 2004) (ver figuras 15 y 16 y apartado 6 de Materiales y Métodos). Para ello, utilizamos células de uno de los pacientes SK (paciente SK3, nulo para kindlina-1).

El análisis macroscópico clínico demostró que la piel humana regenerada presentaba un aspecto similar a la piel de los pacientes SK, observándose la atrofia cutánea característica de la patología (figura 43.A). El análisis histológico e inmunohistoquímico mediante el marcaje con un anticuerpo contra involucrina humana confirmó el origen humano del trasplante (figura 43.B).

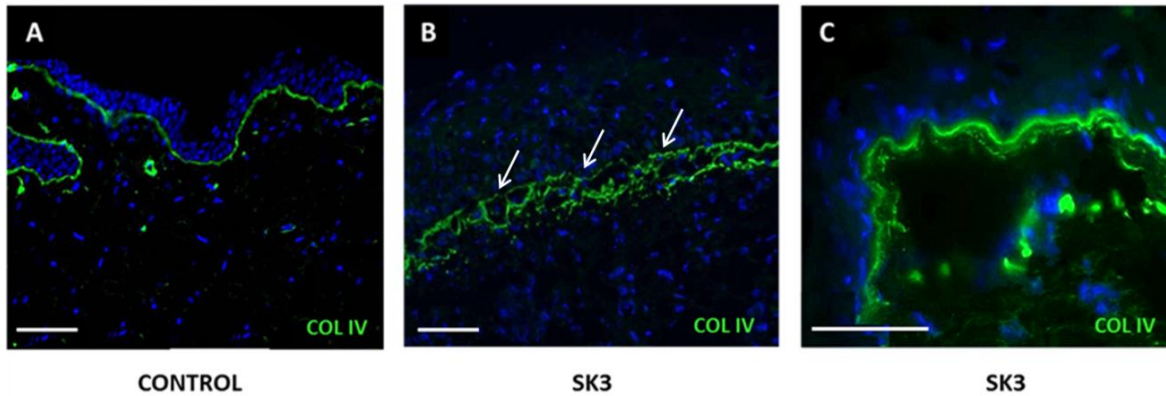


**Figura 43. Modelo humanizado de SK. A)** Aspecto macroscópico de la piel humanizada SK regenerada en el lomo del ratón. **B)** Inmunohistoquímica para involucrina humana en un corte de trasplante, demostrando el origen humano de la piel regenerada. Barra de escala: 100 µm.

Además, se llevó a cabo una IF para la proteína Col IV, una de las proteínas consideradas como criterio diagnóstico en los mapeos antigénicos de SK. A diferencia de lo observado en un trasplante control en cuanto a la distribución lineal de esta proteína de la lámina basal (figura 44.A), la expresión de Col IV en un trasplante SK evidenciaba el fenómeno conocido como “reduplicación de la lámina basal” (figura 44.B), que ha sido descrito en biopsias de piel de pacientes de SK (ver figura 6.B). A mayor aumento, en la figura 44.C, podemos observar la presencia de pequeñas ampollas en la piel humanizada SK, presentes también en los pacientes.

De esta manera, el modelo de ratón humanizado para SK reproducía las principales características histopatológicas de la enfermedad brindando una herramienta excepcional, para la comprensión y terapéutica del SK.

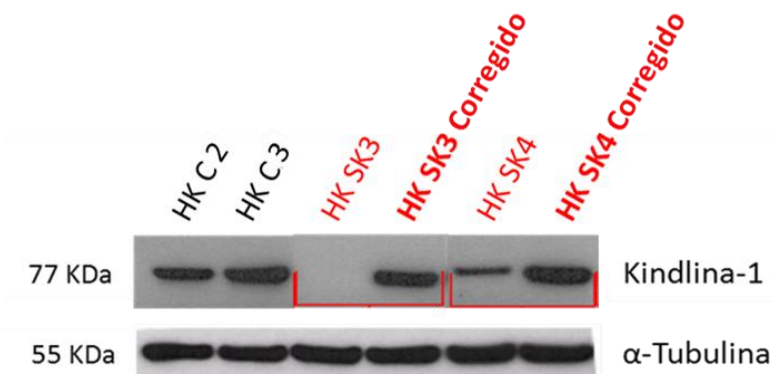




**Figura 44. Mapeo antigénico para colIV mediante IF. A)** Piel de un ratón humanizado control. **B)** Piel de un ratón humanizado SK (paciente SK3), mostrando reduplicación de la MB (flechas). **C)** Ampolla en lámina basal observada en un criocorte de piel de un ratón humanizado SK (paciente SK3). Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  (A, B), 10  $\mu\text{m}$  (C).

### 6.1. Corrección de Síndrome de Kindler mediante terapia génica

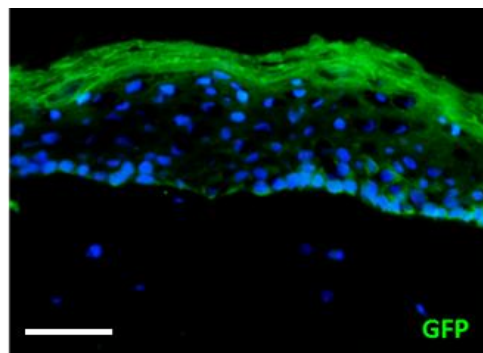
Una vez desarrollado el modelo humanizado de SK, abordamos su corrección mediante terapia génica de adición *ex vivo* del gen *FERMT1*, como prueba de concepto en la corrección de la enfermedad. Para ello, se realizó una construcción génica utilizando el retrovirus pLZR-ires-GFP, que incluía el gen *FERMT1* de ratón (figura 14 y apartado 4 de Materiales y Métodos). El gen *FERMT1* de ratón es 88% homólogo al humano ([http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)) y el anticuerpo frente a kindlina-1 utilizado reconoce la proteína restaurada. Se infectaron queratinocitos de los pacientes SK3 y SK4 (que presentaban distintos niveles de expresión de kindlina-1) y como se observa en el Western-blot de la figura 45, en ambos pacientes se restableció la expresión de kindlina-1 a niveles similares a los controles.



**Figura 45. Análisis de la expresión por Western blot de kindlina-1 en queratinocitos SK modificados genéticamente. Se observa la corrección de queratinocitos SK3 y SK4 con el gen *FERMT1*.  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control de carga.**

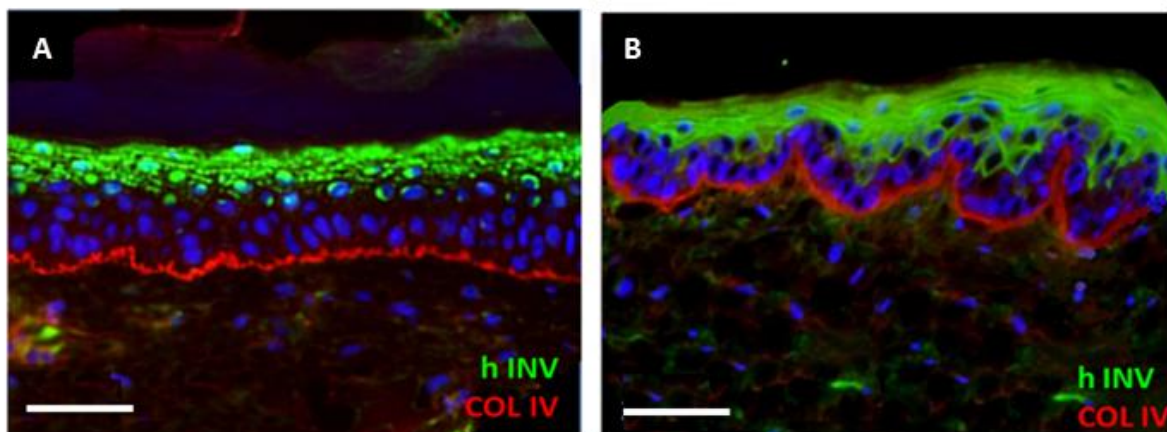
Los queratinocitos corregidos del paciente SK3 junto con sus fibroblastos fueron utilizados para generar equivalentes cutáneos, que posteriormente, fueron trasplantados a ratones inmunodeficientes. Se determinó el origen humano de la piel regenerada (GFP positiva) (figura 46), así como el Col IV, cuyo patrón de expresión se restableció en la piel SK corregida (figura 47.B), siendo comparable al de la piel humanizada control (figura 47.A). Por tanto, al corregir la deficiencia de kindlina-1, se restaura histológicamente el fenotipo fisiológico de la piel. Estudios fuera del alcance de esta tesis analizarán si la corrección obtenida revierte también el fenotipo en cuanto al daño oxidativo y la fotosensibilidad.

El modelo de SK humanizado, posibilitará una mejor comprensión de la patología, así como el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, en un contexto *in vivo*.



SK3 CORREGIDO

**Figura 46. Análisis por IF de la expresión de GFP** indicativa de la expresión concomitante de kindlina-1, y que determina el origen humano de la piel regenerada. Barras de escala: 100  $\mu$ m.



CONTROL

SK3 CORREGIDO

**Figura 47. Análisis por IF de la estructura de la membrana basal y la diferenciación epidérmica en el modelo humanizado corregido de SK.** Marcaje para involucrina humana (verde) y colIV (rojo). **A)** Piel de ratón humanizado control. **B)** Piel de ratón humanizado corregido, mostrando la restauración del patrón normal de colIV en la membrana basal. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

***DISCUSIÓN***



Una enfermedad genética se considera completamente caracterizada, cuando además de identificar la mutación que la origina, se comprenden los mecanismos bioquímicos y moleculares responsables de sus características fenotípicas. A veces, esta comprensión profunda es difícil de lograr debido a las múltiples interacciones en las rutas metabólicas relacionadas con el gen afectado por la mutación. Este parece ser el caso del Síndrome de Kindler en el cual varios aspectos de su patogénesis permanecen aún por aclarar, ya que no pueden ser completamente explicados con las funciones canónicas del gen que codifica para la kindlina-1. En otras palabras, la conocida función en la adhesión celular de la kindlina-1, no es suficiente para explicar algunas de las características patognomónicas de la enfermedad.

### **1. Caracterización de los pacientes de SK**

Nuestros resultados cubren un amplio espectro de la enfermedad, tanto desde el punto de vista de las mutaciones como del fenotipo. Comprenden cuatro tipos de mutaciones diferentes (Has, Castiglia et al. 2011) y los pacientes, en el momento de la toma de muestras, presentaban distintas edades y sexos, factores a tener en cuenta ya que poseen una fuerte asociación con características clínicas como son la fotosensibilidad y el envejecimiento prematuro (Block, Dietrich et al. 2002; Makrantonaki 2010).

Como en otras genodermatosis, en SK la disponibilidad de muestras para obtener cultivos de queratinocitos es normalmente muy baja (sólo se han descrito 171 pacientes en todo el mundo<sup>1</sup>). A pesar de este inconveniente, nuestros resultados con queratinocitos primarios de pacientes heterogéneos, son consistentes en lo relativo al estatus oxidativo desbalanceado, las alteraciones mitocondriales y la fotosensibilidad.

La mutación que presenta la paciente SK1, provoca que se pierda el dominio PH, que media la asociación con la membrana plasmática celular, y los subdominios F2 y F3 del dominio FERM, sintetizándose una proteína truncada de menor tamaño que la silvestre (figura 28). De esta manera, la conexión entre el citoesqueleto de actina y la ECM sería defectuosa, lo cual explicaría algunas de sus principales características clínicas como la presencia de ampollas, la atrofia y la poiquilodermia (tabla 9) (figura 19). En los pacientes SK2 y SK3 la mutación se produce al principio del gen, en los exones 5 y 6 respectivamente. De ahí que el escenario más probable implique bien que el ARNm generado se degrada, o bien que la degradación ocurre a

---

<sup>1</sup> [https://grenada.lumc.nl/LOVD2/mendelian\\_genes/home.php?select\\_db=FERMT1](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/mendelian_genes/home.php?select_db=FERMT1)

nivel de proteína, en el caso que ésta llegara a ser sintetizada. Esta ausencia de kindlina-1 (figura 28), provoca una falta de adhesión total entre el citoesqueleto de actina y la ECM, que puede explicar la mayor severidad del fenotipo clínico de estos pacientes (tabla 9) (figura 19). La paciente SK4, presenta una mutación homocigótica de sustitución de un único nucleótido que se traduce en una proteína del mismo tamaño, que sin embargo se expresa en cantidad reducida (figura 28). Las características clínicas de esta paciente son mucho más leves en comparación con el resto (tabla 9) (figura 19), lo que podría ser resultado de la presencia de la proteína, que aunque en menor cantidad, mantenga su función (figura 28). Adicionalmente, tras llevar a cabo los análisis de la predicción estructural del ARNm mutado, se observó que al menos a nivel global, no estaba afectada ni su estructura ni su estabilidad (figura 27), aunque existen estudios en otros modelos, en los que se demuestra que la expresión de ARNm y los niveles de proteína, no siempre están correlacionados (Battle, Khan et al. 2015). Por otro lado, los análisis transcriptómicos revelaron que los pacientes con Síndrome de Kindler, presentan sobreexpresados algunos de los genes implicados en la degradación del ARN (Anexo III). Por esta razón, otra posibilidad, sería la de una alteración de los mecanismos de degradación del ARN en SK, brindando una explicación a que la paciente SK4 presente una menor cantidad de ARNm (figura 26) y por tanto, menos cantidad también de la proteína kindlina-1 (figura 28).

Además de la heterogeneidad existente en los pacientes SK debida principalmente a variabilidades genóticas y ambientales, se han descrito algunos pacientes cuyo fenotipo es consistente con Síndrome de Kindler pero sin embargo, no presentan mutaciones en las secuencias codificantes del gen *FERMT1*. Algunas familias con SK, presentan mutaciones en la región promotora de dicho gen (Has, Chmel et al. 2014), y además, es posible que mutaciones en otros genes que codifiquen para proteínas que interaccionan con kindlina-1 o que forman parte de las adhesiones focales, e incluso mutaciones en las otras kindlinas, puedan estar implicadas en la heterogeneidad de la enfermedad (Lai-Cheong, Liu et al. 2007; Lai-Cheong, Tanaka et al. 2009; Margadant, Kreft et al. 2013; Fuchs-Telem, Nousbeck et al. 2014; Kapoor 2014). Esto hace, que la alteración de los mecanismos moleculares en los que interviene kindlina-1, merezca un estudio mucho más profundo para ser comprendidos en su totalidad.

Una herramienta muy útil para el desarrollo de los resultados presentados en esta memoria fue la línea celular HaCaT *shFERMT1*, generada con el fin de obtener un modelo celular de SK, que suponga una ventaja frente a las restricciones derivadas de la escasa disponibilidad de muestras de pacientes; además de la baja tasa de proliferación y la alta senescencia de los queratinocitos primarios de SK. Como se muestra en la figura 29, la

expresión del gen *FERMT1* está reducida en esta línea celular (HaCaT sh*FERMT1*) y además, se comporta, en términos de viabilidad, como los queratinocitos primarios de SK, siendo ésta reducida respecto a sus controles (figura 42).

Sin embargo, a pesar de algunas características antagónicas en la línea HaCaT sh*FERMT1* (por ejemplo, inmortalización *versus* senescencia), muchas de las respuestas obtenidas con esta línea celular son coherentes con las observadas en células SK y por tanto facilitan los estudios mecanísticos de la patología, posibilitando la obtención de resultados que puedan luego ser aplicables a la enfermedad en su conjunto, caracterizada por una gran heterogeneidad a nivel genético, proteico y sintomatológico.

## **2. Alteraciones morfológicas y de adhesión en queratinocitos SK**

Los estudios microscópicos clásicos en los queratinocitos SK, demostraron que su morfología y polaridad se encuentra notablemente alterada en contraste con los queratinocitos control, que presentan una morfología poligonal y lamelipodios polarizados (Herz, Aumailley et al. 2006). Asimismo, se ha descrito que el área de la superficie celular es significativamente más pequeña en queratinocitos SK (Herz, Aumailley et al. 2006). Por otra parte, los estudios con microscopía confocal presentados en esta memoria, ayudaron a entender mejor la morfología aberrante de las células SK en cuanto a las alteraciones de la adhesión y procesos como la migración.

En este sentido, estos estudios permitieron demostrar la desestructuración del citoesqueleto de actina (figura 31.A-B) que, dada su interacción con la kindlina-1, nos permite relacionar estos cambios con las alteraciones en la adhesión y la proliferación, la forma celular aberrante y los defectos migratorios descritos en estas células (Has, Herz et al. 2009).

Además de los cambios observados en el citoesqueleto de actina, el patrón de expresión de la queratina K5, cuya expresión es independiente de kindlina-1 y de las adhesiones focales, resultó, como era previsible, normal (figura 31.C-D); aunque sin embargo confirmó la morfología alterada de los queratinocitos SK y la pérdida de polaridad previamente observada *in vivo* e *in vitro* (Herz, Aumailley et al. 2006), más evidente en la reconstrucción tridimensional (3D) (figura 32.C), donde se aprecia el núcleo rodeado de una fina porción de citoplasma y el grueso de éste en planos diferentes.

Las alteraciones morfológicas basadas en el análisis de proteínas del citoesqueleto, tuvieron su correlato en los cambios observados en la expresión génica global. Los análisis transcriptómicos revelaron que en queratinocitos SK, algunos de los genes que codifican para componentes de las adhesiones focales, como *TLN1* (talina) y *VCL* (vinculina) aparecen sobreexpresados (tabla 10), lo que es consistente con la distribución alterada de adhesiones focales que se ha observado en queratinocitos SK en estudios *in vitro* realizados en otros laboratorios (Has, Herz et al. 2009). Asimismo, se vieron sobreexpresados los genes que codifican para algunas cateninas (*CTNN*) y cadherinas (*CDH1*), que son componentes de los desmosomas (D) y uniones oclusivas que se encargan de las uniones célula-célula (tabla 10). Además de estas alteraciones, también se observó sobreexpresión de los genes *COL4A1* y *LAMC1*, muy posiblemente implicados en la reduplicación de la membrana basal, observada en SK (figura 6) (Bruckner-Tuderman and Has 2013; Hiremagalore, Kubba et al. 2014).

En base a estos resultados parece razonable suponer, que en el caso de SK, la ausencia de kindlina-1 se relacione con la sobreexpresión de otros genes relacionados con la adhesión celular, en un intento de compensación por parte de la célula con el fin de restablecer la función adhesiva normal. La existencia de estos mecanismos compensatorios, son conocidos en otra enfermedad como es la distrofia muscular de Duchenne. En ella, la ausencia de distrofina, proteína presente en las AF de los miocitos, genera un aumento de otras proteínas de las AF, como talina y vinculina, en un intento de mecanismo compensatorio (Law, Allen et al. 1994; Spassov, Gredes et al. 2012). Sin duda, estos resultados preliminares necesitan ser complementados con análisis funcionales más exhaustivos que corroboren estas hipótesis.

### **3. Estrés oxidativo en SK**

Las mutaciones en *FERMT1* se han identificado como el origen de esta enfermedad, aunque algunas de sus características clínicas, como son la fotosensibilidad, el envejecimiento prematuro y el cáncer, no pueden explicarse completamente con la pérdida de la función adhesiva de la kindlina-1. Estas características patognomónicas del Síndrome de Kindler, están fuertemente asociadas con el estrés oxidativo (Wang, Wu et al. 2013), y por esta razón uno de los principales objetivos de este trabajo se centró en su estudio.

Los análisis realizados con diversos biomarcadores, indicadores del estado oxidativo celular, tanto en los queratinocitos de pacientes SK como en la línea celular HaCaT sh*FERMT1*, se mostraron consistentes relacionando las alteraciones en kindlina-1 con un estado



prooxidativo celular. En los queratinocitos deficientes en kindlina-1, se observó un elevado ratio GSSG/GSH (figura 33), al mismo tiempo que una menor capacidad para sintetizar GSH *de novo*, debido a la regulación a la baja de las dos subunidades de la GCL (figura 34), lo cual reveló una deficiencia en los mecanismos de defensa antioxidante (Wang, Wu et al. 2013). En los experimentos llevados a cabo con los biosensores Grx1-roGFP2 y mito-Grx1-roGFP2, pudimos observar que las alteraciones oxidativas en la vía del glutatión en los queratinocitos SK, se producen tanto en el citoplasma, como en las mitocondrias (figura 36), reflejando la incapacidad de las células de hacer frente al desequilibrio oxidativo en ambos compartimentos. El desbalance del estado oxidativo celular, patológico y crónico, observado en SK, se encuentra directamente relacionado con el envejecimiento prematuro (Finkel and Holbrook 2000) y señala una posible relación con la mayor predisposición a padecer cáncer, que presentan estos pacientes (Trouba, Hamadeh et al. 2002). Estos resultados fueron corroborados además, en la línea celular HaCaT sh*FERMT1* usando un abordaje experimental alternativo (figura 37).

La elevación del producto de peroxidación lipídica MDA, tanto en queratinocitos primarios de pacientes SK (mayor en células del paciente adulto (SK4) que en los jóvenes (SK1 y SK2)) como en la línea HaCaT sh*FERMT1* (figura 35), nos indicó que se trataba de un proceso pro-oxidativo crónico previsiblemente asociado al envejecimiento prematuro en SK. La presencia de MDA se ha visto implicada en otros estudios sobre cáncer y fotoenvejecimiento cutáneo (Sander, Chang et al. 2002; Yan, Hong et al. 2005). Además de actuar como biomarcador del estatus oxidativo celular, tanto el MDA como sus derivados, desencadenan procesos de fototoxicidad y mutagénesis directa sobre el ADN (Marnett 1999; Del Rio 2005 ; Uchida 2006; Lamore 2010), lo que le confiere a esta molécula un papel determinante en la patogénesis de SK, e incluso podría postularse como interesante diana terapéutica.

Dada la variabilidad presente en las células primarias de pacientes SK, el papel de la línea HaCaT sh*FERMT1*, ha sido muy importante ya que no solo valida este modelo celular para el estudio de las alteraciones en el estrés oxidativo presentes en SK si no que, más importante aún, confirma que la falta de funcionalidad de kindlina-1 supone en sí misma una razón suficiente para desencadenar un desbalance del estado oxidativo celular.

Así como en el estudio de las alteraciones morfológicas, los datos de la expresión génica global también complementaron el análisis de las alteraciones en el equilibrio redox, observándose varios genes desregulados en queratinocitos de pacientes SK. Por un lado, se

encontraron sobreexpresados algunos genes que codifican para subunidades del complejo NADPH oxidasa de membrana, una de las principales fuentes endógenas generadoras de ROS (p22phox (CYBA), p67phox (NCF2) y Rac (RAC1)) (tabla 10) (Bedard K. 2007). Por otra parte, se encontraron reprimidos los genes *GCLC* y *SOD1* (tabla 10), con función antioxidante. La expresión disminuida de *GCLC* fue corroborada previamente mediante q-PCR en nuestros ensayos (figura 34). La subexpresión de *SOD1*, que codifica la enzima CuZnSOD podría suponer *a priori* una actividad detoxificadora (de anión superóxido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) comprometida (Poswig 1999). Recientemente se ha demostrado que la disminución de SOD en la piel de ratones transgénicos posee efectos pleiotrópicos asociados a senescencia como los observados en SK (Velarde, Demaria et al. 2015).

#### **4. Alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias de SK**

Debido al papel tanto en la producción como en la respuesta a ROS por parte de las mitocondrias, en este trabajo, llevamos a cabo un estudio sobre la morfología y funcionalidad de estos orgánulos en células y biopsias de piel de pacientes SK. Los estudios de microscopía electrónica revelaron alteraciones morfológicas a nivel ultraestructural, que son consistentes con mitocondrias disfuncionales (Galloway and Yoon 2012). La fusión de las crestas mitocondriales entre sí, así como la morfología ondulada y el grosor irregular de las membranas mitocondriales tanto internas como externas (figura 38), son consistentes con alteraciones detectadas en piel irradiada con luz UV, previamente descritas (Birch-Machin and Swalwell 2010). Además de las alteraciones morfológicas mitocondriales a nivel individual, los resultados de microscopía confocal con la sonda Mito Tracker Red, revelaron alteraciones en la red mitocondrial de los queratinocitos SK en todo su conjunto.

En consonancia con las alteraciones morfológicas mitocondriales, también se observaron alteraciones funcionales al analizar el potencial de membrana mitocondrial (medido con la sonda JC-1), que apareció reducido en queratinocitos de pacientes SK en comparación con sus respectivos controles (figura 40). Esta despolarización de la membrana mitocondrial, también se ha observado en otras patologías que presentan disfunción mitocondrial como son el Parkinson y el Alzheimer (Trimmer, Swerdlow et al. 2000; Kim, Won et al. 2002).

Los resultados del análisis transcriptómico, una vez más, sustentan los resultados anteriores, ya que algunos genes relacionados con la función mitocondrial y la fosforilación

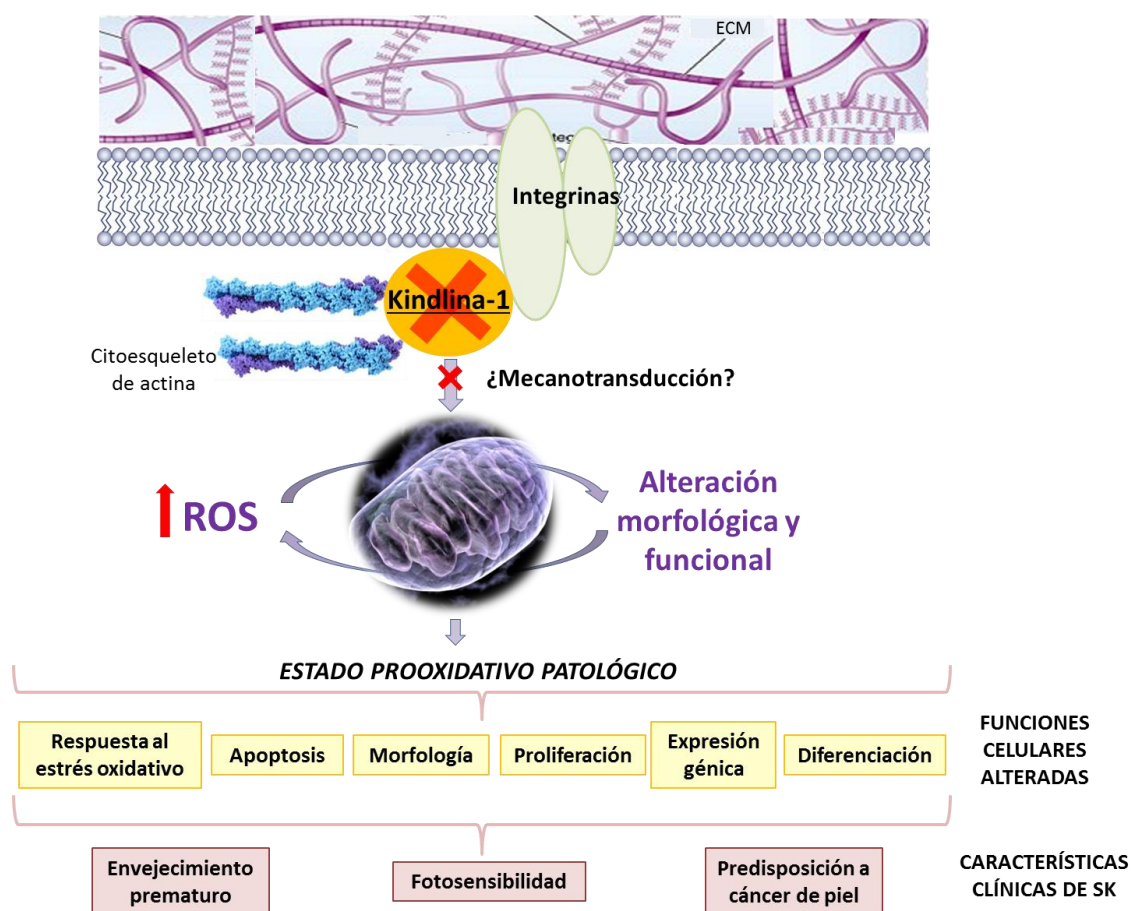
oxidativa, presentaron alteraciones en sus niveles de expresión. Un ejemplo claro es el del gen *NQO1*, que codifica para la NADPH deshidrogenasa quinona 1 del complejo I de la cadena de fosforilación oxidativa, que tiene una función antioxidante (Dinkova-Kostova and Talalay 2010) y se encuentra subexpresado en queratinocitos de pacientes SK (tabla 10). En caso de ser corroborados, los análisis de expresión génica global podrían identificar las rutas metabólicas causales del exceso de oxidación presente en SK. Teniendo en cuenta que ciertos genes alteran su expresión como mecanismos de compensación (Frei 1994; Moreira, Zhu et al. 2006), el estudio de estas rutas puede ser complejo. De cualquier manera, parece evidente que la posible existencia de mecanismos compensatorios no es suficiente en la resolución del proceso prooxidativo que se manifiesta en los pacientes SK.

### **5. Posible relación entre adhesión, mitocondrias y ROS en SK**

Si bien una relación, entre los defectos de adhesión y otros cambios moleculares responsables de la fotosensibilidad o el envejecimiento prematuro en SK no es obvia, podemos, basándonos en parte en los resultados de esta tesis doctoral, concebir una posible interconexión comenzando a partir de la disfunción de kindlina-1. Así pues, la función alterada de esta proteína en SK influiría en las señales de transducción que implican a las integrinas en las adhesiones focales (Werner and Werb 2002; Fiaschi, Cozzi et al. 2006; Lai-Cheong, Parsons et al. 2009; Margadant, Kreft et al. 2013; Rognoni, Widmaier et al. 2014). Es bien conocido que las integrinas, entre otras muchas funciones, actúan como moduladoras de la función mitocondrial a través de procesos de mecanotransducción (transducción de señales, en respuesta a los estímulos mecánicos) mediados por Rho GTPasas (Chiarugi and Giannoni 2005; Chiarugi 2008). En queratinocitos SK, se ha descrito que existen alteraciones en la forma activa de estas Rho GTPasas (Has, Herz et al. 2009). Si bien, en esos estudios se las implicó principalmente con mecanismos como formación de lamelipodios, distribución de adhesiones focales y migración celular, la disfunción de las Rho GTPasas a nivel mitocondrial podría conducir a una producción exacerbada de ROS, lo cual, a su vez, se relacionaría con la elevada apoptosis celular, el fotoenvejecimiento, la fotosensibilidad y el alto riesgo de desarrollar cáncer que se ha descrito en los pacientes SK (Werner and Werb 2002).

Nuestro trabajo es el primer estudio que ha reportado, en queratinocitos de pacientes SK, un desequilibrio en el estrés oxidativo y alteraciones mitocondriales (Zapatero-Solana, Garcia-Gimenez et al. 2014). Todavía no está claro, si el desequilibrio en el estado redox en células SK es la causa o la consecuencia, de la disfunción mitocondrial y sus aberraciones

morfológicas. Aunque la explicación más probable es que la mitocondria sea, tanto la causa como la consecuencia del estrés oxidativo. Por eso, nuestra hipótesis se enmarca en el contexto de la existencia de un círculo vicioso, donde las cantidades patológicas de ROS citoplasmáticas y mitocondriales (no resueltas correctamente por los mecanismos antioxidantes celulares) alteran a las mitocondrias, las cuales como consecuencia, generan más ROS, que a su vez, afectan a su propia estructura y funcionalidad (figura 48).



**Figura 49. Hipótesis de retroalimentación positiva en SK.** La disfunción de kindlina-1 provoca, además de la alteración del citoesqueleto de actina y la pérdida de adhesión a la ECM, una alteración de la correcta señalización por mecanotransducción que induce la producción de ROS citoplasmáticas y mitocondriales que derivan en alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias. Estas alteraciones conducen a una disfunción mitocondrial, lo cual provoca un aumento en la producción de ROS, que no es resuelto por los mecanismos de defensa antioxidante celulares. El aumento de ROS provoca que la mitocondria responda generando más, en un bucle positivo, que deriva en un estado pro-oxidativo patológico el cual podría explicar las funciones celulares alteradas que dan lugar a las características clínicas de SK.

## **6. Efectos de la luz UVB en SK: fotosensibilidad, fotoenvejecimiento y cáncer**

La elevada fotosensibilidad de los pacientes SK a la luz UVB está descrita como uno de los principales criterios diagnósticos de la enfermedad (tabla 1) (Sharma, Mahajan et al. 2003; Mahajan VK. 2005; White and McLean 2005). La disminución de la viabilidad celular tras la irradiación con luz UVB, tanto en queratinocitos primarios de pacientes como en la línea celular HaCaT *shFERMT1* (figuras 41 y 42), puede *a priori* estar relacionada con el incremento del estado oxidativo, así como con la alteración de los mecanismos implicados en la replicación del ADN observada en los análisis transcriptómicos (tabla 10) (aunque este efecto no sea tan marcado como en células de pacientes XP-C (figura 41), cuya elevada fotosensibilidad es bien conocida (Rezvani, Kim et al. 2011)).

Por otra parte, se ha descrito en estudios *in vitro* en queratinocitos primarios de pacientes SK, un aumento de la tasa apoptótica y la senescencia en estas células (Lanschuetzer, Muss et al. 2003; Herz, Aumailley et al. 2006; Piccinni, Di Zenzo et al. 2013). El aumento de la apoptosis, podría ser una de las posibles respuestas de los queratinocitos SK, a la acumulación de ROS y las lesiones en el ADN producidas por la luz UVB natural, impidiendo así la evolución de las mutaciones producidas por ésta y sus posteriores consecuencias en el desarrollo de tumores (Hussein 2005).

Es bien conocido que el envejecimiento de la piel está influido por factores genéticos, epigenéticos y ambientales, siendo uno de los más importantes la luz UV, que ejerce efectos mutagénicos directos sobre el ADN y desencadena una elevada generación de ROS (Heck, Vetrano et al. 2003; Gilchrest 2006; Heinemann, He et al. 2011; Qu, Wen et al. 2012; Vitale, Kisslinger et al. 2013). En células procedentes de un donante sano, las ROS generadas por luz UV son resueltas por el sistema de defensa antioxidante celular (Finkel and Holbrook 2000; Berg, Youdim et al. 2004; Wang, Wu et al. 2013), mientras que los pacientes SK presentan un estado prooxidativo, que aparece aumentado de manera patológica al mismo tiempo que los sistemas de defensa no son capaces de resolver esta situación, que se cronifica en el tiempo (Zapatero-Solana, Garcia-Gimenez et al. 2014).

El envejecimiento prematuro en SK también se relaciona con una producción exacerbada de citoquinas proinflamatorias y metaloproteasas de la ECM, desencadenantes de procesos profibróticos y senescencia (Heinemann, He et al. 2011; Qu, Wen et al. 2012). Consistentemente, en nuestros análisis transcriptómicos se observó que en los queratinocitos

SK, algunos genes implicados en rutas de señalización de linfocitos T y B y algunos receptores de citoquinas estaban sobreexpresados, mientras que algunos genes implicados en mecanismos de reparación del daño al ADN estaban reprimidos (tabla 10), lo cual podría resultar en un incremento de la fotosensibilidad, con una menor viabilidad celular y una elevada tasa de apoptosis. Por otra parte, la acumulación de mutaciones potenciada por el mal funcionamiento de estos mecanismos reparadores genéticos puede derivar en la transformación neoplásica (Goode, Ulrich et al. 2002), lo que se relacionaría con la elevada predisposición a desarrollar SCC en pacientes SK (Emanuel, Rudikoff et al. 2006; Lai-Cheong and McGrath 2010). A estas alteraciones debemos también añadir, la contribución de genes desregulados implicados en morfología, proliferación, adhesión y migración celular como coadyuvantes en el desarrollo tumoral (tabla 10). Sin duda, todas estas rutas deben ser objeto de un análisis más profundo y pormenorizado.

### **7. Modelo de ratón humanizado para Síndrome de Kindler**

La modelización de enfermedades cutáneas en un contexto humanizado, es fundamental para adquirir conocimientos básicos sobre los mecanismos implicados en la patología y permite además, llevar a cabo estudios preclínicos *in vivo* con un posible impacto en el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos. Los modelos para SK que existen en la actualidad, han sido exclusivamente desarrollados en ratón. En este sentido, los modelos disponibles no recapitulan completamente la patología tal y como se presenta en humanos (Ussar, Moser et al. 2008; Meves, Stremmel et al. 2009; Bruckner-Tuderman and Has 2013; Rognoni, Widmaier et al. 2014). El modelo de ratón humanizado descrito en esta memoria, supera las limitaciones de los modelos murinos existentes. Los análisis histológicos e inmunohistoquímicos revelaron la mayoría de rasgos fenotípicos y clínicos de la piel de los pacientes con SK (figuras 43 y 44), como son la atrofia cutánea (figura 43.A) y la presencia de ampollas a nivel microscópico (figura 44.C). Además, a nivel ultraestructural se apreció la reduplicación de la membrana basal para el colágeno IV, fenómeno exclusivo de esta genodermatosis (figura 44.B). Así, el modelo de ratón humanizado para SK reproduce las principales características histopatológicas de la enfermedad.

Nuestro sistema permite además la generación de un gran número de ratones injertados con un área significativa y homogénea de piel humana, procedente de una sola biopsia (figura 15), evitando así, los problemas derivados de la heterogeneidad y escasez de las biopsias de pacientes, más aun tratándose de una enfermedad tan infrecuente como es el SK.

Nuestro modelo humanizado para SK se presenta como una herramienta útil y de gran plasticidad, tanto para estudiar en profundidad los mecanismos fisiopatológicos implicados en el síndrome, como para llevar a cabo ensayos y estrategias terapéuticas en un contexto personalizado, posibilidad especialmente interesante en esta patología que presenta un espectro fenotípico tan amplio (Has, Castiglia et al. 2011).

Aprovechando la experiencia desarrollada en este campo por nuestro grupo (Di, Larcher et al. 2011; Chamorro, Almarza et al. 2013; Larcher and Del Rio 2015), llevamos a cabo una aproximación basada en terapia génica como prueba de concepto del uso de ésta en la corrección de la enfermedad. Al corregir la deficiencia de kindlina-1, conseguimos restablecer el patrón de expresión del Col IV (figuras 46 y 47), restaurando, el fenotipo cutáneo al menos en cuanto a las alteraciones relacionadas con la fragilidad dermo-epidérmica. Estudios en marcha permitirán determinar si las alteraciones como la fotosensibilidad y el envejecimiento prematuro, supuestamente asociadas con el estado pro-oxidativo crónico, también se revierten por la re-expresión de kindlina-1 a niveles fisiológicos.

Si bien la terapia génica se presenta como una opción terapéutica válida, nuestro modelo humanizado también puede servir para testar nuevas terapias farmacológicas, con cócteles antioxidantes capaces de rescatar a las células de su estado pro-oxidado, u otras moléculas que contrarresten la senescencia de forma eficiente y predictiva para que tales tratamientos puedan ser trasladados a la clínica. En este contexto, actualmente en nuestro laboratorio se está testando el potencial terapéutico del compuesto GSE24.2, descrito por el laboratorio de la Dra. Rosario Perona, tanto en células de pacientes SK como en el modelo humanizado de la enfermedad. Este compuesto está basado en la secuencia peptídica de la disquerina, que ha demostrado tener un efecto dual *in vitro* en la Disqueratosis congénita. Por un lado, es capaz de revertir el acortamiento telomérico (induciendo un aumento en los niveles de hTERT y hTERC) y por el otro, inhibe la acción deletérea de las ROS (Machado-Pinilla, Sanchez-Perez et al. 2008; Manguan-Garcia, Pintado-Berninches et al. 2014). Este efecto dual sería particularmente positivo en el caso de SK, ya que la enfermedad cursa con envejecimiento prematuro y estrés oxidativo. En el caso de que GSE24.2 actúe de forma preventiva reduciendo el impacto de la noxa oxidativa y la inestabilidad genómica, podría además, obstaculizar el desarrollo tumoral en los pacientes de esta enfermedad.

Aunque los resultados presentados en esta memoria han sido realizados en su mayoría *in vitro* con cultivos primarios de pacientes de SK, y aún quedan muchos eventos moleculares

por dilucidar para comprender de una manera profunda esta complicada patología, nuestros resultados bioquímicos, transcriptómicos y el desarrollo de un modelo fidedigno de la enfermedad, abren nuevas puertas a una mayor comprensión de la patología, para avanzar el conocimiento desde el fenotipo al mecanismo.



***CONCLUSIONES***



1. Los pacientes SK incluidos en este trabajo, abarcan un amplio espectro mutacional y fenotípico, recapitulando en los estudios realizados la heterogeneidad presente en esta enfermedad.
2. En los queratinocitos SK, la ausencia de kindlina-1 provoca alteraciones en la distribución del citoesqueleto de actina, y alteraciones concomitantes en la morfología celular reveladas mediante el análisis topológico de los filamentos intermedios del citoesqueleto como la queratina K5.
3. Los queratinocitos de pacientes SK presentan un estado pro-oxidativo crónico, que se manifiesta a nivel de las membranas celulares, el citoplasma y la mitocondria, y es consistente utilizando diferentes aproximaciones experimentales.
4. Las mitocondrias en los queratinocitos SK, se encuentran afectadas tanto morfológicamente, a nivel ultraestructural y en cuanto a su estructura de red, como funcionalmente.
5. Los queratinocitos SK presentan *in vitro* una elevada fotosensibilidad, medida por pérdida de viabilidad en respuesta a la luz UVB, lo cual se correlaciona con la sintomatología de los pacientes.
6. Los análisis de expresión génica global validan en su mayoría, los resultados obtenidos mediante otras aproximaciones experimentales. Además, permiten profundizar acerca de las rutas moleculares implicadas en la enfermedad, no relacionadas con la función primaria adhesiva de la kindlina-1.
7. Se ha desarrollado mediante ingeniería de tejidos, un modelo de ratón humanizado de SK que reproduce sus principales características histopatológicas: atrofia de la piel, reduplicación del colágeno IV en la membrana basal y presencia de ampollas. Este modelo representa una poderosa herramienta para una mayor comprensión de los mecanismos patogénicos de SK y para la evaluación de nuevos abordajes terapéuticos.
8. Haciendo uso del modelo de ratón humanizado de SK, se demostró la posibilidad de corrección del fenotipo histopatológico mediante terapia génica *ex vivo*.



## ***BIBLIOGRAFÍA***



- . "<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure.html>."
- . "<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>."
- . "[http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)."
- . "[https://grenada.lumc.nl/LOVD2/mendelian\\_genes/home.php?select\\_db=FERMT1](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/mendelian_genes/home.php?select_db=FERMT1)."
- Ashton, G. H. (2004). "Kindler syndrome." *Clin Exp Dermatol* **29**(2): 116-21.
- Ashton, G. H., W. H. McLean, et al. (2004). "Recurrent mutations in kindlin-1, a novel keratinocyte focal contact protein, in the autosomal recessive skin fragility and photosensitivity disorder, Kindler syndrome." *J Invest Dermatol* **122**(1): 78-83.
- Balaban, R. S., S. Nemoto, et al. (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." *Cell* **120**(4): 483-95.
- Barja, G. (2014). "The mitochondrial free radical theory of aging." *Prog Mol Biol Transl Sci* **127**: 1-27.
- Battle, A., Z. Khan, et al. (2015). "Genomic variation. Impact of regulatory variation from RNA to protein." *Science* **347**(6222): 664-7.
- Bedard K., K. K. H. (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." *Physiol Rev.* **Jan;87**(1): 245-313.
- Benjamini, Y. H., Y. (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **57** (1) 289–300.
- Berg, D., M. B. Youdim, et al. (2004). "Redox imbalance." *Cell Tissue Res* **318**(1): 201-13.
- Berhane, K., M. Widersten, et al. (1994). "Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1480-4.
- Bernerd, F., C. Marionnet, et al. (2012). "Solar ultraviolet radiation induces biological alterations in human skin in vitro: relevance of a well-balanced UVA/UVB protection." *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **78** **Suppl 1**: S15-23.
- Birch-Machin, M. A. and H. Swalwell (2010). "How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue." *Mutagenesis* **25**(2): 101-7.
- Block, G., M. Dietrich, et al. (2002). "Factors associated with oxidative stress in human populations." *Am J Epidemiol* **156**(3): 274-85.
- Boveris, A., N. Oshino, et al. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." *Biochem J* **128**(3): 617-30.
- Brenner, M. and V. J. Hearing (2008). "The protective role of melanin against UV damage in human skin." *Photochem Photobiol* **84**(3): 539-49.
- Bruckner-Tuderman, L. and C. Has (2012). "Molecular heterogeneity of blistering disorders: the paradigm of epidermolysis bullosa." *J Invest Dermatol* **132**(E1): E2-5.
- Bruckner-Tuderman, L. and C. Has (2013). "Disorders of the cutaneous basement membrane zone-The paradigm of epidermolysis bullosa." *Matrix Biol* **33C**: 29-34.
- Burch, J. M., H. Fassihi, et al. (2006). "Kindler syndrome: a new mutation and new diagnostic possibilities." *Arch Dermatol* **142**(5): 620-4.
- Cepeda-Valdes, R., G. Pohla-Gubo, et al. (2010). "[Immunofluorescence mapping for diagnosis of congenital epidermolysis bullosa]." *Actas Dermosifiliogr* **101**(8): 673-82.
- Chamorro, C., D. Almarza, et al. (2013). "Keratinocyte cell lines derived from severe generalized recessive epidermolysis bullosa patients carrying a highly recurrent COL7A1 homozygous mutation: models to assess cell and gene therapies in vitro and in vivo." *Exp Dermatol* **22**(9): 601-3.
- Chiarugi, P. (2008). "From anchorage dependent proliferation to survival: lessons from redox signalling." *IUBMB Life* **60**(5): 301-7.
- Chiarugi, P. and E. Giannoni (2005). "Anchorage-dependent cell growth: tyrosine kinases and phosphatases meet redox regulation." *Antioxid Redox Signal* **7**(5-6): 578-92.

- D'Errico, M., M. Teson, et al. (2003). "Apoptosis and efficient repair of DNA damage protect human keratinocytes against UVB." *Cell Death Differ* **10**(6): 754-6.
- Dale, B. A., K. A. Holbrook, et al. (1985). "Expression of epidermal keratins and filaggrin during human fetal skin development." *J Cell Biol* **101**(4): 1257-69.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N. (2005). "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress." *Nutr Metab Cardiovasc Dis. Aug;15*(4): 316-28.
- Del Rio, M., F. Larcher, et al. (2002). "A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo." *Hum Gene Ther* **13**(8): 959-68.
- Di Mascio, P., M. E. Murphy, et al. (1991). "Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols." *Am J Clin Nutr* **53**(1 Suppl): 194S-200S.
- Di, W. L., F. Larcher, et al. (2011). "Ex-vivo gene therapy restores LEKTI activity and corrects the architecture of Netherton syndrome-derived skin grafts." *Mol Ther* **19**(2): 408-16.
- Dinkova-Kostova, A. T. and P. Talalay (2010). "NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector." *Arch Biochem Biophys* **501**(1): 116-23.
- Emanuel, P. O., D. Rudikoff, et al. (2006). "Aggressive squamous cell carcinoma in Kindler syndrome." *Skinmed* **5**(6): 305-7.
- Fawcett, D. W., Jensch, R.P. (1999). *Compendio de histología*, McGraw-Hill Interamericana.
- Fedets, O. M. (2014). "[Structure and functions of glutathione transferases]." *Ukr Biokhim Zh* **86**(3): 23-32.
- Fiaschi, T., G. Cozzi, et al. (2006). "Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion." *J Biol Chem* **281**(32): 22983-91.
- Fine, J. D. (2010). "Inherited epidermolysis bullosa: past, present, and future." *Ann N Y Acad Sci* **1194**: 213-22.
- Fine, J. D., R. A. Eady, et al. (2008). "The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB." *J Am Acad Dermatol* **58**(6): 931-50.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." *Nature* **408**(6809): 239-47.
- Fischer, I. A., J. Kazandjieva, et al. (2005). "Kindler syndrome: a case report and proposal for clinical diagnostic criteria." *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* **14**(2): 61-7.
- Frei, B., Ed. (1994). *Natural antioxidants in human health and disease*  
San Diego, California
- Fuchs-Telem, D., J. Noursbeck, et al. (2014). "New intragenic and promoter region deletion mutations in FERMT1 underscore genetic homogeneity in Kindler syndrome." *Clin Exp Dermatol* **39**(3): 361-7.
- Fuchs, E. and H. Green (1980). "Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte." *Cell* **19**(4): 1033-42.
- Galloway, C. A. and Y. Yoon (2012). "Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: what comes first, misshape or dysfunction? The view from metabolic excess." *J Gen Physiol* **139**(6): 455-63.
- Garcia, M., M. J. Escamez, et al. (2007). "Modeling normal and pathological processes through skin tissue engineering." *Mol Carcinog* **46**(8): 741-5.
- Garcia, M., S. Llamas, et al. (2010). "In vivo assessment of acute UVB responses in normal and Xeroderma Pigmentosum (XP-C) skin-humanized mouse models." *Am J Pathol* **177**(2): 865-72.
- Gawkrodger, D. J. (2002). *Dermatology: an illustrated colour text*. Edinburgh Churchill Livingstone 2002
- Gilchrest, B. A., Krutmann, J. (2006). *Skin Aging*. Berlin, Heidelberg, Springer
- Goode, E. L., C. M. Ulrich, et al. (2002). "Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(12): 1513-30.



- Guerrero-Aspizua, S., Conti, C.J., Zapatero-Solana, E., Larcher, F., Del Río, M. (2015). Translating Regenerative Medicine to the Clinic. Translational Medicine Series. J. Laurence, Academic Press Inc. II.
- Gutscher, M., A. L. Pauleau, et al. (2008). "Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential." Nat Methods **5**(6): 553-9.
- Hanson, G. T., R. Aggeler, et al. (2004). "Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators." J Biol Chem **279**(13): 13044-53.
- Harman, D. (1992). "Role of free radicals in aging and disease." Ann N Y Acad Sci **673**: 126-41.
- Has, C. and L. Bruckner-Tuderman (2013). "The Genetics of Skin Fragility." Annu Rev Genomics Hum Genet.
- Has, C. and L. Bruckner-Tuderman (2014). "The genetics of skin fragility." Annu Rev Genomics Hum Genet **15**: 245-68.
- Has, C., B. Burger, et al. (2010). "Mild clinical phenotype of Kindler syndrome associated with late diagnosis and skin cancer." Dermatology **221**(4): 309-12.
- Has, C., D. Castiglia, et al. (2011). "Kindler syndrome: extension of FERMT1 mutational spectrum and natural history." Hum Mutat **32**(11): 1204-12.
- Has, C., N. Chmel, et al. (2014). "FERMT1 promoter mutations in patients with Kindler syndrome." Clin Genet.
- Has, C., C. Herz, et al. (2009). "Kindlin-1 Is required for RhoGTPase-mediated lamellipodia formation in keratinocytes." Am J Pathol **175**(4): 1442-52.
- Has, C., R. J. Ludwig, et al. (2008). "C-terminally truncated kindlin-1 leads to abnormal adhesion and migration of keratinocytes." Br J Dermatol **159**(5): 1192-6.
- Has, C., V. Wessagowit, et al. (2006). "Molecular basis of Kindler syndrome in Italy: novel and recurrent Alu/Alu recombination, splice site, nonsense, and frameshift mutations in the KIND1 gene." J Invest Dermatol **126**(8): 1776-83.
- Hashmi, S. and M. P. Marinkovich (2011). "Molecular organization of the basement membrane zone." Clin Dermatol **29**(4): 398-411.
- He, Y., P. Esser, et al. (2011). "Kindlin-1 and -2 have overlapping functions in epithelial cells implications for phenotype modification." Am J Pathol **178**(3): 975-82.
- He, Y., T. Sonnenwald, et al. (2014). "RhoA activation by CNFy restores cell-cell adhesion in kindlin-2 deficient keratinocytes." J Pathol.
- Heck, D. E., A. M. Vetrano, et al. (2003). "UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase." J Biol Chem **278**(25): 22432-6.
- Heinemann, A., Y. He, et al. (2011). "Induction of phenotype modifying cytokines by FERMT1 mutations." Hum Mutat **32**(4): 397-406.
- Herz, C., M. Aumailley, et al. (2006). "Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes." J Biol Chem **281**(47): 36082-90.
- Hiremagalore, R., A. Kubba, et al. (2014). "Immunofluorescence mapping (IFM) in inherited epidermolysis bullosa - A study of eighty-six cases from India." Br J Dermatol.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-74.
- Hoffschir, F., L. Daya-Grosjean, et al. (1998). "Low catalase activity in xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cell lines is directly related to decreased intracellular levels of the cofactor, NADPH." Free Radic Biol Med **24**(5): 809-16.
- Hussein, M. R. (2005). "Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms." J Cutan Pathol **32**(3): 191-205.
- Intong, L. R. and D. F. Murrell (2012). "Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostic criteria and classification." Clin Dermatol **30**(1): 70-7.
- Jacob, K. D., N. Noren Hooten, et al. (2013). "Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease." Mech Ageing Dev **134**(3-4): 139-57.

- Jarvikallio, A., L. Pulkkinen, et al. (1997). "Molecular basis of dystrophic epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen gene (COL7A1)." *Hum Mutat* **10**(5): 338-47.
- Jobard, F., B. Bouadjar, et al. (2003). "Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome." *Hum Mol Genet* **12**(8): 925-35.
- Junqueira (2005). *Histología Básica*. Barcelona, Masson.
- Kalinin, A. E., A. V. Kajava, et al. (2002). "Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope." *Bioessays* **24**(9): 789-800.
- Kapoor, S. (2014). "Kindler syndrome: a close mimic of dyskeratosis congenita and the need to distinguish the two clinical entities." *Oman Med J* **29**(2): 147.
- Kaviarasan, P. K., P. V. Prasad, et al. (2005). "Kindler syndrome." *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **71**(5): 348-50.
- Keene, D. R., M. P. Marinkovich, et al. (1997). "Immunodissection of the connective tissue matrix in human skin." *Microsc Res Tech* **38**(4): 394-406.
- Kim, D. Y., S. J. Won, et al. (2002). "Analysis of mitochondrial free radical generation in animal models of neuronal disease." *Free Radic Biol Med* **33**(5): 715-23.
- Kim, Y. J. and D. M. Wilson, 3rd (2012). "Overview of base excision repair biochemistry." *Curr Mol Pharmacol* **5**(1): 3-13.
- Kimber, I., M. Cumberbatch, et al. (2000). "Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization." *Br J Dermatol* **142**(3): 401-12.
- Kloeker, S., M. B. Major, et al. (2004). "The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion." *J Biol Chem* **279**(8): 6824-33.
- Kohen, R. and A. Nyska (2002). "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." *Toxicol Pathol* **30**(6): 620-50.
- Kolesnikov, N. e. a. (2015). "ArrayExpress update-simplifying data submissions." *Nucleic Acids Res.*
- Krejsa, C. M., C. C. Franklin, et al. (2010). "Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress." *J Biol Chem* **285**(21): 16116-24.
- Kumar, H., H. W. Lim, et al. (2012). "The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism." *Int J Mol Sci* **13**(8): 10478-504.
- Kuper, J. and C. Kisker (2013). "DNA Helicases in NER, BER, and MMR." *Adv Exp Med Biol* **767**: 203-24.
- Lai-Cheong, J. E., L. Liu, et al. (2007). "Five new homozygous mutations in the KIND1 gene in Kindler syndrome." *J Invest Dermatol* **127**(9): 2268-70.
- Lai-Cheong, J. E. and J. A. McGrath (2010). "Kindler syndrome." *Dermatol Clin* **28**(1): 119-24.
- Lai-Cheong, J. E. and J. A. McGrath (2011). "What is Kindler syndrome?" *Skinmed* **9**(3): 145-6.
- Lai-Cheong, J. E., M. Parsons, et al. (2010). "The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(5): 595-603.
- Lai-Cheong, J. E., M. Parsons, et al. (2009). "Loss-of-function FERMT1 mutations in kindler syndrome implicate a role for fermitin family homolog-1 in integrin activation." *Am J Pathol* **175**(4): 1431-41.
- Lai-Cheong, J. E., A. Tanaka, et al. (2009). "Kindler syndrome: a focal adhesion genodermatosis." *Br J Dermatol* **160**(2): 233-42.
- Lai-Cheong, J. E., S. Ussar, et al. (2008). "Colocalization of kindlin-1, kindlin-2, and migfilin at keratinocyte focal adhesion and relevance to the pathophysiology of Kindler syndrome." *J Invest Dermatol* **128**(9): 2156-65.
- Lamore, S. D., Azimian, S., Horn, D., Anglin, B.L., Uchida, K., Cabello, C.M., Wondrak, G.T. (2010). "The malondialdehyde-derived fluorophore DHP-lysine is a potent sensitizer of UVA-induced photooxidative stress in human skin cells." *J Photochem Photobiol B*. **Dec 2;101**(3): 251-64.

- Lanschuetzer, C. M., W. H. Muss, et al. (2003). "Characteristic immunohistochemical and ultrastructural findings indicate that Kindler's syndrome is an apoptotic skin disorder." *J Cutan Pathol* **30**(9): 553-60.
- Larcher, F. and M. Del Rio (2015). "Innovative therapeutic strategies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa." *Actas Dermosifiliogr* **106**(5): 376-82.
- Larcher, F., M. Del Rio, et al. (2001). "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts." *FASEB J* **15**(9): 1529-38.
- Larjava, H., E. F. Plow, et al. (2008). "Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion." *EMBO Rep* **9**(12): 1203-8.
- Law, D. J., D. L. Allen, et al. (1994). "Talin, vinculin and DRP (utrophin) concentrations are increased at mdx myotendinous junctions following onset of necrosis." *J Cell Sci* **107** (Pt 6): 1477-83.
- Leblond, C. P. and S. Inoue (1989). "Structure, composition, and assembly of basement membrane." *Am J Anat* **185**(4): 367-90.
- Li, G. M. (2008). "Mechanisms and functions of DNA mismatch repair." *Cell Res* **18**(1): 85-98.
- Lillie, R. D., P. Pizzolato, et al. (1976). "Nuclear stains with soluble metachrome metal mordant dye lakes. The effect of chemical endgroup blocking reactions and the artificial introduction of acid groups into tissues." *Histochemistry* **49**(1): 23-35.
- Lobo, V., A. Patil, et al. (2010). "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health." *Pharmacogn Rev* **4**(8): 118-26.
- Lotem, M., M. Raben, et al. (2001). "Kindler syndrome complicated by squamous cell carcinoma of the hard palate: successful treatment with high-dose radiation therapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Br J Dermatol* **144**(6): 1284-6.
- Llames, S. G., M. Del Rio, et al. (2004). "Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin." *Transplantation* **77**(3): 350-5.
- Machado-Pinilla, R., I. Sanchez-Perez, et al. (2008). "A dyskerin motif reactivates telomerase activity in X-linked dyskeratosis congenita and in telomerase-deficient human cells." *Blood* **111**(5): 2606-14.
- Mahajan VK., S. N. a. S. R. (2005). "Kindler syndrome." *Orphanet Encyclopedia*.
- Makrantonaki, E., Schönknecht, P., Hossini, A.M., Kaiser, E., Katsouli, M.M., Adjaye, J., Schröder, J., Zouboulis, C.C. (2010). "Skin and brain age together: The role of hormones in the ageing process." *Exp Gerontol.* **Oct;45(10)**: 801-13.
- Manguan-Garcia, C., L. Pintado-Berninches, et al. (2014). "Expression of the genetic suppressor element 24.2 (GSE24.2) decreases DNA damage and oxidative stress in X-linked dyskeratosis congenita cells." *PLoS One* **9**(7): e101424.
- Margadant, C., M. Kreft, et al. (2013). "Kindlin-1 regulates integrin dynamics and adhesion turnover." *PLoS One* **8**(6): e65341.
- Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde." *Mutat Res* **424**(1-2): 83-95.
- Masunaga, T. (2006). "Epidermal basement membrane: its molecular organization and blistering disorders." *Connect Tissue Res* **47**(2): 55-66.
- Meana, A., J. Iglesias, et al. (1998). "Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels." *Burns* **24**(7): 621-30.
- Medina, I., J. Carbonell, et al. (2010). "Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling." *Nucleic Acids Res* **38**(Web Server issue): W210-3.
- Mehrel, T., D. Hohl, et al. (1990). "Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin." *Cell* **61**(6): 1103-12.
- Mendes, L., L. Nogueira, et al. (2012). "Kindler syndrome: report of two cases." *An Bras Dermatol* **87**(5): 779-81.

- Meves, A., C. Stremmel, et al. (2009). "The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins." *Trends Cell Biol* **19**(10): 504-13.
- Michiels, C., M. Raes, et al. (1994). "Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **17**(3): 235-48.
- Mizutani, H., K. Masuda, et al. (2012). "Cutaneous and laryngeal squamous cell carcinoma in mixed epidermolysis bullosa, kindler syndrome." *Case Rep Dermatol* **4**(2): 133-8.
- Montagna, W., Parakkal, P.F. (1974). *The Structure and Function of Skin*. New York.
- Moreira, P. I., X. Zhu, et al. (2006). "Compensatory responses induced by oxidative stress in Alzheimer disease." *Biol Res* **39**(1): 7-13.
- Mulero Abellán, M. (2004). EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (RUV) SOBRE LOS PROCESOS DE ESTRÉS OXIDATIVO E INMUNODEPRESIÓN CUTÁNEA. EFECTO PROTECTOR DE LOS FILTROS SOLARES. Reus, FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD "ROVIRA I VIRGILI".
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* **417**(1): 1-13.
- Novakova, E., L. Vysin, et al. (2015). "Breaking DNA strands by extreme-ultraviolet laser pulses in vacuum." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **91**(4): 042718.
- Ogawa, H. (1996). "The Merkel cell as a possible mechanoreceptor cell." *Prog Neurobiol* **49**(4): 317-34.
- Otto, A. I., L. Riou, et al. (1999). "Differential behaviors toward ultraviolet A and B radiation of fibroblasts and keratinocytes from normal and DNA-repair-deficient patients." *Cancer Res* **59**(6): 1212-8.
- Pandel, R., B. Poljsak, et al. (2013). "Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention." *ISRN Dermatol* **2013**: 930164.
- Peak, M. J., J. G. Peak, et al. (1987). "Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms." *Photochem Photobiol* **45**(3): 381-7.
- Pham-Huy, L. A., H. He, et al. (2008). "Free radicals, antioxidants in disease and health." *Int J Biomed Sci* **4**(2): 89-96.
- Piccinni, E., G. Di Zenzo, et al. (2013). "Induction of senescence pathways in Kindler syndrome primary keratinocytes." *Br J Dermatol* **168**(5): 1019-26.
- Poswig, A., Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Hommel, C., Quel, G., Faisst, K., Dissemond, J., Briviba, K., Krieg, T., Scharffetter-Kochanek, K. (1999). "Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation." *J Invest Dermatol*. **Jan**; **112**(1).
- Qu, H., T. Wen, et al. (2012). "Partial loss of epithelial phenotype in kindlin-1-deficient keratinocytes." *Am J Pathol* **180**(4): 1581-92.
- Radtke, F. and K. Raj (2003). "The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?" *Nat Rev Cancer* **3**(10): 756-67.
- Ray, G. and S. A. Husain (2002). "Oxidants, antioxidants and carcinogenesis." *Indian J Exp Biol* **40**(11): 1213-32.
- Reagan-Shaw, S., J. Breur, et al. (2006). "Enhancement of UVB radiation-mediated apoptosis by sanguinarine in HaCaT human immortalized keratinocytes." *Mol Cancer Ther* **5**(2): 418-29.
- Rezvani, H. R., A. L. Kim, et al. (2011). "XPC silencing in normal human keratinocytes triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas." *J Clin Invest* **121**(1): 195-211.
- Rice, R. H. and H. Green (1979). "Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions." *Cell* **18**(3): 681-94.

- Richardson, R. B. (2009). "Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea." *Aging (Albany NY)* **1**(11): 887-902.
- Rognoni, E., M. Widmaier, et al. (2014). "Kindlin-1 controls Wnt and TGF-beta availability to regulate cutaneous stem cell proliferation." *Nat Med.*
- Roop, D. R., P. Hawley-Nelson, et al. (1983). "Keratin gene expression in mouse epidermis and cultured epidermal cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(3): 716-20.
- Sander, C. S., H. Chang, et al. (2002). "Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo." *J Invest Dermatol* **118**(4): 618-25.
- Segre, J. A. (2006). "Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders." *J Clin Invest* **116**(5): 1150-8.
- Seneschal, J., R. A. Clark, et al. (2012). "Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells." *Immunity* **36**(5): 873-84.
- Sharma, R. C., V. Mahajan, et al. (2003). "Kindler syndrome." *Int J Dermatol* **42**(9): 727-32.
- Siegel, D. H., G. H. Ashton, et al. (2003). "Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome." *Am J Hum Genet* **73**(1): 174-87.
- Slupphaug, G., B. Kavli, et al. (2003). "The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage." *Mutat Res* **531**(1-2): 231-51.
- Spasov, A., T. Gredes, et al. (2012). "Talin, vinculin and nestin expression in orofacial muscles of dystrophin deficient mdx mice." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **60**(2): 137-43.
- Tenchini, M. L., C. Ranzati, et al. (1992). "Culture techniques for human keratinocytes." *Burns* **18 Suppl 1**: S11-6.
- Trimmer, P. A., R. H. Swerdlow, et al. (2000). "Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines." *Exp Neurol* **162**(1): 37-50.
- Trouba, K. J., H. K. Hamadeh, et al. (2002). "Oxidative stress and its role in skin disease." *Antioxid Redox Signal* **4**(4): 665-73.
- Uchida, K. (2006). "Lipofuscin-like fluorophores originated from malondialdehyde." *Free Radic Res* **40**(12): 1335-8.
- Ussar, S., M. Moser, et al. (2008). "Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction." *PLoS Genet* **4**(12): e1000289.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(1): 44-84.
- Velarde, M. C., M. Demaria, et al. (2015). "Pleiotropic age-dependent effects of mitochondrial dysfunction on epidermal stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(33): 10407-12.
- Visser, M., R. J. Palstra, et al. (2014). "Human skin color is influenced by an intergenic DNA polymorphism regulating transcription of the nearby BNC2 pigmentation gene." *Hum Mol Genet.*
- Vitale, N., A. Kisslinger, et al. (2013). "Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells." *PLoS One* **8**(11): e80728.
- Wang, C. H., S. B. Wu, et al. (2013). "Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging." *Exp Biol Med (Maywood)* **238**(5): 450-60.
- Wang, S. Q., Y. Balagula, et al. (2010). "Photoprotection: a review of the current and future technologies." *Dermatol Ther* **23**(1): 31-47.
- Watt, F. M. (1989). "Terminal differentiation of epidermal keratinocytes." *Curr Opin Cell Biol* **1**(6): 1107-15.
- Werner, E. and Z. Werb (2002). "Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases." *J Cell Biol* **158**(2): 357-68.
- White, S. J. and W. H. McLean (2005). "Kindler surprise: mutations in a novel actin-associated protein cause Kindler syndrome." *J Dermatol Sci* **38**(3): 169-75.

- Wu, G., Y. Z. Fang, et al. (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." J Nutr **134**(3): 489-92.
- Yan, S. X., X. Y. Hong, et al. (2005). "Tempol, one of nitroxides, is a novel ultraviolet-A1 radiation protector for human dermal fibroblasts." J Dermatol Sci **37**(3): 137-43.
- Young, I. S. and J. V. Woodside (2001). "Antioxidants in health and disease." J Clin Pathol **54**(3): 176-86.
- Zapatero-Solana, E., J. Garcia-Gimenez, et al. (2014). "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Kindler syndrome." Orphanet J Rare Dis **9**(1): 211.

## ***ANEXOS***

- PUBLICACIÓN desarrollada durante el periodo predoctoral.
- INFORME del Comité Ético de Investigación Clínica.
- Rutas metabólicas alteradas en los análisis transcriptómicos (Advanced Pathway Painter v2.29).





**INFORME DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACION CLINICA**


**TITULO DEL PROYECTO:** “Bases moleculares, genéticas y fisiopatológicas de enfermedades cutáneas: desarrollo de modelos experimentales humanizados y de procedimientos terapéuticos innovadores”

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Dra. Carmen Ayuso García

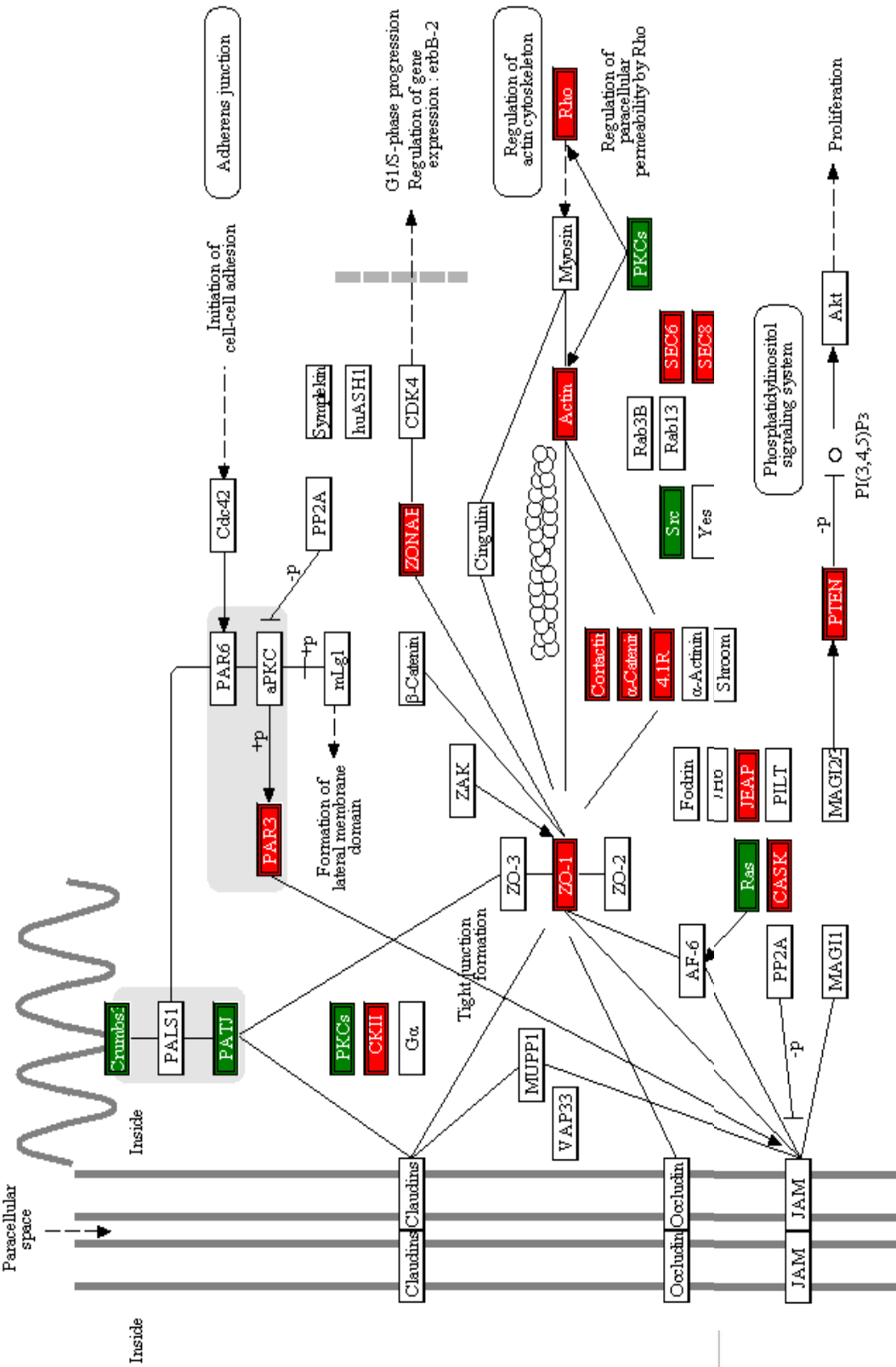
Este protocolo de Ensayo Clínico ha sido recibido, para su estudio y valoración en el Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundación Jiménez Díaz-UTE, el cual apoya su solicitud.

Consideramos que el Estudio reúne las normas éticas estándar de nuestra Institución para experimentación en el hombre, y que éstas a su vez coinciden con las de la Declaración de Helsinki de 1964 y posteriores revisiones de Tokio (1975), Venecia (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996), Edimburgo (2000) y la última edición de Seúl (2008).

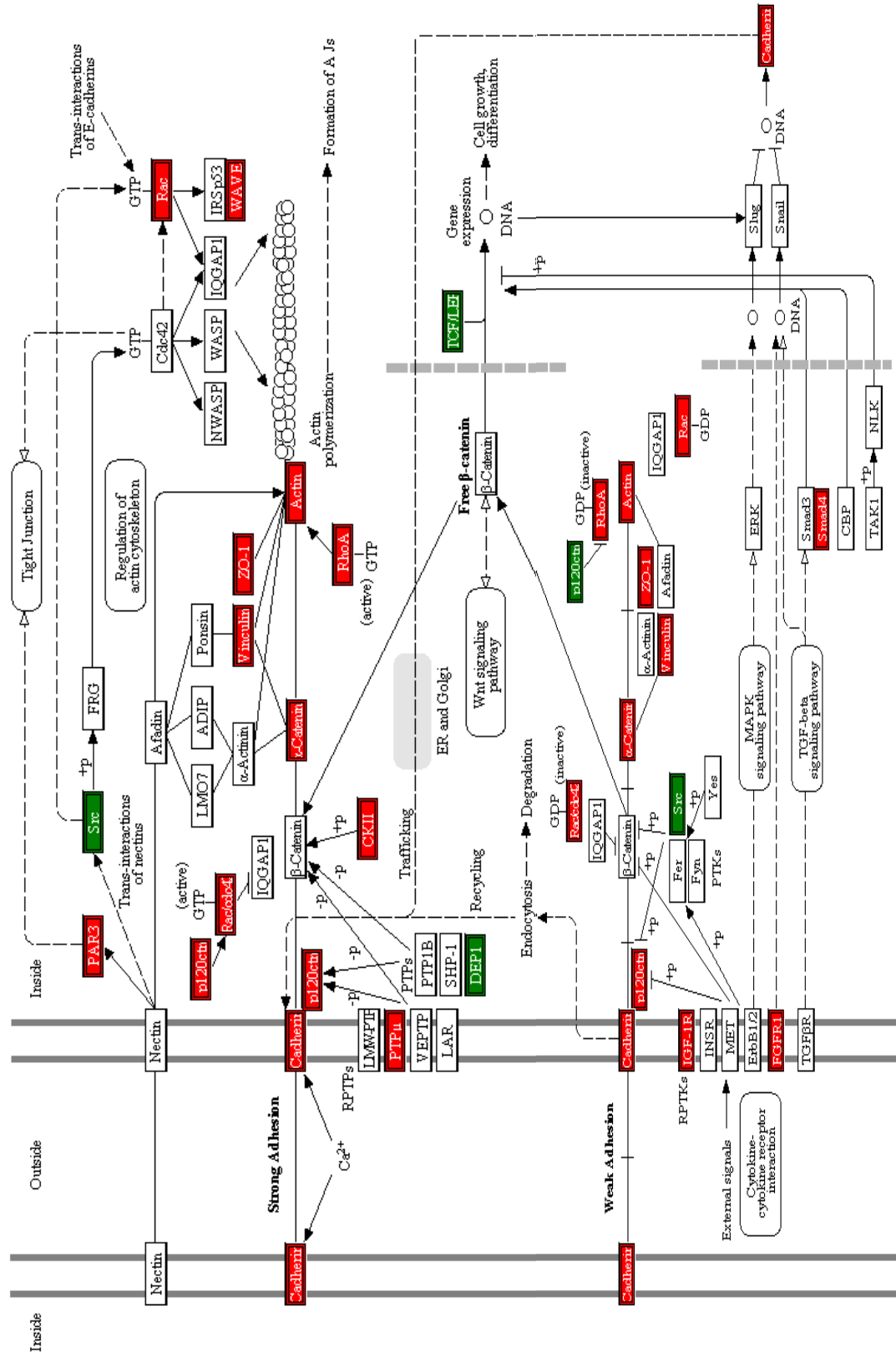
Madrid, 1 de febrero de 2010

  
Dr. Javier Bécares Martínez  
Secretario del CEIC-FJD

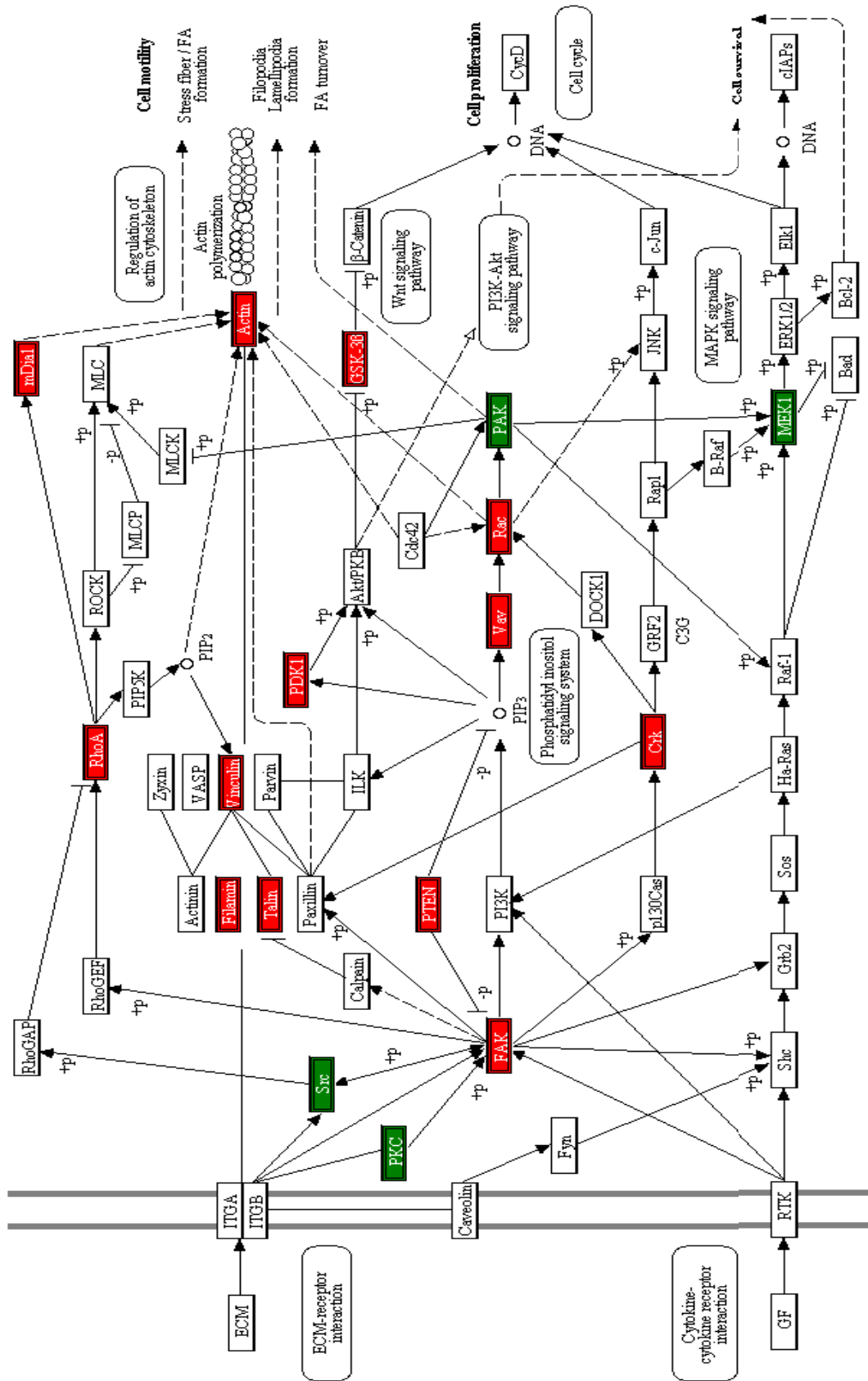
# UNIONES OCLUSIVAS



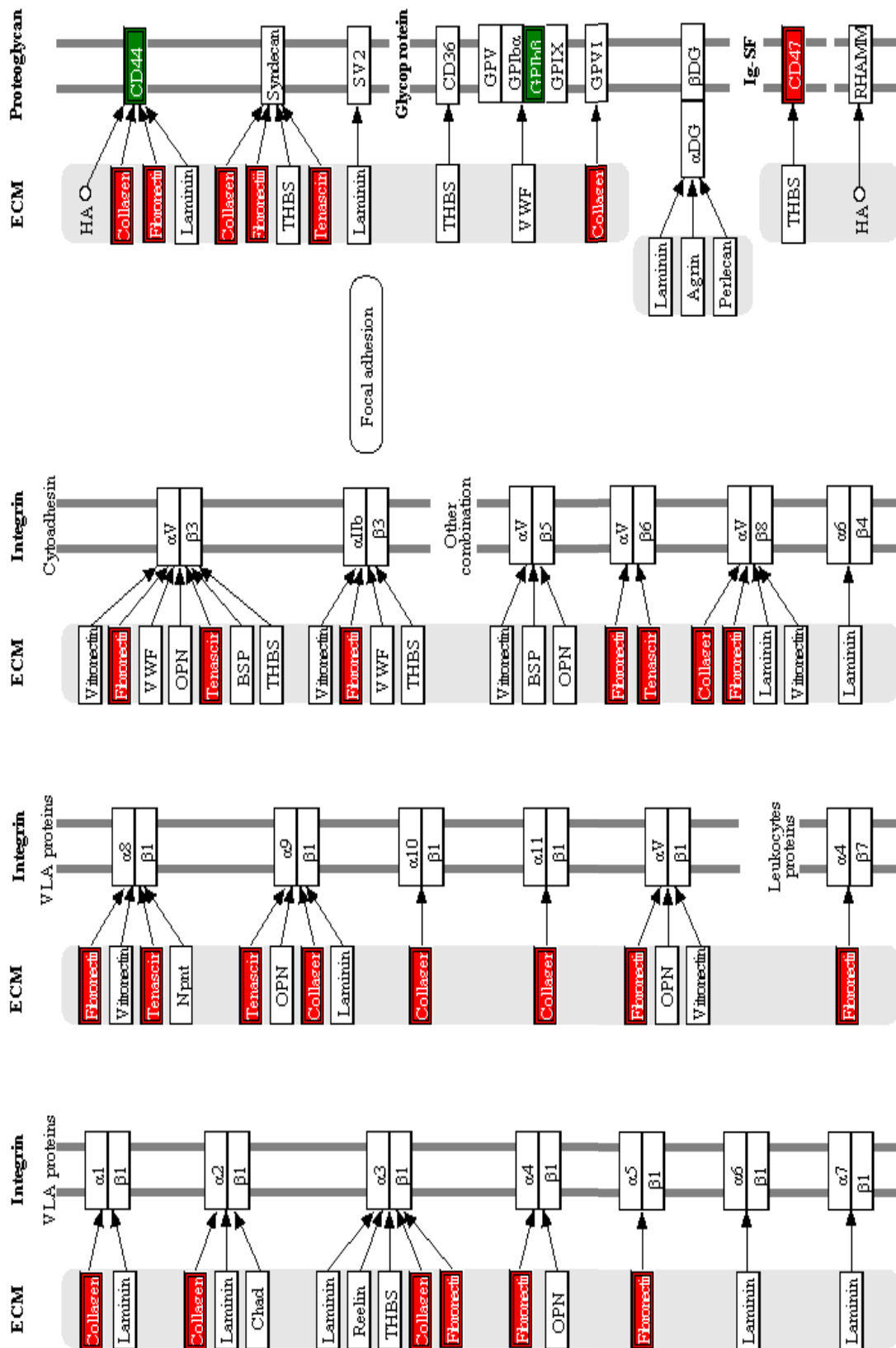
UNIONES ADHERENTES



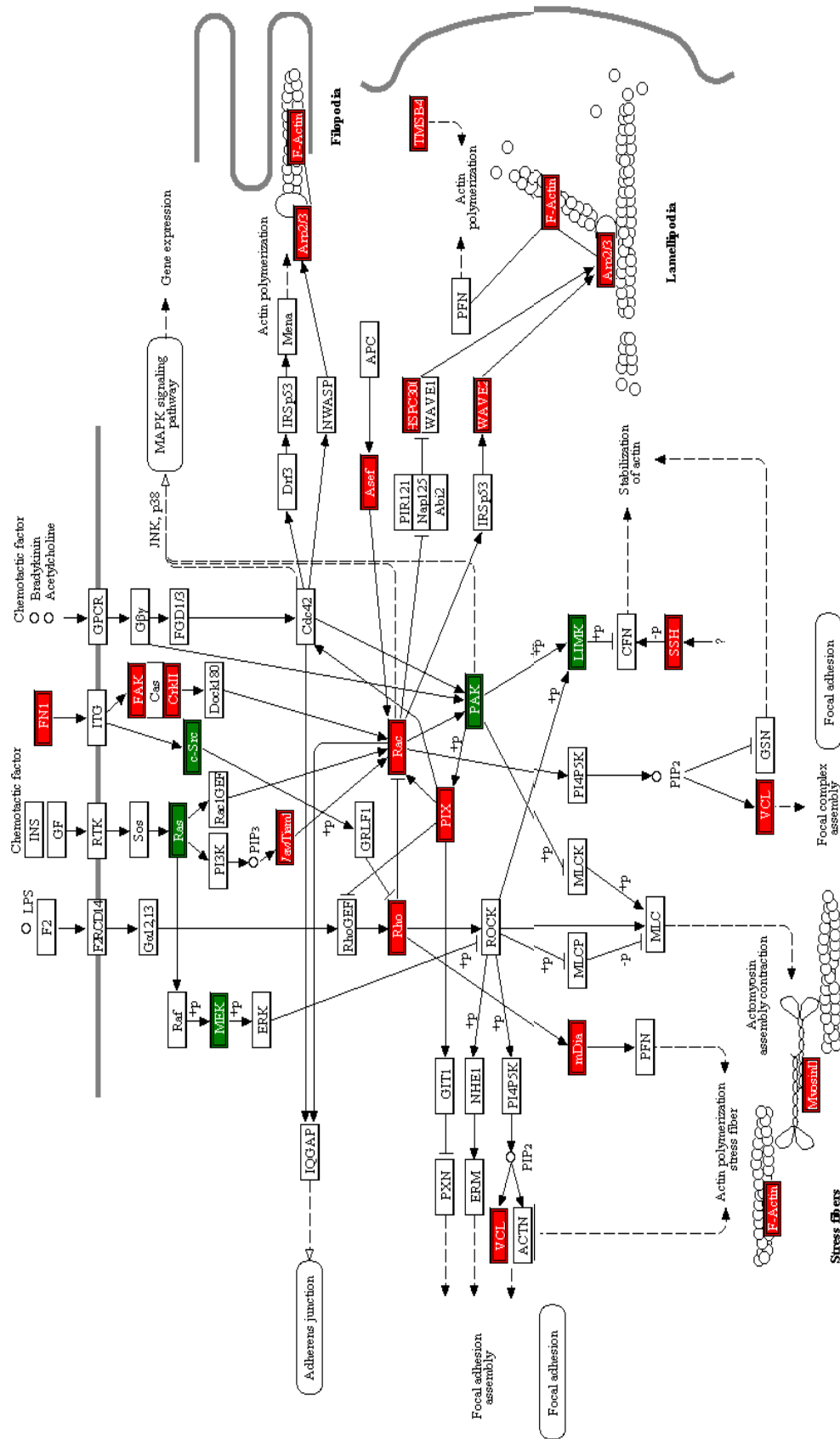
## ADHESIONES FOCALES



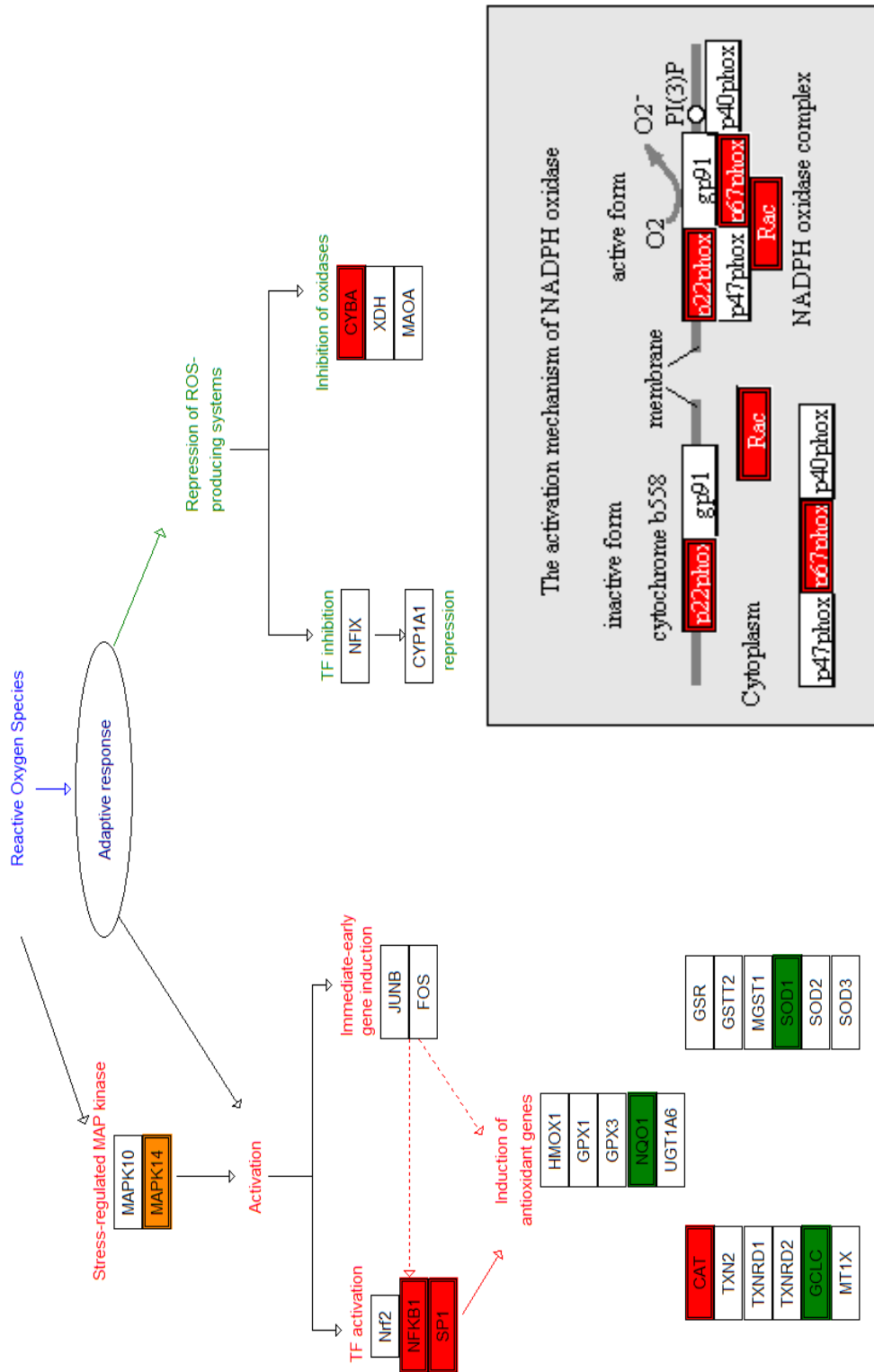
## INTERACCIÓN ECM CON RECEPTORES DE MEMBRANA



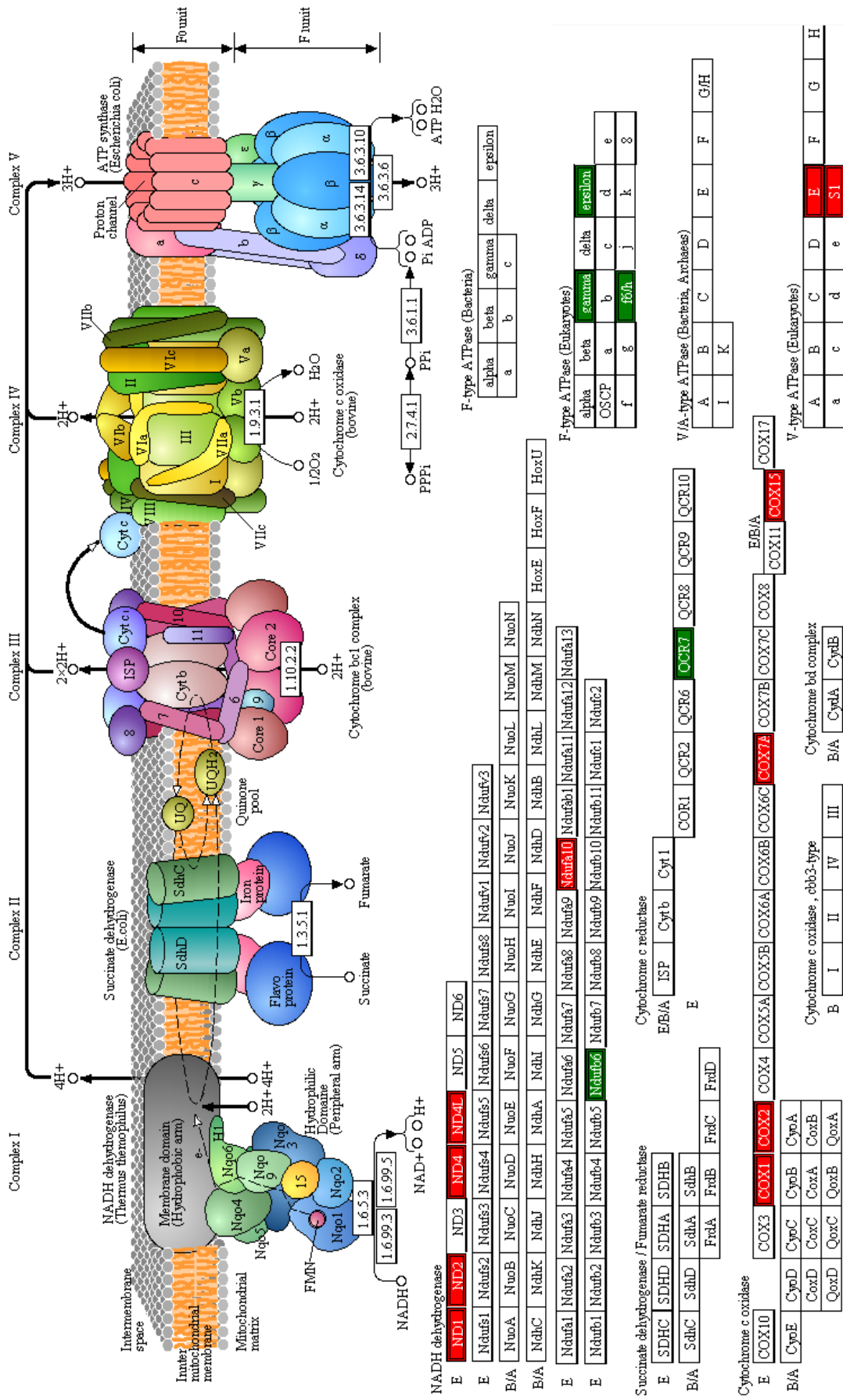
# REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA



# ESTRÉS OXIDATIVO



# FOSFORILACIÓN OXIDATIVA



### NADH dehydrogenase

E	<b>ND1</b>	<b>ND2</b>	ND3	ND4	<b>ND4L</b>	ND5	ND6
E	Ndufs1	Ndufs2	Ndufs3	Ndufs4	Ndufs5	Ndufs6	Ndufs7
B/A	NuoA	NuoB	NuoC	NuoD	NuoE	NuoF	NuoG
B/A	NdhC	NdhK	NdhJ	NdhH	NdhA	NdhI	NdhG
E	Ndufa1	Ndufa2	Ndufa3	Ndufa4	Ndufa5	Ndufa6	Ndufa7
E	Ndufb1	Ndufb2	Ndufb3	Ndufb4	Ndufb5	<b>Ndufb6</b>	Ndufb7

### Succinate dehydrogenase / Fumarate reductase

E	SDHC	SDHD	SDHA	SDHB
B/A	SdhC	SdhD	SdhA	SdhB
	FrdA	FrdB	FrdC	FrdD

### Cytochrome c oxidase

E	<b>COX10</b>	<b>COX3</b>	<b>COX1</b>	<b>COX2</b>	COX4	COX3A	COX3B	COX6A	COX6B	COX6C	<b>COX7A</b>	COX7B	COX7C	COX8
B/A	CyoE	CyoD	CyoC	CyoB	CyoA	CoxD	CoxC	CoxA	CoxB	QoxD	QoxC	QoxB	QoxA	

### Cytochrome bcl complex

	ISP	Cyt c	10	11	Core 2	Core 1	9	6	1.10.2.2
	Cytc	Cytc	10	11	Core 2	Core 1	9	6	1.10.2.2
	Cytc	Cytc	10	11	Core 2	Core 1	9	6	1.10.2.2

### Cytochrome c oxidase, cbb3-type

B	I	II	IV	III
	CytA	CytB	CytC	CytD

### Cytochrome c oxidase, cbb3-type

E/B/A	ISP	Cyt b	Cyt 1
E	COR1	QCR2	QCR6
	QCR8	QCR9	QCR10

### F-type ATPase (Bacteria)

	alpha	beta	gamma	delta	epsilon
	a	b	c	d	e

### F-type ATPase (Eukaryotes)

	alpha	beta	gamma	delta	epsilon
	OSCF	a	b	c	d
	f	g	h/i	j	k
					l

### V/A-type ATPase (Bacteria, Archaeas)

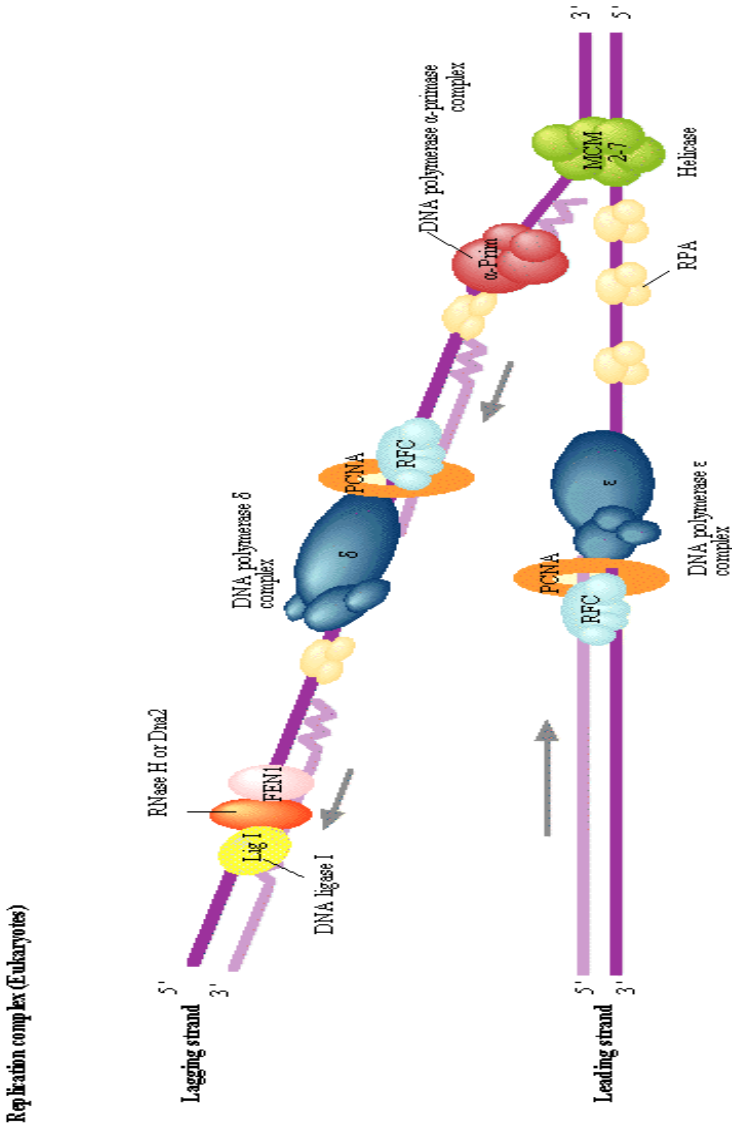
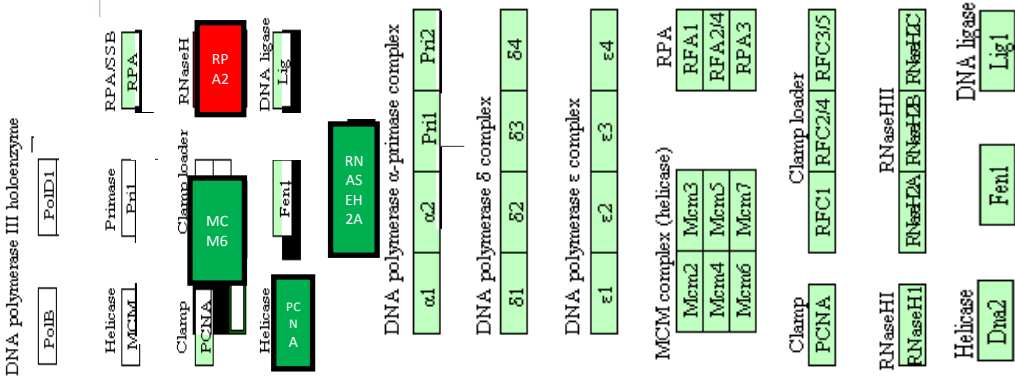
A	B	C	D	E	F	G/H
I	K					

### V-type ATPase (Eukaryotes)

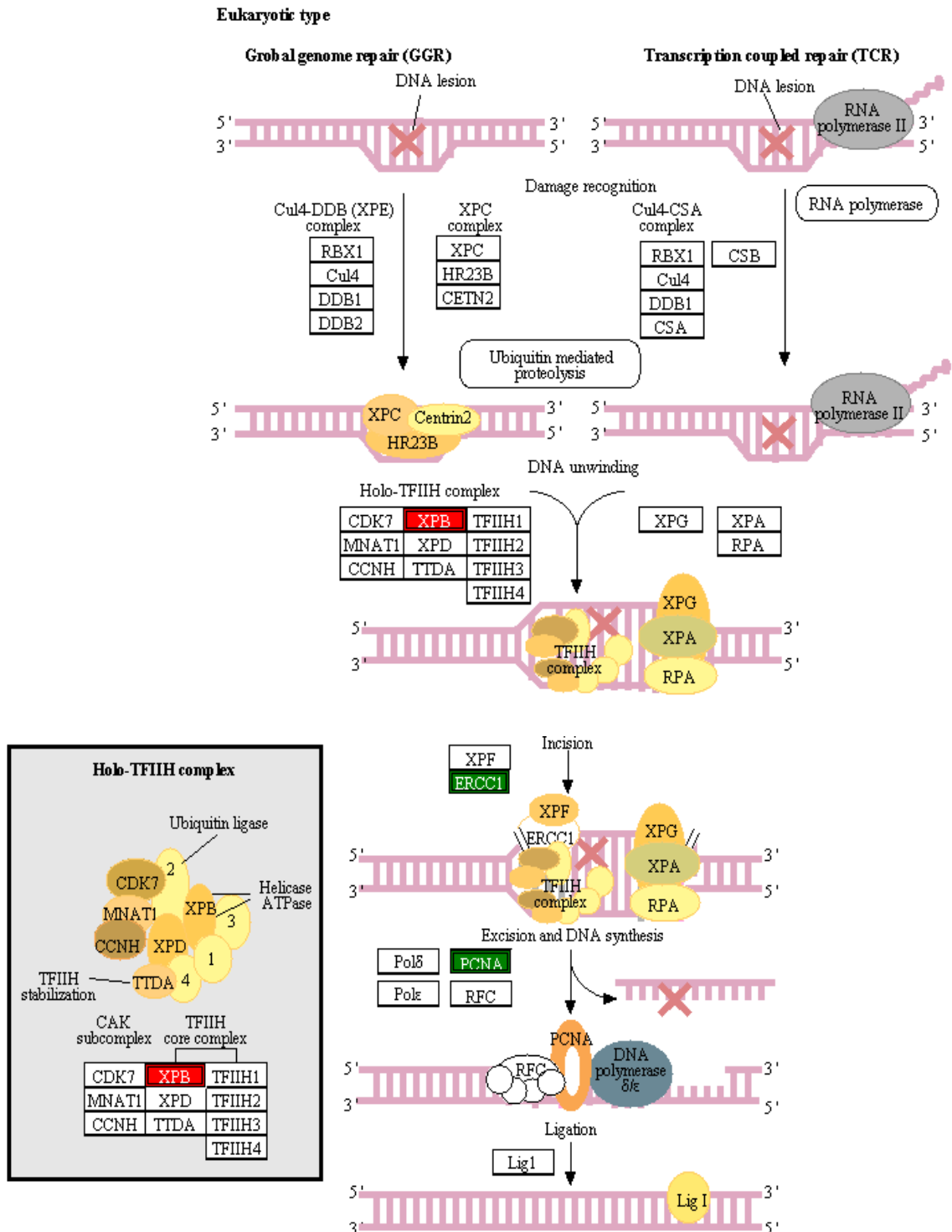
	A	B	C	D	E	F	G	H
	a	b	c	d	e	f	g	h



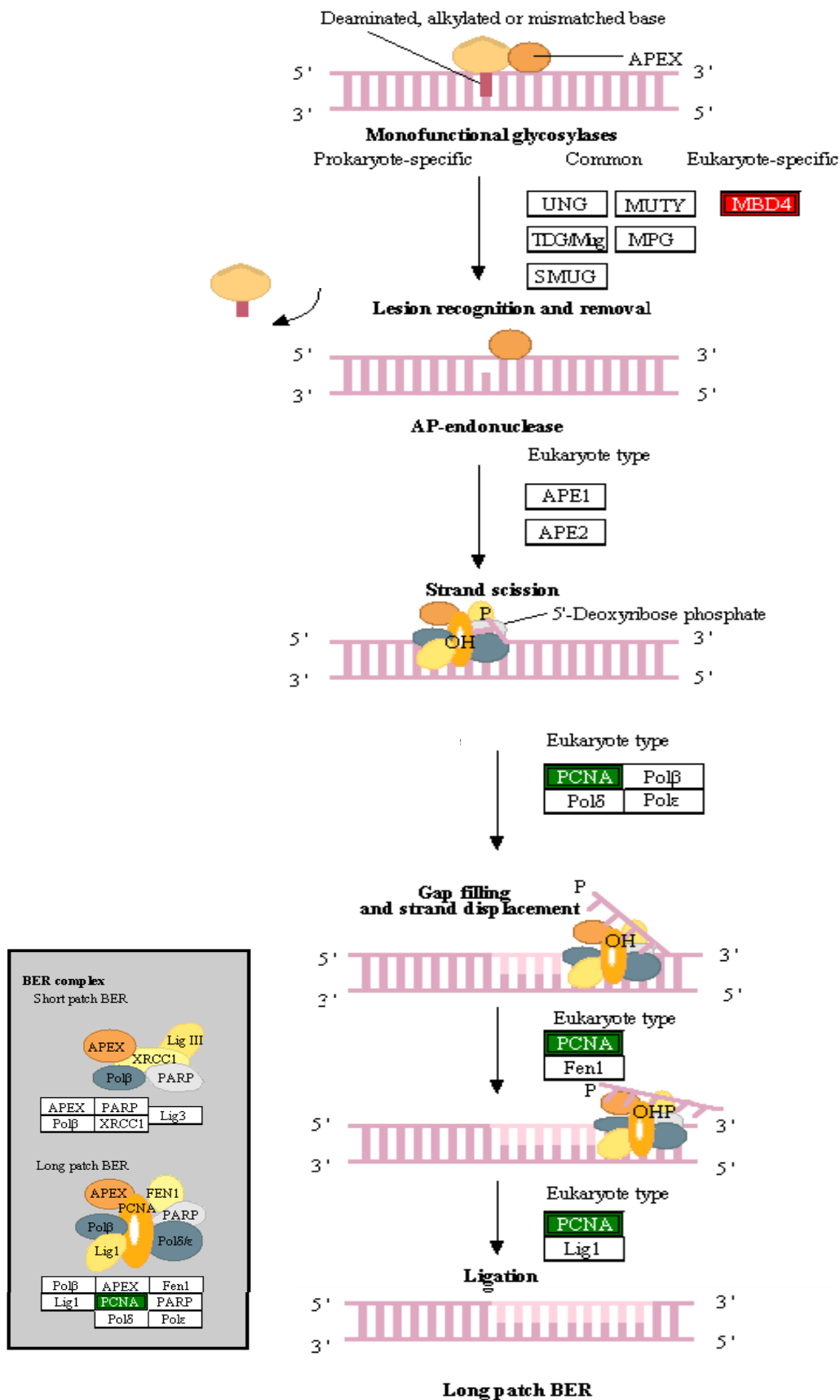
REPLICACIÓN DEL ADN



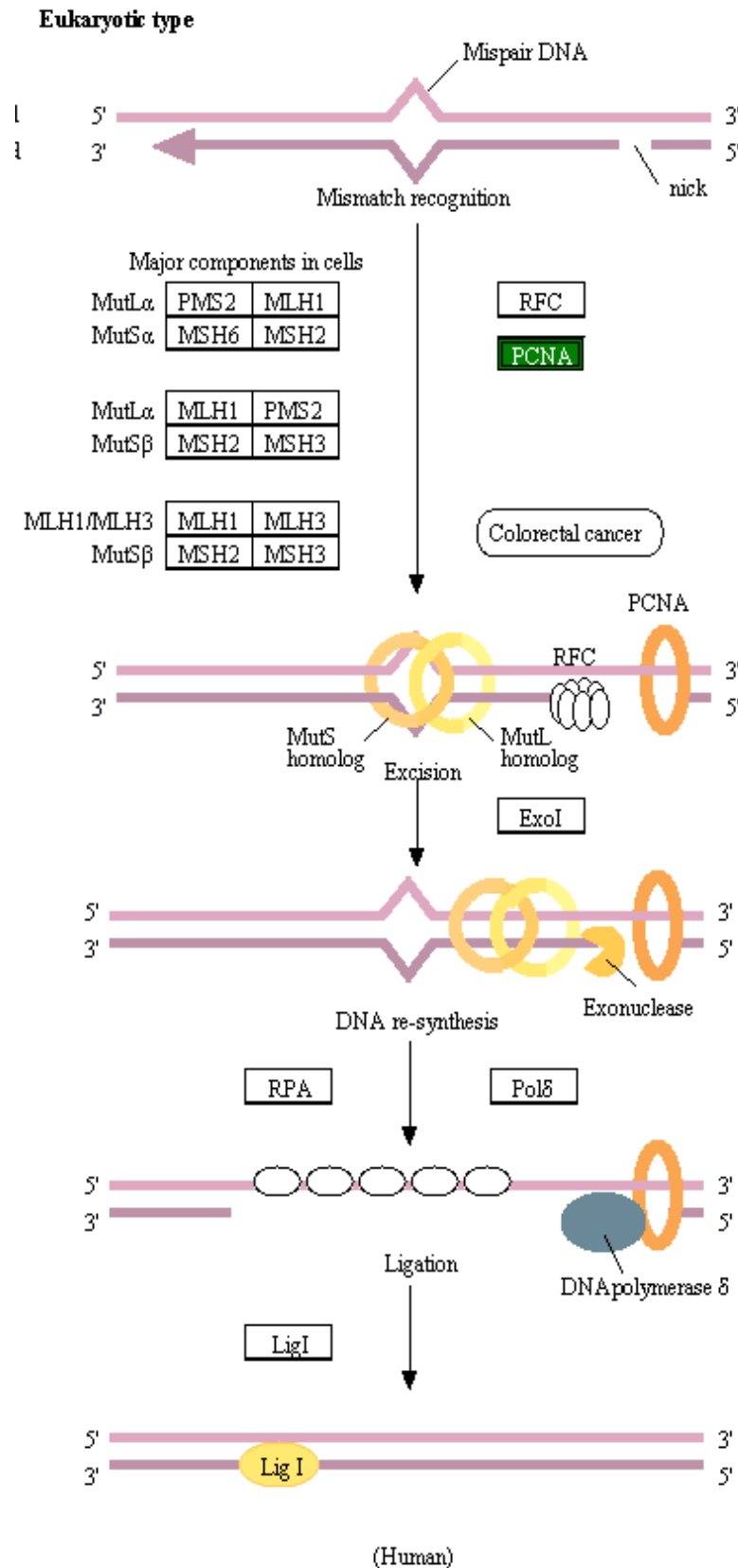
## REPARACIÓN DE DAÑO EN EL ADN: REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER)



## REPARACIÓN DE DAÑO EN EL ADN: REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES (BER)



## REPARACIÓN DE DAÑO EN EL ADN: REPARACIÓN DE BASES ERRÓNEAS (MMR)





RUTAS EN CÁNCER

