

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Estudio de la funcionalidad de la proteína del  
síndrome de Werner (WRN) en la maquinaria  
traduccional y alteraciones moleculares  
derivadas de su silenciamiento en células  
HeLa**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en  
Biología

Diego Matia Antonio Fossatti Jara

Lima, Perú

2018

## *Dedicatoria*

*A mi mamá,  
a quién debo mi existencia,  
por su apoyo y su ejemplo.*

*A la memoria de mi abuelo "papá Juan"*

"No es la fuerza, sino la **perseverancia** de los altos sentimientos la que hace a los hombres superiores".

Friedrich W. Nietzsche

# AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Manuel Iglesias Pedraz, al cual tengo un profundo respeto, admiración y eterno agradecimiento por la oportunidad concedida, sus enseñanzas, orientación, profesionalismo, paciencia, ejemplo y amistad a lo largo de estos 2 años. Muchas gracias Juan Manuel, te estaré eternamente agradecido.

Al Dr. Lucio Comai y al Dr. Baomin Li de la University of Southern California, por abrirme las puertas de su laboratorio durante 2 meses y el apoyo constante.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (INNOVATE PERÚ) por el financiamiento de esta tesis.

Al Dr. Javier Enciso, jefe del laboratorio de Cultivo Celular, por la amistad y el apoyo constante en la realización de esta tesis.

A la Dra. Lidia Cruz Neyra, por sus enseñanzas y por el apoyo a lo largo de la realización de esta tesis.

A Stfanny Meza, por su empeño y constancia en el trabajo, por los buenos momentos, por las innumerables discusiones, por el apoyo en muchos de los experimentos de esta tesis, por sus consejos y por ser una gran compañera y amiga.

A la Tec. Fabiola Rentería, por el apoyo en innumerables oportunidades con mis experimentos, en la búsqueda de reactivos y en ayudarme a controlar mi desorden dentro del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Luis y Carlos, por el apoyo en innumerables oportunidades, consejos y amistad.

A la Dra. Dionicia Gamboa Vilela y a Mg. Pamela Rodríguez Reyna del laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por el apoyo con las células Sf9.

A la Dra. Giovanna Müller Cadenilla y a Bethy Flores del laboratorio de Virología del Centro Internacional de la Papa, por cedermme su laboratorio para realizar mis ultracentrifugaciones.

Al Dr. Javier Quino Favero y a Adriana Martínez del laboratorio de Docimasia de la Universidad de Lima, por el apoyo con las cuantificaciones de luminiscencia.

Al Dr. Miguel Garay por darme la oportunidad de tener mi primer contacto con la investigación, el apoyo, la amistad y la ayuda en la parte estadística.

Al prof. Dr. David Talledo, a quien estoy eternamente agradecido por la confianza que depositó en mí y por la amistad.

Al Centro de Investigación y Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Ricardo Palma por el apoyo económico de parte de mi estadía en Estados Unidos y la tesis.

A mis amigos de la universidad, Valeria, Barbara, Michella, Diego, Jocelyn, Rosario, Mario, Paolo, muchas gracias a todos por los buenos momentos y el apoyo.

A Lesia por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido y por tu constante apoyo durante la realización de esta tesis.

A todos aquellos que pueda haber olvidado, por el apoyo y participación directa o indirecta en la realización en este trabajo de investigación.

# RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la relación funcional de la proteína del Síndrome de Werner (WRN) con la maquinaria traduccional en células HeLa depletadas para WRN. Se utilizó el sistema lentiviral inducible en células HeLa para desregular la expresión de WRN y realizar los posteriores análisis de qPCR y Western Blot. Así mismo, se utilizó el sistema de expresión de baculovirus y el sistema de transcripción/traducción para expresar la proteína WRN. Finalmente, se realizaron los ensayos de traducción *in vitro* utilizando vectores reporteros. Se localizó la presencia de la proteína WRN en la fracción citoplasmática y polisomal. Además, no se encontraron diferencias entre la expresión de los ARNm de las proteínas ribosomales RPS6, RPL7a entre las células HeLa carentes de WRN y células HeLa control. Sin embargo, se encontró un aumento de ~3 veces (326%) más de la expresión de los ARNm de IDH1 en células HeLa debido quizás al estrés celular. Adicionalmente, los ensayos de traducción *in vitro* entre células HeLa depletadas para WRN y células control, lograron determinar que la ausencia de WRN da como resultado una disminución en la traducción de proteínas (65% menos con respecto al control) y con el uso del inhibidor de la actividad helicasa de WRN NSC-19630 (67.5% menos con respecto al control). La depleción de WRN no altera la expresión de los ARNm y las proteínas ribosomales RPS3, RPS6 y RPL7A. Así mismo, se demostró que la proteína de WRN presenta una función en la traducción de proteínas al comparar los niveles de traducción de proteínas reporteras en células HeLa shWRN y shCTR, y mediante la inhibición de la actividad helicasa de WRN.

Palabras clave: WRN, maquinaria traduccional, qPCR, Western Blot, transcripción/traducción.

# ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the functional relationship of the Werner Syndrome protein (WRN) in the translational machinery in HeLa cells depleted for WRN. The inducible lentiviral system was used in HeLa cells to downregulate the expression of WRN and perform the subsequent analyzes of qPCR and Western Blot. Likewise, the baculovirus expression system and the transcription/translation system were used to express the WRN protein. Finally, the *in vitro* translation assays were carried out using reporter vectors. The WRN protein was located in the cytoplasmic and polysomal fraction. No differences were found between the expression of mRNA levels of RPS6, RPL7a between HeLa shWRN and HeLa control cells. However, a ~ 3 fold (326%) increase in the metabolic gene IDH1 in HeLa cells was found due to cell stress. Moreover, the *in vitro* translation assays between shWRN HeLa and control were able to determine that the absence of WRN results in a decrease in the translation of proteins (65% less compared to the control) and with the use of the helicase activity inhibitor of WRN (NSC-19630) (67.5% less compared to the control). WRN depletion does not alter the expression of mRNAs and ribosomal proteins RPS3, RPS6 and RPL7A. Furthermore, it was demonstrated that the WRN protein has a function in the translation of proteins when comparing the levels of translation of reporter proteins in HeLa cells shWRN and shCTR, and by inhibiting the helicase activity of WRN.

Key words: WRN, translational machinery, qPCR, Western Blot, transcription/translation.

# ABREVIACIONES

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

ARNm – ARN mensajero

ARNr – ARN ribosomal

$\beta$ -GP – Beta-glicerofosfato de sodio

ADNc – ADN complementario

DEPC – Dietil pirocarbonato

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

g – Gravedades

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico

IDH1 – Isocitrato deshidrogenasa 1

IPTG – Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

M – Molar

mM - Milimolar

NP-40 - Nonil fenoxipolietoxietanol

NSC 19630 - 1-((1-Oxopropoxy)methyl)-maleimide

pbs – Pares de bases

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

PIC – Coctel de inhibidores de proteasas

PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVDF – Fluoruro de polivinilideno

qPCR – Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

ROS – Especies reactivas de oxígeno

RPM – Revoluciones por minuto

RT-PCR – Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa

SDS – Dodecilsulfato de sodio

shARN – Horquilla pequeña de ARN

TE – Tris-EDTA

U – Unidades

$\mu$ l – Microlitro

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| AGRADECIMIENTOS                                    | 3  |
| RESUMEN  | 5  |
| ABSTRACT   | 6  |
| ABREVIACIONES                                      | 7  |
| ÍNDICE   | 9  |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                  | 13 |
| ÍNDICE DE TABLAS                                   | 17 |
| I. INTRODUCCIÓN                                    | 18 |
| 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA                    | 19 |
| 1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA                      | 19 |
| 1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN             | 20 |
| 1.4. OBJETIVOS                                     | 20 |
| 1.4.1. OBJETIVO GENERAL                            | 20 |
| 1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS                       | 20 |
| II. MARCO TEÓRICO                                  | 21 |
| III. ANTECEDENTES                                  | 23 |
| 3.1. El Síndrome de Werner                         | 23 |
| 3.1.1. Familia de las helicasas RecQ               | 24 |
| 3.1.2. El gen del Síndrome de Werner               | 25 |
| 3.1.3. La proteína del Síndrome de Werner (WRN)    | 25 |
| 3.1.4. Modificaciones postraduccionales de WRN     | 26 |
| 3.1.5. Funciones de la proteína WRN                | 27 |
| 3.2. Ribosomas                                     | 28 |
| 3.2.1. Proteína ribosomal S6 (RPS6)                | 29 |
| 3.2.2. Proteína ribosomal L7a (RPL7a)              | 30 |
| 3.2.3. Proteína ribosomal S3 (RPS3)                | 30 |
| 3.3. Mecanismos de traducción de las proteínas     | 31 |
| 3.3.1. Mecanismo de iniciación dependiente del CAP | 31 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.3.2. | Mecanismo de iniciación de la traducción independiente del cap   | 31 |
| 3.4.   | Sistema de expresión lentiviral  | 32 |
| 3.4.1. | Lentivirus   | 32 |
| 3.4.2. | Vectores lentivirales utilizados para la expresión de shRNA  | 33 |
| IV.    | HIPÓTESIS  | 34 |
| V.     | MATERIALES Y MÉTODOS   | 35 |
| 5.1.   | Lugar de ejecución   | 35 |
| 5.2.   | Material biológico   | 35 |
| 5.3.   | Identificación de las posibles alteraciones de las proteínas ribosomales en células de cáncer silenciadas para WRN | 36 |
| 5.3.1. | Cultivo <i>in vitro</i> de células HeLa shCTR y shWRN  | 36 |
| 5.3.2. | Desregulación de WRN con doxiciclina en HeLa shCTR y shWRN   | 36 |
| 5.3.3. | Fraccionamiento celular  | 37 |
| 5.3.4. | Obtención de la fracción polisomal   | 37 |
| 5.3.5. | Análisis de expresión génica de RPS6, RPL7a, RPS3 y G6PD por RT-qPCR a partir de ARN total                         | 38 |
| 5.3.6. | Western Blot   | 39 |
| 5.4.   | Expresión la proteína recombinante WRN   | 40 |
| 5.4.1. | Expresión de la proteína WRN por el sistema de baculovirus   | 40 |
| 5.4.2. | Expresión de WRN en el sistema de transcripción/ traducción <i>in vitro</i>  | 44 |
| 5.5.   | Ensayo de recuperación de la traducción usando WRN expresado exógenamente  | 45 |
| 5.5.1. | Preparación de extractos celulares usados el sistema de transcripción y traducción <i>in vitro</i> (TnT)           | 45 |
| 5.5.2. | Amplificación de los vectores reporteros   | 46 |
| 5.5.3. | Linearización de los plásmidos   | 46 |
| 5.5.4. | Reacción de TnT <i>in vitro</i>  | 46 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| VI.     | RESULTADOS  | 48 |
| 6.1.    | Desregulación de la proteína WRN en células HeLa  | 48 |
| 6.2.    | Expresión de la histona $\gamma$ -H2A.X como marcador de daño al ADN  | 48 |
| 6.3.    | Distribución espacial de la proteína WRN  | 48 |
| 6.4.    | Integridad de los ARN purificados de shCTR y shWRN  | 49 |
| 6.5.    | Tratamiento de los ARN con DNAsa  | 49 |
| 6.6.    | Expresión génica de los ARNm totales de RPS6, RPL7a y RPS3 en células HeLa shWRN                                | 50 |
| 6.7.    | Niveles de expresión proteica de las proteínas ribosomales RPS6, RPL7a y RPS3 en células HeLa shWRN             | 50 |
| 6.8.    | Expresión génica de los ARNm de G6PD, IDH1, y RPS3 en la fracción polisomal                                     | 50 |
| 6.9.    | Análisis de la integridad de los ARNr 28S, 18S y 5.8S tras la depleción de WRN                                  | 51 |
| 6.10.   | Expresión de WRN en el sistema de baculovirus   | 51 |
| 6.10.1. | Clonación del vector pFastBac-His-WRN   | 51 |
| 6.10.2. | Aislamiento del ADN bacmidual recombinante y análisis por PCR   | 52 |
| 6.10.3. | Expresión y purificación de la proteína WRN por el sistema de baculovirus                                       | 52 |
| 6.10.4. | Ensayo de la actividad helicasa de WRN  | 53 |
| 6.11.   | Expresión de WRN utilizando el sistema de transcripción/traducción <i>in vitro</i>                              | 53 |
| 6.11.1. | Clonación del vector pT7-IRES-WRN   | 53 |
| 6.11.2. | Expresión de la proteína WRN por el sistema de transcripción/traducción <i>in vitro</i>                         | 53 |
| 6.12.   | Reacción de transcripción/ traducción <i>in vitro</i> utilizando extractos celulares derivados de shCTR y shWRN | 54 |
| 6.12.1. | Extractos citoplasmáticos de HeLa shCTR y shWRN   | 54 |
| 6.12.2. | Reacción de transcripción/traducción <i>in vitro</i>  | 54 |
| VII.    | DISCUSIÓN   | 56 |

|       |                           |    |
|-------|---------------------------|----|
| VIII. | CONCLUSIONES              | 60 |
| IX.   | REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS | 61 |
| X.    | ANEXOS                    | 69 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Paciente con WS. Se muestra una persona aparentemente normal a los 8 años, sin embargo, a la edad de 36 años ya se evidencian los fenotipos de la enfermedad (Hisama et al., 2006). \_\_\_\_\_ 69
- Figura 2.** Miembros de la familia de las helicasas RecQ. Se muestra el tamaño de cada proteína con su número de aminoácidos. En azul y amarillo se observa las regiones conservadas de helicasa y RQC respectivamente (Cobb & Bjergbaek 2006). \_\_\_\_\_ 69
- Figura 3. Cromosoma 8.** Localización del gen del Síndrome de Werner en la posición p12 (Base de datos de NCBI). \_\_\_\_\_ 70
- Figura 4. A)** Dominios presentes en la secuencia en la proteína WRN. La proteína WRN se une a un dominio ATPasa, un dominio RQC (color azul) y un dominio HRDC (verde). El subdominio Zn (amarillo) se encuentra en la región terminal del dominio ATPasa (Kitano, 2014). **B)** Estructura del dominio de unión al ADN de la proteína WRN. Basado en la representación del PDB 2axl en el software PyMOL. \_\_\_\_\_ 70
- Figura 5.** Modificaciones postraduccionales de WRN (Kusumoto et al., 2007). \_\_\_\_\_ 71
- Figura 6. Complejo de iniciación.** Se muestra la interacción entre el complejo eIF4F, 43S y ARNm. EIF4F está formado por eIF4A, eIF4G y eIF4E. El complejo 43S está formado por eIF3, la subunidad ribosómica pequeña, y eIF2, que a su vez está formado por iniciador de ARNt de metionina (Met-tRNAi) y GTP. El ARNm se recluta en el complejo eIF4F a través de la interacción del extremo 3' y la proteína de unión PABP y el casquete 5' UTR y eIF4E (Montero et al., 2015). \_\_\_\_\_ 71
- Figura 7. Mecanismo del ARNi.** Para estudiar los eventos de la desregulación de WRN, se creó un vector lentiviral con una secuencia de WRN que se clonó en un plásmido para su uso con el sistema pSLIK (lentivirus único inducible). Este lentivirus se usa para infectar células humanas. En este proceso, el shRNA de WRN expresado a partir del lentivirus pSLIK forma una estructura de tipo horquilla de doble cadena, que se escinde en la horquilla por la enzima citosólica, DICER. Esta escisión provoca que el shRNA de WRN se integre en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Aquí, RISC guía la cadena del shRNA de WRN a su ARNm objetivo complementario, escinde la secuencia específica del ARNm de WRN y luego la dirige a la degradación, coordinada por SLICER (Bobbin et al., 2015). \_\_\_\_\_ 72
- Figura 8.** Sistema de expresión de Baculovirus. El sistema de expresión de proteínas de Baculovirus se basa en la inserción de un gen de interés en un bacmido mediante transposición sitio-específica en bacterias DH10Bac. El báculo recombinante obtenido es transfectado en células de insecto Sf9 capaces de producir baculovirus

recombinantes, conteniendo en su genoma la secuencia del gen de interés conduciendo a su expresión durante el proceso de infección celular (Manual Comercial de Thermo Fisher). \_\_\_\_\_ 73

**Figura 9.** Expresión de la proteína WRN en células HeLa (shCTR y shWRN) luego de 3 días de inducción de silenciamiento con dox. La expresión de la Tubulina se usó como control de carga. \_\_\_\_\_ 74

**Figura 10.** Cuantificación de las señales quimioluminiscentes (A.U.) de la expresión de la proteína WRN en células HeLa shCTR y shWRN. La expresión de la Tubulina se utilizó como factor normalizador. \_\_\_\_\_ 74

**Figura 11.** Expresión de  $\gamma$ -H2A.X en células HeLa (shCTR y shWRN) luego de 3 días de inducción de silenciamiento con dox. La expresión de la Tubulina se usó como control de carga. \_\_\_\_\_ 75

**Figura 12.** Cuantificación de las señales quimioluminiscentes (A.U.) de la expresión de la proteína  $\gamma$ -H2A.X en células HeLa shCTR y shWRN. La expresión de la Tubulina se utilizó como factor normalizador. \_\_\_\_\_ 75

**Figura 13.** Expresión de WRN en diferentes fracciones subcelulares. (A) Expresión de WRN en la fracción nuclear y citoplasmática de células shCTR y shWRN. Lamin A/C se utilizó como control nuclear mientras que Tubulina se usó como marcador citoplasmático. (B) Expresión de WRN en la fracción polisomal. \_\_\_\_\_ 76

**Figura 14.** Integridad de los ARN totales de HeLa shCTR y shWRN. Se observan las subunidades 28S y 18S. \_\_\_\_\_ 76

**Figura 15.** Confirmación de la ausencia de contaminación de los ARN totales con ADN. El producto esperado de la PCR fue de 90 bps. (A) ARN total tratado con DNase I. (B) ARN total no tratado con DNase I. (C) ADN genómico usado como control positivo. (D) H<sub>2</sub>O. \_\_\_\_\_ 77

**Figura 16.** Análisis de RT-qPCR de los niveles de RPS6, RPL7a y RPS3 a partir de ARN total. Los niveles de expresión de los ARNm se normalizaron con los ARNm de GAPDH y se muestran como relativos a shCTR ( $P < 0.05$ ). \_\_\_\_\_ 77

**Figura 17.** Expresión de las proteínas ribosomales (RPS6, RPS3 y RPL7a) en células HeLa (shCTR y shWRN) tras la inducción de silenciamiento con dox. La expresión de Lamin A/C se utilizó como control de carga. \_\_\_\_\_ 78

**Figura 18.** Cuantificación de las señales quimioluminiscentes (A.U.) de la expresión de las proteínas ribosomales RPS6, RPL7a y RPS3 en células HeLa shCTR y shWRN ( $P < 0.05$ ). La expresión de Lamin A/C se utilizó como factor normalizador. \_\_\_\_\_ 78

**Figura 19.** Análisis de RT-qPCR de los niveles de RPS3, G6PD y IDH1 a partir de ARN obtenido de la fracción polisomal. Los niveles de expresión de los ARNm se normalizaron con los ARNm de GAPDH y se muestran como relativos a shCTR ( $P < 0.05$ ). \_\_\_\_\_ 79

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 20.</b> Análisis de RT-qPCR de los niveles de expresión de los ARNr de 28S, 18S y 5.8S a partir de ARN obtenido de la fracción polisomal. Los niveles de expresión de los ARNr de shWRN se normalizaron con los ARNm de GAPDH y se muestran como relativos a shCTR ( $P < 0.05$ ).   | 79 |
| <b>Figura 21.</b> Clonación del vector pFastBac-His-WRN. (A) Mapa de la construcción pFastBac-His-WRN con los sitios de restricción para la enzima HindIII y sus respectivos tamaños esperados. (B) Digestión de los clones obtenidos tras la ligación del vector pFastBac con el ADNc de WRN. Gel de agarosa al 0.7%.   | 80 |
| <b>Figura 22.</b> Producto de PCR de la amplificación de un fragmento de WRN (385bps) en 6 clones obtenidos de ADN bacmial His-WRN. Gel de agarosa al 2%.  | 81 |
| <b>Figura 23.</b> Expresión de la proteína WRN en células de insecto Sf9. (A) Western Blot anti-WRN en extractos de células infectadas con baculovirus recombinantes His-WRN. (B) Western Blot anti-Histag en extractos de células infectadas con baculovirus recombinantes His-WRN.   | 81 |
| <b>Figura 24.</b> Expresión y purificación de la proteína WRN en el sistema de baculovirus. (A) Gel de SDS-PAGE. Las células infectadas con los baculovirus recombinantes His-WRN fueron lisadas (LC), se obtuvo la fracción soluble (LS) y fue sometida a cromatografía de afinidad con resina $N^{2+}$ NTA (LN). (B) Confirmación de la presencia de WRN en las fracciones eluidas por Western Blot. (C) SDS-PAGE de WRN purificado. | 82 |
| <b>Figura 25.</b> Western Blot anti-Biotina de los ensayos de actividad helicasa de WRN utilizando los cebadores parcialmente complementarios.   | 83 |
| <b>Figura 26.</b> Clonación del vector pT7-IRES-WRN. (A) Mapa de la construcción pT7-IRES-WRN con los sitios de restricción para las enzimas NcoI, XbaI y sus respectivos tamaños esperados. (B) Digestión de los clones obtenidos tras la ligación del vector pT7-IRES con el ADNc de WRN. Gel de agarosa al 0.7%.  | 84 |
| <b>Figura 27.</b> Western Blot de la expresión de WRN en el sistema de transcripción/traducción <i>in vitro</i> . Tubulina se utilizó como control de carga.   | 85 |
| <b>Figura 28.</b> Tinción de Coomassie de los extractos celulares derivados de células shCTR y shWRN para los ensayos de traducción/transcripción <i>in vitro</i> .  | 85 |
| <b>Figura 29.</b> Mapas de los vectores reporteros usados en el ensayo de transcripción/traducción <i>in vitro</i> pUC-TEV-Luc y pUC-TEV-Ren. Mapas creados usando el software SnapGene.   | 86 |
| <b>Figura 30.</b> Traducción <i>in vitro</i> de los vectores que codifican las proteínas Firefly luciferase (Luc) y Renilla luciferase (Ren) en extractos celulares de HeLa shCTR y shWRN ( $P < 0.05$ ).  | 86 |
| <b>Figura 31.</b> Traducción <i>in vitro</i> de los vectores que codifican las proteínas Firefly luciferase (Luc) y Renilla luciferase (Ren) en extractos celulares de HeLa shCTR y HeLa shCTR + NSC 19630 ( $P < 0.05$ ).   | 87 |

**Figura 32.** Traducción *in vitro* de los vectores que codifican las proteínas Firefly luciferase (Luc) y Renilla luciferase (Ren) en extractos celulares de HeLa shCTR, HeLa shWRN y HeLa shWRN suplementadas con proteína de WRN (WRNp) ( $P < 0.05$ ). \_\_\_\_ 87

# ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Lista de primers usados para el análisis por RT-qPCR. _____                 | 88 |
| <b>Tabla 2.</b> Lista de anticuerpos primarios. _____                                       | 88 |
| <b>Tabla 3.</b> Primers parcialmente complementarios usados para reacción de helicasa. ____ | 89 |

# I. INTRODUCCIÓN

La proteína del síndrome de Werner (WRN) está implicada en diversos procesos moleculares asociados al ácido desoxirribonucleico (ADN) como la replicación y reparación del ADN, mantención de los telómeros e interacciones proteína-proteína, entre ellas p53 y Ku70/80.

Se ha demostrado que el silenciamiento génico de WRN en células cancerígenas y otras líneas celulares, disminuye la concentración de proteínas clave en los mecanismos de óxido-reducción, como la glucosa 6 fosfato (G6PD), enzima clave en la vía de la pentosa fosfato y la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1). Estas enzimas están implicadas en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la regeneración de Glutati6n (GSH) a trav6s de la producci6n de Nicotinamida adenina dinucle6tido fosfato (NADPH).

Existen evidencias que WRN no solo estar6a involucrada en la regulaci6n de los mecanismos replicativos del ADN, si no tambi6n cumplir6a un rol importante en el control y regulaci6n de los mecanismos traduccionales como posibles responsables de la regulaci6n de estas enzimas.

Por tal motivo, en la presente investigaci6n se ha realizado procedimientos experimentales destinados a entender la relaci6n funcional de WRN con la maquinaria traduccional en c6lulas HeLa. Conocer estos procesos moleculares podr6a ser beneficioso para el tratamiento del c6ncer a trav6s del bloqueo de esta v6a metab6lica identificada y as6 evitar la proliferaci6n descontrolada.

## **1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Durante el flujo de la información génica, desde el ADN hasta las proteínas, existen mecanismos replicativos, transcripcionales y traduccionales que controlan y regulan las moléculas que permiten la homeostasis celular.

La proteína WRN está vinculada a procesos que implican al ADN, como la reparación de los daños ocurridos al ADN, mantención de los telómeros, entre otros. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la ausencia de la proteína WRN no solo está relacionada con las vías metabólicas que intervienen en la homeostasis del ADN, sino también que el silenciamiento de WRN afectaría la síntesis global de proteínas, la que incluye a enzimas claves implicadas en el metabolismo de la glucosa como la G6PD y IDH1 (Li *et al.*, 2014), las cuales están directamente relacionadas con el daño al ADN mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS), ampliamente descrita en pacientes con WS (Sun *et al.*, 2017).

La síntesis de proteínas en células tumorales se encuentra alterada y es considerada una de las características principales del cáncer, además está vinculada a la proliferación descontrolada, supervivencia, angiogénesis, alteraciones en la respuesta inmunológica y metabolismo. Por lo tanto, comprender la relación entre WRN y la síntesis de proteínas en células HeLa es crucial, lo que permitirá a su vez entender la funcionalidad de WRN en estas patologías, con la posibilidad de generar nuevas herramientas terapéuticas moleculares (Bhat *et al.*, 2015).

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Está la proteína WRN funcionalmente asociada a la maquinaria de síntesis de proteínas en células HeLa?

### **1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

La traducción de proteínas es un proceso crítico para la homeostasis celular. Las recientes evidencias de que la proteína WRN cumpliría un papel en la maquinaria traduccional hacen plantear estudiar más a fondo este mecanismo molecular. Por lo tanto en el presente trabajo se realiza el silenciamiento de WRN para estudiar los diferentes niveles del flujo de información genética como análisis por qPCR, Western Blots y los ensayos de traducción *in vitro* para determinar un posible rol de WRN en los mecanismos traduccionales. Esto con la finalidad de sentar las bases de WRN con la traducción de proteínas y que en estudios posteriores contribuirían al desarrollo de terapias génicas destinadas al tratamiento del cáncer.

### **1.4. OBJETIVOS**

#### **1.4.1.OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la relación funcional de la proteína del síndrome de Werner (WRN) en la maquinaria traduccional.

#### **1.4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar las posibles alteraciones de la expresión de proteínas ribosomales en células HeLa deplecionadas para WRN.

Expresar la proteína WRN utilizando el sistema de baculovirus en células Sf9 y el sistema de transcripción/traducción *in vitro*.

Determinar las capacidades de síntesis de proteínas a partir de extractos celulares derivados de células deplecionadas para WRN.

## II. MARCO TEÓRICO

La información genética es un proceso por el cual un gen da lugar a un producto funcional y por lo tanto un fenotipo. La manifestación fenotípica está determinada por la síntesis de ARN (ARNr, ARNt, microARN y ARNm) y por la síntesis de proteínas. Estos son productos del flujo regulado de información génica o también llamado dogma central de la biología. La información se transfiere primero del ADN al ARN (transcripción), seguida de la transferencia de información del ARN a las proteínas (traducción) (Crick, 1970).

La transcripción inicia con el ensamblaje del complejo de preiniciación en el sitio de inicio de la transcripción. Este complejo de preiniciación está compuesto por un conjunto de proteínas adicionales (factores de transcripción TF) que guían el posicionamiento de la ARN polimerasa II en el promotor de transcripción y ayudan a separar las dos cadenas de ADN, de las cuales una actúa como molde para la síntesis de ARN (Roeder, 2005). Luego, la ARN polimerasa es reclutada por la acción de otros TF que guían esta proteína y es movilizada a lo largo del ADN produciendo la transcripción del ARN (este proceso es llamado elongación). La transcripción es terminada y el ARN producido es modificado después de la transcripción. El pre-ARNm monocatenario (transcrito primario que incluye tanto exones como intrones) se sintetiza en una dirección 5' a 3' mediante la adición de residuos de ribonucleótidos al grupo hidroxilo libre en el extremo 3' de la cadena de ARN en formación (Strachan & Read, 2004).

La primera modificación del pre-ARNm es la adición de un casquete 5' al transcrito nuevo, lo cual asegura que la célula podrá distinguir los ARNm de otras moléculas de ARN y además ayuda a su transporte al citoplasma. Luego, los intrones se remueven del pre-ARNm mediante la escisión

endonucleolítica y mediante el proceso de corte y empalme del ARN. El extremo 3' de la molécula de ARN también se modifica mediante la adición de un tramo de ~200 nucleótidos de adenina (cola de poli A), que ayuda a dirigir la síntesis de la proteína en el ribosoma (Modrek & Lee, 2003).

Para el caso de algunos ARNs como el ARNr y el ARNt, estos son considerados productos finales. Sin embargo, los ARNm son transportadas desde el poro nuclear hasta el citoplasma, donde interactuarán con la maquinaria traduccional y serán traducidos en proteínas (Guenther *et al.*, 2007).

La traducción puede ser dividida en todos los organismos en tres fases; iniciación, elongación y terminación. Durante la iniciación, las dos subunidades ribosomales (40S y 60S), el ARNm a traducir, el primer aminoacil-ARNt (el ARNt cargado con metionina), GTP (como fuente de energía) y factores de iniciación (eIFs) se ensamblan para formar el complejo de iniciación para producir la síntesis proteica. En la elongación el tRNA transfiere un aminoácido al tRNA correspondiente al siguiente codón. El ribosoma luego se mueve (transloca) al siguiente codón de ARNm para continuar el proceso, creando una cadena de aminoácidos. Mientras que en la terminación la traducción concluye, el producto peptídico se libera y las subunidades ribosomales se reciclan para repetir el ciclo de traducción. Las modificaciones postraduccionales implican la unión de grupos funcionales (por ejemplo, fosforilo, carbohidrato), escisión proteolítica o el cambio de la naturaleza química de los aminoácidos seleccionados (Mann y Jensen, 2003).

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1. El Síndrome de Werner

El Síndrome de Werner (WS) es una rara enfermedad autosómica recesiva causada por la mutación del gen WRN. Fue identificado por primera vez por Otto Werner, quién describió el síndrome en su tesis doctoral en 1904. WS se caracteriza por la aparición de cánceres poco comunes (sarcomas) y la aparición temprana o la frecuencia de fenotipos característicos del síndrome como: estatura baja, canas y/o pérdida del cabello, osteoporosis, cataratas, aterosclerosis, diabetes del tipo II, hipogonadismo, úlceras en la piel y niveles de fertilidad baja (Figura 1) (Goto *et al.*, 1996). Los pacientes de WS comienzan a evidenciar los síntomas a los 20 años, tras la cual la salud se deteriora rápidamente. La vida media de estos pacientes es de aproximadamente 56 años.

Los pacientes de WS generalmente fallecen como resultado de cáncer o enfermedades cardiovasculares aterosclerótica. (Huang *et al.*, 2006). Las células derivadas de pacientes con WS experimentan senescencia replicativa prematura (detención del crecimiento en la fase G0/G1 del ciclo celular, detención de la proliferación, pero metabólicamente activas) mucho más rápido que las células normales, muestran una alta inestabilidad genómica, como translocaciones, inversiones, reordenamientos cromosómicos y deleciones y una fase S prolongada en el ciclo celular. Estas características de WS indican que la proteína responsable de este síndrome está relacionada al ADN, reparación del ADN, recombinación del ADN, replicación del ADN y manutención de los telómeros (Takeuchi *et al.*, 1982). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito una función definida para esta proteína.

### 3.1.1. Familia de las helicasas RecQ

El síndrome de Werner (WS) es causado por mutaciones en el gen WRN, el cual es un miembro de la familia de las helicasas RecQ. Hasta la fecha se han identificado 92 distintas mutaciones en el gen. La mayoría de ellas genera un ARNm truncado que es rápidamente degradado por el sistema llamado “*non-sense mediated decay*”, el cual elimina los ARNm imperfectos que contienen codones de terminación de la traducción prematuros (Bachrati *et al.*, 2003). *Escherichia coli* en su genoma contiene la primera helicasa RecQ descrita y es de donde la familia toma el nombre. Esta familia de proteínas también está presente en otros grupos como en la levadura (llamado Sg1 en *Saccharomyces cerevisiae* y Rqph1 en *Saccharomyces pombe*), *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus levis* y en ratones. En humanos, esta familia está compuesta por 5 miembros como BLM, RECQL, RECQ4 y RECQ5b y WRN (Figura 2), lo cual demuestra que esta proteína está conservada desde bacterias hasta humanos. Además de WRN, la mutación de BLM causa el síndrome de Bloom y la mutación de RECQ4 causa el síndrome de Rothmund Thomson síndrome (RTS), el síndrome de Baller-Gerold (BGS) y el síndrome de RAPADILINO (Chu & Hickson, 2009).

Las helicasas actúan usando la energía derivada de la hidrólisis de ATP para catalizar el desenrollamiento de los ácidos nucleicos bicatenarios. Todas las helicasas humanas RecQ comparten un dominio central de ~450 residuos. La pérdida en la función de un miembro de las RecQ da como resultado niveles altos de recombinación ilegítima (que no requiere ni homología de secuencia ni acción de ninguna proteína específica). Por lo tanto, las RecQ cumplen un papel primordial en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, aunque los detalles precisos de sus funciones en el metabolismo del ADN aún son desconocidos (Martin & Oshima, 2000).

### 3.1.2. El gen del Síndrome de Werner

El gen de WRN se localiza en el cromosoma 8 posición 12 (Figura 3), inicialmente fue localizado por análisis de ligamiento y usado como un marcador para detectar pacientes con WS (Goto *et al.*, 1992). Sin embargo, fue en 1996 cuando se logró la clonación posicional del gen, donde se identificó que el gen estaba asociado al envejecimiento y además que era un gen de susceptibilidad al cáncer (Yu *et al.*, 1996, Nakura *et al.*, 1996). El gen de WRN contiene más de 250 kb y consta de 35 exones (34 exones codificantes) que codifican una proteína de 1432 aminoácidos y su secuencia sugirió inmediatamente un papel en el metabolismo del ADN. Se ha demostrado la existencia de 7 motivos de secuencia conservados, típicos de proteínas con actividad de ATPasa y/o helicasa, lo cual coloca a WRN en la familia RecQ de helicasas (Liu *et al.*, 1999, Yu *et al.*, 1997).

### 3.1.3. La proteína del Síndrome de Werner (WRN)

WRN posee un peso molecular de aproximadamente 162 kilodaltons (kDa) y presenta diversos dominios estructurales que contribuyen a su función enzimática. Muchos estudios han demostrado que WRN posee actividad de unión al ADN gracias a sus cuatro regiones distintas de unión al ADN, que incluyen los dominios helicasa, RQC y HRDC (Figura 4) (Hu *et al.*, 2005). A diferencia de las demás RecQ helicasa de humanos, WRN posee además un dominio exonucleasa con afinidad de unión al ADN, aunque menos específico que los antes nombrados. Es importante mencionar que WRN es más estable y tiene mayor afinidad a estructuras de ADN complejas que incluyen sustratos que poseen “burbujas” y lazos D o ADN cuadruplex (Brosh *et al.*, 2002).

La región central de WRN confiere la actividad ATPasa que proporciona la energía para desenrollar el ADN con una direccionalidad 3' → 5' (Gray *et al.*, 1997). Además, posee un dominio de tipo RNasa D (HRDC) C-terminal y un dominio exonucleasa con actividad 3' → 5'. El análisis bioquímico de

la actividad de la exonucleasa WRN indica que la enzima prefiere la degradación del dúplex de ADN con un extremo 3' libre y el dominio de exonucleasa se pliega en una unidad funcional que se puede desacoplar de la actividad helicasa de WRN. Aunque varios estudios bioquímicos han examinado la posible coordinación entre la helicasa y las actividades de exonucleasa de WRN, aún no se conoce si existe una relación concreta entre estos dominios (Huang *et al.*, 1998).

Estudios realizados *in vitro* usando cultivos de células derivadas de pacientes con WS demostraron que los fibroblastos primarios WS muestran una progresión más lenta a través de la fase S que los fibroblastos normales y entran en la senescencia prematura después de 20-25 pases. Además presentan genotipos caracterizados por translocaciones, deleciones, alta inestabilidad telomérica y acumulación del daño oxidativo en el ADN (Salk *et al.*, 1981). Ratones carentes de la actividad helicasa de WRN (*wrn* hel<sup>-/-</sup>) muestran inestabilidad genómica debido a la acumulación del ROS, produciendo daño al ADN (Massip *et al.*, 2006). Por otro lado, las mutaciones de WRN identificadas en pacientes y células WS y que afectan la NLS, generan una proteína truncada que es incapaz de migrar al núcleo tras su síntesis en la maquinaria traduccional presente en el citoplasma (Huang *et al.*, 2006). Muchas de las mutaciones conducen a un codón de parada prematuro que induce al ARNm a degradarse via “*non-sense mediated decay*” mientras que otras mutaciones producen una proteína truncada con pérdida de función.

#### 3.1.4. Modificaciones postraduccionales de WRN

Las actividades enzimáticas y la localización de WRN en caso de daños al ADN, están modulados por modificaciones postraduccionales. Entre las modificaciones más comunes se encuentran la fosforilación, la acetilación y la sumoilación. La primera modificación reportada fue la sumoilación cuando se demostró que WRN expresado endógeno y exógeno, se

modificó por moléculas de tipo ubiquitina SUMO-1 dentro de células, estos resultados concluyeron que la sumoilación podría afectar la localización de WRN en el núcleo (Kawabe *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha informado que WRN se fosforila en residuos de serina/treonina después de tratamientos con agente que bloquean la replicación del ADN y que dañan el ADN. La fosforilación de WRN dependiente de ATR/ATM afecta la colocación con sus socios proteicos y la translocación de WRN en focos nucleares después del daño del ADN (Pichierri *et al.*, 2003).

Además de ser sumoilado y fosforilado, WRN también es acetilado. La acetilación de WRN está relacionada con la acetiltransferasa p300. Estudios de WRN desacetilada indican que se localiza en el nucleolo y la acetilación de WRN se correlaciona con su reclutamiento al nucleoplasma (Figura 5) (Karmakar y Bohr, 2005).

### 3.1.5. Funciones de la proteína WRN

Estudios proteómicos enfocados en el entendimiento de los cambios celulares tempranos desencadenados por la desregulación de WRN (previos a los daños ocurridos por ROS), revelaron una imprevista alteración de varias vías metabólicas en múltiples líneas celulares incluyendo fibroblastos humanos, células HeLa, MCF7A, células madre mesenquimales de ratón (MSC) y fibroblastos embrionarios derivados de ratones *wrn*<sup>-/-</sup>. Entre las alteraciones observadas, se presentan la reducción de enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa como la G6PD y la IDH1, lo que conlleva a un incremento del ROS que incrementa el nivel de daño oxidativo al ADN y a otras macromoléculas. Además, los análisis en los niveles de los ARNm, tras la depleción de WRN, no refleja cambios significativos de la baja expresión de las proteínas metabólicas observadas, por lo que estos cambios no se debe a una alteración en la expresión génica (Li *et al.*, 2014).

Análisis de la interacción entre WRN y la proteína BLM, demostraron que una pequeña fracción de WRN se localiza en el citoplasma sin interactuar con BLM (von Kobbe *et al.*, 2002). Estudios preliminares han demostrado que una fracción de WRN se localiza en el citoplasma formando complejos enriquecidos en componentes de la maquinaria traduccional. Además, el ensayo *in vitro* destinado a determinar la capacidad de síntesis de proteínas, reveló que las células carentes de WRN poseen aproximadamente un 20% menos síntesis *de novo* comparadas con la muestra control, lo que indica que en ausencia de WRN la síntesis de proteínas se inhibe por un mecanismo aún por determinar (Pedraz *et al.*, 2016).

Sin embargo, no se puede descartar que la ausencia de WRN también afecte el proceso de traducción debido a la acumulación de ROS. Ensayos de inmunofluorescencia utilizando la proteína TIAR han demostrado que, bajo condiciones de estrés incluido ROS, secuestran a los ARNm y otros componentes de la maquinaria traduccional y los dirigen hacia los gránulos de estrés (SG) bloqueando al traducción, no muestran formación y acumulación de SG tras el silenciamiento de WRN, lo que indirectamente sugiere que el silenciamiento de WRN no altera el proceso de iniciación de la traducción, por lo que el defecto en síntesis de proteínas observado en ausencia de WRN podría darse durante la elongación o la terminación (Kedersha *et al.*, 2002).

### 3.2. Ribosomas

Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos que constan de 2 subunidades distintas llamadas subunidad grande y subunidad pequeña. En mamíferos estas estructuras son conocidas como 60S (grande) y 40S (pequeña). Aproximadamente el 70% de la masa del ribosoma consiste en ARN conocido como ARN ribosomal (ARNr), mientras que las proteínas ribosomales (RP) accesorias son un tercio del ribosoma. La subunidad 40S

está compuesta de una sola molécula de ARN, ARNr 18S y 33 proteínas, mientras que la subunidad 60S tiene tres moléculas de ARN: 5S, 5.8S y el ARNr 28S, y 46 proteínas (Jang *et al.*, 2011). Las RP son los principales constituyentes de los ribosomas, que catalizan la síntesis de proteínas en el citoplasma. Las RP se nombran de acuerdo con la subunidad del ribosoma a la que pertenecen, de tal forma que las proteínas que pertenecen a la subunidad grande se designan entre L1-L44 y las que pertenecen a la subunidad pequeña se designan S1-S31. (Mager, 1988).

Muchas RP consisten en un dominio de unión a ARN expuesto en la superficie globular que se une al centro del ARNr para estabilizar su estructura. A pesar de que las actividades de decodificación y la transferencia de péptidos se basan en el ARNr, las RP también desempeñan un papel fundamental en el proceso de síntesis de proteínas (Wool, 1996). Además de su función en la síntesis de proteínas, muchas RP tienen una función especial fuera del ribosoma que implica diversos procesos celulares tales como la replicación, transcripción, procesamiento del ARN, reparación del ADN e incluso inflamación (Yamamoto, 2000). Asimismo, datos recientes han demostrado que la regulación negativa de algunas RP está relacionada con la carcinogénesis (Ebert *et al.*, 2008).

La maquinaria traduccional está compuesta por más de 150 proteínas ribosomales (Robledo *et al.*, 2008). Por lo que en el presente trabajo se han seleccionado las proteínas ribosomales RPS6, RPL7a y RPS3.

### 3.2.1. Proteína ribosomal S6 (RPS6)

RPS6 es una proteína de 33 kDa que pertenece a la familia de las proteínas ribosomales S6. Es el principal sustrato de las proteínas quinasas en el ribosoma, con subconjuntos de cinco residuos de serina C-terminales fosforilados por diferentes proteínas quinasas. La fosforilación es inducida por varios estímulos, incluidos los factores de crecimiento, agentes promotores de tumores y mitógenos. La desfosforilación ocurre en la

detención del crecimiento. La proteína contribuye al control del crecimiento y la proliferación celular mediante la traducción selectiva de clases particulares de ARNm (Meyuhas, 2008).

### 3.2.2. Proteína ribosomal L7a (RPL7a)

RPL7a pertenece a la familia de las proteínas ribosomales L7AE. El gen de L7AE se reordena con el protooncogén *trk* para formar el oncogén quimérico *trk-2h*, que codifica una oncoproteína compuesta del extremo N de la proteína ribosomal L7a fusionada al dominio tirosina quinasa del receptor de *trk*. RPL7a, un constituyente de la subunidad ribosómica 60S, también desempeña un papel importante en la estabilización de los ribosomas mediante la unión a los ARNr (De Falco *et al.*, 1993). Además, RPL7a participa en el control de la transformación celular, el crecimiento tumoral, la agresividad y la metástasis (Zhu *et al.*, 2001).

### 3.2.3. Proteína ribosomal S3 (RPS3)

RPS3 es un miembro de la subunidad ribosomal 40S. Desempeña un papel crítico en la iniciación de la traducción al participar en la reordenación de la subunidad pequeña para permitir el acceso del ARNm (Valášek, 2012). Además, cumple varias funciones extraribosómicas, especialmente en la reparación del ADN y la regulación de la transcripción génica específica. Aunque las funciones extraribosómicas de RPS3 son diversas, todas están unificadas en su propósito de garantizar la integridad del genoma y proteger contra la carcinogénesis (Deutsch *et al.*, 1997).

### 3.3. Mecanismos de traducción de las proteínas

#### 3.3.1. Mecanismo de iniciación dependiente del CAP

La iniciación es un proceso crítico, donde el codón de iniciación se empareja con el bucle anticodón del RNAt iniciador (tRNA Met) en el sitio P ribosómico. Por lo general, la ruta canónica de iniciación de la traducción en organismos eucariotas es el reclutamiento del complejo eIF4F a la estructura m<sup>7</sup>G CAP del extremo 5' del ARNm en el citoplasma, a través de la subunidad eIF4G de dicho complejo. Ese complejo está conformado por los factores de iniciación eIF4G, eIF4E y eIF4A, al cual finalmente se le une el factor eIF4B. La proteína PABP (Poly-A Binding Protein) se une a la cola Poli A del extremo 3' terminal de los ARNm generando un loop circular mediante su interacción con eIF4G del complejo eIF4F (Mathews *et al.*, 2007).

Este complejo de ARNm-proteína (ARNm activados) recluta al complejo de pre-iniciación 43S, el cual está conformado por la subunidad ribosomal 40S, el complejo ternario Met-tRNA<sup>i</sup>-eIF2-GTP y los factores adicionales eIF3 y eIF5. Este nuevo complejo recibe el nombre de complejo de iniciación 48S, el cual escanea la región 5'UTR hasta encontrar el primer codón de inicio AUG (Figura 6). Finalmente, la estabilización del complejo esta mediado por el acoplamiento de a subunidad ribosomal 60S el cual estabiliza el ribosoma y la traducción se inicia (Jackson *et al.*, 2010).

#### 3.3.2. Mecanismo de iniciación de la traducción independiente del cap

Muchos ARNm celulares y virales poseen elementos denominados IRES dentro de sus regiones 5'-UTR, que dirigen la traducción mediante un mecanismo no canónico e independiente de la estructura cap. En estos casos, los ribosomas se reclutan a posiciones internas en el ARNm cercanas al AUGi o directamente sobre él en ausencia de "scanning" de la

5'-UTR, y en muchas ocasiones sin la participación de ciertos eIFs (Jackson *et al.*, 2010).

La mayoría de los IRES no requieren el complejo eIF4F, y pueden traducirse sin el eIF4E y con el factor eIF4G hidrolizado por proteasas como las de picornavirus. Otros factores prescindibles en algunos de estos IRES pueden ser en muchos casos el eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B o eIF2, aunque la mayoría necesita la presencia del eIF3. Esto, sin embargo, no ha sido estudiado en células infectadas y es posible que muchos de los requerimientos de eIFs descritos hasta la fecha cambien en los próximos años, tal y como se ha visto recientemente con respecto a la utilización del eIF2 y del eIF4G por algunos IRES de picornavirus (Redondo *et al.*, 2011). El caso más extremo es el IRES de la región intergénica (IGR) de diversos dicistrovirus como el virus de la parálisis del grillo (CrPV). Este IRES es capaz de iniciar la traducción internamente en ausencia de todos los eIFs. Además, esta traducción se inicia sobre un codón distinto al AUG. Por otra parte, el mecanismo de iniciación en algunos IRES está modulado también por ciertos factores trans-activadores específicos (ITAFs), que podrían funcionar estabilizando la conformación tridimensional óptima de los IRES (López-Lastra *et al.*, 2010).

### 3.4. Sistema de expresión lentiviral

#### 3.4.1. Lentivirus

Los lentivirus pertenecen a la familia Retroviridae, son viriones esféricos de ~100 nm de diámetro, con una envoltura externa compuesta de glicoproteínas. Se incluyen dos copias del genoma del ARN viral lineal (aproximadamente 10 kb), que contienen tres genes esenciales: gag, pol y env (Ramezani & Hawley, 2002).

Los lentivirus contienen un genoma complejo, capaz de transducir una cantidad significativa de ARN en el ADN de una célula humana,

independiente de la fase del ciclo celular. Esta es una característica valiosa para utilizar los vectores lentivirales en la modulación de la expresión génica, con la capacidad de integrar y lograr la expresión a largo plazo, convirtiéndolos en herramientas muy útiles para la investigación biomédica (Tolstoshev, 1992).

### 3.4.2. Vectores lentivirales utilizados para la expresión de shRNA

Los vectores lentivirales están basados en los primeros vectores virales realizados por el Premio Nobel de 1980, Paul Berg. Berg y su grupo de investigación construyeron virus híbridos entre el virus del mono SV40 y segmentos de ADN del fago  $\lambda$ . Además, fueron los primeros en replicarlos dentro de células cultivadas de mono (Jackson *et al.*, 1972). Actualmente, las secuencias de poliadenilación viral de SV40 se usan en dirección 3'  $\rightarrow$  5' del 3' LTR (repetición terminal larga) de los vectores lentivirales de última generación, debido a que reducen en gran medida las posibilidades de interferencia transcripcional. Los lentivirus se pueden integrar de forma estable en células que se dividen y que no se dividen para la expresión transgénica a largo plazo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Proudfoot, 2011).

Los vectores lentivirales que encierran el ARN de horquilla corta (shRNA) se utilizan para inducir la eliminación eficaz de genes individuales específicos y múltiples en células humanas. Debido a la complejidad de los vectores lentivirales y los riesgos adversos de la incorporación del gen del VIH, los vectores lentivirales de tercera generación se formularon con tres o cuatro sistemas de producción del vector lentiviral, con homología de secuencia marginal del VIH (Kay *et al.*, 2001). En la actualidad, los vectores lentivirales de tercera generación son los sistemas de vectores más utilizados para la administración de shRNA a las células (Figura 7) (Singer & Verma, 2008).

## IV. HIPÓTESIS

La proteína WRN cumple un rol en la maquinaria traduccional.

Si WRN está implicado en los procesos de síntesis de proteínas, entonces su depleción mediante un sistema de silenciamiento condicional y por el uso del inhibidor NSC-19630, reducirá los niveles de síntesis proteica *in vitro*.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo Celular de la Universidad Científica del Sur (UCSUR), ubicado en el distrito de Villa El Salvador, provincia de Lima y departamento de Lima, bajo la supervisión del Dr. Juan Manuel Iglesias Pedraz.

Las ultracentrifugaciones se realizaron en el laboratorio de Virología del Centro Internacional de la Papa (CIP), a cargo de la Blga. Giovanna Müller Cadenillas, ubicado en el distrito de La Molina, provincia de Lima y departamento de Lima.

La expresión de la proteína WRN en células Sf9 y la clonación del vector pT7-IRES-WRN se realizaron en el laboratorio del Dr. Lucio Comai en el Institute for Genetic Medicine, Keck School of Medicine de la University of Southern California, Los Ángeles, California, Estados Unidos.

Las cuantificaciones de luminiscencia de las reacciones de traducción *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Docimasia de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad de Lima, a cargo del Dr. Javier Quino Favero ubicado en el distrito de Surco, provincia de Lima y departamento de Lima.

### 5.2. Material biológico

Se utilizaron células HeLa modificadas por transfección lentiviral usando la región 3' UTR dirigidos con shARN para silenciar el gen WRN (shWRN), lo cual permite tener células con un sistema inducible de silenciamiento mediante la adición de doxiciclina, y como control se usaron células con un

sistema lentiviral sin ninguna homología a ninguna parte del genoma (shCTR) (Li *et al.*, 2014).

Para la expresión de la proteína recombinante WRN se usó la línea celular Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), las cuales fueron amablemente cedidas por la Dra. Dionicia Gamboa Vilela del laboratorio de Malaria de la Universidad Cayetano Heredia.

### **5.3. Identificación de las posibles alteraciones de las proteínas ribosomales en células de cáncer silenciadas para WRN**

#### **5.3.1. Cultivo *in vitro* de células HeLa shCTR y shWRN**

Las células fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (*Biowest*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) y mantenidos a 37°C en una incubadora humidificada a 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **5.3.2. Desregulación de WRN con doxiciclina en HeLa shCTR y shWRN**

Las células shCTR y shWRN se trataron con doxiciclina (1.5 µg/ml) por 3 días para inducir la expresión del shARN. El nivel de desregulación de la proteína WRN se determinó mediante Western Blot usando el anticuerpo anti-Werner (*Bethyl*). Como control de carga se usó el anticuerpo anti-Tubulina (*Santa Cruz*).

### **5.3.3. Fraccionamiento celular**

Las células fueron tratadas 20 minutos con cicloheximida (CHX) a una concentración final de 100µg/ml. Luego, las células fueron colectadas y lavadas 3 veces con PBS suplementado con 100µg/ml CHX frío. El pellet celular se resuspendió en buffer de lisis hipotónico (10mM HEPES-KOH, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> 1.5, 10mM KCl, 1mM PMSF, 5mM β-GP, 1mM DTT, 1U/µl RNase Inhibitor Murine, 10µl/ml PIC, 100µg/ml CHX, pH 7.6), se incubó por 15 minutos en hielo y luego se agregó NP-40 a una concentración final de 0.1%, y se incubó finalmente por 10 minutos. El lisado celular se centrifugó a 4 000 RPM por 5 minutos a 4°C, se colectó el sobrenadante y se dio una última centrifugación a 13 000 RPM por 20 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante (fracción citoplasmática) mientras que el pellet se usó para extraer las proteínas de la fracción nuclear resuspendiendo el pellet con buffer hipotónico y NaCl a una concentración final de 420 mM.

De cada fracción (total, nuclear y citoplasmática) se tomaron alícuotas para el análisis por Western Blot o para la extracción de ARN total para su posterior análisis por RT-qPCR.

### **5.3.4. Obtención de la fracción polisomal**

La fracción polisomal se obtuvo a partir de la fracción citoplasmática por ultracentrifugación.

Los extractos citoplasmáticos se cargaron en un colchón de sacarosa al 30% (Buffer hipotónico, 30% Sacarosa libre de RNasas) y se centrifugaron a 46 000 RPM por 2 horas y 30 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Optima LE-80K, usando el rotor TLS-55 (*Beckman Coulter*). El pellet se lavó con 100 µl de buffer hipotónico y se resuspendió o bien en buffer de carga de proteínas (120mM Tris-HCl, 20% Glicerol, 4% SDS, 0.02% Azul de bromofenol, 1mM β-mercaptoetanol, pH 7.6) para el análisis por Western

Blot o en Trizol para la extracción de ARN total para el análisis por RT-qPCR.

### **5.3.5. Análisis de expresión génica de RPS6, RPL7a, RPS3 y G6PD por RT-qPCR a partir de ARN total**

El ARN total de las células HeLa shCTR y shWRN inducidas con doxyciclina por 3 días, fue extraído por el método de Trizol (*Thermo Fisher*) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los ARN totales extraídos fueron tratados con la enzima Turbo DNase (*Ambion*) y la síntesis del ADNc (RT) se realizó utilizando el kit Maxima First Strand ADNc Synthesis (*Thermo Fisher*) según el protocolo del fabricante.

Para la reacción de qPCR se utilizaron *primers* específicos para secuencias de ARN (Tabla 1). La reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ l con los siguientes reactivos: 1  $\mu$ l del producto de la reacción de transcripción inversa (ADNc), 5  $\mu$ l de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (*Thermo Fisher*), 0.5  $\mu$ l de cada primer (0.2  $\mu$ M de concentración final) y 3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. El termociclaje se optimizó a 40 ciclos (95°C, 60°C y 72°C) en un termociclador StepOne Real-Time PCR (*Applied Biosystems*), indicando líneas basales inversamente proporcionales al nivel de expresión de los genes de interés (Ct), las cuales fueron normalizadas utilizando los resultados de expresión de la enzima GAPDH en cada ensayo.

La maquinaria traduccional está compuesta por más de 150 proteínas ribosomales (Robledo *et al.*, 2008), por lo tanto estudiar todas estas proteínas sería muy complicado. Para este estudio se seleccionaron y utilizaron las siguientes proteínas ribosomales como marcadores: RPS3, RPS6 y RPL7a. Se ha demostrado que RPS3 interacciona directamente con WRN (Lachapelle *et al.*, 2011). RPS6 al igual que RPS3 son miembros de la subunidad pequeña 40S. Por su parte, RL7a es un miembro de la subunidad larga 60S y previamente se ha usado en ensayos de perfil

polisomal (Pedraz *et al.*, 2016). Por lo tanto se analizó la expresión de las proteínas ribosomales RPS6, RPL7a y RPS3 tras la depleción de WRN (shWRN).

### **5.3.6. Western Blot**

Las alícuotas de los extractos de proteínas de las inducciones del silenciamiento y del fraccionamiento se desnaturalizaron a 95°C por 3 minutos en presencia del tampón de carga. Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida y separadas mediante electroforesis a 100 V por 1 hora.

La transferencia se realizó en membranas de PVDF o nitrocelulosa con buffer carbonato de sodio (6.275 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.325 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), usando corriente eléctrica de 250 V por 1 hora y 20 minutos. Luego, la membrana se bloqueó en 5% de leche descremada (*SERVA*) en PBS-T (PBS 1x, 0.5 % Tween-20) por 1 hora a temperatura ambiente. La incubación de anticuerpos primarios (Tabla 2) se realizó por 8 horas a 4°C. Luego, la membrana fue lavada 3 veces con PBS-T por 5 minutos cada vez e incubada con el anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) por 1 hora a temperatura ambiente.

Para el revelado del Western Blot, se utilizó el kit de quimioluminiscencia *SERVALight* Polaris (*SERVA*) y exposición de las membranas a películas de rayos X.

## 5.4. Expresión la proteína recombinante WRN

### 5.4.1. Expresión de la proteína WRN por el sistema de baculovirus

#### 5.4.1.1. Clonación del vector pFastBac-His-WRN

Los experimentos de clonaje se realizaron utilizando el vector pFastBac-His (gentilmente cedido por el Dr. Lucio Comai), el cual es una modificación del vector comercial pFastBac1, el cual permite su transposición en el bácmido que contiene el genoma de baculovirus, permitiendo su expresión (Figura 8) (*Thermo Fisher*) y que contiene la secuencia de las colas de histidina (6-His) en la región N-terminal y el nuevo sitio de restricción *NdeI*, con la finalidad de que el inserto siempre este en pauta de lectura con el codón de inicio (ATG) de *NdeI*.

El ADNc de WRN se obtuvo digiriendo el vector pRRLs-Flag-WRN (Dr. Lucio Comai) con las endonucleasas de restricción *NdeI* y *XhoI* para luego ligarlo en el vector pFastBac-His en los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* utilizando la enzima T4 ligasa (*New England Biolabs*) a 16°C por 8 horas. Posteriormente, el producto de la ligación fue usado para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  (*New England Biolabs*) por choque térmico. Los clones transformados fueron aislados y purificados utilizando el kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (*Thermo Fisher*).

Los plásmidos de los clones positivos fueron confirmados por digestión con endonucleasas de restricción y fueron enviados a *MacroGen Sequencing Service* (*MacroGen*) para confirmar la correcta inserción del gen WRN y la ausencia de posibles mutaciones.

#### **5.4.1.2. Transformación y transposición del vector pFastBac-His-WRN en bacterias *E.coli* DH10Bac**

El vector generado pFastBac-His-WRN se usó para transformar bacterias *E.coli* DH10Bac (*Thermo Fisher*) por choque térmico y luego se incubaron en placas de LB para bacterias DH10Bac (50µg/ml Kanamicina, 7 µg/ml Gentamicina, 10 µg/ml Tetraciclina, 100 µg/ml X-gal, 40 µg/ml IPTG) a 37°C por 48 horas. La selección de las colonias transformadas se realizó por el método *Blue/White screening* (*Thermo Fisher*), aislando las colonias blancas.

Las colonias positivas fueron repicadas en cultivos líquidos de 3 ml e incubadas a 37°C y 250 RPM hasta alcanzar la saturación del cultivo (12 horas) con el fin de amplificar el plásmido de interés.

Las bacterias se colectaron y se resuspendieron en buffer de Solución I (15mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A, pH 8.0), posteriormente se añadió la Solución II (0.2 M NaOH, 1% SDS), luego se agregó NaCl (5 M) a la mezcla y se centrifugó a 14 000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se colectó y se le agregó isopropanol, se incubó por 2 horas a -20°C y se centrifugó a 14 000 g por 15 minutos. El pellet se lavó 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió en buffer TE.

La presencia del gen WRN en el ADN bacmial purificado se confirmó por PCR.

#### **5.4.1.3. Generación de los baculovirus recombinantes WRN**

Las células Sf9 se cultivaron en medio Sf-900 II (*Gibco*) completo (Sf-900 II, SFB 10%, P/S 1%) y se mantuvieron en una incubadora a 28°C. Las células se cultivaron a una confluencia del 70%.

La transfección se realizó incubando la solución A (100 µl de medio Sf-900 II y 6 µl de Cellfectin II (*Thermo Fisher*)) con la solución B (100 µl de medio Sf-900 II y 5 µl del ADN bacmial recombinante) por 30 minutos a

temperatura ambiente. La mezcla se añadió al cultivo celular y se incubó a 15 RPM por 5 horas a temperatura ambiente. Luego de la incubación se retiró la mezcla, se añadió medio fresco Sf-900 II completo y se incubaron a 28°C por 5 días o hasta observar signos de infección (células desprendidas de la superficie de la placa, células de mayor dimensión o hinchadas, núcleos grandes y detención de la división celular).

Las células infectadas se colectaron y se analizó la presencia de la proteína WRN por Western Blot, mientras que el sobrenadante que posee los virus recombinantes His-WRN se amplificó infectando nuevas células Sf9.

#### **5.4.1.4. Obtención de la proteína WRN soluble**

Las células fueron precipitadas, resuspendidas y lisadas en buffer nativo completo (500 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 5 mM β-GP, 1 mM DTT, 1U/μl RNase Inhibitor Murine, 10μl/ml PIC, pH 8.0) por 10 minutos y la suspensión se centrifugó a 30 000 g por 30 minutos a 4°C.

#### **5.4.1.5. Cromatografía de afinidad con níquel (Ni<sup>2+</sup>)**

Por cada 1 ml de extracto celular fue adicionado 100 μl de resina ProBond (*Thermo Fisher*) previamente equilibrada con buffer nativo y bloqueada con BSA al 2.5%, manteniéndolo en agitación por 2 horas a 4°C. Posteriormente la incubación fue centrifugada a 500 RPM por 2 minutos. La resina conteniendo la proteína de fusión de interés fue usado para los siguientes pasos de purificación y se descartó el sobrenadante. La resina conteniendo la proteína de fusión de interés fue lavada en agitación con 10 ml volúmenes de buffer nativo y 25 mM de Imidazol. Se tomó una pequeña alícuota se almacenó para su análisis por Western Blot y tinción de nitrato de plata.

Tras la confirmación de la captura de la proteína recombinante His-WRN por la resina de Ni, se procedió a eluir la proteína de interés con 1 ml de

buffer de elución (500 mM NaCl , 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 250 mM Imidazol, pH 8.0) en una columna. Una pequeña alícuota se tomó para su análisis por Western Blot y por tinción con nitrato de plata.

Para realizar los ensayos enzimáticos, la proteína purificada fue dializada en tubos de diálisis Tube-O-Concentrator (G-Biosciences) hasta obtener un volumen aproximado de 200 µl. La concentración final de la proteína se determinó por tinción con nitrato de plata.

#### **5.4.1.6. Determinación de la actividad enzimática de la proteína WRN por la reacción de helicasa**

Para la reacción de helicasa se utilizaron *primers* parcialmente complementarios (Brosh, 2002) (Tabla 3).

Los *primers* se anillaron en buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8.0) a 95°C por 3 minutos y luego se enfrió lentamente la reacción hasta llegar a la temperatura ambiente. Los *primers* parcialmente anillados se corrieron en un gel de agarosa al 5% y se purificaron usando el kit GeneJET Gel Extraction (*Thermo Fisher*).

La reacción de helicasa se realizó en buffer de helicasa (30mM HEPES, 5% Glicerol, 40mM KCl, 0.1 µg/µl BSA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM ATP, 5 µM *Primers* y concentraciones crecientes de la proteína WRN), y se incubó a 37°C por 15 minutos. La reacción se corrió en un gel de agarosa al 5% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa con buffer SSC 20x (3M NaCl, 0.3 M Citrato de sodio, pH 7.5). La membrana se bloqueó con PBS-T con leche descremada al 5% y se incubó con el anticuerpo anti-Estreptavidina-HRP (*Abcam*).

Se utilizó el kit de quimioluminiscencia SERVALight Polaris para revelar las membranas con películas de rayos X.

## 5.4.2. Expresión de WRN en el sistema de transcripción/ traducción *in vitro*

### 5.4.2.1. Clonación del vector pT7-IRES-WRN

La clonación se realizó utilizando el vector pT7-IRES por 2 etapas de subclonajes.

En la primera se clonó la región de 141 a 4299 pbs del gen WRN. El fragmento de WRN (141-4299 bps) se obtuvo digiriendo el vector pRRLs-Flag-WRN con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Luego, se realizó la ligación utilizando la enzima T4 ligasa (*New England Biolabs*) a 16°C por 8 horas. El producto de la ligación se transformó en bacterias competentes *E. coli* DH5α por choque térmico. Los clones transformados fueron aislados y purificados utilizando el kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (*Thermo Fisher*). La confirmación del inserto del ADNc de WRN se realizó por digestión con enzimas de restricción.

En la segunda etapa se realizó una PCR utilizando los *primers* específicos: *Forward*: 5'-CATGCCCATGGGAATGAGTGAAAAAAATTGGAAACAAC-3' y *Reverse*: 5'-CAAGCAACATTTTTAATCCCTG-3, la polimerasa Q5 High Fidelity DNA polymerase (*New England Biolabs*) y como molde de ADN el vector pRRLs-Flag-WRN. El producto de la PCR se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *EcoRI*. El fragmento de 141 bps se ligó en el vector generado pT7-IRES-WRN (141-4299 bps) utilizando la enzima T4 ligasa (*New England Biolabs*) a 16°C por 8 horas. El producto de la ligación se transformó en bacterias competentes *E. coli* DH5α por choque térmico. Los clones transformados fueron aislados y purificados utilizando el kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (*Thermo Fisher*).

La confirmación del inserto del ADNc completo de WRN se realizó por digestión con enzimas de restricción y fueron enviados a *MacroGen Sequencing Service (MacroGen)* para confirmar la correcta inserción del ADNc de WRN y la ausencia de posibles mutaciones.

#### **5.4.2.2. Linearización del plásmido pT7-IRES-WRN**

Con el fin de facilitar la transcripción de las construcciones en el ensayo de transcripción/traducción *in vitro*, los plásmidos fueron linearizados por digestión con enzimas de restricción en regiones que no comprometan secuencias de los promotores o los genes a transcribir.

La concentración final se determinó utilizando el espectrofotómetro Lambda 3-1 (*PCRmax*).

#### **5.4.2.3. Reacción de transcripción y traducción *in vitro***

Con el fin de expresar la proteína de WRN en un sistema humano *in vitro*, se realizó la reacción de transcripción y traducción *in vitro* como sigue: 9  $\mu$ l de lisado comercial del kit (25mg/ml), 6  $\mu$ l de Mixtura-1, 1  $\mu$ l de Mixtura-2, 2  $\mu$ l de Mixtura-3, 1  $\mu$ l de plásmido linearizado pT7-IRES-WRN (0.15  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l T7 RNA polimerasa), en agitación a 32°C por 2 horas.

### **5.5. Ensayo de recuperación de la traducción usando WRN expresado exógenamente**

#### **5.5.1. Preparación de extractos celulares usados el sistema de transcripción y traducción *in vitro* (TnT)**

Para la traducción *in vitro* se lisaron células HeLa shCTR y shWRN con 3 días de tratamiento con doxiciclina en buffer hipotónico (10mM HEPES, 10mM KAc, 0.5mM MgAc, 1 $\mu$ l/100 $\mu$ l PIC, 5mM DTT, pH 7.6) por 1 hora. El lisado se centrifugó a 13 000 g por 3 minutos. Se colectó el sobrenadante y se almacenaron alícuotas de 20  $\mu$ l a -80°C.

### **5.5.2. Amplificación de los vectores reporteros**

Para los ensayos de traducción *in vitro* se utilizaron los vectores reporteros pTEV-Luc y pTEV-Ren (cedidos gentilmente por la Dra. Katalin Karikó), que codifican las enzimas bioluminiscentes luciferasa Firefly (Luc) y luciferasa Renilla (Ren) respectivamente.

Los plásmidos se amplificaron en bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  y se purificaron usando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (*Thermo Fisher*). Los plásmidos se confirmaron por digestión con enzimas de restricción.

### **5.5.3. Linearización de los plásmidos**

Con el fin de facilitar la transcripción de las construcciones en el ensayo de transcripción/traducción *in vitro*, los plásmidos fueron linearizados por digestión con enzimas de restricción en regiones que no comprometan secuencias de los promotores o los genes a transcribir.

Los plásmidos linearizados fueron desfosforilados para evitar la religación, utilizando la enzima rSAP (*New England Biolabs*) a 37°C por 1 hora. Posteriormente, los plásmidos fueron purificados utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (*Thermo Fisher*).

La concentración final de los plásmidos linearizados y desfosforilados se determinó utilizando el espectrofotómetro Lambda 3-1 (*PCRmax*).

### **5.5.4. Reacción de TnT *in vitro***

Los niveles de expresión en los extractos celulares HeLa shCTR y shWRN se determinaron mediante el ensayo de transcripción/traducción *in vitro* utilizando el kit Human Cell-Free Protein Expression System (*Takara, Clontech*).

La reacción se realizó como sigue: 9  $\mu$ l de lisado celular (25mg/ml), 6  $\mu$ l de Mixtura-1, 1  $\mu$ l de Mixtura-2, 2  $\mu$ l de Mixtura-3, 1  $\mu$ l de plásmido linearizado (0.15  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l T7 RNA polimerasa), en agitación a 32°C por 2 horas.

La reacción de luminiscencia se realizó utilizando el kit Dual Luciferase (*Promega*) y se cuantificó en un luminómetro de tubo FB14 (*Titertek Berthold*).

## VI. RESULTADOS

### **6.1. Desregulación de la proteína WRN en células HeLa**

El análisis por Western Blot tras la inhibición de la proteína de WRN muestra que, las células HeLa portadoras de la construcción de silenciamiento shWRN contienen menos de expresión de WRN comparadas con las células control (shCTR), tras ser inducidas con dox por 3 días, (Figura 9). El análisis de las intensidades obtenidas utilizando el programa ImageJ (NIH) muestra una desregulación de más del 80% (14.84 %) de la proteína WRN comparada con las muestras control (Figura 10).

### **6.2. Expresión de la histona $\gamma$ -H2A.X como marcador de daño al ADN**

Se analizó la expresión del marcador de ruptura del ADN  $\gamma$ -H2A.X por Western Blot en células shWRN y shCTR (Figura 11). El análisis muestra que tras el silenciamiento de WRN no existen diferencias significativas en la expresión de  $\gamma$ -H2A.X entre las células desreguladas para WRN (91.26%) y las células control (100%), en los tiempo analizados en el que WRN se reduce hasta en un 80% comparados con las células shCTR (Figura 12).

### **6.3. Distribución espacial de la proteína WRN**

Las fracciones subcelulares obtenidas de células HeLa (nuclear, citoplasmática y polisomal) fueron analizadas mediante Western Blot. La eficacia del fraccionamiento se confirmó mediante el uso del marcador nuclear específico Lamin A/C y el marcador citoplasmático específico

Tubulina (Figura 13A). Se detectó la presencia de la proteína WRN en el citoplasma, la cual también es detectada posteriormente en la fracción polisomal (Figura 13A, B).

#### **6.4. Integridad de los ARN purificados de shCTR y shWRN**

Se analizó la integridad de los ARN obtenidos mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % y tinción con bromuro de etidio con el fin de determinar que los ARN purificados están en condiciones óptimas (no degradados) para realizar sin inconvenientes los siguientes pasos que incluyen la síntesis de ADNc y los análisis de qPCR, la integridad del ARN.

Los ARN obtenidos mostraron excelentes niveles de integridad tras la corrida electroforética (Figura 14).

#### **6.5. Tratamiento de los ARN con DNAsa**

Los ARN purificados fueron tratados con DNase I (*Ambion*) para eliminar la posible contaminación de ADN en las muestras obtenidas de ARN. Para confirmar la ausencia de contaminación genómica, se realizó una PCR utilizando estos ARN tratados y primers específicos para ADN ( $\beta$ 2M con un amplicón de 90 bps). La reacción de PCR sobre el ARN tratado con DNase I demostró que los ARN usados posteriormente para los análisis por qPCR no presentaron contaminación con ADN (Figura 15).

## **6.6. Expresión génica de los ARNm totales de RPS6, RPL7a y RPS3 en células HeLa shWRN**

Se realizó un análisis por RT-qPCR de los transcritos a partir de ARN total para estudiar la posible alteración de estos genes tras la depleción de WRN. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en la expresión de los ARNm de RPS6, RPL7a y RPS3 en células shWRN, en relación a las células shCTR. (Figura 16).

## **6.7. Niveles de expresión proteica de las proteínas ribosomales RPS6, RPL7a y RPS3 en células HeLa shWRN**

Se realizó un análisis por Western Blot con el fin de determinar posibles alteraciones en los niveles de las proteínas ribosomales que forman parte de los complejos ribosomales e implicadas en los procesos de síntesis proteica. Los resultados de la expresión de las proteínas totales RPS6, RPL7a no muestran diferencias significativas. Sin embargo, la proteína ribosomal RPS3 muestra una ligera sobreexpresión en células carentes de WRN con relación a las células control (142.7 %) (Figura 17, 18).

## **6.8. Expresión génica de los ARNm de G6PD, IDH1, y RPS3 en la fracción polisomal**

Se analizó la fracción polisomal mediante RT-qPCR de los ARNm que codifican las proteínas metabólicas G6PD e IDH1 con el fin de determinar si la depleción de WRN podría alterar la carga de los ARNm en los polisomas. Los resultados muestran que, no existe diferencia significativa en la abundancia de los ARNm de G6PD y RPS3 en las células deplecionadas para WRN en relación a células shCTR, Sin embargo, el gen

IDH1 analizado muestra un aumento ~3 veces (326 %) más en comparación a las células control. (Figura 19).

## **6.9. Análisis de la integridad de los ARNr 28S, 18S y 5.8S tras la depleción de WRN**

Se analizó los niveles de ARN ribosomales (ARNr) por medio de RT-qPCR con el fin de analizar si existía alteraciones en los niveles de abundancia de los ARNr tras el silenciamiento de WRN. Los resultados obtenidos a partir de los ARN purificados de la fracción polisomal de células shWRN y shCTR muestran que no existen diferencias significativas en la expresión de dichos transcritos (Figura 20). Por lo que la alteración de la síntesis de proteínas no podría deberse a una alteración en la biogénesis de los ARN ribosomales ni a un defecto en la abundancia de estas especies en los ribosomas.

## **6.10. Expresión de WRN en el sistema de baculovirus**

### **6.10.1. Clonación del vector pFastBac-His-WRN**

Se diseñó el mapa de la construcción pFastBac-His-WRN para obtener los nuevos sitios de restricción y sus tamaños respectivos generados por la adición del gen WRN (Figura 21A). De las 5 colonias analizadas para determinar la presencia del gen WRN en el vector pFastBac-His mediante restricción enzimática; todas presentaron el gen WRN insertado en el vector pFastBac-His; es decir estos 5 plásmidos presentaron las bandas de 7.5 kbs, 910 bps y 514 bps, luego de la digestión con la enzima *HindIII* (Figura 21B).

### **6.10.2. Aislamiento del ADN bacmial recombinante y análisis por PCR**

Se aisló el báculo recombinante a partir de 6 colonias de bacterias DH10Bac con fenotipo positivo (colonias blancas). El análisis por PCR utilizando los primers específicos *Forward*: 5'-CATGCCATGGAATGAGTGAAAAAATTGGAAACAAC-3' y *Reverse*: 5'-CAAGCAACATTTTAAATCCCTG-3, confirmó la inserción del gen WRN dentro del genoma del ADN bacmial demostrado por la presencia de una banda de 385 bps (Figura 22).

### **6.10.3. Expresión y purificación de la proteína WRN por el sistema de baculovirus**

Tras la infección de las células de insecto Sf9 con los baculovirus recombinantes His-WRN, se observó la presencia de la proteína WRN recombinante mediante análisis por Western Blot utilizando 2 diferentes anticuerpos, anti-WRN (Figura 23A) y anti-histidinas (His-tag) (Figura 23B). Como control del análisis se utilizaron células Sf9 sin infectar.

La proteína WRN fue purificada por cromatografía de afinidad en presencia de 30 mM de Imidazol. El análisis de la captura de la proteína recombinante His-WRN con la resina de Ni<sup>2+</sup>NTA fue realizada mediante SDS-PAGE y tinción de plata (Figura 24A). Posteriormente, la proteína recombinante His-WRN unida a la resina fue eluida en 6 diferentes fracciones, las que fueron confirmadas por el análisis de Western Blot utilizando el anticuerpo específico contra WRN (Figura 24B). Estas fracciones fueron juntadas y la pureza de la proteína WRN fue confirmada por SDS-PAGE y tinción de plata (Figura 24C).

#### **6.10.4. Ensayo de la actividad helicasa de WRN**

El ensayo de helicasa no mostró actividad enzimática de la proteína recombinante WRN purificada del sistema de baculovirus en ninguna de las cantidades crecientes de proteína en las diferentes reacciones incubadas (Figura 25).

### **6.11. Expresión de WRN utilizando el sistema de transcripción/traducción *in vitro***

#### **6.11.1. Clonación del vector pT7-IRES-WRN**

Se diseñó el mapa de la construcción pT7-IRES-WRN para obtener los nuevos sitios de restricción y sus tamaños respectivos generados por la adición del gen WRN (Figura 26A). De las 6 colonias analizadas para determinar la presencia del gen WRN en el vector pT7-IRES mediante restricción enzimática; todas presentaron el gen WRN insertado en el vector pT7-IRES; es decir estos 6 plásmidos presentaron las bandas de 5618 bps y 1982 bps, luego de la digestión con la enzima *XbaI*; y las bandas de 4758 bps y 2842 bps, tras la digestión con la enzima *NcoI* (Figura 26B).

#### **6.11.2. Expresión de la proteína WRN por el sistema de transcripción/traducción *in vitro***

El plásmido pT7-IRES-WRN fue linearizado utilizando la enzima *NdeI*, debido a que realiza un solo corte y no compromete ni los promotores de transcripción o traducción, ni al gen de WRN. La reacción de transcripción/traducción *in vitro* fue incubada a 32°C por 3 horas (según recomendación del fabricante). Se tomaron alícuotas en el tiempo 0 horas y tras las 3 horas de incubación de la reacción. La sobreexpresión de WRN en el sistema *in vitro* fue confirmado por Western Blot utilizando el

anticuerpo específico WRN y usando el anticuerpo anti-Tubulina como control de carga (Figura 27).

## **6.12. Reacción de transcripción/ traducción *in vitro* utilizando extractos celulares derivados de shCTR y shWRN**

### **6.12.1. Extractos citoplasmáticos de HeLa shCTR y shWRN**

Los extractos de citoplasmáticos fueron obtenidos de células HeLa shCTR y shWRN inducidas previamente con dox por 3 días. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford utilizando BSA como estándar. La concentración de proteína se igualó a 25 mg/ml en ambos casos y fue confirmada la equivalencia de concentración en ambos extractos celulares por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Figura 28).

### **6.12.2. Reacción de transcripción/traducción *in vitro***

Se realizó los ensayos de transcripción/traducción *in vitro* con el fin de determinar las capacidades de síntesis proteica mediante un análisis cuantitativo de los niveles de expresión de los extractos citoplásmicos de shWRN usando los plásmidos reporteros pTEV-Luc y pTEV-Ren, los cuales expresan las proteínas Firefly luciferasa y Renilla luciferasa respectivamente (Figura 29).

Los resultados del ensayo y posterior análisis muestra que, existe una disminución de la traducción de las proteínas reporteras utilizando los extractos citoplásmicos derivados de células silenciadas para WRN (35.12%) en comparación con el control (100%) (Figura 30).

El experimento utilizando el inhibidor NSC 19630 mostró una reducción en la capacidad de síntesis en shCTR + NSC 19630 (32.5 %) en comparación a las células control sin el inhibidor. (Figura 31).

Con el fin de demostrar que la proteína WRN está implicada en la síntesis de proteínas, extractos citoplásmicos derivados de células silenciadas para WRN fueron enriquecidas con la proteína WRN expresada *in vitro*. El análisis de los resultados no mostró una recuperación significativa de la traducción en los extractos shWRN suplementados con proteína WRN recombinante expresada por el sistema de transcripción/traducción *in vitro* (44.15%) (Figura 32).

## VII. DISCUSIÓN

La proteína WRN es una de las proteínas comúnmente denominadas guardianes del genoma debido a sus características y funciones relacionadas con el ADN, sin embargo existen indicios que relacionan a esta proteína con la traducción de proteínas.

En las células cancerígenas (incluyendo a las células HeLa) se genera un incremento del ROS haciéndolas vulnerables al estrés oxidativo y del daño al ADN. Sin embargo, éstas células poseen los mecanismos necesarios para contrarrestar estos eventos a diferencias de las células normales (Trachootham *et al.*, 2009). La expresión de la histona  $\gamma$ -H2A.X es considerada un marcador del estrés oxidativo y de la ruptura de la doble hebra del ADN (DSB) (Kuo y Yang, 2009). Estudios realizados en células HeLa deplecionadas para WRN tras 5 días de inducción lentiviral, demostraron una alteración en los niveles de 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHdG) y de  $\gamma$ -H2AX, indicando que la reducción de la capacidad redox después de la desregulación de WRN conduce a la acumulación de daño oxidativo y a la rotura del ADN (Li *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación en células HeLa deplecionadas para WRN, tras 3 días de inducción lentiviral, no mostraron cambios significativos en los niveles de  $\gamma$ -H2AX (Figura 11, 12), indicando que se logró capturar eventos tempranos previos a la respuesta al daño oxidativo al ADN causado por ROS o el DDR.

Muy pocos estudios han evidenciado la presencia de WRN en fracciones citoplasmáticas de células humanas (von Kobbe *et al.*, 2002, Pedraz *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en el presente trabajo también demuestran la presencia de WRN en la fracción citoplasmática de células HeLa, la cual se ve enriquecida en la fracción polisomal. La carencia de señal en el citoplasma y en la fracción polisomal utilizando el anticuerpo anti Lamin

A/C, indica que el fraccionamiento ha sido limpio, y que las señales extra nucleares para WRN, no es debido a una contaminación por ruptura de los núcleos (Figura 13). Estos datos refuerzan la idea de que WRN podría cumplir un papel en la traducción debido a su asociación con los ribosomas, junto al hecho de que recientes estudios realizados mediante inmunoprecipitación, han demostrado una relación entre la proteína WRN y RPS3 (Lachapelle *et al.*, 2011).

La posible alteración en la síntesis de proteínas a consecuencia del silenciamiento de WRN llevó a plantear que dicho defecto podría deberse a una alteración en la abundancia de los ARNm de proteínas ribosomales como la S3, S6 y L7a o las propias proteínas *per se*. Los resultados obtenidos en este trabajo mediante RT-qPCR permite descartar a la expresión génica como la posible causa de la deficiencia en síntesis proteica tras la depleción de WRN (Figura 16), reforzando la idea de que al no existir cambios a nivel en la transcripción, las alteraciones podrían darse a nivel traduccional.

Dado que el análisis por RT-qPCR de las proteínas ribosomales no mostró evidencia sobre el posible mecanismo por el cual la depleción de WRN podría alterar la síntesis global de proteínas, se decidió estudiar mediante Western Blot los niveles de sus productos génicos. Se observó un incremento de la expresión de RPS3 en células deplecionadas para WRN, sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en los ARNm de RPS6 y RPL7A (Figura 17, 18), lo que indica que la alteración en la síntesis global de proteínas no es debido a un defecto en las proteínas ribosomales S6 y L7a tras el silenciamiento de WRN. La sobreexpresión de RPS3 observada posiblemente se deba a la actividad endonucleasa involucrada en el reconocimiento oxidativo del ADN en células carentes de WRN, previo a la respuesta de daño al ADN o DDR ocasionado por ROS (Yadavilli *et al.*, 2007). Estos datos en su conjunto sugieren que la depleción de WRN no altera la síntesis de proteínas a consecuencia de una disminución de componentes clave para la traducción.

Se ha demostrado en estudios previos que no hay cambios en la abundancia de los ARNm de las proteínas metabólicas G6PD y IDH1 a partir de los ARN obtenido de extractos totales de células HeLa, tras el silenciamiento de WRN (Li *et al.*, 2014). Así mismo, no hay evidencia científica publicada de algún defecto en la carga de dichos ARNm sobre los ribosomas y que afecte la correcta síntesis de las proteínas. En este estudio se analizó el ARN obtenido de la fracción polisomal de células deplecionadas para WRN debido a su directa relación con la maquinaria traduccional. Los resultados obtenidos tampoco evidenciaron diferencias significativas en la expresión de los ARNm de las proteínas metabólicas G6PD en los ARN obtenidos de la fracción polisomal de células HeLa deplecionadas para WRN. Sin embargo, se observó que el transcrito correspondiente al gen IDH1 muestra un aumento de ~3 veces en comparación a las células control (Figura 19). Estudios previos han evidenciado la acción directa de IDH1 para mitigar el ROS (Jiang *et al.*, 2016). Por lo tanto, la sobreexpresión de IDH1 en células deplecionadas para WRN podría ser explicada como un mecanismo de respuesta celular frente a la carencia de una respuesta al ROS.

La presencia de WRN en el nucleolo está relacionada con la biogénesis de los ARN ribosomales y en fibroblastos derivados de pacientes con WS se mostró un nivel disminuido de la transcripción de ARNr debido a la falta de WRN (Shiratori *et al.*, 2002). Al analizar las subunidades ribosomales 28S, 18S y 5.8S, mediante RT-qPCR, para descartar que la depleción de WRN sea responsable de la alteración de los niveles de ARNr, se observó que no existe una alteración en los niveles de expresión de dichos ARNr en células HeLa deplecionadas para WRN, comparadas con las líneas control, indicando que la depleción de WRN no altera la expresión de las unidades ribosomales 28S, 18S y 5.8S (Figura 20). Estos datos en su conjunto sugieren que la depleción de WRN altera la síntesis global de proteínas por un mecanismo distinto a la alteración de la expresión génica y a la biogénesis de los ribosomas.

La expresión de WRN recombinante ha sido ampliamente descrita en el sistema baculovirus y el método más eficiente para demostrar la actividad enzimática de la misma es el ensayo de helicasa utilizando cebadores marcados radiactivamente (Suzuki *et al.*, 1997, Li *et al.*, 2004, Tadokoro *et al.*, 2012). En el presente trabajo se logró expresar y purificar con éxito la proteína WRN por el sistema de baculovirus (Figura 23), sin embargo, no se logró evidenciar que la proteína purificada estuviera enzimáticamente activa debido a que el ensayo de helicasa que usamos con el sustrato marcado con biotina requería grandes cantidades (aproximadamente entre 100ng) para poder visualizarlo y posiblemente saturara la reacción (Figura 25), por otro lado, muchos estudios de la actividad helicasa de WRN utilizan marcaje radioactivo requiriendo cantidades mínimas de sustrato (0.5 nM) y haciendo mucho más fácil la visualización y lectura de la reacción (Brosh *et al.*, 2002) . Por lo tanto, se optó por utilizar el sistema de traducción y transcripción *in vitro*, debido a que utiliza todos los componentes necesarios para nuestros ensayos posteriores y a que es realizada en una simple incubación evitando inactivar a WRN (Figura 27).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de transcripción y traducción *in vitro* se demostró que WRN es necesaria para la traducción de proteínas. Los datos obtenidos muestran una deficiencia en la síntesis de proteínas en extractos de células carentes de WRN, en comparación a su control (Figura 30). Además, el uso del inhibidor NSC-1930 (inhibidor de la actividad helicasa de WRN) redujo significativamente la síntesis de proteínas (Figura 31). Sin embargo, no se pudo revertir el defecto de síntesis proteica en la expresión de proteínas en los ensayos de reinserción utilizando la proteína de WRN expresada exógenamente (Figura 32). Estudios previos demostraron que el agotamiento de WRN induce una reducción significativa de la síntesis de proteínas *de novo* utilizando marcaje con Metionina 35S (Pedraz *et al.*, 2015). Por lo tanto, este estudio evidencia por primera vez el requerimiento de WRN en la maquinaria de síntesis de proteínas y además una relación entre la actividad helicasa de WRN con la síntesis de proteínas.

## VIII.CONCLUSIONES

- Una pequeña fracción de WRN se localiza en el citoplasma asociada a la maquinaria traduccional.
- La depleción de WRN no altera la expresión de los ARNm y las proteínas que codifican a las proteínas ribosomales RPS3, RPS6 y RPL7A.
- El aumento de los niveles de expresión de los ARNm de IDH1 y de la proteína RPS3 en células deplecionadas de WRN se presenta como un mecanismo de respuesta celular frente a la carencia de una respuesta al ROS.
- La depleción de WRN no altera la abundancia de los ARN ribosomales.
- La proteína de WRN presenta una función en la traducción de proteínas al comparar los niveles de traducción de proteínas reporteras en células HeLa shWRN y shCTR, y mediante el uso del inhibidor de la actividad helicasa de WRN (NSC 19630).

## IX. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS

1. Bachrati, C. Z., & Hickson, I. D. (2003). RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochemical Journal*, 374(3), 577-606.
2. Bhat M, Rabichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J, Topisirovic I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 261-278, doi: 10.1038/nrd4505.
3. Brosh, R. M., Waheed, J., & Sommers, J. A. (2002). Biochemical characterization of the DNA substrate specificity of Werner syndrome helicase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23236-23245.
4. Bobbin, M. L., Burnett, J. C., & Rossi, J. J. (2015). RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection. *Genome medicine*, 7(1), 50.
5. Chu, W. K., & Hickson, I. D. (2009). RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nature Reviews Cancer*, 9(9), 644-654.
6. Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561
7. Cobb, J. A., & Bjergbaek, L. (2006). RecQ helicases: lessons from model organisms. *Nucleic acids research*, 34(15), 4106-4114.
8. De Falco, S., Russo, G., Angiolillo, A., & Pietropaolo, C. (1993). Human L7a ribosomal protein: sequence, structural organization, and expression of a functional gene. *Gene*, 126(2), 227-235.
9. Deutsch, W. A., Yacoub, A., Jaruga, P., Zastawny, T. H., & Dizdaroglu, M. (1997). Characterization and Mechanism of Action of Drosophila Ribosomal Protein S3 DNA Glycosylase Activity for the Removal of

Oxidatively Damaged DNA Bases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 32857-32860.

10. Ebert, B. L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C. Y., Tamayo, P., Galili, N., ... & Golub, T. R. (2008). Identification of RPS14 as a 5q-syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*, 451(7176), 335-339.
11. Goto, M., Miller, R. W., Ishikawa, Y., & Sugano, H. (1996). Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 5(4), 239-246.
12. Goto, M., Rubenstein, M., Weber, J., Woods, K., & Drayna, D. (1992). Genetic linkage of Werner's syndrome to five markers on chromosome 8. *Nature*, 355(6362), 735-738.
13. Gray, M. D., Shen, J. C., Kamath-Loeb, A. S., Blank, A., Sopher, B. L., Martin, G. M., ... & Loeb, L. A. (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nature genetics*, 17(1), 100-103.
14. Hisama, F. M., Bohr, V. A., & Oshima, J. (2006). WRN's tenth anniversary. *Science's SAGE KE*, 2006(10), pe18.
15. Hu, J. S., Feng, H., Zeng, W., Lin, G. X., & Xi, X. G. (2005). Solution structure of a multifunctional DNA-and protein-binding motif of human Werner syndrome protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18379-18384
16. Huang, S., Lee, L., Hanson, N. B., Lenaerts, C., Hoehn, H., Poot, M., ... & Dorn, T. (2006). The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Human mutation*, 27(6), 558-567
17. Huang, S., Li, B., Gray, M. D., Oshima, J., Mian, I. S., & Campisi, J. (1998). The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→ 5' exonuclease. *Nature genetics*, 20(2), 114-116.

18. Jackson, D. A., Symons, R. H., & Berg, P. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(10), 2904-2909
19. Jackson, R. J., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(2), 113-127.
20. Jang, T. H., Park, J. H., Jeon, J. H., Lee, D. S., Choi, K., Kim, I. G., ... & Park, H. H. (2011). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the N-terminal domain of human ribosomal protein L7a (RPL7a). *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(4), 510-512.
21. Jiang, L., Shestov, A. A., Swain, P., Yang, C., Parker, S. J., Wang, Q. A., ... & Schmidt, S. (2016). Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature*, 532(7598), 255-258
22. Karmakar, P., & Bohr, V. A. (2005). Cellular dynamics and modulation of WRN protein is DNA damage specific. *Mechanisms of ageing and development*, 126(11), 1146-1158
23. Kay, M. A., Glorioso, J. C., & Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature medicine*, 7(1), 33-40.
24. Kawabe, Y. I., Seki, M., Seki, T., Wang, W. S., Imamura, O., Furuichi, Y., ... & Enomoto, T. (2000). Covalent modification of the Werner's syndrome gene product with the ubiquitin-related protein, SUMO-1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 20963-20966

25. Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I. J., Stahl, J., & Anderson, P. (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA<sup>i</sup> Met)-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Molecular biology of the cell*, 13(1), 195-210
26. Kitano, K. (2014). Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM. *Frontiers in genetics*, 5
27. Kusumoto, R., Muftuoglu, M., & Bohr, V. A. (2007). The role of WRN in DNA repair is affected by post-translational modifications. *Mechanisms of ageing and development*, 128(1), 50-57.
28. Kuo LJ, Yang LX (2009). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008 May-Jun;22(3):305-9.
29. Lachapelle, S., Gagné, J. P., Garand, C., Desbiens, M., Coulombe, Y., Bohr, V. A., ... & Lebel, M. (2011). Proteome-wide identification of WRN-interacting proteins in untreated and nuclease-treated samples. *Journal of proteome research*, 10(3), 1216-1227
30. Li, B., Navarro, S., Kasahara, N., & Comai, L. (2004). Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 13659-13667.
31. Li B, Iglesias-Pedraz JM, Chen LY, Yin F, Cadenas E, Reddy S, Comai L. (2014). Downregulation of the Werner syndrome protein induces a metabolic shift that compromises redox homeostasis and limits proliferation of cancer cells. *Aging cell* 13, 367-378.
32. Liu, Z., Macias, M. J., Bottomley, M. J., Stier, G., Linge, J. P., Nilges, M., ... & Sattler, M. (1999). The three-dimensional structure of the HRDC domain and implications for the Werner and Bloom syndrome proteins. *Structure*, 7(12), 1557-1566.

33. López-Lastra, M., Ramdohr, P., Letelier, A., Vallejos, M., Vera-Otarola, J., & Valiente-Echeverría, F. (2010). Translation initiation of viral mRNAs. *Reviews in medical virology*, 20(3), 177-195
34. Mager, W. H. (1988). Control of ribosomal protein gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 949(1), 1-15.
35. Mann, M., & Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology*, 21(3), 255
36. Martin, G. M., & Oshima, J. (2000). Lessons from human progeroid syndromes. *Nature*, 408(6809), 263-266
37. Massip, L., Garand, C., Turaga, R. V., Deschênes, F., Thorin, E., & Lebel, M. (2006). Increased insulin, triglycerides, reactive oxygen species, and cardiac fibrosis in mice with a mutation in the helicase domain of the Werner syndrome gene homologue. *Experimental gerontology*, 41(2), 157-168
38. Mathews, M., Sonenberg, N., & Hershey, J. W. (Eds.). (2007). Translational control in biology and medicine (Vol. 1). Cold Spring Harbor, NY:: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
39. Meyuhas, O. (2008). Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *International review of cell and molecular biology*, 268, 1-37.
40. Modrek, B., & Lee, C. J. (2003). Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nature genetics*, 34(2), 177.
41. Montero, H., García-Román, R., & Mora, S. I. (2015). eIF4E as a control target for viruses. *Viruses*, 7(2), 739-750.
42. Nakura, J., Miki, T., Ye, L., Mitsuda, N., Zhao, Y., Kihara, K., ... & Schellenberg, G. D. (1996). Narrowing the Position of the Werner

Syndrome Locus by Homozygosity Analysis-Extension of Homozygosity Analysis. *Genomics*, 36(1), 130-141.

43. Pedraz, J. M., Jara, D. M., Araujo, J., Pinto, J., Li, B., & Comai, L. (2016). A novel and unanticipated link between the Werner syndrome protein (WRN) and protein translation. *Annals of Oncology*, 27(suppl\_6)
44. Pichierri, P., Rosselli, F., & Franchitto, A. (2003). Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene*, 22(10), 1491-1500
45. Proudfoot, N. J. (2011). Ending the message: poly (A) signals then and now. *Genes & development*, 25(17), 1770-1782.
46. Ramezani, A., & Hawley, R. G. (2002). Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Current Protocols in Molecular Biology*, 16-21
47. Redondo, N., Sanz, M. A., Welnowska, E., & Carrasco, L. (2011). Translation without eIF2 promoted by poliovirus 2A protease. *PLoS one*, 6(10), e25699
48. Robledo, S., Idol, R. A., Crimmins, D. L., Ladenson, J. H., Mason, P. J., & Bessler, M. (2008). The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *Rna*, 14(9), 1918-1929.
49. Roeder, R. G. (2005). Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS letters*, 579(4), 909-915
50. Salk, D., Bryant, E., Au, K., Hoehn, H., & Martin, G. M. (1981). Systematic growth studies, cocultivation, and cell hybridization studies of Werner syndrome cultured skin fibroblasts. *Human genetics*, 58(3), 310-316
51. Shiratori, M., Suzuki, T., Itoh, C., Goto, M., Furuichi, Y., & Matsumoto, T. (2002). WRN helicase accelerates the transcription of ribosomal RNA

as a component of an RNA polymerase I-associated complex. *Oncogene*, 21(16), 2447-2454.

52. Singer, O., & Verma, I. M. (2008). Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Current gene therapy*, 8(6), 483-488
53. Strachan, T, Read A. Human Molecular Genetics 3. Volume 3. *Garland Science*, 2014
54. Sun, L., Nakajima, S., Teng, Y., Chen, H., Yang, L., Chen, X., ... & Lan, L. (2017). WRN is recruited to damaged telomeres via its RQC domain and tankyrase1-mediated poly-ADP-ribosylation of TRF1. *Nucleic acids research*, 45(7), 3844-3859.
55. Suzuki, N., Shimamoto, A., Imamura, O., Kuromitsu, J., Kitao, S., Goto, M., & Furuichi, Y. (1997). DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. *Nucleic acids research*, 25(15), 2973-2978.
56. Tadokoro, T., Kulikowicz, T., Dawut, L., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2012). DNA binding residues in the RQC domain of Werner protein are critical for its catalytic activities. *Aging (Albany NY)*, 4(6), 417.
57. Takeuchi, F., Hanaoka, F., Goto, M., Yamada, M. A., & Miyamoto, T. (1982). Prolongation of S phase and whole cell cycle in Werner's syndrome fibroblasts. *Experimental gerontology*, 17(6), 473-480.
58. Tolstoshev, P. (1992). Retroviral-mediated gene therapy--safety considerations and preclinical studies. *Bone marrow transplantation*, 9, 148-150
59. Trachootham D, Alexandre J, Huang P (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nat. Rev. Drug Discovery* 8, 579–591.

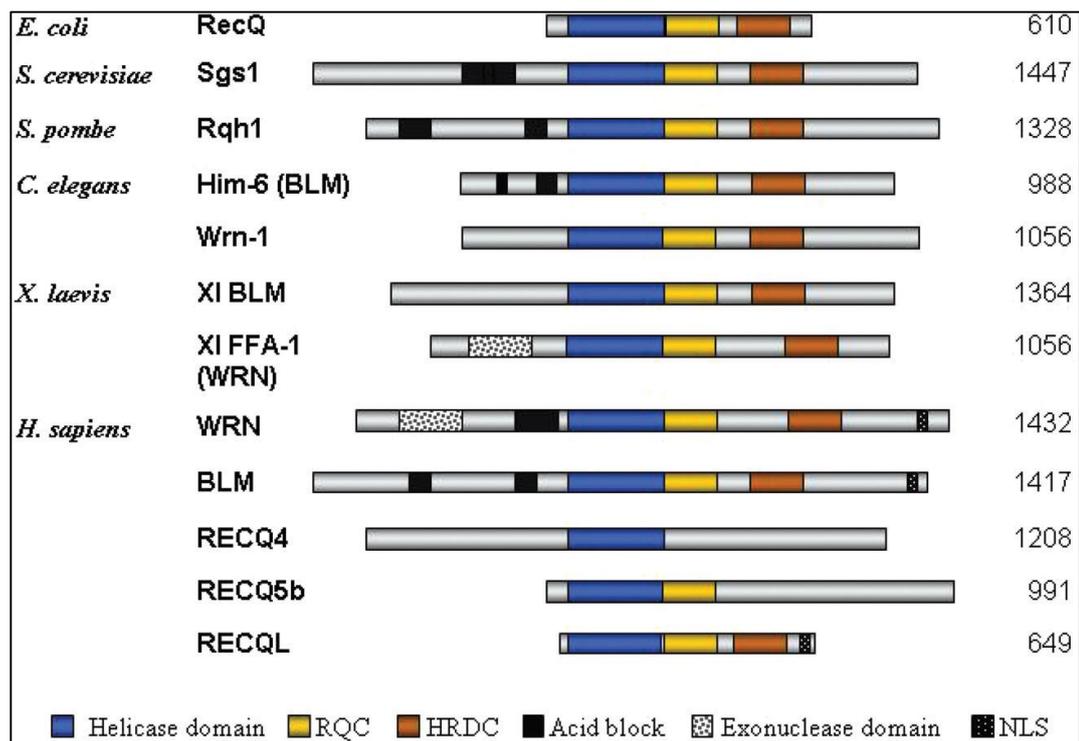
60. Valášek, L. S. (2012). 'Ribozoomin'—Translation Initiation from the Perspective of the Ribosome-bound Eukaryotic Initiation Factors (eIFs). *Current protein & peptide science*, 13(4), 305.
61. von Kobbe, C., Karmakar, P., Dawut, L., Opresko, P., Zeng, X., Brosh, R. M., ... & Bohr, V. A. (2002). Colocalization, physical, and functional interaction between Werner and Bloom syndrome proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 22035-22044
62. Wool, I. G. (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in biochemical sciences*, 21(5), 164-165.
63. Yadavilli, S., Hegde, V., & Deutsch, W. A. (2007). Translocation of human ribosomal protein S3 to sites of DNA damage is dependant on ERK-mediated phosphorylation following genotoxic stress. *DNA repair*, 6(10), 1453-1462.
64. Yamamoto, T. (2000). Molecular mechanism of monocyte predominant infiltration in chronic inflammation: mediation by a novel monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer. *Pathology international*, 50(11), 863-871.
65. Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., ... & Martin, G. M. (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 258-262.
66. Yu, C. E., Oshima, J., Wijsman, E. M., Nakura, J., Miki, T., Piussan, C., ... & Schellenberg, G. D. (1997). Mutations in the consensus helicase domains of the Werner syndrome gene. Werner's Syndrome Collaborative Group. *American journal of human genetics*, 60(2), 330
67. Zhu, Y., Lin, H., Li, Z., Wang, M., & Luo, J. (2001). Modulation of expression of ribosomal protein L7a (RPL7a) by ethanol in human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 69(1), 29-38.

## X. ANEXOS

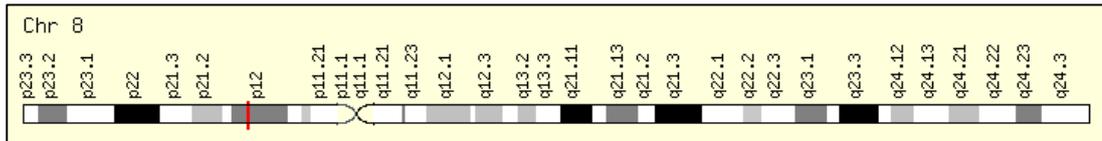
### FIGURAS



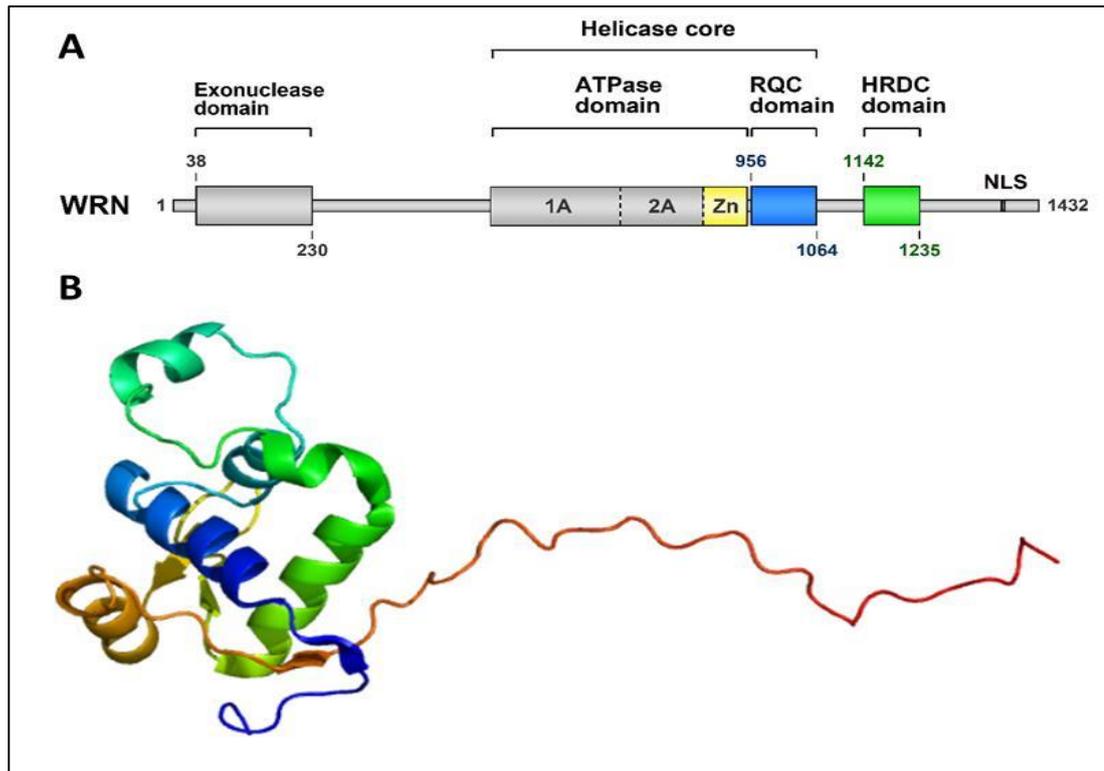
**Figura 1.** Paciente con WS. Se muestra una persona aparentemente normal a los 8 años, sin embargo, a la edad de 36 años ya se evidencian los fenotipos de la enfermedad (Hisama *et al.*, 2006).



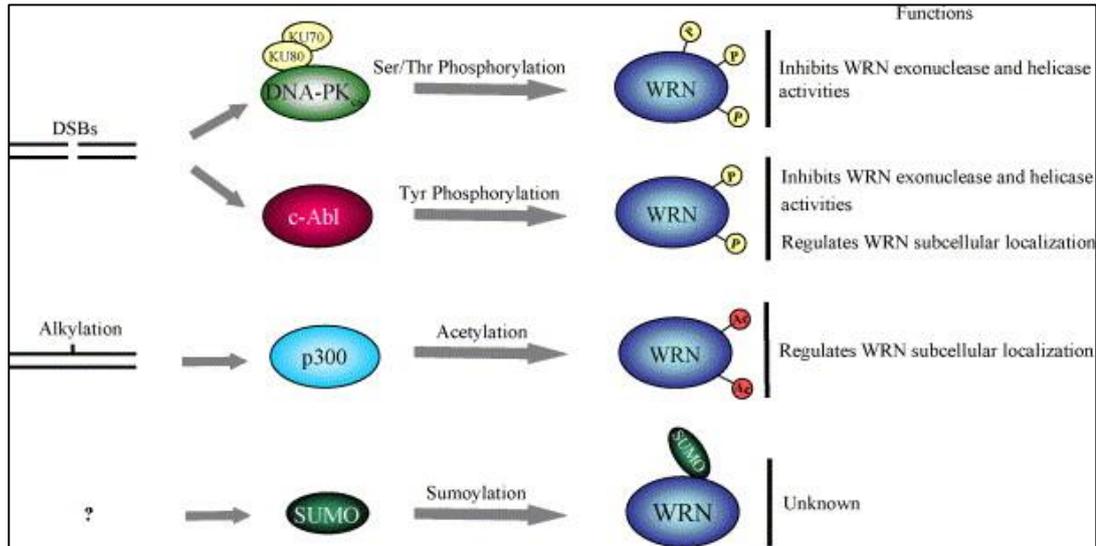
**Figura 2.** Miembros de la familia de las helicasas RecQ. Se muestra el tamaño de cada proteína con su número de aminoácidos. En azul y amarillo se observa las regiones conservadas de helicasa y RQC respectivamente (Cobb & Bjergbaek 2006).



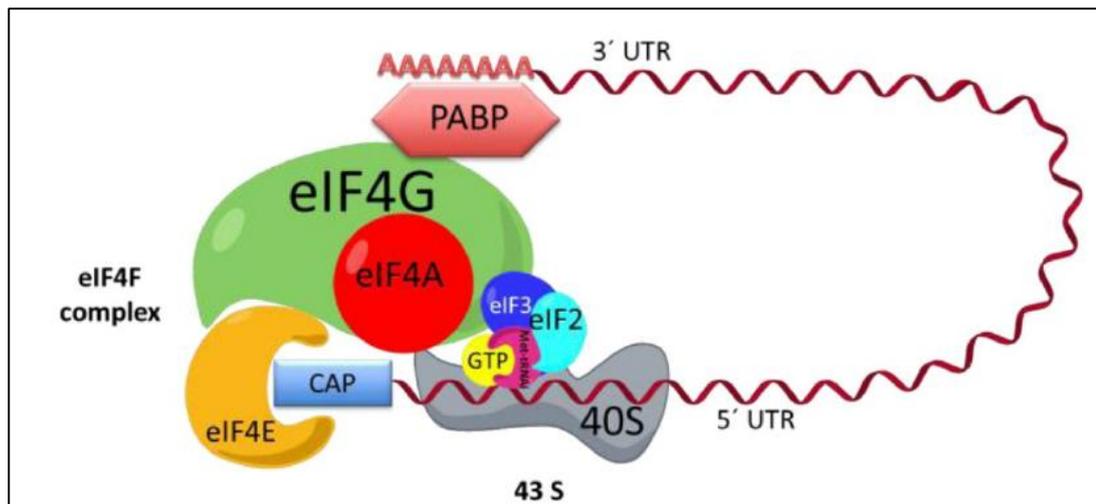
**Figura 3. Cromosoma 8.** Localización del gen del Síndrome de Werner en la posición p12 (Base de datos de NCBI).



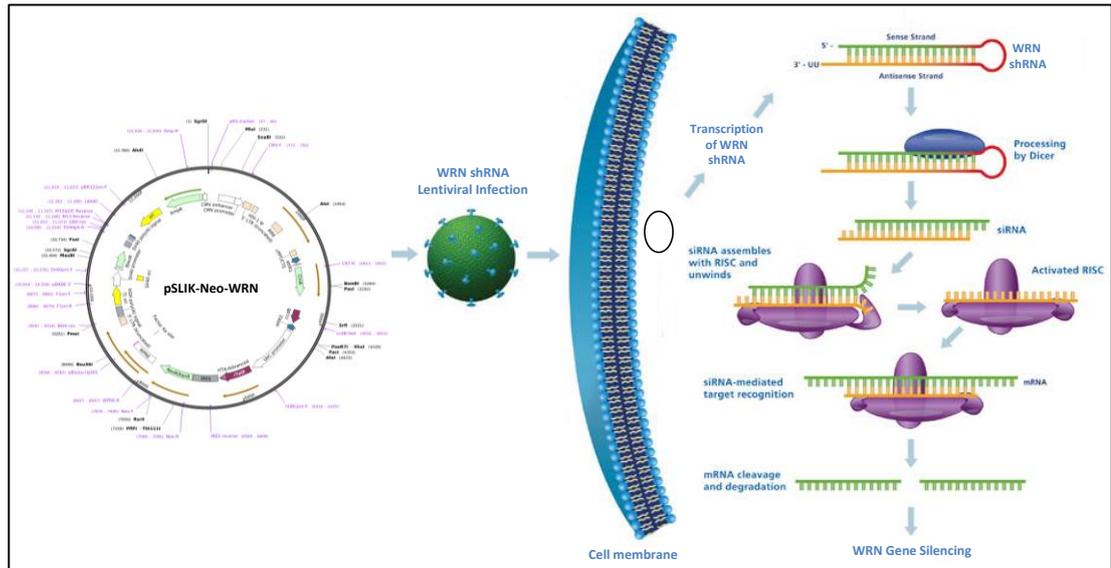
**Figura 4. A)** Dominios presentes en la secuencia en la proteína WRN. La proteína WRN se une a un dominio ATPasa, un dominio RQC (color azul) y un dominio HRDC (verde). El subdominio Zn (amarillo) se encuentra en la región terminal del dominio ATPasa (Kitano, 2014). **B)** Estructura del dominio de unión al ADN de la proteína WRN. Basado en la representación del PDB 2axl en el software PyMOL.



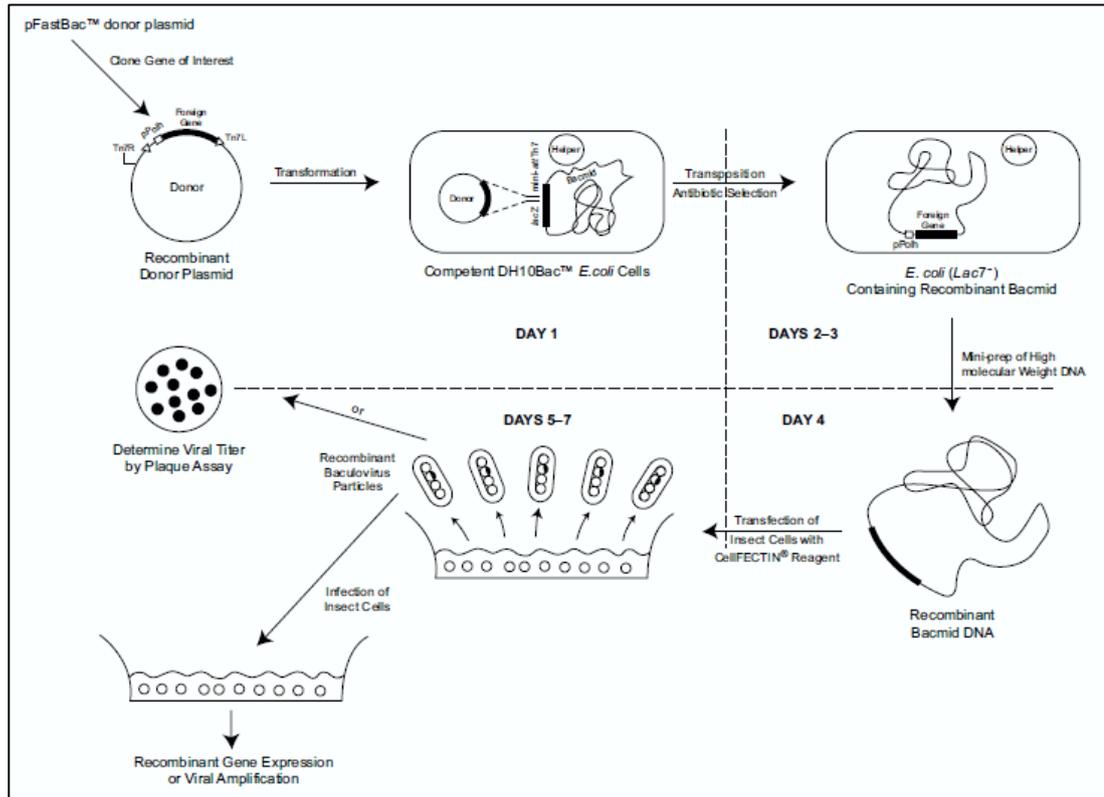
**Figura 5.** Modificaciones postraduccionales de WRN (Kusumoto *et al.*, 2007).



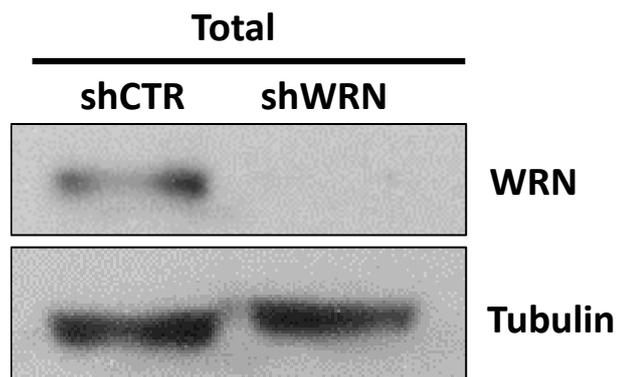
**Figura 6. Complejo de iniciación.** Se muestra la interacción entre el complejo eIF4F, 43S y ARNm. EIF4F está formado por eIF4A, eIF4G y eIF4E. El complejo 43S está formado por eIF3, la subunidad ribosómica pequeña, y eIF2, que a su vez está formado por iniciador de ARNt de metionina (Met-tRNA<sub>i</sub>) y GTP. El ARNm se recluta en el complejo eIF4F a través de la interacción del extremo 3' y la proteína de unión PABP y el casquete 5' UTR y eIF4E (Montero *et al.*, 2015).



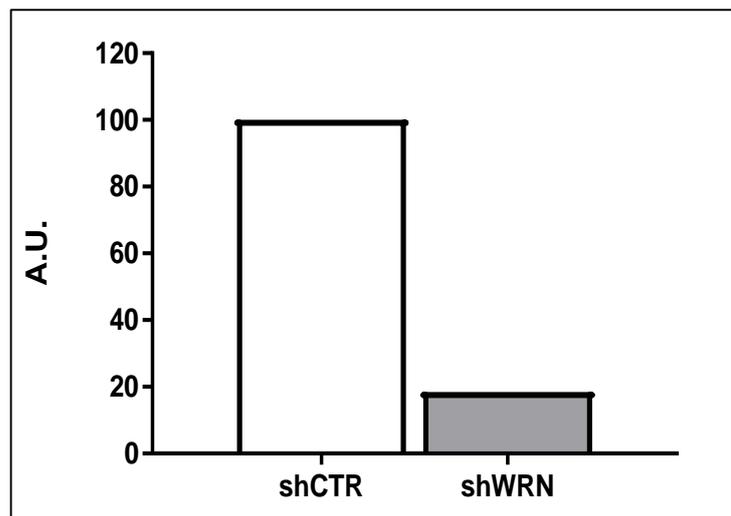
**Figura 7. Mecanismo del ARNi.** Para estudiar los eventos de la desregulación de WRN, se creó un vector lentiviral con una secuencia de WRN que se clonó en un plásmido para su uso con el sistema pSLIK (lentivirus único inducible). Este lentivirus se usa para infectar células humanas. En este proceso, el shRNA de WRN expresado a partir del lentivirus pSLIK forma una estructura de tipo horquilla de doble cadena, que se escinde en la horquilla por la enzima citosólica, DICER. Esta escisión provoca que el shRNA de WRN se integre en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Aquí, RISC guía la cadena del shRNA de WRN a su ARNm objetivo complementario, escinde la secuencia específica del ARNm de WRN y luego la dirige a la degradación, coordinada por SLICER (Bobbin *et al.*, 2015).



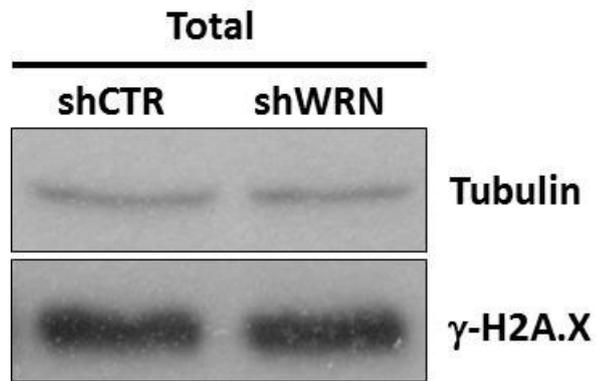
**Figura 8.** Sistema de expresión de Baculovirus. El sistema de expresión de proteínas de Baculovirus se basa en la inserción de un gen de interés en un bacmido mediante transposición sitio-específica en bacterias DH10Bac. El bácrido recombinante obtenido es transfectado en células de insecto Sf9 capaces de producir baculovirus recombinantes, conteniendo en su genoma la secuencia del gen de interés conduciendo a su expresión durante el proceso de infección celular (Manual Comercial de *Thermo Fisher*).



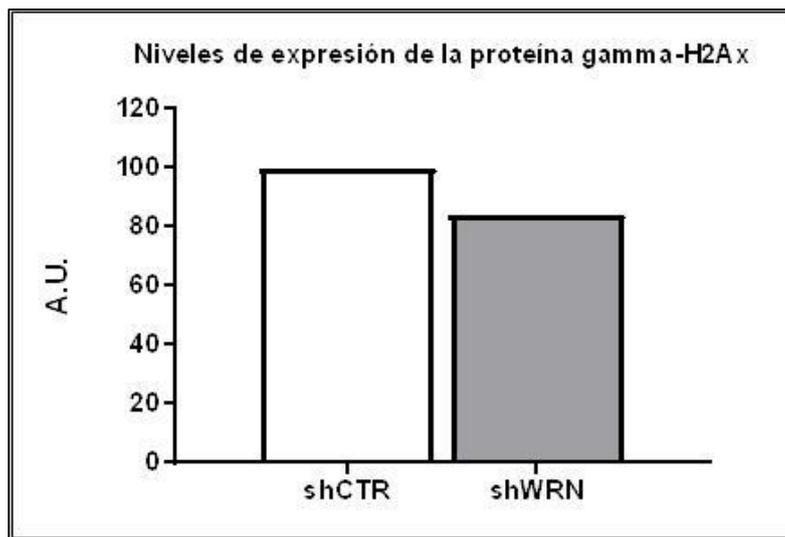
**Figura 9.** Expresión de la proteína WRN en células HeLa (shCTR y shWRN) luego de 3 días de inducción de silenciamiento con dox. La expresión de la Tubulina se usó como control de carga.



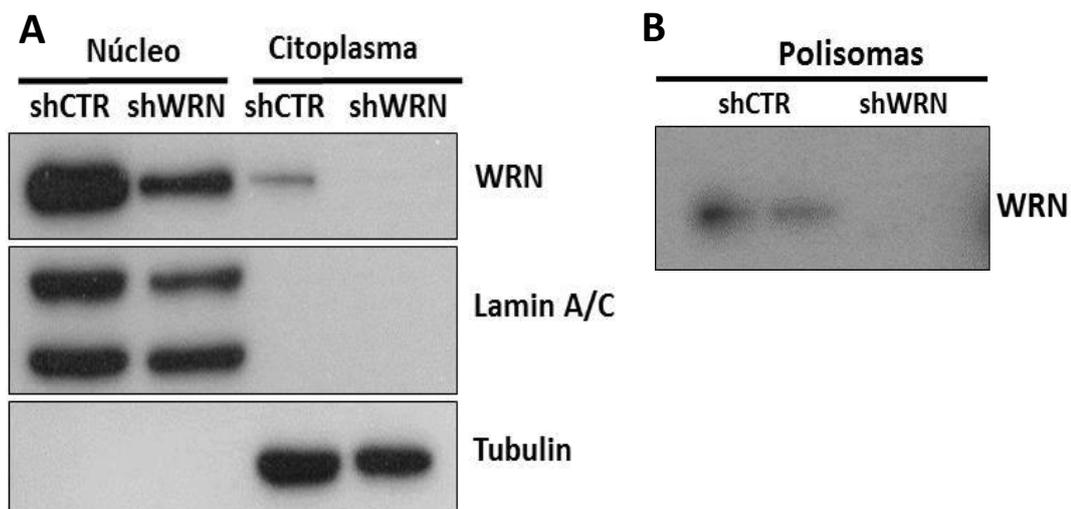
**Figura 10.** Cuantificación de las señales quimioluminiscentes (A.U.) de la expresión de la proteína WRN en células HeLa shCTR y shWRN. La expresión de la Tubulina se utilizó como factor normalizador.



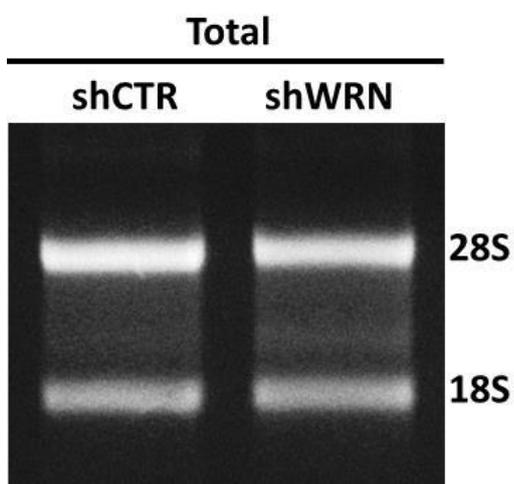
**Figura 11.** Expresión de  $\gamma$ -H2A.X en células HeLa (shCTR y shWRN) luego de 3 días de inducción de silenciamiento con dox. La expresión de la Tubulina se usó como control de carga.



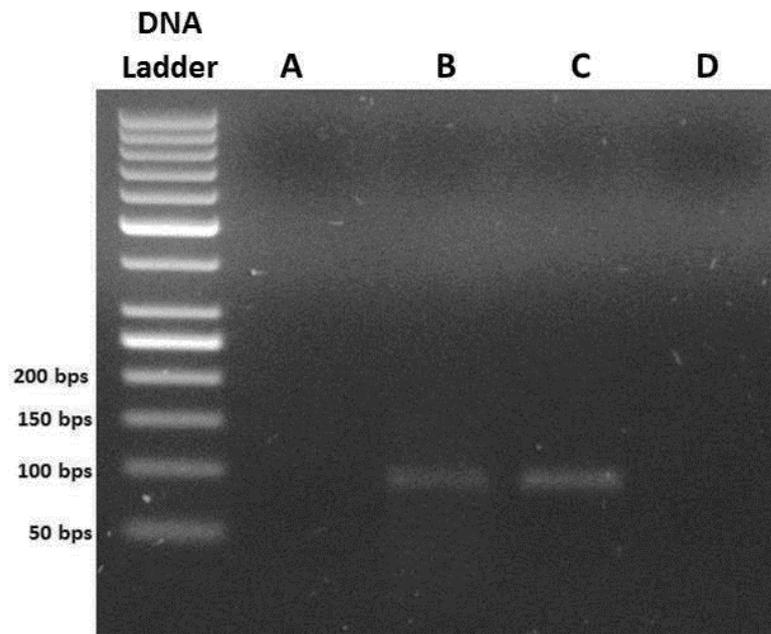
**Figura 12.** Cuantificación de las señales quimioluminiscentes (A.U.) de la expresión de la proteína  $\gamma$ -H2A.X en células HeLa shCTR y shWRN. La expresión de la Tubulina se utilizó como factor normalizador.



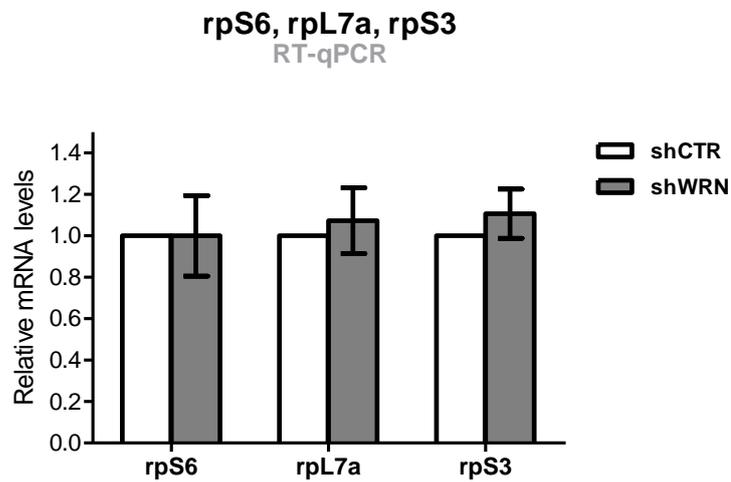
**Figura 13.** Expresión de WRN en diferentes fracciones subcelulares. (A) Expresión de WRN en la fracción nuclear y citoplasmática de células shCTR y shWRN. Lamin A/C se utilizó como control nuclear mientras que Tubulina se usó como marcador citoplasmático. (B) Expresión de WRN en la fracción polisomal.



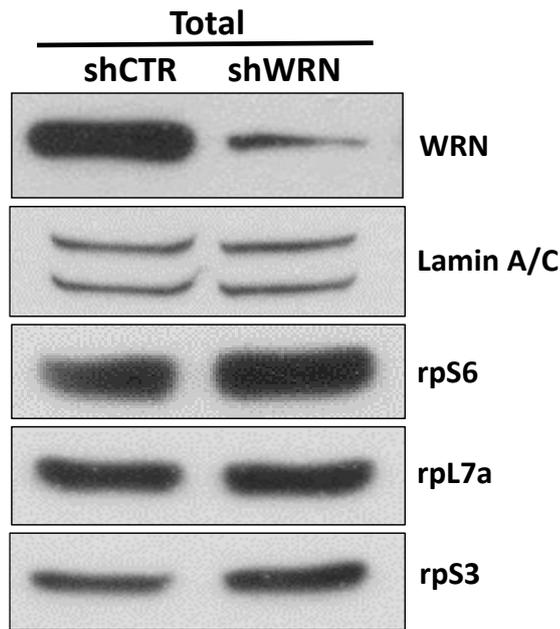
**Figura 14.** Integridad de los ARN totales de HeLa shCTR y shWRN. Se observan las subunidades 28S y 18S.



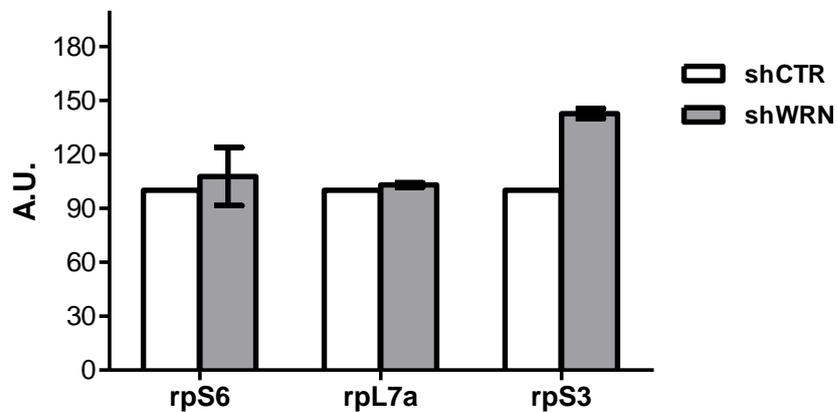
**Figura 15.** Confirmación de la ausencia de contaminación de los ARN totales con ADN. El producto esperado de la PCR fue de 90 bps. (A) ARN total tratado con DNase I. (B) ARN total no tratado con DNase I. (C) ADN genómico usado como control positivo. (D) H<sub>2</sub>O.



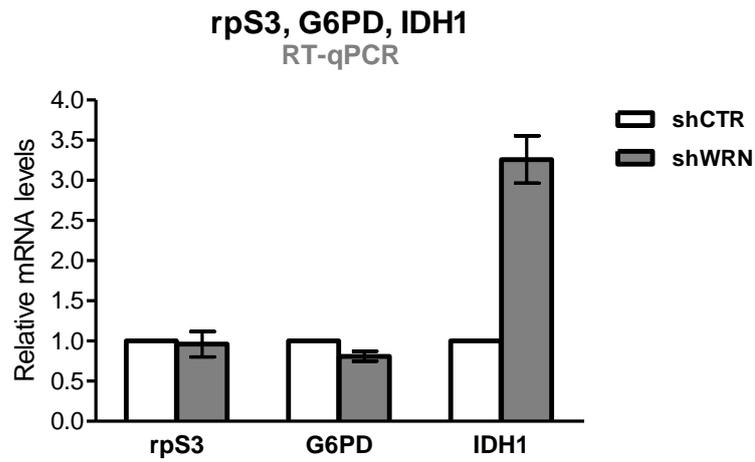
**Figura 16.** Análisis de RT-qPCR de los niveles de RPS6, RPL7a y RPS3 a partir de ARN total. Los niveles de expresión de los ARNm se normalizaron con los ARNm de GAPDH y se muestran como relativos a shCTR ( $P < 0.05$ ).



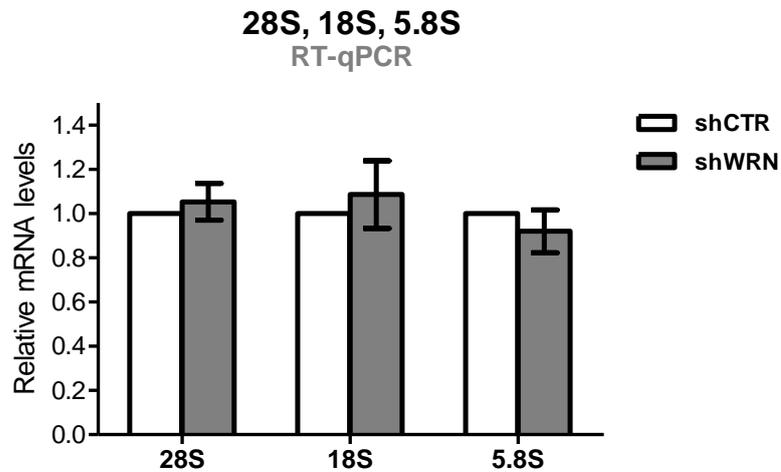
**Figura 17.** Expresión de las proteínas ribosomales (RPS6, RPS3 y RPL7a) en células HeLa (shCTR y shWRN) tras la inducción de silenciamiento con dox. La expresión de Lamin A/C se utilizó como control de carga.



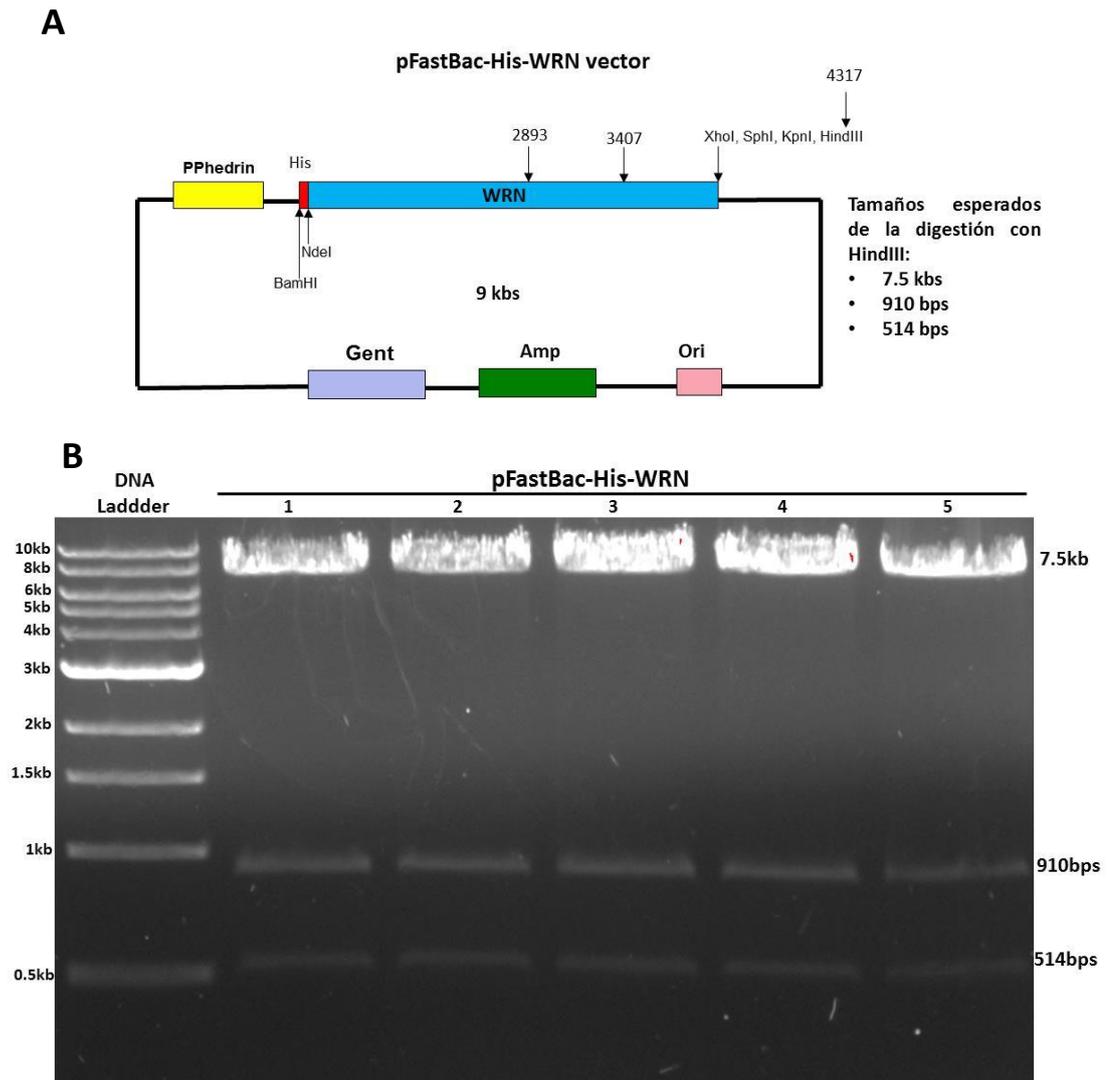
**Figura 18.** Cuantificación de las señales quimioluminiscentes (A.U.) de la expresión de las proteínas ribosomales RPS6, RPL7a y RPS3 en células HeLa shCTR y shWRN ( $P < 0.05$ ). La expresión de Lamin A/C se utilizó como factor normalizador.



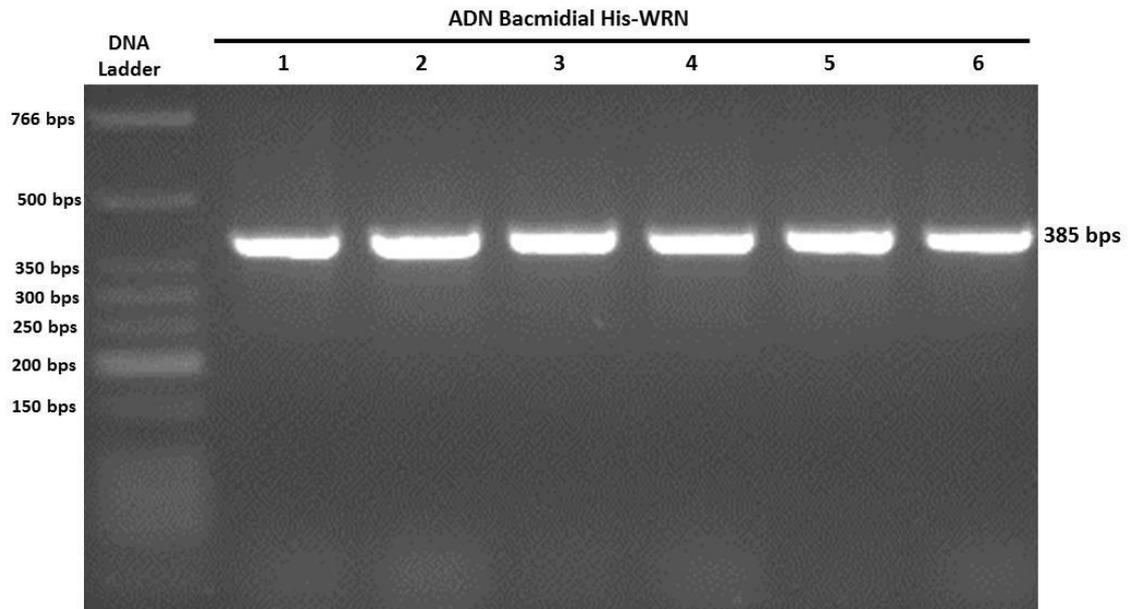
**Figura 19.** Análisis de RT-qPCR de los niveles de RPS3, G6PD y IDH1 a partir de ARN obtenido de la fracción polisomal. Los niveles de expresión de los ARNm se normalizaron con los ARNm de GAPDH y se muestran como relativos a shCTR ( $P < 0.05$ ).



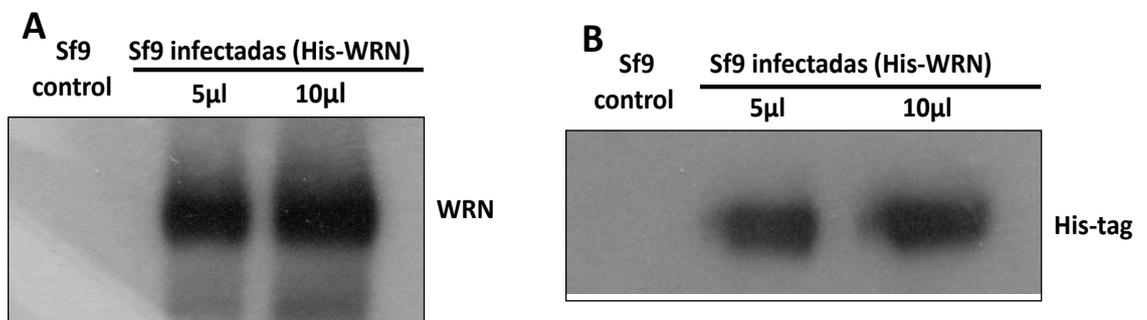
**Figura 20.** Análisis de RT-qPCR de los niveles de expresión de los ARNr de 28S, 18S y 5.8S a partir de ARN obtenido de la fracción polisomal. Los niveles de expresión de los ARNr de shWRN se normalizaron con los ARNm de GAPDH y se muestran como relativos a shCTR ( $P < 0.05$ ).



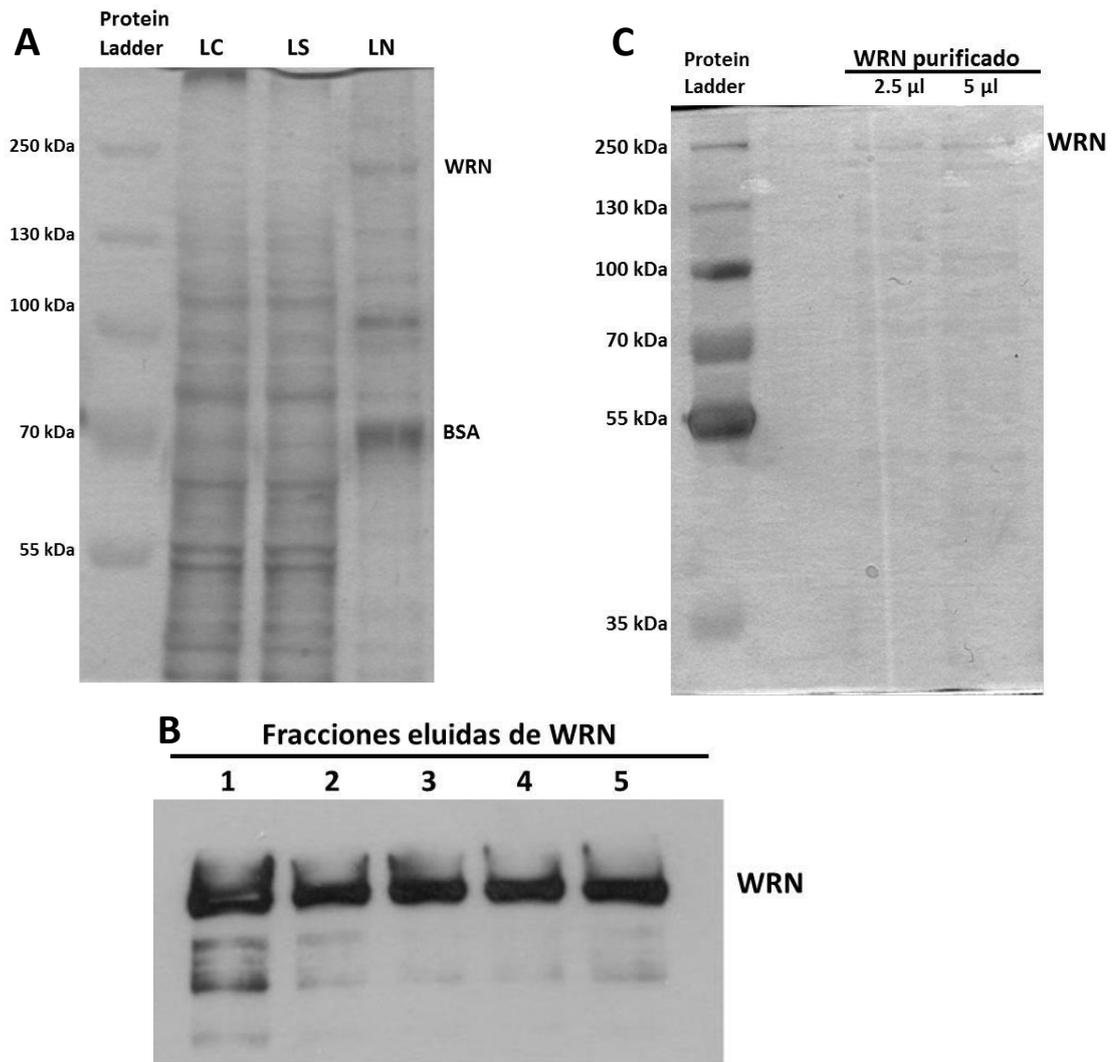
**Figura 21.** Clonación del vector pFastBac-His-WRN. (A) Mapa de la construcción pFastBac-His-WRN con los sitios de restricción para la enzima *HindIII* y sus respectivos tamaños esperados. (B) Digestión de los clones obtenidos tras la ligación del vector pFastBac con el ADNc de WRN. Gel de agarosa al 0.7%.



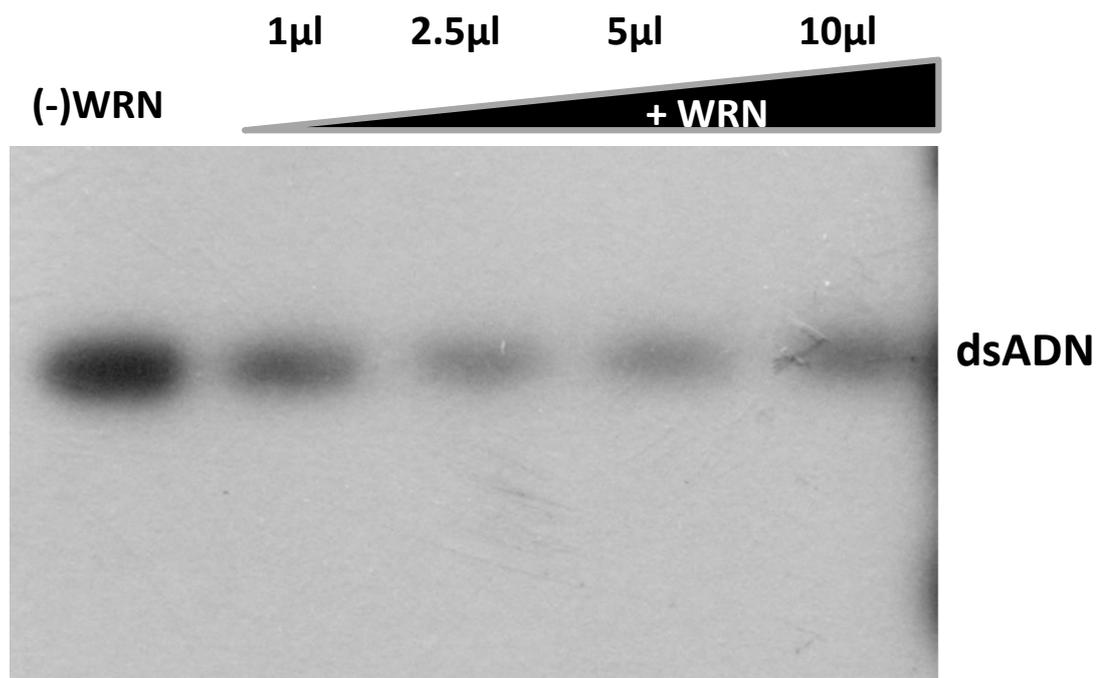
**Figura 22.** Producto de PCR de la amplificación de un fragmento de WRN (385bps) en 6 clones obtenidos de ADN bacmial His-WRN. Gel de agarosa al 2%.



**Figura 23.** Expresión de la proteína WRN en células de insecto Sf9. (A) Western Blot anti-WRN en extractos de células infectadas con baculovirus recombinantes His-WRN. (B) Western Blot anti-Histag en extractos de células infectadas con baculovirus recombinantes His-WRN.

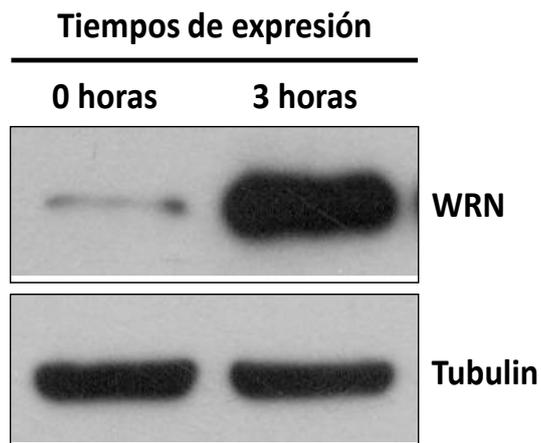


**Figura 24.** Expresión y purificación de la proteína WRN en el sistema de baculovirus. (A) Gel de SDS-PAGE. Las células infectadas con los baculovirus recombinantes His-WRN fueron lisadas (LC), se obtuvo la fracción soluble (LS) y fue sometida a cromatografía de afinidad con resina  $Ni^{2+}$ NTA (LN). (B) Confirmación de la presencia de WRN en las fracciones eluidas por Western Blot. (C) SDS-PAGE de WRN purificado.

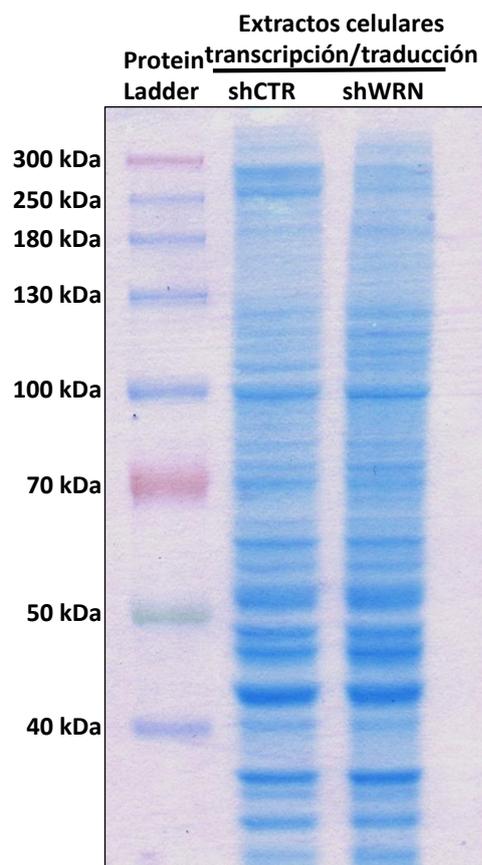


**Figura 25.** Western Blot anti-Biotina de los ensayos de actividad helicasa de WRN utilizando los cebadores parcialmente complementarios.

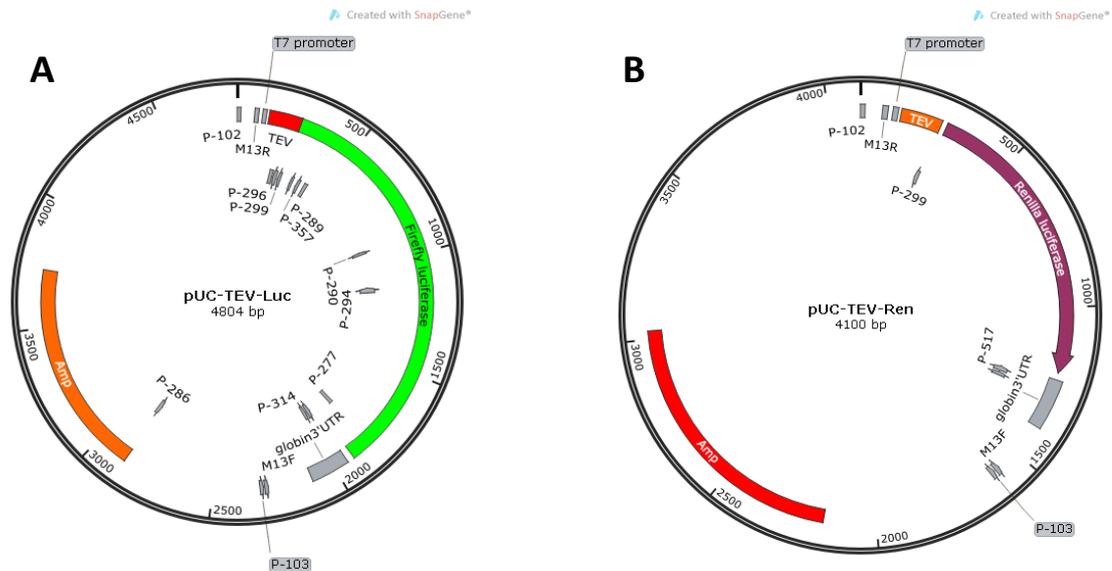




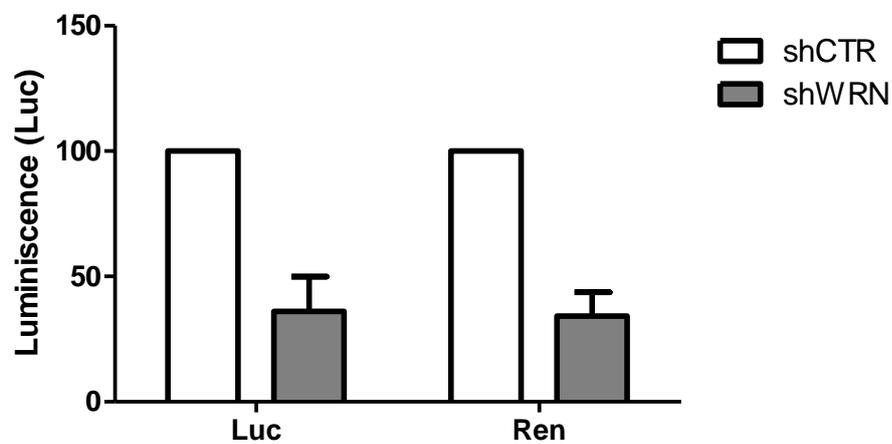
**Figura 27.** Western Blot de la expresión de WRN en el sistema de transcripción/traducción *in vitro*. Tubulina se utilizó como control de carga.



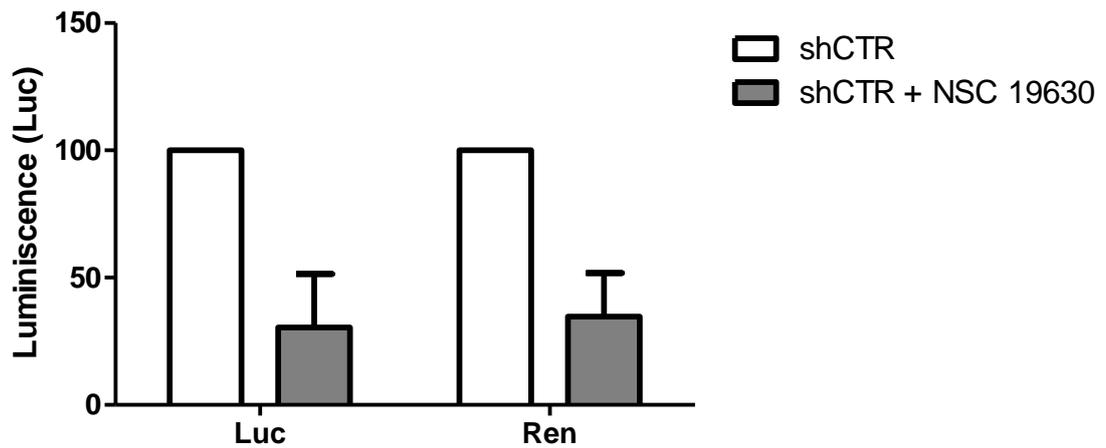
**Figura 28.** Tinción de Coomassie de los extractos celulares derivados de células shCTR y shWRN para los ensayos de traducción/transcripción *in vitro*.



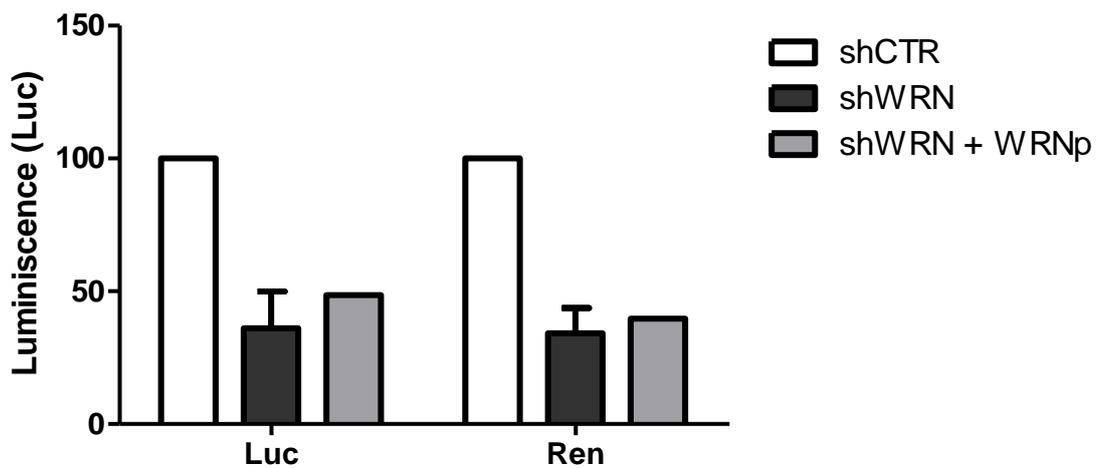
**Figura 29.** Mapas de los vectores reporteros usados en el ensayo de transcripción/traducción *in vitro* pUC-TEV-Luc y pUC-TEV-Ren. Mapas creados usando el software *SnapGene*.



**Figura 30.** Traducción *in vitro* de los vectores que codifican las proteínas Firefly luciferase (Luc) y Renilla luciferase (Ren) en extractos celulares de HeLa shCTR y shWRN ( $P < 0.05$ ).



**Figura 31.** Traducción *in vitro* de los vectores que codifican las proteínas Firefly luciferase (Luc) y Renilla luciferase (Ren) en extractos celulares de HeLa shCTR y HeLa shCTR + NSC 19630 (P <0.05).



**Figura 32.** Traducción *in vitro* de los vectores que codifican las proteínas Firefly luciferase (Luc) y Renilla luciferase (Ren) en extractos celulares de HeLa shCTR, HeLa shWRN y HeLa shWRN suplementadas con proteína de WRN (WRNp) (P <0.05).

## TABLAS

**Tabla 1.** Lista de *primers* usados para el análisis por RT-qPCR.

| Gen   | Secuencias                            |
|-------|---------------------------------------|
| IDH1  | Forward: 5'-CGGACTCTGTGGCCCAAGGG-3'   |
|       | Reverse: 5'-AGTCCCGTGGGCAGCCTCTG-3'   |
| G6PD  | Forward: 5'-TGCCCCGACCGTCTAC-3'       |
|       | Reverse: 5'-ATGCGGTTCCAGCCTATCTG-3'   |
| GAPDH | Forward: 5'-CTTTGACGCTGGGGCTGGCA-3'   |
|       | Reverse: 5'-GGCTGGTGGTCCAGGGGTCT-3'   |
| RPS6  | Forward: 5'-GCAAATCTGAGCGTTCTCAAC-3'  |
|       | Reverse: 5'-CATACTGGCGGACATCATCTT-3'  |
| RPL7a | Forward: 5'-TCCTGCGATTAACCAGTTCAC-3'  |
|       | Reverse: 5'-TTAACTCCTGCTCGAAGGACA-3'  |
| RPS3  | Forward: 5'-GGCATCTTCAAAGCTGAACTG-3'  |
|       | Reverse: 5'-CTGGAAAGCCAAACCTCTTCT-3'  |
| r28S  | Forward: 5'-GGGTTTTAAGCAGGAGGTGTC-3'  |
|       | Reverse: 5'-AACCTGTCTCACGACGGTCTA-3'  |
| r18S  | Forward: 5'-CGGCGACGACCCATTGGAAC-3'   |
|       | Reverse: 5'-GACGGGGAATCAGGGTTGATTC-3' |
| r5.8S | Forward: 5'-GACTCTTAGCGGTGGATCACTC-3' |
|       | Reverse: 5'-ATCGACACTTCGAACGCACT-3'   |

**Tabla 2.** Lista de anticuerpos primarios.

| Anticuerpos           | Tipo       |
|-----------------------|------------|
| Anti-WRN              | Policlonal |
| Anti-Tubulina         | Policlonal |
| Anti-Lamin A/C        | Policlonal |
| Anti-RPS6             | Policlonal |
| Anti-RPL7a            | Policlonal |
| Anti-RPS3             | Policlonal |
| Anti-HisTag           | Policlonal |
| Anti-Streptavidin-HRP | Policlonal |

**Tabla 3.** *Primers* parcialmente complementarios usados para reacción de helicasa.

| Nombre          | Secuencia                           |
|-----------------|-------------------------------------|
| FLAP10 (Biotin) | 5' TTTTTTCCAAGTAAAACGACGGCCAGTGC 3' |
| TSTEM           | 5' GCACTGGCCGTCGTTTTACGGTCGTGACT 3' |