

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



“INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA DEL SÍNDROME DE WERNER (WRN) CON  
LOS ARN MENSAJEROS (ARN<sub>m</sub>) EN LA LÍNEA CELULAR HELA”

**VALERIA DEL CARMEN VALLE-RIESTRA FELICE**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN  
BIOLOGÍA**

Asesora: Dra. Lidia Cruz Neyra

Lima, Perú

2021



**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



“INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA DEL SÍNDROME DE WERNER (WRN) CON  
LOS ARN MENSAJEROS (ARN<sub>m</sub>) EN LA LÍNEA CELULAR HELA”

**VALERIA DEL CARMEN VALLE-RIESTRA FELICE**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN  
BIOLOGÍA**

Asesora: Dra. Lidia Cruz Neyra

Lima, Perú

2021

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**“INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA DEL SÍNDROME DE WERNER  
(WRN) CON LOS ARN MENSAJEROS (ARN<sub>m</sub>) EN LA LÍNEA  
CELULAR HELA”**

**VALERIA DEL CARMEN VALLE-RIESTRA FELICE**

**MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR**

**PRESIDENTE: HUGO GONZALES FIGUEROA**

**SECRETARIO: FLOR DE MARIA MADRID**

**VOCAL: HUGO GONZALES MOLFINO**

**ASESORA: LIDIA CRUZ NEYRA**

## **Agradecimientos**

Al Dr. Juan Manuel Iglesias Pedraz, por darnos la oportunidad de aprender, motivarnos a mejorar e incentivarnos el espíritu investigador. Gracias por la confianza y por las enseñanzas durante este camino.

A la Dra. Carla Columbano de Oliveira, por recibirme durante 3 meses en su laboratorio y brindarme el constante apoyo en cada uno de los experimentos.

A Paola Páez Cepeda, por todas las conversaciones al salir del laboratorio, paciencia en cada experimento y por siempre motivarme a seguir trabajando.

A la Dra. Lidia Cruz Neyra, por el constante apoyo durante la elaboración y revisión de este trabajo.

A mis amigos y familia. A mis nonnos, a mis papás y a Ale. Gracias por siempre motivarme y creer en mí.

A la subvención 150-2017 FONDECYT-CONCYTEC otorgada al Dr. Iglesias por el financiamiento de esta tesis.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
I. INTRODUCCION.....	3
I.I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
I.II FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	5
I.III JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION .....	5
I.IV OBJETIVO GENERAL .....	6
I.V OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	6
II. MARCO TEORICO .....	6
III. ANTECEDENTES .....	8
3.1 Familia de las RecQ helicasas .....	8
3.2 El síndrome de Werner.....	9
3.3 La proteína del síndrome de Werner (WRN).....	10
3.3.1 Dominios funcionales de la proteína de Werner (WRN).....	10
3.3.1.1 La Región Amino-terminal (N-terminal) de WRN.....	10
3.3.1.2 La región central de WRN.....	11
3.3.1.3 Región C-terminal de WRN .....	12
IV. HIPOTESIS .....	12
V. MATERIALES Y METODOS.....	12
5.1 Lugar de ejecución .....	12
5.2 Tipo y diseño de la investigación.....	13
5.3 Variable.....	13
5.4 Operacionalización de las variables.....	14
5.5 Muestreo.....	14
5.6 Procedimiento y análisis de datos .....	15
5.6.1 Procedimiento .....	15
5.6.1.1 Material Biológico .....	15
5.6.1.2 Identificación de la interacción proteína-ARNm <i>in vivo</i> en células HeLa, mediante la técnica de pull-down con Oligo(dT) conjugado a esferas magnéticas. ....	15
5.6.1.2.1 Cultivo de células HeLa .....	15
5.6.1.2.2 Obtención de las proteínas totales .....	15
5.6.1.2.3 Hibridación con Oligo(dT) conjugado a esferas magnéticas .....	16

5.6.1.2.4 Electroforesis de agarosa .....	16
5.6.1.2.5 Western Blot .....	16
5.6.1.3 Clonaje, expresión y purificación de los dominios funcionales N-Terminal, ATPase, DEAD, RQC y C-Terminal en el vector de expresión pGEX-4T1 .....	17
5.6.1.3.1 Amplificación de las secuencias por PCR convencional .....	17
5.6.1.3.2 Clonajes en los vectores pJET1.2/blunt y pGEX-4T1 .....	17
5.6.2 Expresión y purificación de los dominios de WRN .....	18
5.6.2.1 Test de expresión y solubilidad .....	18
5.6.2.2 Expresión del dominio N-Terminal .....	18
5.6.2.2.1 Cromatografía de afinidad con Glutathiona Sefarosa .....	19
5.6.2.2.2 Purificación por cromatografía de gel de filtración .....	19
5.6.2.2.3 Determinación del estado oligomérico de la proteína N-Terminal .....	20
5.6.2.3 Expresión del dominio ATPasa .....	20
5.6.2.3.1 Obtención de la proteína soluble ATPasa desde cuerpos de inclusión .....	20
5.6.2.3.2 Cromatografía de afinidad con Glutathiona Sefarosa .....	21
5.6.2.4 Expresión del dominio DEAD .....	22
5.6.2.4.1 Obtención de la proteína soluble DEAD desde cuerpos de inclusión .....	22
5.6.2.4.2 Purificación mediante Cromatografía de afinidad usando Glutathiona Sefarosa .....	22
5.6.3 Determinación de la interacción <i>in vitro</i> de los dominios N-Terminal, ATPase y DEAD con los ARNm .....	23
5.6.3.1 Purificación de ARNm de células Hela .....	23
5.6.3.2 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) .....	23
5.6.3.2.1 Electroforesis en gel nativo de acrilamida .....	23
5.6.3.2.2 Técnica de Northern Blot y Western Blot .....	24
5.6.3.3 Detección de los ARNm ligados a los dominios N-terminal, ATPasa y DEAD mediante RT-PCR .....	24
5.6.3.3.1 Técnica de pull-down con resina de glutathiona sefarosa .....	24
5.6.4 Procesamiento y Análisis de datos .....	25
<b>VI RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
6.1 Interacción <i>in vivo</i> entre la proteína de WRN con los ARN mensajeros .....	25
6.1.1 Integridad de los ARN de extractos totales de células HeLa .....	25
6.1.2 Ensayos de pull-down con Oligo(dT) <sub>25</sub> conjugado a esferas magnéticas .....	26
6.2 Clonaje de los dominios N-Terminal, C-terminal, ATPasa, DEAD y RQC .....	26
6.2.1 Clonaje de los dominios de WRN en el vector pJET1.2/blunt .....	26
6.2.2 Clonaje de los dominios en el vector de expresión pGEX-4T1 .....	27
6.3 Expresión y purificación de los dominios de WRN .....	27

6.3.1 Expresión de los dominios Full Length, C-Terminal y RQC .....	27
6.3.2 Expresión y purificación del dominio N-Terminal.....	28
6.3.3 Determinación del estado oligomérico del dominio N-Terminal.....	28
6.3.4 Test de expresión de los dominios ATPasa y DEAD .....	28
6.3.5 Obtención de las proteínas ATPasa y DEAD desde cuerpos de inclusión.....	29
6.4 Detección <i>in vitro</i> de la interacción de los dominios N-Terminal, ATPase y DEAD con los ARNm. ....	29
6.4.1 Cambio de movilidad electroforética (EMSA) .....	29
6.4.2 Detección de ARNm ligados a los dominios N-Terminal, DEAD y ATPasa por RT-PCR.....	30
VII DISCUSIÓN.....	30
VIII CONCLUSIONES .....	34
IX REFERENCIAS.....	35
X ANEXO .....	43



## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la interacción *in vivo*, mediante ensayos de pull-down, de la proteína de Werner (WRN), con los ARNm totales, ambos aislados de células HeLa. Los dominios N-terminal, ATPasa y DEAD, de la proteína WRN fueron clonados utilizando el sistema de expresión de *E. coli* y luego purificados mediante cromatografía de afinidad a Glutathiona Sefarosa con los cuales se realizaron ensayos EMSA (ensayo de cambio de movilidad electroforética) y RT-qPCR para esclarecer que dominios de la proteína de WRN podrían estar involucrados en la formación de complejos de unión al ARNm. Mediante ensayos de pull-down con Oligo(dT) conjugado a esferas magnéticas se determinó que la proteína de Werner era capaz de interactuar con los ARNm *in vivo*. Para el control de la interacción de proteínas con los ARNm se utilizaron las proteínas NXF1 y CBP80, evidenciándose la especificidad del ensayo, a través de tratamientos con VRC y ARNs. En el ensayo EMSA se observó un patrón normal de corrida del dominio N-Terminal de la proteína WRN, pero no con los dominios DEAD y ATPasa y el análisis de las curvas de amplificación obtenidos mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) de los genes diana G6PD y RPS3 y derivados de los ensayos de interacción *in vitro*, muestran que los dominios N-Terminal, ATPasa y DEAD son capaces de interactuar con los ARNm.

Palabras clave: WRN, ARNm, EMSA, RT-qPCR

## **ABSTRACT**

The present work aimed to evaluate the interaction *in vivo*, by means of pull-down tests, of Werner's protein (WRN), with total mRNAs, both isolated from HeLa cells. The N-terminal domains, ATPase and DEAD, of the WRN protein were cloned using the *E. coli* expression system and then purified by glutathione Sepharose affinity chromatography and EMSA (electrophoretic mobility shift assay) and RT assays were performed. -qPCR to elucidate which domains of the WRN protein could be involved in the formation of mRNA-binding complexes. Through pull-down assays with Oligo (dT) conjugated to magnetic spheres, it was determined that Werner's protein was able to interact with mRNAs *in vivo*. To control the interaction of proteins with mRNAs, the proteins NXF1 and CBP80 were used, demonstrating the specificity of the assay, through treatments with VRC and RNase. The EMSA assay showed a normal running pattern of the N-terminal domain of the WRN protein, but not with the DEAD and ATPase domains. In the RT-qPCR assays using mRNA from HeLa cells, the curves of the control treatment were compared against the amplification curves of the target genes G6PD and RPS3 that the N-Terminal domains, ATPase and DEAD are able to interact with the mRNA. Of these three, the N Terminal domain would bind more efficiently to mRNAs than the other two domains. All these data would suggest that WRN could participate in mRNA homeostasis

Key words: WRN, ARNm, EMSA, RT-qPCR

## I. INTRODUCCION

El Síndrome de Werner (WS) es un desorden genético recesivo autosómico (es decir ocurre en células somáticas) y es causado por mutaciones en el gen que codifica para la proteína de Werner (WRN), la que es una proteína nuclear que pertenece a la familia de las RecQ helicasas humanas. Sin embargo, a diferencia de otros miembros de la familia, WRN posee actividad helicasa y exonucleasa cuyas funciones son cruciales y están implicadas, a través de interacciones proteína-proteína, en la reparación, replicación y transcripción del ADN, así como la mantención de los telómeros, por lo que se le considera una proteína necesaria para la estabilidad genómica (Ahn et al., 2004; Chen et al., 2003; Comai & Li, 2004; Crabbe et al., 2006; Kusumoto et al., 2007; Rossi et al., 2010)

Las personas con WS muestran una notable predisposición al desarrollo temprano de una variedad de enfermedades, que generalmente se observan en adultos mayores durante el envejecimiento normal. Estas incluyen canosidad acelerada, aterosclerosis, osteoporosis, diabetes mellitus tipo II y predisposición a varios tipos de cáncer, con una mayor prevalencia de neoplasias mesenquimales (sarcomas) y una incidencia relativamente baja de carcinomas (Goto et al., 1996; Lauper et al., 2013; Nakamura et al., 2005; Opresko et al., 2018; Oshima, J., Sidorova, J., Monnat, 2017; Tokita et al., 2016). Los portadores de este síndrome tienen un promedio de vida de 47 años y fallecen tras desarrollar enfermedades cardíacas y algunos tipos raros de cáncer, especialmente sarcomas (Davis et al., 2005; Martin et al., 1999).

Se ha demostrado que el agotamiento de WRN conduce a un cambio metabólico (reducción de los niveles proteicos) que debilita coordinadamente las vías que generan equivalentes reductores para la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno y aumenta la respiración mitocondrial. En las células cancerosas, este cambio metabólico resulta en un equilibrio redox alterado y una acumulación de daño oxidativo del ADN que inhibe la proliferación celular e induce un fenotipo senescente (B. Li et al., 2014). Sin embargo, datos más recientes muestran que, los niveles de los transcritos génicos de los principales genes implicados en la generación de equivalentes reductores (G6PD y IDH1) no están alterados y que la depleción de WRN afecta además, en células de cáncer HeLa, la distribución espacial de los ARN mensajeros (ARNm) a través de la alteración de la exportación de los ARNm, indicando que otro mecanismo postranscripcional está

siendo afectado tras el silenciamiento de WRN (Iglesias-Pedraz et al., 2020). Aunque a la fecha no se ha descrito la asociación de la proteína WRN con esta clase de ácido nucleico, nosotros hemos demostrado que WRN interactúa con el principal Factor de Exportación de ARN Nuclear 1 (NXF1) (Iglesias-Pedraz et al., 2020) y con los ARNm de forma directa.

Estos datos en su conjunto sugieren que el agotamiento de WRN, en las líneas celulares de cáncer HeLa, podría estar atenuando la síntesis global de proteínas, posiblemente al alterar el transporte nucleocitoplásmico de los ARNm, indicando un posible vínculo entre WRN y los ARNm y que tras el silenciamiento génico de WRN en células HeLa, los ARNm de G6PD y IDH1 podrían estar retenidos en el núcleo celular.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación, usando diferentes aproximaciones bioquímicas y moleculares fue demostrar que la proteína WRN es capaz de interactuar con los ARN mensajeros.

## **I.I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El rápido crecimiento de las células neoplásicas está asociado a un aumento en la síntesis de proteínas (Ruggero, 2012), para lo cual es necesario una alta demanda de síntesis proteica, así como mantener un equilibrio entre la transcripción, el transporte del ARN al citoplasma y la traducción (Bhat *et al.*, 2015; Vaklavas *et al.*, 2017). Se ha observado que muchas líneas celulares tumorales expresan altos niveles de WRN (Opresko et al., 2004) y la depleción de WRN en células de cáncer HeLa y MCF-7 induce una disminución en los niveles proteicos de las enzimas IDH1 y G6PD sin mostrar alteración en los niveles de expresión de sus transcritos génicos (B. Li et al., 2014). Estos resultados demuestran que WRN es requerido para la correcta síntesis proteica en células neoplásicas señalando que WRN, por un mecanismo aun no descrito, podría estar regulando el transporte nucleocitoplásmico de los ARNm. Sin embargo, aún no se ha descrito la interacción entre WRN y los ARNm, por lo tanto, definir la participación de WRN dentro del transporte de los ARNm es de gran interés y serviría para identificar el potencial de WRN como diana terapéutica que ayudaría a generar nuevas terapias antineoplásicas destinadas a frenar la proliferación de células cancerígenas y evitar la metástasis.

## **I.II FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Existe interacción entre la proteína de Werner (WRN) con los ARNm para el correcto transporte núcleo-citoplasma de los ARNm en las células HeLa?

## **I.III JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION**

Dada la alta tasa replicativa que tienen las células neoplásicas y a la continua generación de multi-drogo resistencia por parte de éstas, es que se hace necesario la identificación de nuevas dianas terapéuticas que sean más eficientes con el fin de frenar el avance de varios procesos oncológicos y evitar la metástasis. Actualmente, las investigaciones se están relacionando en identificar y caracterizar componentes claves de varios procesos biológicos como potenciales dianas de estudio. Estas dianas terapéuticas involucran a componentes en el procesamiento de los ARNm en los núcleos, a los implicados en los mecanismos de transporte de los ARNm hacia el citoplasma y finalmente a componentes de la traducción, específicamente la iniciación (Bhat et al., 2015; Carey & Wickramasinghe, 2018; Desterro et al., 2020; Goodall & Wickramasinghe, 2020; Wickramasinghe & Laskey, 2015).

La descripción de la retención nuclear de los ARNm de los transcritos G6PD e IDH1 acoplada a la alteración de la síntesis proteica observada en células neoplásicas silenciadas para WRN (Iglesias-Pedraz et al., 2020) ayudan a entender los procesos moleculares que disparan la senescencia replicativa y que en última instancia frenan la proliferación de las células cancerosas y evitan la metástasis. Estos hallazgos, en última instancia, refuerzan el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el bloqueo molecular de esta nueva vía, con la subsecuente inhibición de la proliferación de células de cáncer a través de la inducción de la senescencia.

Por lo tanto, la presente tesis tiene como propósito definir, mediante una serie de aproximaciones moleculares y bioquímicas el posible vínculo colaborativo que tiene la proteína WRN en el complejo proceso de transporte de los ARNm.

## **I.IV OBJETIVO GENERAL**

El objetivo del proyecto fue demostrar la interacción entre la proteína WRN y los ARNm en células HeLa.

## **I.V OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Comprobar la posible interacción de la proteína WRN con los ARNm *in vivo* en células HeLa, mediante la técnica de pull-down usando Oligo(dT) conjugado a esferas magnéticas.
- Clonar los dominios N-Terminal, ATPase, DEAD, RQC y C-Terminal obtenidos mediante PCR de la proteína WRN en el vector pGEX-4T1.
- Expresar los dominios N-Terminal, ATPase, DEAD, RQC y C-Terminal de la proteína WRN en el vector pGEX-4T1.
- Purificar las proteínas de fusión a GST de los fragmentos de WRN mediante cromatografía por afinidad.
- Caracterizar la interacción *in vitro* de los dominios N-Terminal, ATPase y DEAD con los ARNm mediante *Shift Assay* y RT-qPCR.

## **II. MARCO TEORICO**

En las células eucariotas, el núcleo se encuentra separado del resto de los compartimientos sub celulares por una envoltura nuclear (EN), conformada por cisternas derivadas del retículo endoplasmático, que limita el nucleoplasma y que contiene el material genético (Figura 1), separadas entre sí por los complejos de poros nucleares (NPC) que permiten el intercambio de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma tales como proteínas, ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomal (ARNr) y ARN mensajero (ARNm) y otros factores (De Magistris & Antonin, 2018; Fichtman et al., 2010; Suntharalingam & Wentz, 2003).

El NPC es un complejo proteico de aproximadamente 125 MDa y se compone por 30 diferentes proteínas llamadas nucleoporinas (Nups). Los Nups forman una estructura octagonal con un canal central cilíndrico, fibrillas citoplasmáticas y una canasta nuclear. Las nucleoporinas pueden ser divididas en tres grupos: de membrana, estructurales y con

secuencias repetidas FG (fenilalanina y glicina) (Delaleau & Borden, 2015; Stewart, 2010; Tetenbaum-Novatt & Rout, 2010) Los ARNm, por su parte, al ser generados en el núcleo requieren ser exportados hacia el citoplasma donde la maquinaria de síntesis de proteínas se encarga de decodificar la información genética en proteínas (Dirk & Kutay, 1999; Knockenhauer & Schwartz, 2016).

Los transcritos primarios de ARNm son procesados en el núcleo, antes de ser exportados y traducidos a proteínas en el citoplasma. Su procesamiento consta de tres etapas: la adición de la estructura Cap o metil-7-guanosina (m7G) en el extremo 5', la eliminación de los intrones por el corte y empalme de los exones mediante el proceso conocido como splicing (splicing constitutivo y alternativo) y la poliadenilación en el extremo 3' los cuales son mediados co-transcripcionalmente por varios factores asociados con el dominio C-Terminal de la ARN polimerasa II (Hsin & Manley, 2012). Estos ARNm reclutan proteínas nucleares para formar las partículas ribonucleoproteicas mensajeras (RNPM).

Algunos de los factores que se asocian a los ARNm en el núcleo son responsables de dirigir al RNPM hacia el complejo de poros nucleares (NPC). Estas proteínas, al ser reclutadas co-transcripcionalmente actúan como adaptadores, permitiendo que se unan más proteínas accesorias y receptores de exporte (Hahn, 2004; Hsin & Manley, 2012). Al atravesar el NPC, se asociarán con otros componentes que forman parte del NPC y luego se disociarán de los ARNm al transitar por los poros o poco después de llegar al citoplasma (Moore, 2005; Rodriguez *et al.*, 2004).

Las principales proteínas transportadoras de ARNm son CRM1 y NXF1-p15, (también conocida como TAP o Mex67p-Mtr2p en levadura). Ambas se unen a proteínas adaptadoras, con lo cual se incrementa la afinidad por los ARNm y se facilita el transporte a través del canal central de los poros nucleares, interactuando transitoriamente con las nucleoporinas, específicamente con TPR (localizada en la canasta nuclear). A su vez, el complejo TREX (*transcription-export*) interactúa con el extremo 5' de los ARNm y cumple un papel fundamental en el transporte desde el núcleo al citoplasma. Este complejo se encuentra altamente conservado en levadura y mamíferos y está formado por ALY, UAP56 y la subunidad del complejo THO (Wickramasinghe *et al.*, 2010).

Ciertos dominios funcionales de las proteínas de unión al ARN son los responsables de garantizar las interacciones entre estas proteínas y los ARNm y dentro de los más importantes se encuentran los dominios: RBD (*RNA-binding domain*), KH (dominio K), RGG box (formado por la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Gly), DEAD/DEXH box, *Zinc finger*, dsRBD (*double stranded RNA binding domain*), entre otros (Glisovic *et al.*, 2008).

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Familia de las RecQ helicasas

Para que procesos biológicos como la replicación, transcripción y reparación del ADN se lleven a cabo, es necesario que se produzca una separación de la hebra complementaria para que la información genética sea accesible. Este mecanismo es mediado por proteínas catalizadoras conocidas como ADN helicasas (Soultanas & Wigley, 2001). Uno de los grupos más estudiados pertenece a la familia RecQ. La mayoría de organismos unicelulares posee un solo miembro de helicasas dentro de la familia, mientras que organismos más evolucionados expresan dos o más. En las células humanas podemos identificar 5 miembros dentro de la familia: RECQ1, RECQ4, RECQ5, WRN y BLM (Chu & Hickson, 2009).

Existen tres regiones conservadas dentro de esta familia de proteínas: el dominio helicasa, encargado de utilizar la energía derivada de la unión e hidrólisis de los NTPs (nucleósidos trifosfatos) para catalizar el desenrollamiento de las hebras de ADN; el dominio RecQ carboxyterminal (RQC) y el dominio menos conservado Helicasa y RNasa D C-terminal (HRDC) (Figura 2). Este último, comparte una secuencia homóloga con un dominio de las RNasas D de la familia de las nucleasas (Bennett & Keck, 2004).

La función de esta familia de proteínas, está relacionada con el mantenimiento y estabilidad genómica. Las mutaciones en tres miembros de la familia: BLM, WRN y RECQL4 (proteína del síndrome de Bloom, proteína del Síndrome de Werner y la Helicasa Q4 dependiente de ATP, respectivamente) desencadenan desordenes asociados con cáncer y envejecimiento prematuro (Opresko *et al.*, 2004). Mientras que las mutaciones con pérdida de función en BLM y WRN están asociados a un solo tipo de

síndrome, alteraciones en RECQ4 están asociadas a tres desordenes: Rothmund-Thomson, RAPADLINO y al síndrome Baller-Gerold (Chu & Hickson, 2009).

### **3.2 El síndrome de Werner**

En el año 1904, Otto Werner describió una enfermedad rara durante la cual se desarrollan características relacionadas a un envejecimiento acelerado y prematuro (Figura 3). Usualmente es categorizada como un síndrome segmental progeroide, el cual afecta múltiples órganos y tejidos (Martin & Oshima, 2000).

Los pacientes tienen una vida media de 48 a 56 años, tras la cual fallecen a causa de enfermedades vasculares o cáncer. (Goto *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2006). Se ha evidenciado que células somáticas derivadas de pacientes con Síndrome de Werner presentan una inestabilidad genómica con alta incidencia en la reorganización cromosomal, siendo incapaces de reparar el ADN dañado y presentan un ciclo replicativo menor comparado con células control (Martin, 2014).

Las personas con síndrome de Werner tienen una tasa de crecimiento anormalmente lenta deteniéndose en la pubertad. Como resultado, los individuos afectados tienen baja estatura y bajo peso en relación con la altura. Al ser un síndrome de progeria adulto, los síntomas clínicos empiezan a manifestarse alrededor de la segunda década de vida. A los 25 años, las personas portadoras del síndrome suelen experimentar encanecimiento temprano y pérdida prematura del cabello del cuero cabelludo (alopecia). A medida que avanza la enfermedad, otras anomalías se presentan e incluyen la pérdida de la capa de grasa debajo de la piel (tejido adiposo subcutáneo); desgaste (atrofia) grave del tejido muscular en determinadas zonas del cuerpo; y cambios degenerativos de la piel, particularmente en el área facial, la parte superior de los brazos y las manos, y la parte inferior de las piernas y los pies (extremidades distales). Debido a los cambios degenerativos que afectan el área facial, las personas con síndrome de Werner pueden tener ojos inusualmente prominentes, nariz picuda o pellizcada y / u otras anomalías faciales característica (Oshima, J., Sidorova, J., Monnat, 2017; Takemoto *et al.*, 2013).

Otras enfermedades presentes son: diabetes mellitus tipo II, osteoporosis, cataratas, pies planos, aterosclerosis, etc. (Epstein, J.; Martin, G.; Schultzs, A.; Motulskys, 1966)

y se han identificado 5 neoplasmas distintos en pacientes con síndrome de Werner: sarcomas de tejidos suaves, carcinoma de tiroides, osteosarcoma, melanoma acral lentiginoso y meningioma (Goto *et al.*, 1996; Lauper *et al.*, 2013).

### **3.3 La proteína del síndrome de Werner (WRN)**

La proteína del síndrome de Werner es codificada por el gen del mismo nombre. La pauta de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés) del gen contiene 35 exones, cuyo producto es una proteína de 1432 aminoácidos (aa), con un peso molecular de 162.5 kDa que pertenece a la familia de las RecQ ADN helicasas humanas. Esta familia de proteínas está compuesta por 5 miembros: BLM (relacionada al síndrome de Bloom), WRN, RTS (relacionada al síndrome Rothmund Thomson), RECQ1, RECQ2 y RECQ5 (Shimamoto *et al.*, 2004). Cabe resaltar que de todos los miembros, WRN es el único que posee actividad 3'-5' exonucleasa (Opresko *et al.*, 2018).

Aunque se desconoce si la actividad helicasa propia de esta familia actúa simultáneamente con la actividad exonucleasa *in vivo*, investigaciones han demostrado que aparentemente ambas estarían actuando en conjunto para catalizar la degradación de ciertas estructuras de ADN. (Shen & Loeb, 2000).

#### **3.3.1 Dominios funcionales de la proteína de Werner (WRN)**

Análisis bioquímicos y bioinformáticos han identificado potenciales dominios funcionales en la proteína WRN, estos dominios se identifican como: 3'-5' exonucleasa en el extremo amino-terminal, el dominio ATPasa (incluye el motivo DEAH), el dominio RQC en la región central (y que forman el núcleo helicasa) y el dominio HRDC en la región C-terminal, el cual contiene además la señal de localización nuclear (NLS) (Figura 5) (Coppedè, 2013; Moser *et al.*, 1999).

##### **3.3.1.1 La Región Amino-terminal (N-terminal) de WRN**

Dentro de la familia RecQ helicasas humanas, WRN es la única que contiene en el extremo N-Terminal un dominio 3'-5' exonucleasa dependiente de la hidrólisis de ATP (Shen & Loeb, 2000) y que puede ser estimulado por interacciones con la proteína Ku (B.

Li & Comai, 2001). El dominio exonucleasa toma diferentes estructuras de ADN como sustratos, inicia la digestión en los extremos 3' que contengan burbujas, horquillas, *loops* o uniones de Holliday (Kamath-loeb *et al.*, 2012), así como complejos ARN-ADN.

La estructura cristalográfica del dominio exonucleasa de WRN (WRN-Exo) reveló que está formado por un pliegue  $\alpha\beta$  compuesto por una hoja  $\beta$  central rodeada por siete  $\alpha$  hélices y loops (Figura 6 A). Un modelo estructural permitió visualizar la formación de un anillo de seis dominios de exonucleasa con sitios de unión y sitios catalíticos orientando la parte interna del anillo donde interactuaría con el ADN (Figura 6 B). Además, se pudo confirmar que el mecanismo de exonucleasa es mediado por la unión de los metales  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  (Perry *et al.*, 2006).

Todos estos datos sugieren que WRN cumpliría un rol importante en la replicación y reparación del ADN.

### **3.3.1.2 La región central de WRN**

En esta región se localizan dos importantes dominios: ATPasa y RQC y que en conjunto forman el núcleo helicasa. El primero de estos es el responsable de proporcionar la energía (proviene de la hidrólisis del ATP) necesaria para que se produzca la reacción helicasa generada por el dominio RQC.

El dominio ATPasa es además el dominio más grande y conservado dentro de las RecQ helicasas humanas (Moser *et al.*, 1999) presentando un motivo que lleva la secuencia consenso DEAH (Oshima, 2000). En su extremo C-Terminal de este dominio se localiza el subdominio Zinc (Zn), conservado en la familia RecQ y usualmente combinado con la secuencia del dominio RQC. (Kitano *et al.*, 2010)

El dominio RQC es la principal región de unión al ADN en las RecQ helicasas. Se compone por cinco  $\alpha$ -hélices y cuatro hebras- $\beta$  y cumple un rol fundamental en las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN, donde los *loops*  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  juegan un papel importante interactuando específicamente con extremos romos del ADN duplex logrando desemparejar los pares de bases e impidiendo que se vuelvan a unir (Kitano, 2014) (Figura 7).

### **3.3.1.3 Región C-terminal de WRN**

El dominio HRDC (Helicase and RNaseD C-terminal, por sus siglas en inglés) se presenta únicamente en dos miembros de las RecQ helicasas humanas, WRN y BLM. La estructura cristalográfica del dominio HRDC (Figura 8) comprobó que es termoestable y resistente a la digestión de proteasas y se presenta como un monómero en solución, mostrando tener una débil afinidad con el ADN *in vitro*. (Kitano *et al.*, 2007).

La región C-terminal de este dominio también lleva una secuencia de direccionamiento nucleolar dependiente de la señal de localización nuclear (NLS) (C. von Kobbe, 2002). Se ha registrado que las mutaciones en la región C-terminal dan como resultado una proteína trunca que es incapaz de ingresar al núcleo como consecuencia de la pérdida de la NLS (Matsumoto *et al.*, 1997).

## **IV. HIPOTESIS**

Previos estudios han mostrado que la depleción de la proteína WRN induce en células cancerosas senescencia replicativa que finalmente dispara la apoptosis (Comai & Li 2004, Davis *et al.* 2007). La reciente observación de la interacción de WRN con componentes de los NPC (Kaur *et al.* 2010, Li *et al.* 2013) y los resultados que demuestran que la depleción de WRN altera la síntesis proteica sin afectar a la expresión génica, junto a la retención de los ARNm en el núcleo células de cáncer HeLa (Iglesias-Pedraz *et al.*, 2020; B. Li *et al.*, 2014) conducen a proponer la hipótesis: “Si la depleción de WRN altera la distribución espacial de los ARNm la cual reduce la capacidad de síntesis proteica y WRN está asociada a los poros nucleares, entonces WRN podría interactuar con los ARNm facilitando su translocación hacia el citoplasma a través de los NPC.

## **V. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 Lugar de ejecución**

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Genética Molecular y Bioquímica de la Universidad Científica del Sur (UCSUR), en el distrito de Villa el Salvador, provincia y departamento de Lima. El seguimiento de la tesis se realizó en

coordinación con el laboratorio de Biología Celular y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, ubicado en el distrito de Surco, Provincia y Departamento de Lima.

Los clonajes, expresión y purificación de los dominios proteicos y los ensayos EMSA y RT-qPCR se realizaron en el laboratorio de Control Post-Transcripcional y Expresión Génica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

## **5.2 Tipo y diseño de la investigación**

De acuerdo al enfoque de esta investigación, es una investigación experimental usando el método científico con análisis cualitativos y cuantitativos.

## **5.3 Variable**

Variables independientes: Proteína del Síndrome de Werner (WRN), dominios N-Terminal, ATPase, DEAD, RQC y C-Terminal de la proteína WRN.

Variables dependientes: Interacción proteína- ARNm en líneas celulares

## 5.4 Operacionalización de las variables

Las variables se organizan de la siguiente forma:

Objetivos específicos	Variable	Indicador	Escala de medida	Instrumento	Categorización de la variable
Comprobar la posible interacción de la proteína WRN con los ARNm <i>in vivo</i> en células HeLa, mediante la técnica de pull-down usando Oligo(dT) conjugado a esferas magnéticas.	V.I. Proteína del Síndrome de Werner (WRN). V.D. Interacción proteína-ARNm en líneas celulares.	Unidades de Intensidad Relativa (AU)	Razón	Análisis visual mediante Western blot de la interacción proteína-ARNm.	Cualitativa
Clonar y expresar los dominios N-Terminal, ATPase, DEAD, RQC y C-Terminal de la proteína WRN en el vector pGEX-4T1.	V.I. Dominios N-Terminal, ATPase, DEAD, RQC y C-Terminal de la proteína WRN. V.D. Confirmación de los clones positivos por enzimas de restricción.	Presencia o ausencia.	Razón	Análisis visual mediante Western blot de la interacción proteína-ARNm.	Cualitativa
Caracterizar la interacción <i>in vitro</i> de los dominios N-Terminal, ATPase y DEAD con los ARNm mediante <i>Shift Assay</i> y RT-qPCR.	V.I. Dominios N-Terminal, ATPase, DEAD, RQC y C-Terminal de la proteína WRN. V.D. Interacción de los dominios de WRN con los ARNm	Cambio en la Motilidad en gel de agarosa. Ciclo umbral (ct).	Razón	Análisis de los niveles de expresión de los fragmentos capturados	Cuantitativa

Tabla 1. Operacionalización de las variables.

## 5.5 Muestreo

Para realizar la extracción de proteínas y ARNm se utilizó la línea celular HeLa ATCC® CCL-2™ adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC) y mantenidas según recomendaciones en el laboratorio de Genética Molecular y Bioquímica de la Universidad Científica del Sur (UCSUR).

Para la expresión y purificación de los dominios proteicos se utilizaron las cepas bacterianas de *E. coli*: DH5α Y BL21 RIL.

## **5.6 Procedimiento y análisis de datos**

### **5.6.1 Procedimiento**

#### **5.6.1.1 Material Biológico**

Se utilizó la línea de cultivo celular HeLa (ATCC® CCL-2™) adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC) y mantenidas según recomendaciones en el laboratorio de Genética Molecular y Bioquímica de la Universidad Científica del Sur (UCSUR).

**5.6.1.2 Identificación de la interacción proteína-ARNm *in vivo* en células HeLa, mediante la técnica de pull-down con Oligo(dT) conjugado a esferas magnéticas.**

##### **5.6.1.2.1 Cultivo de células HeLa**

Las células se cultivaron en 15 placas de 100mm x 20mm en medio DMEM completo (10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) en una incubadora humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C hasta alcanzar un 80% de confluencia (el tiempo de incubación puede variar dependiendo de la confluencia inicial del cultivo).

##### **5.6.1.2.2 Obtención de las proteínas totales**

Cada placa fue lavada 2 veces con PBS frío y se procedió a rasparlas para luego colectarlas por centrifugación a 1200 g x 5 minutos. El pellet celular fue resuspendido en 1 mL de PBS frío y se dividió en 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.

Se eliminó el sobrenadante y las células fueron lisadas en 500 uL de buffer de lisis (25 mM Tris pH 6.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 150 mM NaCl) en presencia de 10 mM de Complejo Vanadil Ribonucleósido (VRC) para inhibir las ARNasas endógenas en uno de los tratamientos y con 100 µg/mL de RNasa A (libre de DNAsa) para el otro.

Ambos tubos fueron homogenizados resuspendiendo el pellet con una pipeta y utilizando una jeringa de insulina para acelerar la lisis células. El extracto celular se dejó

incubar durante 1 hora y media en hielo y luego se centrifugaron ambos tubos a 15,000 x g por 1 hora a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se tomó una pequeña alícuota de cada tratamiento para su análisis por Western Blot y electroforesis de agarosa para la visualización de la integridad de los ARN totales.

#### **5.6.1.2.3 Hibridación con Oligo(dT) conjugado a esferas magnéticas**

Se colocaron 50 uL de la suspensión de Oligo(dT)<sub>25</sub> conjugado a esferas magnéticas (*NEB*) en un rack magnético para eliminar el tampón de almacenamiento, posteriormente se equilibró la resina con 1 mL de buffer y luego se bloqueó con BSA al 5% a temperatura ambiente durante 1 hora con rotación constante. Concluido el tiempo de bloqueo, se incubó el lisado celular con las esferas magnéticas durante 1 hora a 4°C. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 1 mL de buffer de lisis conteniendo 2mM PMSF y se eluyó calentando las muestras a 95°C con 20 uL de tampón de carga para proteínas.

#### **5.6.1.2.4 Electroforesis de agarosa**

Para verificar la integridad de los ARNm luego de ambos tratamientos, se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1% preparado en agua DEPC (0.1%).

#### **5.6.1.2.5 Western Blot**

Las alícuotas de los extractos de proteínas tratadas con VRC, RNasa A y las eluciones de ambos tratamientos se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos con tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 1% β-mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, 0.02 % azul de bromofenol) para proteínas. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% y se resolvieron a 150V durante 1 hora.

Finalizada la electroforesis, se procedió a transferir las muestras en membranas de nitrocelulosa con tampón carbonato de sodio (6.275 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.325 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 250V durante 100 minutos.

### **5.6.1.3 Clonaje, expresión y purificación de los dominios funcionales N-Terminal, ATPase, DEAD, RQC y C-Terminal en el vector de expresión pGEX-4T1**

#### **5.6.1.3.1 Amplificación de las secuencias por PCR convencional**

Para las amplificaciones por PCR se usó el enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (*Thermo Scientific*) utilizando como molde de ADN el vector GFP-WRN y *primers* específicos para cada dominio (Figura 9).

##### **N-Terminal (181-687bp)**

*Forward:* 5' -ACGCGTCGACagATGAGTGAAAAAAAAATTGGAAACAACACTG-3'

*Reverse:* 5' - TATTCTTAGCGGCCGCagAATTTGTTTCTGTTGTACTCCCCC -3'

##### **ATPase (1612-3030bp)**

*Forward:* 5'-ACGCGTCGACagACTTGCCTCAAGATGTACTTTGG-3'

*Reverse:* 5' - TATTCTTAGCGGCCGCagAAGCCAATTTCTACCCTTTTTTCG-3'

##### **DEAD (1651-2136bp)**

*Forward:* 5'- ACGCGTCGACagACTTGCCTCAAGATGTACTTTGG-3'

*Reverse:* 5' - TATTCTTAGCGGCCGCagGAGGACGTGACAAGAACTTTGAA-3'

##### **RQC (2872-3153bp)**

*Forward:* 5'- ACGCGTCGACagGACATTA ACTTAAATAGGCACCTTCTT-3'

*Reverse:* 5' - TATTCTTAGCGGCCGCagAAGCCAATTTCTACCCTTTTTTCG-3'

##### **C-Terminal (3465-4296bp)**

*Forward:* 5'- ACGCGTCGACagTTATATGGCAAATTGGTAGAAGCTAGG-3'

*Reverse:* 5' - TATTCTTAGCGGCCGCagACTAAAAGACCTCCCCTTTTTTCG-3'

#### **5.6.1.3.2 Clonajes en los vectores pJET1.2/blunt y pGEX-4T1**

Los clonajes se realizaron en dos etapas. Primero se clonaron en el vector pJET1.2/blunt que permite la ligación directa de los productos de PCR con extremos romos generados por la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (*Thermo*

*Scientific*) para luego realizar digestiones con las enzimas de restricción *Not I* y *Sal I* y subclonarlos en el vector pGEX-4T1 utilizando la enzima T4 ligasa (*New England Biolabs*) a 16°C durante 8 horas. Los productos de ligación se transformaron en bacterias competentes *E.coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico y se sembraron en placas con ampicilina (50  $\mu$ g/mL) y cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL) las cuales se incubaron a 37°C por 8 horas. Se seleccionaron colonias aisladas para la confirmación de los clones positivos por enzimas de restricción; todos los plásmidos fueron purificados utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (*QIAGEN*).

Los insertos confirmados por enzimas de restricción fueron enviados al Centro de Investigaciones sobre el Genoma Humano y Células Troncales, del Instituto de Biociencias de la Universidad de Sao Paulo para confirmar la correcta inserción de los dominios de Werner y la ausencia de posibles mutaciones.

## **5.6.2 Expresión y purificación de los dominios de WRN**

### **5.6.2.1 Test de expresión y solubilidad**

Todos los dominios clonados en el vector pGEX-4T1 fueron transformados mediante shock térmico en las cepas de *E. coli* BL21 RIL, Plyss, Artic, Rosseta y Origami. Se probó la inducción de expresión a diferentes temperaturas: 12°C, 18°C, 30°C y 37°C, con diferentes concentraciones de IPTG: 0.5mM y 1mM e inducciones con lactosa para determinar que cepa y condición de cultivo e inducción era la más adecuada para lograr obtener la proteína soluble.

### **5.6.2.2 Expresión del dominio N-Terminal**

Se transformó las cepas BL21 RIL con el vector pGEX-4T1-NTER mediante choque térmico y se incubó un pre-inóculo de caldo nutritivo LB con 34  $\mu$ g/mL de cloranfenicol y 50  $\mu$ g/mL de ampicilina a 37°C durante 8 horas.

Se indujo 10 litros de cultivo 2YT con 1 mM de IPTG durante 3 horas a 30°C con agitación constante; se colectaron centrifugando a 4°C y 10,000 rpm durante 10 minutos (rotor F12-6x500 LEX *Thermo Scientific*).

El pellet bacteriano se resuspendió en Buffer de Lisis (1X PBS, 150 mM NaCl, 5% Glicerol, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol), posteriormente se agregó lisozima (1 mg/mL) y DNasa I (0.1 mg/mL). La suspensión bacteriana se pasó 5 veces por *Avestin Emulsiflex C3* para asegurar la completa lisis bacteriana.

Finalmente, la muestra se centrifugo a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C (rotor F21-8x50Y *Thermo Scientific*). Se colectó el sobrenadante para identificar la presencia de la proteína soluble por SDS-PAGE.

#### **5.6.2.2.1 Cromatografía de afinidad con Glutaciona Sefarosa**

Se tomó 1 mL de resina Glutaciona Sefarosa, la cual fue lavada con 5 volúmenes de Agua MilliQ y equilibrada con 5 volúmenes de buffer de lisis. El sobrenadante celular que contiene la proteína de interés fue incubado con la resina durante 2 horas con rotación constante a 4°C. Pasado este tiempo, se lavó la resina con 10 volúmenes de buffer de lavado (1X PBS, 350 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol).

La proteína de interés se obtuvo incubando la resina durante 20 minutos con 6 mL de buffer de elución (50 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM Glutaciona reducida) con rotación constante a 4°C.

Se tomó una alícuota en cada paso y se corrieron en un SDS-PAGE (lisado total, lavados y elución) para monitorear la correcta purificación de la proteína.

Para realizar el segundo paso de purificación por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) se concentró la elución a un volumen final de 2mL utilizando tubos Amicon ultra-15 (Merck Millipore).

#### **5.6.2.2.2 Purificación por cromatografía de gel de filtración**

La estrategia elegida para purificar el dominio N-Terminal fue a través cromatografía de gel de filtración en una columna *High Load 26600 Superdex 200pg* utilizando el sistema AKTA, la cual fue pre equilibrada *over night* con Buffer de Lisis (1X PBS, 150

mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoetanol, 5% glicerol). Se inyectó la muestra utilizando un *loop* de 2 mL.

Se seleccionaron y concentraron las fracciones de los picos mostrados en la corrida cromatográfica. Las fracciones correspondientes fueron: 22-25; 34-36; 41-43, las cuales se analizaron por SDS-PAGE para confirmar que la proteína purificada correspondía a N-Terminal. La concentración final de la proteína se determinó por absorbancia a 280 nm.

#### **5.6.2.2.3 Determinación del estado oligomérico de la proteína N-Terminal**

Para la caracterización del estado oligomérico en el que se encontraba la proteína, se realizó un ensayo de cromatografía por exclusión de tamaño con dispersión de luz por múltiples ángulos (SEC-MALS por sus siglas en inglés).

Se equilibró *overnight* una columna Superdex 200 10/300 grado analítico con buffer de equilibrio (20 mM Tris-HCl pH8 y 100 mM NaCl), luego se inyectó 100 uL de ambas fracciones identificadas en la purificación por gel de filtración a ambos experimentos que se realizaron a temperatura ambiente.

#### **5.6.2.3 Expresión del dominio ATPasa**

Se transformó la cepa BL21 RIL con el vector PGEX-4T1-ATPasa por choque térmico, se incubó un pre inóculo de caldo de cultivo 2YT con 34ug/mL de cloranfenicol y 50  $\mu$ g/mL de ampicilina a 37°C durante 8 horas.

Se indujeron 10 litros de cultivo bacteriano con 0.5 mM de IPTG a 18°C por 8 horas con agitación constante. Se colectaron centrifugando a 10,000 rpm a 4°C durante 10 minutos (rotor F12-6x500 LEX *Thermo Scientific*).

##### **5.6.2.3.1 Obtención de la proteína soluble ATPasa desde cuerpos de inclusión**

Se siguió el protocolo de solubilización de cuerpos de inclusión utilizando sarkosyl, tritón X-100 y CHAPS (Massiah *et al.*, 2016). Se pesaron 4 gramos de pellet bacteriano

y se resuspendieron en buffer de lisis (1X PBS, 150 mM NaCl, 20 mM  $\beta$ -Mercaptoetanol). Se incubó la suspensión en hielo durante 30 minutos y se agregó lisozima a una concentración final de 1 mg/mL. Luego se añadió 10 uL de DNasa I (0.1 mg/mL) y se incubó por 30 minutos más en hielo con agitación constante.

A la suspensión celular se le añadió 1.3 mL de sarkosyl (concentración final 1% partiendo de un stock al 30%), se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación constante. Para finalizar con la lisis, la suspensión se pasó 5 veces por *Avestin Emulsiflex C3*.

Por último, la muestra se centrifugó a 10, 000 rpm durante 30 minutos a 4°C (rotor F21-8x50Y *Thermo Scientific*). Se colectó el sobrenadante para identificar la presencia de la proteína soluble por SDS-PAGE.

#### **5.6.2.3.2 Cromatografía de afinidad con Glutaciona Sefarosa**

Se tomaron 750 uL de resina Glutaciona sefarosa y se lavó con 5 volúmenes de agua MilliQ para eliminar el etanol presente en la suspensión, luego se equilibró con 5 volúmenes de buffer de lisis.

Por cada 1% de sarkosyl presente en el lisado se añadió 2% de Triton-X100 y 20 mM de CHAPS. Una vez homogenizado, se incubó con la resina previamente equilibrada durante 4 horas a temperatura ambiente con rotación constante.

Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a lavar la resina 5 veces con 10 volúmenes de buffer de lavado (1X PBS, 200 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). La proteína de interés se obtuvo incubando la resina con rotación constante a 4°C durante 20 minutos con 6 mL de buffer de elución (50 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM Glutaciona reducida). Se tomó una alícuota en cada paso y se corrieron en un SDS-PAGE (lisado total, lavados y elución) para monitorear la correcta purificación de la proteína. Al confirmar la presencia de la proteína en la elución, se concentró a un volumen final de 2 mL y se corrió un Western Blot para su confirmación.

#### **5.6.2.4 Expresión del dominio DEAD**

Se transformó la cepa BL21 RIL con el vector PGEX-4T1-ATP por choque térmico, se incubó un pre inóculo de caldo de cultivo 2YT con 34 µg/mL de cloranfenicol y 50 µg/mL de ampicilina a 37°C durante 8 horas.

Se indujeron 10 litros de cultivo bacteriano 2YT con 0.5 mM de IPTG a 18°C por 8 horas con agitación constante. Se colectaron centrifugando a 10,000 rpm a 4°C durante 10 minutos (rotor F12-6x500 LEX *Thermo Scientific*).

##### **5.6.2.4.1 Obtención de la proteína soluble DEAD desde cuerpos de inclusión**

Se siguió el protocolo de solubilización, descrito por Massiah, M.A, de cuerpos de inclusión utilizando sarkosyl, tritón X-100 y CHAPS (Massiah *et al.*, 2016). Se pesaron 4 gramos de pellet bacteriano y se resuspendieron en buffer de lisis (1X PBS, 150 mM NaCl, 20 mM β-Mercaptoetanol). Se incubó la suspensión en hielo durante 30 minutos y se agregó lisozima a una concentración final de 1mg/mL. Luego se añadió 10 uL de DNasa I (0.1 mg/mL) y se incubó por 30 minutos más, en hielo con agitación constante. Toda la suspensión se pasó 5 veces por *Avestin Emulsiflex C3* y se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C (rotor F21-8x50Y *Thermo Scientific*).

Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet que contiene los cuerpos de inclusión con 5 mL de buffer de lisis y 10% de sarkosyl. Se dejó incubando este nuevo lisado *overnight* a temperatura ambiente con agitación constante. Al día siguiente, se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 30 minutos. La presencia de la proteína soluble fue confirmada mediante SDS-PAGE.

##### **5.6.2.4.2 Purificación mediante Cromatografía de afinidad usando Glutaciona Sefarosa**

La metodología seguida en este apartado, fue efectuada de forma similar al protocolo mencionado en el punto 5.6.2.4.2 (Cromatografía de afinidad con Glutaciona Sefarosa del dominio ATPasa).

### **5.6.3 Determinación de la interacción *in vitro* de los dominios N-Terminal, ATPase y DEAD con los ARNm.**

#### **5.6.3.1 Purificación de ARNm de células Hela**

La extracción de ARNs totales fue llevada a cabo utilizando el reactivo Trizol (*Invitrogen*) siguiendo las recomendaciones y protocolo del fabricante. Se cuantificó la concentración total mediante absorbancia a 260 nm y se procedió a purificar los ARNm utilizando una resina de Oligo(dT) celulosa. Por cada 20 µg de ARNs cuantificados, se añadió 50 uL de resina. Esta fue lavada dos veces con agua MilliQ tratada con DEPC y luego equilibrada 2 veces con buffer de equilibrio (1X PBS pH 7.4, 150 mM NaCl). La resina fue incubada durante media hora en hielo con los ARN totales. Luego se lavó 2 veces con buffer de equilibrio y se eluyó con agua MilliQ calentando las muestras a 95°C durante 5 minutos.

La elusión fue precipitada con acetato de sodio y etanol al 100% a -20°C *overnight*. Al siguiente día, se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 minutos, el *pellet* se lavó 2 veces con etanol al 70% y finalmente se resuspendió en 20 uL de agua DEPC. Todas las muestras se cuantificaron a una absorbancia de 260nm.

#### **5.6.3.2 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)**

##### **5.6.3.2.1 Electroforesis en gel nativo de acrilamida**

Se incubó 1 µg de cada proteína purificada con 1 µg de ARNm con buffer de unión (1X PBS, 150 mM NaCl). Se añadió 50 mM de MgCl<sub>2</sub> como cofactor para la reacción del dominio N-Terminal y 2 mM de ATP para los dominios ATPasa y DEAD. Paralelamente, se colocó 1 muestra de cada dominio incubado previamente con ARNm y acoplado a ARN mediante *crosslink* a 245 nm durante 10 minutos.

Las muestras se resolvieron en un gel nativo de acrilamida (7% acrilamida, 1X TBE, TEMED y APS) a 150V durante 3 horas y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 250mA durante una hora. Esta membrana fue sometida a *crosslink* a 245 nm durante 2 minutos para asegurar la fijación de los ARNm.

### **5.6.3.2.2 Técnica de Northern Blot y Western Blot**

Se preparó una reacción de biotilación de sonda Oligo(dT)<sub>20</sub> (5X TdT buffer de reacción, 100 nM Oligo(dT), 0.5 uM Biotina-11-UTP, 0.15 U/ uL enzima TdT), la cual se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Las membranas de nitrocelulosa fueron prehibridadas con buffer de hibridación (5X SSPE, 5X Solución Denhardt, 0.1% SDS, 50 µg de esperma de salmón) durante 2 horas a 37°C. Luego de este tiempo las membranas se incubaron *overnight* con 10 mL de buffer de hibridación y sonda Oligo(dT) biotilada. Al siguiente día, se revelaron las membranas utilizando el kit *Light Shift chemiluminiscent EMSA (Thermo Scientific)*.

Luego de revelar las membranas por Northern Blot, estas se lavaron 3 veces con TBS-T (1X TBS, 0.5% Tween-20), se bloquearon por una hora en 5% de leche descremada y se incubaron con anticuerpo primario Anti-GST por 8 horas a 4°C. Finalizado este tiempo, se lavó las membranas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos y se incubó con anticuerpo secundario fluorescente durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el revelado del Western Blot se utilizó el sistema Odyssey 9120 *Imaging System* (LICOR Biosciences).

### **5.6.3.3 Detección de los ARNm ligados a los dominios N-terminal, ATPasa y DEAD mediante RT-PCR**

#### **5.6.3.3.1 Técnica de pull-down con resina de glutationa sefarosa**

Se adicionó 50 uL de resina Glutationa Sefarosa a los dominios purificados N-terminal, ATPasa y DEAD durante 2 horas. Luego se agregó 5 µg de ARNm y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después del periodo de incubación, cada tratamiento se lavó 3 veces con buffer de lavado (1X PBS, 150 mM NaCl). Finalmente, se purificó los ARNm por el método de Trizol y se procedió a realizar la reacción de transcriptasa reversa para utilizar el ADN complementario (cADN) como molde para la reacción de RT-qPCR.

#### **5.6.4 Procesamiento y Análisis de datos**

Dada la complejidad y variedad de la experimentación realizada, el procesamiento y análisis de los datos se realizó de manera independiente y según la metodología experimental realizada para cada objetivo. Los clonajes positivos de los dominios en el vector pGEX-4T1 fueron comprobados mediante digestiones con enzimas de restricción y corridas electroforéticas en gel de agarosa. La verificación de las expresiones proteicas se realizó por electroforesis en poliacrilamida (PAA) y tinción de Coomassie. En el caso de los ensayos EMSA se evaluó los cambios en la movilidad electroforética y para los ensayos de qPCR se compararon los niveles de Ct de cada tratamiento. Todos los ensayos fueron realizados un mínimo de tres veces cada uno.

### **VI RESULTADOS**

#### **6.1 Interacción *in vivo* entre la proteína de WRN con los ARN mensajeros.**

##### **6.1.1 Integridad de los ARN de extractos totales de células HeLa**

Con el fin de demostrar que la interacción observada entre WRN y los ARNm, tras los ensayos de pull-down, es debido a una interacción directa con los ARNm y no a una interacción inespecífica entre WRN y las esferas magnéticas, alícuotas provenientes de ambos tratamientos (RVC y RNasa A) tras el periodo de incubación de las muestras con el Oligo(dT) fueron resueltos en un gel de agarosa. Los resultados obtenidos tras el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa muestran que el RVC protege a los ARN de la degradación por acción de las RNasas endógenas, manteniendo su integridad a lo largo de todo el protocolo de incubación. Esta protección se evidencia por la detección de bandas bien definidas de los correspondientes ARN ribosomales 28S, 18S y 5.8S. Sin embargo, dicha bandas no son detectadas en las muestras tratadas con RNasa A (libre de DNasa), indicando que la interacción entre WRN y los ARNm es estrictamente dependientes de la integridad de los ARNm (Figura 10B).

### **6.1.2 Ensayos de pull-down con Oligo(dT)<sub>25</sub> conjugado a esferas magnéticas**

Dado que la depleción de WRN afecta los niveles proteicos de enzimas metabólicas clave sin alterar sus niveles de expresión génica (Iglesias-Pedraz et al., 2020; B. Li et al., 2014) y dado que WRN interacciona con componentes de los poros (Kaur et al., 2016) y que su depleción además causa una alteración en la distribución espacial de los ARNm (Iglesias-Pedraz et al., 2020), se planteó definir si la proteína WRN era requerida por las células HeLa para la correcta localización de los ARNm. De esta forma se propuso evaluar si la proteína WRN era capaz de interactuar con los ARNm. Para identificar esta posible interacción llevamos a cabo ensayos de pull-down usando Oligo(dT) conjugado a esferas magnéticas, los cuales se unen exclusivamente a los ARNm y los complejos proteicos asociados. Como control de la especificidad de la interacción usamos dos proteínas de unión a los ARNm, CBP80 y NXF1. Tubulina fue usado como control negativo de la interacción. Tanto NXF1 como la proteína de unión a los ARNm CBP80, pero no la tubulina, fueron capturadas de manera eficiente solo en los extractos que no fueron tratados con RNasa A (Fig. 9A), lo que confirma la especificidad del ensayo para capturar proteínas de unión al ARNm. Sorprendentemente, se detectó a la proteína WRN en el material unido al Oligo(dT) del extracto tratado con RVC, pero ausente en el pull-down de la muestra tratada con RNasa A, lo que indica que la captura de WRN depende de la integridad del ARNm (Fig. 9B). Este hallazgo demuestra un vínculo novedoso entre WRN y mRNA.

## **6.2 Clonaje de los dominios N-Terminal, C-terminal, ATPasa, DEAD y RQC**

### **6.2.1 Clonaje de los dominios de WRN en el vector pJET1.2/blunt**

Para definir que dominios o regiones de la proteína WRN es la responsable de la interacción con los ARNm, cada uno de los dominios de WRN fue correctamente amplificado por PCR convencional y clonados en el vector de destino pJET1.2/BLUNT para ser expresados más adelante en el vector pGEX-4T1. El análisis de los dominios amplificados mediante PCR y visualizados en gel de agarosa indica que dichos fragmentos poseen los tamaños esperados: WRN Full length 4296 bp, WRN N-Terminal 999 bp, WRN C-Terminal 831 bp, WRN Dead 951 bp, WRN ATPasa 1543 bp y WRN RQC 540 bp (Figura 11). La correcta inserción de los dominios en el vector pJET1.2/blunt

fue confirmada por digestión con enzimas de restricción y se confirmó la ausencia de mutaciones luego del análisis de secuenciación.

### **6.2.2 Clonaje de los dominios en el vector de expresión pGEX-4T1**

Con el fin de producir o expresar los fragmentos proteicos derivados de la proteína WRN se propuso generar fusiones a la GST usando el vector de expresión pGEX-4T1. El diseño de los clonajes se muestra en la Figura 12. Estas fusiones fueron confirmadas posteriormente usando enzimas de restricción y los resultados demuestran que se ha podido clonar de manera eficiente cada uno de los fragmentos en el vector de expresión pGEX-4T1 (Figura 13).

## **6.3 Expresión y purificación de los dominios de WRN**

La expresión de proteínas humanas en sistemas bacterianos es un tarea compleja y dificultosa que se ve afectada por muchos factores tanto endógenos como exógenos. Dentro de los factores endógenos esta la formación de cuerpos de inclusión debido a una muy alta expresión de genes heterólogo lo que conduce a agregados intercelulares de proteína. Estrategias utilizadas en biotecnología para ayudar a reducir la formación de estos cuerpos de inclusión incluyen la puesta a punto de factores exógenos como son la selección de la cepa bacteriana a usar, la temperatura de inducción, el tiempo de inducción y la concentración final del inductor de la expresión, siendo el compuesto más común el IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). Durante el proceso de expresión y purificación de las proteínas de fusión de los fragmentos de WRN y de WRN completo se llevó a cabo mediante una serie de protocolos destinados a obtener la mayor cantidad posible de proteína soluble. Los resultados obtenidos para cada uno de los fragmentos se detallan a continuación.

### **6.3.1 Expresión de los dominios Full Length, C-Terminal y RQC**

La proteína de fusión correspondiente a la longitud total de la proteína WRN y los dominios C-terminal y RQC mostraron escasa o nula expresión de dichas proteínas de fusión pese a usar diferentes condiciones de temperatura, concentraciones de IPTG o Lactosa, tiempos de inducción y diferentes cepas bacterianas (Figura 14). De tal forma

que no pudimos purificar ni los fragmentos ni la proteína WRN completa durante nuestra experimentación.

### **6.3.2 Expresión y purificación del dominio N-Terminal**

Para el caso del dominio N-Terminal, los niveles de expresión fueron excepcionalmente altos mostrando niveles elevados de expresión bajo las condiciones señaladas en la parte experimental (Figura 15A). Este fragmento generado fue purificado en dos etapas: la primera de ellas por cromatografía de afinidad con resina de Glutathione Sefarosa tras la cual se eluyeron dos fracciones con 25 mM de Glutathione Reducida y luego se concentraron a un volumen de 2 mL para volver a purificarse por gel filtración en una columna High Load 26600 Superdex 200 prep grade. Así, fue posible observar la expresión y purificación del dominio mediante un SDS-PAGE en un gel al 10%. (Figura 15).

### **6.3.3 Determinación del estado oligomérico del dominio N-Terminal**

Una de las técnicas empleadas en laboratorios para separar las proteínas por tamaños y formas es a través de filtración en gel. Este método analítico permite caracterizar moléculas en solución. El método SEC-MALS (cromatografía por exclusión de tamaño con dispersión de luz por múltiples ángulos), combina el gel filtración convencional con técnicas de dispersión de la luz, índice de refracción y ultravioleta. Esta técnica permite calcular los pesos moleculares de las proteínas calculando la cantidad de luz dispersada y detectada por los sensores MALS. El análisis SEC-MALS indicó que el dominio N-Terminal se encontraba en dos conformaciones: como un oligómero y un dímero. (Figura 16).

### **6.3.4 Test de expresión de los dominios ATPasa y DEAD**

Al igual que para los dominios C-Terminal, RQC y WRN, la expresión de estos dominios fue evaluada en las cepas de *E.coli* BL21 RIL, Plyss, Artic y Rosseta con distintas condiciones de temperatura, al lisar los pellets bacterianos y resolverlos mediante SDS-PAGE se evidenció que ambas proteínas quedaban retenidas en cuerpos de inclusión (Figura 17 y 18).

### **6.3.5 Obtención de las proteínas ATPasa y DEAD desde cuerpos de inclusión**

Con la finalidad de obtener estos fragmentos de forma soluble, los vectores que contenían las estructuras en mención fueron inducidos durante 8 horas a 18°C con 0.5 mM de IPTG. Ambos pellets bacterianos fueron lisados utilizando el protocolo de solubilización de cuerpos de inclusión con Sarkosyl. Para reconstituir la proteína se añadió 2% de Triton-X100 y 20 mM de CHAPS por cada 1% de sarkosyl. Se comprobó la presencia de la proteína soluble por SDS-PAGE. (Figura 19 A).

Tras confirmar la presencia de las proteínas solubles en los lisados totales, se realizó una cromatografía de afinidad incubándolos durante 4 horas con resina de Glutathione Sefarosa. El análisis de la captura de las proteínas por la resina fue realizado por SDS-PAGE (Figura 19 B). Las eluciones de ambas proteínas fueron concentradas y se confirmó la presencia de ambas mediante Western Blot. (Figura 19 C).

### **6.4 Detección *in vitro* de la interacción de los dominios N-Terminal, ATPase y DEAD con los ARNm.**

#### **6.4.1 Cambio de movilidad electroforética (EMSA)**

Para determinar la interacción entre los dominios N-Terminal, ATPasa y DEAD con los ARNm, se llevaron a cabo ensayos EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay, por sus siglas en inglés). Luego de incubar cada fragmento con los ARNm, se resolvieron en un gel nativo de acrilamida al 7% y se analizaron mediante las técnicas de Western y Northern Blot.

Tras revelar las membranas por Western Blot del dominio N-Terminal con anticuerpo Anti-GST, se evidenció un cambio en la movilidad electroforética en los tratamientos con ARNm comparado con los controles (Figura 20 A). Al analizar las membranas de Northern Blot se pudo verificar la presencia de ARNm en los controles, pero no en los tratamientos que fueron hibridados con el dominio N-Terminal. (Figura 20 B), lo cual sugeriría que, al producirse una interacción, los ARNm quedarían retenidos en la parte superior del gel, modificando el patrón de corrida.

Respecto a los dominios ATPasa y DEAD, al analizar las membranas por Western Blot (Figura 20 C) y Northern Blot (Figura 20 D), no fue posible visualizar claramente un cambio en la movilidad electroforética.

#### **6.4.2 Detección de ARNm ligados a los dominios N-Terminal, DEAD y ATPasa por RT-PCR**

Con el fin de determinar las capacidades de unión de los fragmentos de WRN al ARNm, 50 uL de resina de Glutathiona Sefarosa unida con GST como control y resina unida a los dominios N-terminal, ATPasa y DEAD fueron preparadas. Luego de añadir 5 µg de ARNm e incubar las muestras por 2 horas a 37°C, fueron lavadas repetidamente y luego se prepararon para la síntesis del ADNc. Se utilizaron como dianas los genes RPS3 y G6PD para la comparación de las curvas de amplificación. El análisis de los resultados obtenidos por RT-qPCR muestra que, para ambos genes, RPS3 y G6PD el dominio N-Terminal captura con más eficiencia a los ARNm que los dominios ATPasa y DEAD en comparación con los controles (Figura 21 y 22). Estos resultados indican que WRN a través de su dominio N-Terminal es capaz de interactuar con los ARNm.

## **VII DISCUSIÓN**

El objetivo de este trabajo fue demostrar la interacción entre WRN y los ARNm en células HeLa mediante una serie de aproximaciones genéticas y moleculares que han permitido obtener evidencia experimental de que WRN interactúa con los ARNm a través de sus dominios N terminal, ATPasa y DEAD.

El transporte eficiente de ARNm es importante para la proliferación celular y en especial para las células cancerosas. Esto queda evidenciado por la sobreexpresión de algunos de los factores asociados a la maduración y/o transporte de los ARNm, los cuáles juegan un papel clave en el transporte de RNPs a través de los complejos poros nucleares (NPC) para su traducción a proteínas en el citoplasma (Beck & Hurt, 2016; Coyle *et al.*, 2011; Okamura *et al.*, 2015; Soheilypour & Mofrad, 2016). Se ha reportado que WRN interactúa con un subconjunto de proteínas de poros nucleares (Kaur *et al.*, 2016; Lachapelle *et al.*, 2011; Z. Li *et al.*, 2013), que incluyen NDC1, una nucleoporina transmembrana. Aunque se desconoce la importancia de estas interacciones, estos

hallazgos sugirieron que WRN podría contribuir a procesos como el transporte de ARNm que implican la translocación de los ARNm a través del complejo del poro nuclear. Por lo tanto, en la presente tesis se propuso estudiar la posible interacción de WRN con los ARNm como requerimiento para la correcta homeostasis de estas especies de ARNs.

Diversos autores han descrito que, a través de una red de interacciones proteína-proteína, WRN contribuye a varios procesos nucleares, incluida la homeostasis de la longitud de los telómeros, la replicación y reparación del ADN (Ahn *et al.*, 2004; Bohr, 2008; Chen *et al.*, 2003; Comai & Li, 2004; Crabbe *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2007; Harrigan *et al.*, 2006; Kusumoto *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2010; Shamanna *et al.*, 2017). Sin embargo, no existe a la fecha reportes que describan la relación de WRN con los ARNs y especialmente con los ARNm. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de la presente investigación y llevados a cabo en células HeLa, proporcionan la primera evidencia de que WRN interacciona con los ARNm.

Utilizando dos enfoques distintos, observamos que WRN es capaz de interactuar con los ARNm. En la primera aproximación mediante la técnica de pull-down usando Oligo(dT) acoplado a esferas magnéticas observamos que la proteína WRN es retenida en los complejos capturados a partir de extractos totales de células HeLa, a los cuales se les ha protegido de la degradación de ARNs mediante VRC. Sin embargo, esta interacción es abolida por el tratamiento con RNasa A, indicando que esta interacción es dependiente de la integridad de los ARNs. Mediante la adición de controles experimentales en este ensayo se demuestra la eficiencia del experimento, observándose que las proteínas de unión al ARN CBP80 y NXF1 son eficientemente capturadas a partir de muestras que han sido protegidas de la degradación por acción de las ribonucleasas exógenas, pero no la tubulina, usada como control negativo de la interacción (Figura 10A). Estos ensayos demuestran que la interacción detectada para WRN no se debe a un artefacto ocasionado por la interacción inespecífica de WRN con las esferas magnéticas, o a la captura de complejos WRN-ADN (para el caso de los tratamientos con RNasa A libre de DNasa), confirmándose así la interacción de WRN con los ARNm (Figura 10B).

Aunque los resultados obtenidos con la técnica de pull-down usando Oligo(dT) acopladas a esferas magnéticas confirman que WRN es capaz de formar complejos con los ARNm, estos no confirmarían que esta interacción se produzca de manera directa

entre WRN y los ARNm, ya que esta podría estar dándose a través de interacciones proteína-proteína con proteínas de interacción al ARN y que formen parte del complejo de transporte. Sin embargo, estos resultados no han sido reportados con anterioridad.

Dado que ciertos dominios de la proteína WRN están implicados en la interacción con el ADN, se propuso evaluar si WRN era capaz de asociarse también con los ARNs. Para probar esta posibilidad se planteó realizar construcciones génicas de expresión usando los diferentes dominios de WRN (Figura 9). Así, mediante esta segunda aproximación y usando los ensayos de EMSA y RT-qPCR, se podría definir si alguno de los dominios podría estar involucrado en la interacción directa con los ARNm. Para este fin, la pauta de lectura abierta correspondiente a la longitud total de la proteína WRN y los fragmentos generados de sus dominios funcionales, fueron clonados como proteínas de fusión a GST y expresados usando sistemas bacterianos.

Los dominios funcionales de WRN y la longitud total de la proteína WRN fusionados a Glutathione S-transferasa (GST o GST- *tagged proteins*) (Figura 2) fueron purificados mediante cromatografía de afinidad. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada por diversos grupos de investigación, en los cuales se ha logrado obtener proteínas solubles dependientes del diseño del constructo (Cayetano Von Kobbe *et al.*, 2003). Sin embargo, al expresar los dominios ATPasa y DEAD, a pesar de visualizar una correcta expresión no fue posible obtener la proteína soluble (Figuras 16 y 17). Esto se debió a que ambos fragmentos de fusión estaban siendo retenidos en cuerpos de inclusión, a pesar de que se ha descrito que el *tag* de GST puede incrementar los niveles de expresión y mejorar la solubilidad de las proteínas fusionadas, pues actúa como una chaperona que facilita el correcto plegamiento de la proteína (Harper & Speicher, 2008), incluso cuando las inducciones se daban a bajas temperaturas utilizando cepas de *E. coli* Artic, lo que coincidimos con estos supuestos, dado nuestros resultados.

Así, los resultados obtenidos de la expresión proteica muestran que algunos de los fragmentos se generaron como cuerpos de inclusión (Figuras 16 y 17). Aunque existen diferentes métodos de solubilización para recuperar proteínas producidas como cuerpos de inclusión como el uso de detergentes aniónicos como el Sarkosil, el cual es uno de los métodos más eficientes y permite la recuperación de las proteínas precipitadas (Massiah *et al.*, 2016) dado que rompe las interacciones inter e intramoleculares en los agregados

proteicos de los cuerpos de inclusión solubilizándolas y encapsulando las proteínas. La adición subsecuente de otros detergentes zwitteriónicos como el CHAPS y el detergente no iónico Tritón X-100 que forman estructuras micelares que secuestran a las moléculas de sarkosyl facilitan subsecuentemente el correcto plegamiento de las proteínas liberadas. No obstante, a pesar de utilizar esta técnica existieron muchos inconvenientes durante la expresión y purificación de varios de los fragmentos de WRN y de WRN entero y en el presente trabajo solo se logró expresar y purificar con éxito el dominio N-Terminal fusionado a GST, obteniendo niveles elevados de expresión proteica de dicho fragmento *in vitro* (Figura 14) y el uso de detergentes como el Sarkosil facilitó purificar los dominios DEAD y ATPasa desde cuerpos de inclusión (Figura 18), lo cual permitió realizar los posteriores ensayos de interacción con los ARNm.

Con los fragmentos de WRN finalmente purificados y acoplados a la resina se iniciaron los ensayos de interacción proteína-ARN. Para este fin cada resina conteniendo el respectivo dominio de WRN fue incubado con los ARNm previamente purificados. Tras los respectivos lavados de rigor, los ARNm capturados fueron sometidos a análisis por RT- qPCR. El análisis de las curvas de amplificación de los genes diana G6PD y RPS3 muestran que los dominios N-Terminal, ATPasa y DEAD son capaces de interactuar con los ARNm. Al comparar las curvas de amplificación frente al tratamiento control de GST, quedó en evidencia que el dominio N-Terminal se estaría uniendo de manera más eficiente a los ARNm que los otros dominios (Figuras 20 y 21). Sin embargo, los otros dos dominios (ATPase y DEAD) muestran un grado de interacción moderada, siendo el dominio DEAD el que muestra menor carga de ARNm (Figura 21C). Las amplificaciones observadas con la resina GST vacía, sirven de patrón, y dichas amplificaciones corresponderían más a amplificaciones debido a interacciones inespecíficas de los ARNm con las resinas de glutatona, sirviendo además como un límite de amplificación específica a la cual los genes diana analizados en las resinas conteniendo los fragmentos de WRN como fusión a GST no deben acercarse.

Este resultado podría verse relacionado a la alteración espacial que sufren los ARNm tras la depleción de WRN en células HeLa. Con lo cual estos resultados fuertemente sugieren la participación activa entre WRN y la homeostasis de los ARNm, específicamente en el exporte de los ARNm.

## VIII CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en la presente investigación representan un hallazgo novedoso y son sumamente valiosos dado el contexto de su utilidad en salud. De los resultados obtenidos podemos concluir que:

- La proteína WRN podría ser necesaria para el correcto transporte nucleocitoplásmico de los ARNm en células de cáncer HeLa.
- Este requerimiento de la proteína WRN por las células de cáncer HeLa se ve reforzado por la interacción de WRN con los ARNm y se asegura la funcionalidad de WRN en el proceso de transporte nucleocitoplásmico de los ARNm.
- Se confirma la hipótesis de que WRN interactúa con los ARNm posiblemente facilitando su traslado hacia el citoplasma a través de los NPC.
- Los análisis mediante RT-qPCR demuestran que se produce una ligación entre los ARNm y los dominios de la proteína de Werner: DEAD, ATP y N-Terminal.

## IX REFERENCIAS

- Ahn, B., Harrigan, J. A., Indig, F. E., Iii, D. M. W., & Bohr, V. A. (2004). *Regulation of WRN Helicase Activity in Human Base Excision Repair* \*. 279(51), 53465–53474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409624200>
- Beck, M., & Hurt, E. (2016). The nuclear pore complex : *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.147>
- Bennett, R. J., & Keck, J. L. (2004). *Structure and Function of RecQ DNA Helicases*. 79–97. <https://doi.org/10.1080/10409230490460756>
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., & Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nature Publishing Group, March*. <https://doi.org/10.1038/nrd4505>
- Bohr, V. A. (2008). *Rising from the RecQ-age : the role of human RecQ helicases in genome maintenance*. *October*, 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.09.003>
- Carey, K. T., & Wickramasinghe, V. O. (2018). Regulatory Potential of the RNA Processing Machinery: Implications for Human Disease. *Trends in Genetics*, 34(4), 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.012>
- Chen, L., Huang, S., Lee, L., Davalos, A., Schiestl, R. H., Campisi, J., & Oshima, J. (2003). WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair. *Aging Cell*, 2(4), 191–199. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00052.x>
- Chu, W. K., & Hickson, I. D. (2009). *RecQ helicases : multifunctional genome caretakers*. 9(SEPTEMBER). <https://doi.org/10.1038/nrc2682>
- Comai, L., & Li, B. (2004). *The Werner syndrome protein at the crossroads of DNA repair and apoptosis*. 125, 521–528. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.06.004>
- Coppedè, F. (2013). The epidemiology of premature aging and associated comorbidities. *Clinical Interventions in Aging*, 8, 1023–1032. <https://doi.org/10.2147/CIA.S37213>
- Coyle, J. H., Bor, Y., Rekosh, D., & Hammarskjold, M. (2011). *The Tpr protein regulates export of mRNAs with retained introns that traffic through the Nxf1 pathway*. 1344–1356. <https://doi.org/10.1261/rna.2616111.2>

- Crabbe, L., Jauch, A., Naeger, C. M., Holtgreve-grez, H., & Karlseder, J. (2006). *Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome.*
- Das, A., Boldogh, I., Lee, J. W., Harrigan, J. A., Hegde, M. L., Piotrowski, J., Pinto, N. D. S., Ramos, W., Greenberg, M. M., Hazra, T. K., Mitra, S., & Bohr, V. A. (2007). *The Human Werner Syndrome Protein Stimulates Repair of Oxidative DNA Base Damage by the DNA Glycosylase NEIL1* \* □. 282(36), 26591–26602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703343200>
- Davis, T., Baird, D. M., Haughton, M. F., Jones, C. J., & Kipling, D. (2005). Prevention of accelerated cell aging in Werner Syndrome using a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(11), 1386–1393. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.11.1386>
- De Magistris, P., & Antonin, W. (2018). The Dynamic Nature of the Nuclear Envelope. *Current Biology*, 28(8), R487–R497. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.073>
- Delaleau, M., & Borden, K. (2015). Multiple Export Mechanisms for mRNAs. *Cells*, 4(3), 452–473. <https://doi.org/10.3390/cells4030452>
- Desterro, J., Bak-Gordon, P., & Carmo-Fonseca, M. (2020). Targeting mRNA processing as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(2), 112–129. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0042-3>
- Dirk, G., & Kutay, U. (1999). *Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm.*
- Epstein, J.; Martin, G.; Schultzs, A.; Motulskys, A. (1966). *A\_Review\_of\_its\_Symptomatology,\_Natural\_History,.1.pdf.*
- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., & Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letters*, 582(14), 1977–1986. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.03.004>
- Goodall, G. J., & Wickramasinghe, V. O. (2020). RNA in cancer. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00306-0>
- Goto, M., Miller, R. W., Ishikawa, Y., & Sugano, H. (1996). Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 5(4), 239–246.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8722214>

- Hahn, S. (2004). *Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery*. *11*(5), 394–403. <https://doi.org/10.1038/nsmb763>
- Harper, S., & Speicher, D. W. (2008). *Expression and Purification of GST Fusion Proteins*. *May*, 1–26. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0606s52>
- Harrigan, J. A., Iii, D. M. W., Prasad, R., Opresko, P. L., Beck, G., May, A., Wilson, S. H., & Bohr, V. A. (2006). *The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase  $\beta$* . *34*(2), 745–754. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj475>
- Hsin, J. P., & Manley, J. L. (2012). The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes and Development*, *26*(19), 2119–2137. <https://doi.org/10.1101/gad.200303.112>
- Huang, S., Lee, L., Hanson, N. B., Lenaerts, C., Hoehn, H., Poot, M., Rubin, C. D., Chen, D., Yang, C., Juch, H., Dorn, T., Spiegel, R., Oral, E. A., Abid, M., Battisti, C., Lucci-cordisco, E., Neri, G., Steed, E. H., Kidd, A., ... Ã, J. O. (n.d.). *The Spectrum of WRN Mutations in Werner Syndrome Patients*. <https://doi.org/10.1002/humu.20337>
- Iglesias-Pedraz, J. M., Fossatti-Jara, D. M., Valle-Riestra-Felice, V., Cruz-Visalaya, S. R., Ayala Felix, J. A., & Comai, L. (2020). WRN modulates translation by influencing nuclear mRNA export in HeLa cancer cells. *BMC Molecular and Cell Biology*, *21*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00315-9>
- Kamath-loeb, A., Loeb, L. A., & Fry, M. (2012). *The Werner Syndrome Protein Is Distinguished from the Bloom Syndrome Protein by Its Capacity to Tightly Bind Diverse DNA Structures*. *7*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030189>
- Kaur, S., White, T. E., Diguilio, A. L., Glavy, J. S., Kaur, S., White, T. E., Diguilio, A. L., Glavy, J. S., Kaur, S., White, T. E., Diguilio, A. L., & Glavy, J. S. (2016). *The discovery of a Werner helicase interacting protein ( WHIP ) association with the nuclear pore complex The discovery of a Werner helicase interacting protein ( WHIP ) association with the nuclear pore complex*. *4101*(January). <https://doi.org/10.4161/cc.9.15.12524>

- Kitano, K. (2014). *Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM*. 5(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00366>
- Kitano, K., Kim, S., & Hakoshima, T. (2010). Article Structural Basis for DNA Strand Separation by the Unconventional Winged-Helix Domain of RecQ Helicase WRN. *Structure/Folding and Design*, 18(2), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.12.011>
- Kitano, K., Yoshihara, N., & Hakoshima, T. (2007). *Crystal Structure of the HRDC Domain of Human Werner Syndrome Protein*, WRN \* □. 282(4), 2717–2728. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610142200>
- Knockenbauer, K. E., & Schwartz, T. U. (2016). The Nuclear Pore Complex. *Cell*, 164(6), 1162–1171. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.034>
- Kusumoto, R., Muftuoglu, M., & Bohr, V. A. (2007). *The role of WRN in DNA repair is affected by post-translational modifications*. 128, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.010>
- Lachapelle, S., Gagn, J., Garand, C., Desbiens, M., Coulombe, Y., Bohr, V. A., Hendzel, M. J., Masson, J., Poirier, G. G., & Lebel, M. (2011). *Proteome-wide Identification of WRN-Interacting Proteins in Untreated and Nuclease-Treated Samples*. 1216–1227.
- Lan, L., Nakajima, S., Komatsu, K., Nussenzweig, A., Shimamoto, A., Oshima, J., & Yasui, A. (2005). *Accumulation of Werner protein at DNA double-strand breaks in human cells*. 40. <https://doi.org/10.1242/jcs.02544>
- Lauer, J. M., Krause, A., Vaughan, T. L., & Monnat, R. J. (2013). Spectrum and Risk of Neoplasia in Werner Syndrome: A Systematic Review. *PLoS ONE*, 8(4), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059709>
- Li, B., & Comai, L. (2001). Requirements for the Nucleolytic Processing of DNA Ends by the Werner Syndrome Protein-Ku70/80 Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 9896–9902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008575200>
- Li, B., Iglesias-pedraz, J. M., Yin, F., Cadenas, E., Reddy, S., & Comai, L. (2014). *Aging Cell*. 1(October 2013), 367–378. <https://doi.org/10.1111/accel.12181>
- Li, Z., Zhu, Y., Zhai, Y., Castroagudin, M. R., Bao, Y., White, T. E., & Glavy, J. S.

- (2013). Biochimica et Biophysica Acta Werner complex deficiency in cells disrupts the Nuclear Pore Complex and the distribution of lamin B1. *BBA - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3338–3345. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.09.003>
- Martin, G. M. (2014). *Martin GM , Sprague CA , Epstein CJ . Replicative life-span of cultivated human. August 1970*, 86–92.
- Martin, G. M., & Oshima, J. (2000). Lessons from human progeroid syndromes. *Nature*, 408(6809), 263–266. <https://doi.org/10.1038/35041705>
- Martin, G. M., Oshima, J., Gray, M. D., & Poot, M. (1999). What geriatricians should know about the Werner syndrome. *Journal of the American Geriatrics Society*, 47(9), 1136–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1999.tb05240.x>
- Massiah, M. A., Wright, K. M., & Du, H. (2016). Obtaining soluble folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, triton X-100, and CHAPS: Application to LB and M9 minimal media. *Current Protocols in Protein Science*, 2016, 6.13.1-6.13.24. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0613s84>
- Matsumoto, T., Shimamoto, A., Goto, M., & Furuichi, Y. (1997). Impaired nuclear localization of defective dna helicases in werner's syndrome. *Nature Genetics*, 16(4), 335–336. <https://doi.org/10.1038/ng0897-335>
- Moore, M. J. (2005). From birth to death: The complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, 309(5740), 1514–1518. <https://doi.org/10.1126/science.1111443>
- Moser, M. J., Oshima, J., & Monnat, R. J. (1999). *WRN Mutations in Werner Syndrome*.
- Nakamura, Y., Shimizu, T., Ohigashi, Y., Itou, N., & Ishikawa, Y. (2005). Meningioma arising in Werner syndrome confirmed by mutation analysis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 12(4), 503–506. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2003.12.022>
- Okamura, M., Inose, H., & Masuda, S. (2015). *RNA Export through the NPC in Eukaryotes*. 124–149. <https://doi.org/10.3390/genes6010124>
- Opresko, P. L., Cheng, W., & Bohr, V. A. (2004). *Junction of RecQ Helicase Biochemistry and Human Disease* \*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300034200>
- Opresko, P. L., Cheng, W., Von, C., Harrigan, J. A., & Bohr, V. A. (2018). *Werner syndrome and the function of the Werner protein ; what they can teach us about the*

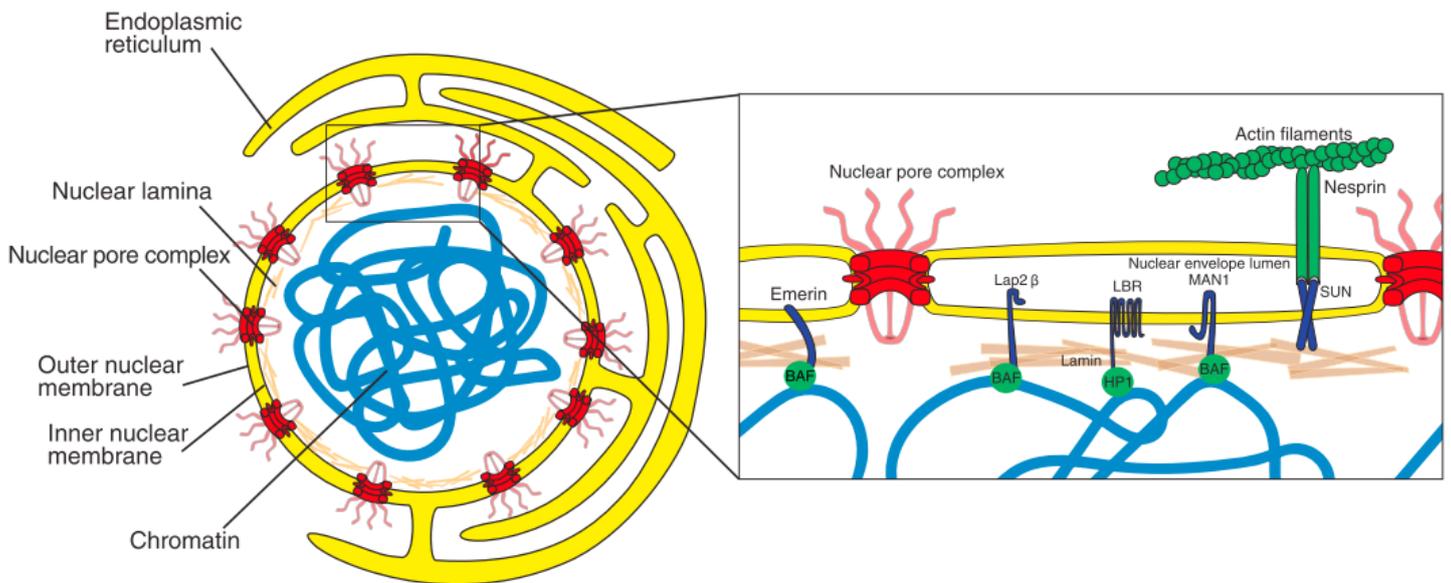
- molecular aging process* . 24(5), 791–802. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg034>
- Oshima, J., Sidorova, J., Monnat, R. (2017). Werner syndrome: Clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions. *Diagnostic and Interventional Imaging*, 98(5), 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.03.002>
- Oshima, J. (2000). *The Werner syndrome protein : an update*. 894–901.
- Perry, J. J. P., Yannone, S. M., Holden, L. G., Hitomi, C., Asaithamby, A., Han, S., Cooper, P. K., Chen, D. J., & Tainer, J. A. (2006). *WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing*. 13(5), 414–422. <https://doi.org/10.1038/nsmb1088>
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C., & Stutz, F. (2004). Nuclear export of RNA. *Biology of the Cell*, 96(8), 639–655. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.04.014>
- Rossi, M. L., Ghosh, A. K., & Bohr, V. A. (2010). Roles of Werner syndrome protein in protection of genome integrity. *DNA Repair*, 9(3), 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.12.011>
- Ruggero, D. (2012). Revisiting the nucleolus: From marker to dynamic integrator of cancer signaling. *Science Signaling*, 5(241). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003477>
- Shamanna, R. A., Croteau, D. L., Lee, J., & Bohr, V. A. (2017). *Recent Advances in Understanding Werner Syndrome [ version 1 ; referees : 3 approved ] Referee Status : 6(0)*, 1–12. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12110.1>
- Shen, J.-L., & Loeb, L. A. (2000). The Werner syndrome gene. *Trends Genet.*, 16(99), 213–220. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01970-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01970-8)
- Shimamoto, A., Sugimoto, M., & Furuichi, Y. (2004). Molecular biology of Werner syndrome. *International Journal of Clinical Oncology*, 9(4), 288–298. <https://doi.org/10.1007/s10147-004-0426-0>
- Soheilypour, M., & Mofrad, M. R. K. (2016). Regulation of RNA-binding proteins affinity to export receptors enables the nuclear basket proteins to distinguish and retain aberrant mRNAs. *Nature Publishing Group, November*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep35380>

- Soultanas, P., & Wigley, D. B. (2001). *Unwinding the ' Gordian knot ' of helicase action.* 26(1), 47–54.
- Stewart, M. (2010). Nuclear export of mRNA. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(11), 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.001>
- Takemoto, M., Mori, S., Kuzuya, M., Yoshimoto, S., Shimamoto, A., Igarashi, M., Tanaka, Y., Miki, T., & Yokote, K. (2013). Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. *Geriatrics and Gerontology International*, 13(2), 475–481. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2012.00913.x>
- Tetenbaum-Novatt, J., & Rout, M. P. (2010). The mechanism of nucleocytoplasmic transport through the nuclear pore complex. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75, 567–584. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.033>
- Tokita, M., Kennedy, S. R., Risques, R. A., Chun, S. G., Pritchard, C., Oshima, J., Liu, Y., Bryant-Greenwood, P. K., Welch, P., & Monnat, R. J. (2016). Werner syndrome through the lens of tissue and tumour genomics. *Scientific Reports*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep32038>
- Vaklavas, C., Blume, S. W., Grizzle, W. E., & Vaklavas, C. (2017). *Translational Dysregulation in Cancer : Molecular insights and Potential Clinical Applications in Biomarker Development.* 7(July). <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00158>
- von Kobbe, C. (2002). A nucleolar targeting sequence in the Werner syndrome protein resides within residues 949-1092. *Journal of Cell Science*, 115(20), 3901–3907. <https://doi.org/10.1242/jcs.00076>
- Von Kobbe, Cayetano, Thomäs, N. H., Czyzewski, B. K., Pavletich, N. P., & Bohr, V. A. (2003). Werner Syndrome Protein Contains Three Structure-specific DNA Binding Domains. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52997–53006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308338200>
- Wickramasinghe, V. O., & Laskey, R. A. (2015). Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. *Nature Publishing Group*, June, 1–12. <https://doi.org/10.1038/nrm4010>
- Wickramasinghe, V. O., Stewart, M., & Laskey, R. A. (2010). GANP enhances the efficiency of mRNA nuclear export in mammalian cells. *Nucleus*, 1(5), 1–5.

<https://doi.org/10.4161/nucl.1.5.12351>

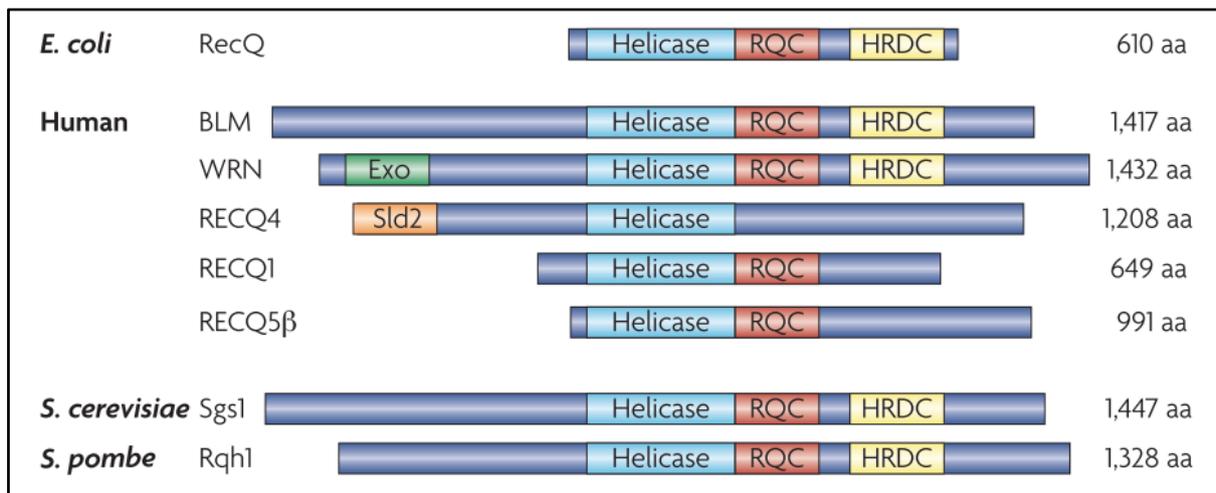
## X ANEXO

### FIGURAS

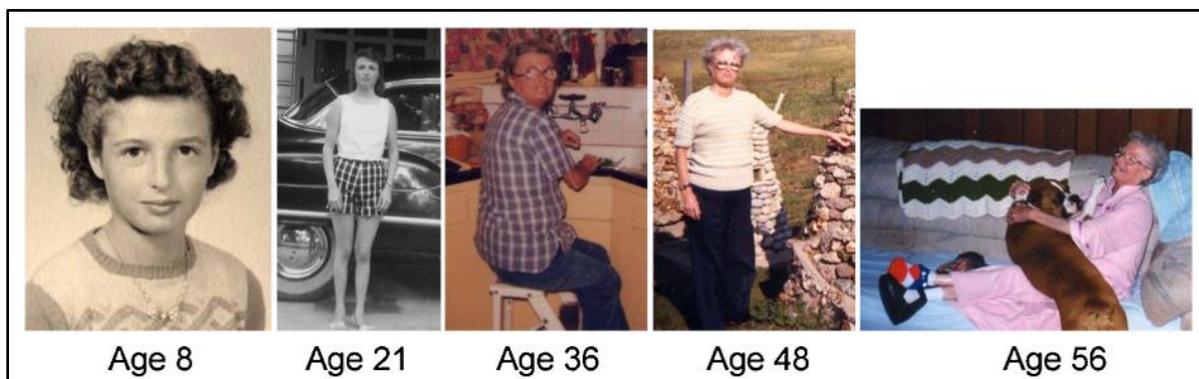


**Figura 1. Esquema representativo de la envoltura nuclear.**

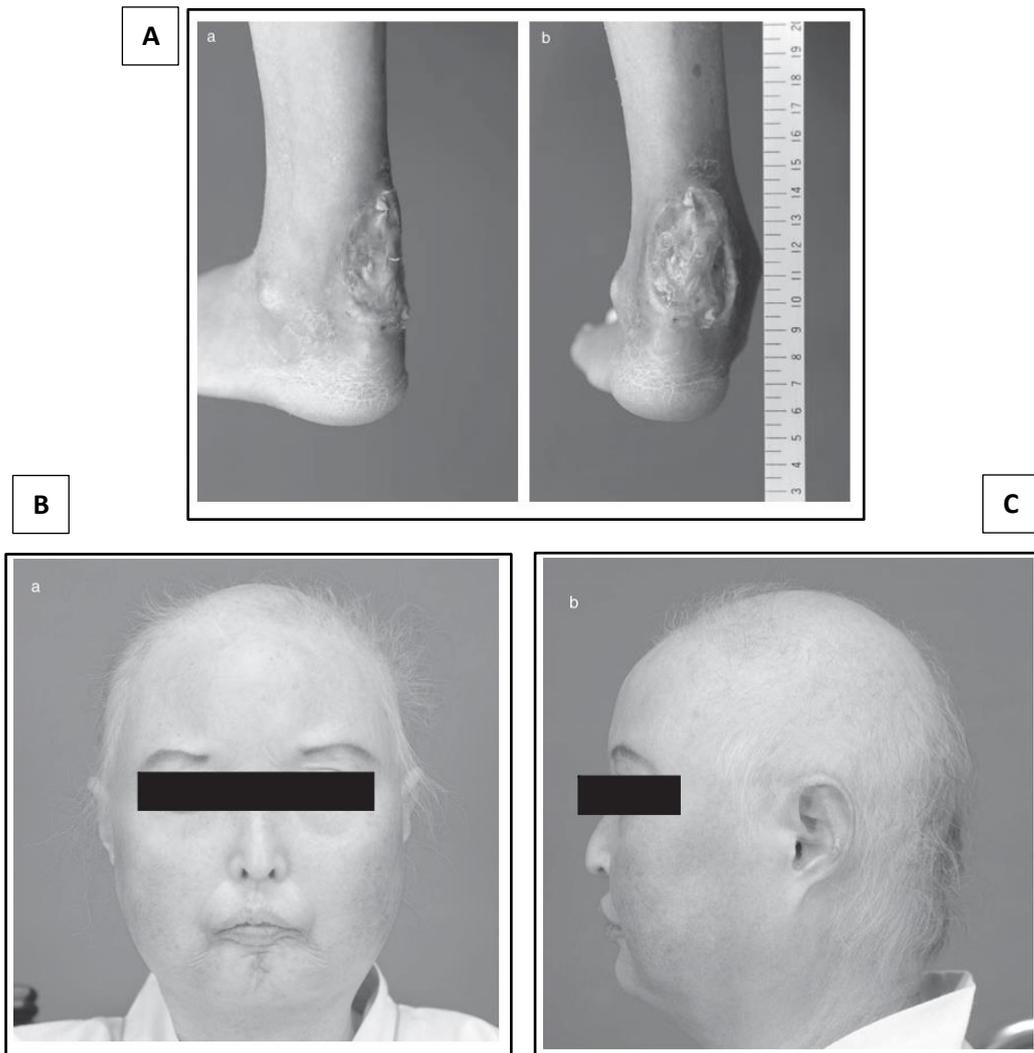
El núcleo se encuentra separado del resto de los compartimientos sub celulares por una membrana doble altamente organizada llamada la envoltura nuclear. Esta consta de dos membranas, la membrana nuclear externa (ONM, por sus siglas en inglés), que es continua con el retículo endoplásmico (ER) y la membrana nuclear interna (INM, por sus siglas en inglés) que encierra el nucleoplasma el cual contiene el material genético (De Magistris & Antonin, 2018)



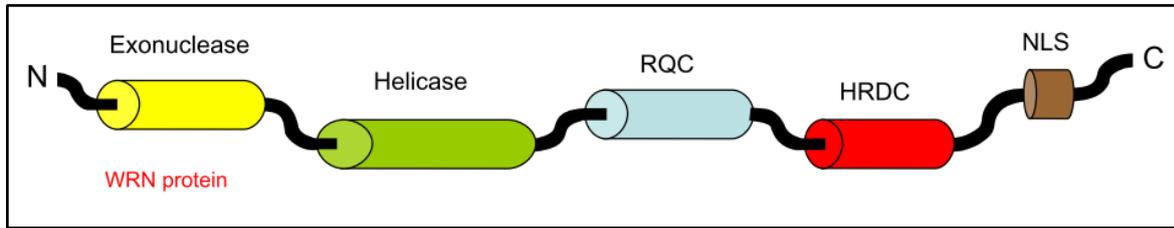
**Figura 2. Familia RecQ helicinas.** Se han identificado diferentes miembros en bacterias (RecQ), humanos (BLM, WRN, RECQ1, RECQ4 y RECQ5β) y en levaduras (Sgs1 y Rqh1). La región resaltada en celeste corresponde al dominio conservado helicasa, el cual está presente en todos los miembros. Los otros dos dominios conservados, RQC y HRDC se pueden observar de color rojo y amarillo, respectivamente. El dominio exonucleasa, presente únicamente en WRN se encuentra resaltado de color verde. (Chu & Hickson, 2009).



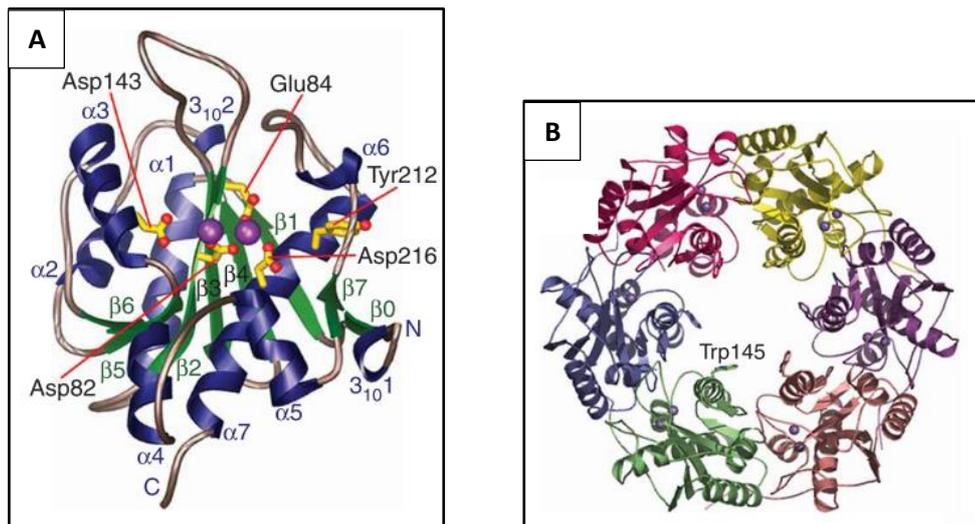
**Figura 3. Desarrollo de la enfermedad en un paciente con síndrome de Werner (WS).** A los 8 años de edad los síntomas clínicos no son notorios. Con el transcurso del tiempo los signos característicos de este síndrome se tornan más evidentes. (Oshima, J., Sidorova, J., Monnat, 2017).



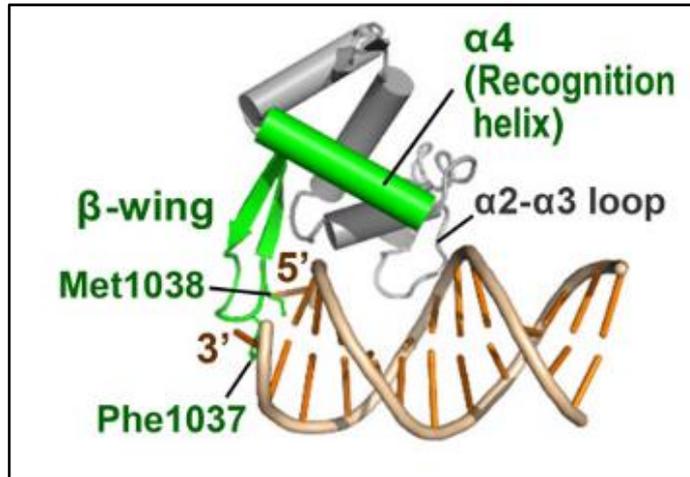
**Figura 4. Signos clínicos de WS.** A. Las ulceraciones en los miembros inferiores pueden asociarse a neuropatías e insuficiencias vasculares que desencadenan en amputaciones. B. La incidencia de rostros que se asemejan al de un ave es alta (>93%), esta incluye una nariz aguda acompañada de disminución del tejido subcutáneo. (Takemoto *et al.*, 2013)



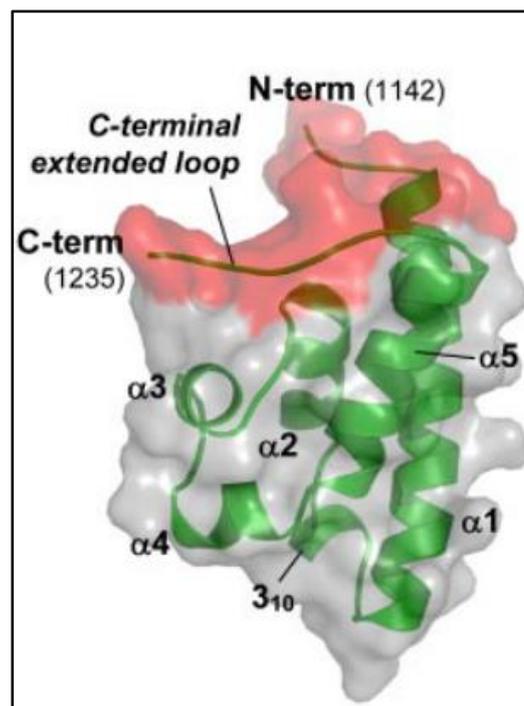
**Figura 5. Dominios funcionales de WRN.** En la región N-Terminal se ubica el dominio exonucleasa (amarillo), en la región central se encuentran los dominios ATPasa (verde) y RQC (celeste) y en la región C-terminal el dominio HRDC (rojo) y la señal de localización nuclear o NLS (marrón).(Coppedè, 2013)



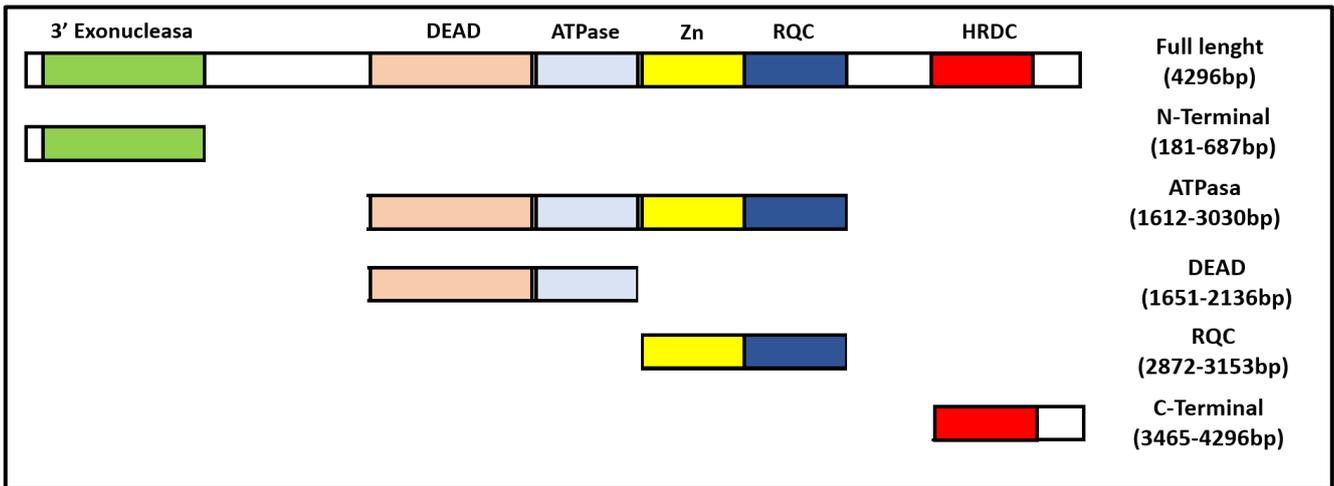
**Figura 6. A. Estructura de WRN-Exonucleasa.** Pliegues  $\alpha\beta$  con  $\alpha$ -hélices (azul), hojas  $\beta$  (verde) y *loops* (plomo) **B.** Modelo de anillo hexamérico con los sitios activos posicionados en la parte central del anillo permitiendo la interacción con el ADN. (Perry *et al.*, 2006).



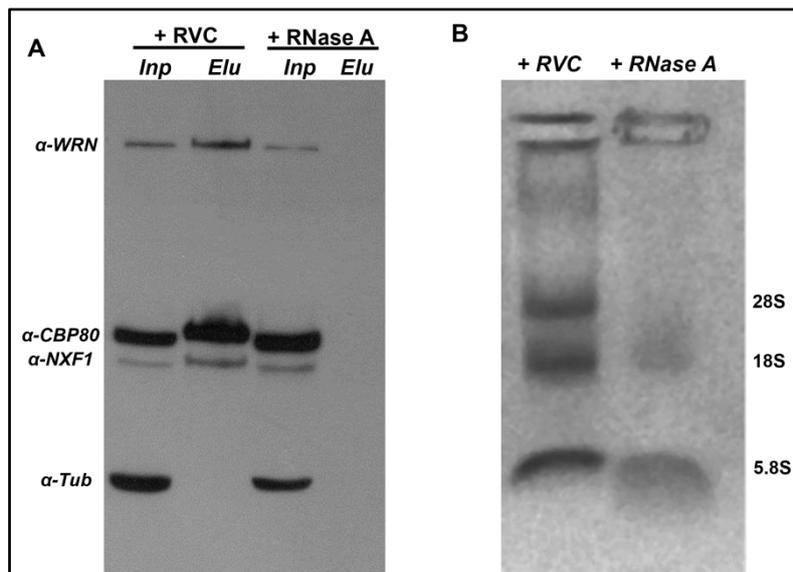
**Figura 7. Dominio RQC de WRN.** Este dominio se une al extremo del ADN duplex a través de los *loops*  $\alpha 2$ -  $\alpha 3$  y por el ala  $\beta$ . Logra desemparejar las pares de bases e impide que se vuelvan a unir (Kitano, 2014).



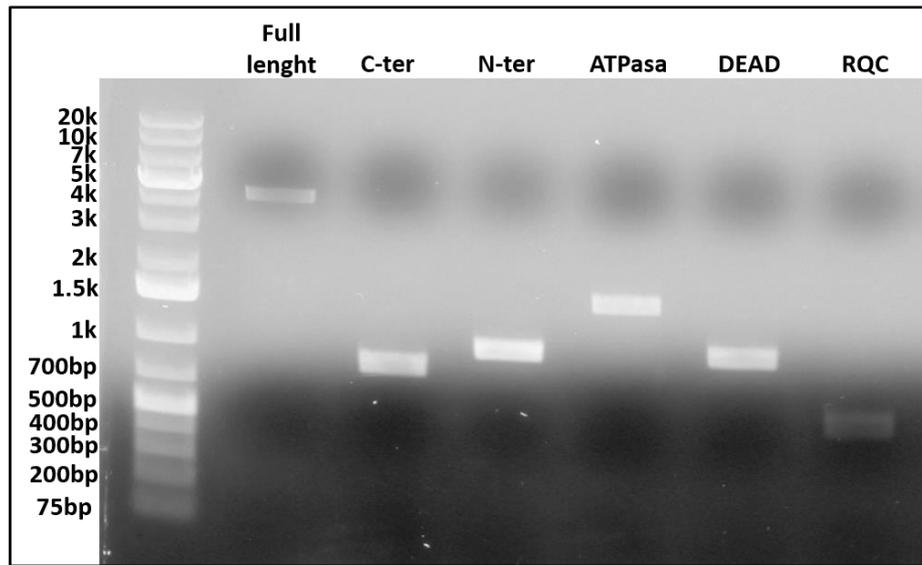
**Figura 8. Dominio HRDC de WRN.** Estructuralmente formado por cinco  $\alpha$ -hélices conectadas por *loops*. (Kitano *et al.*, 2007)



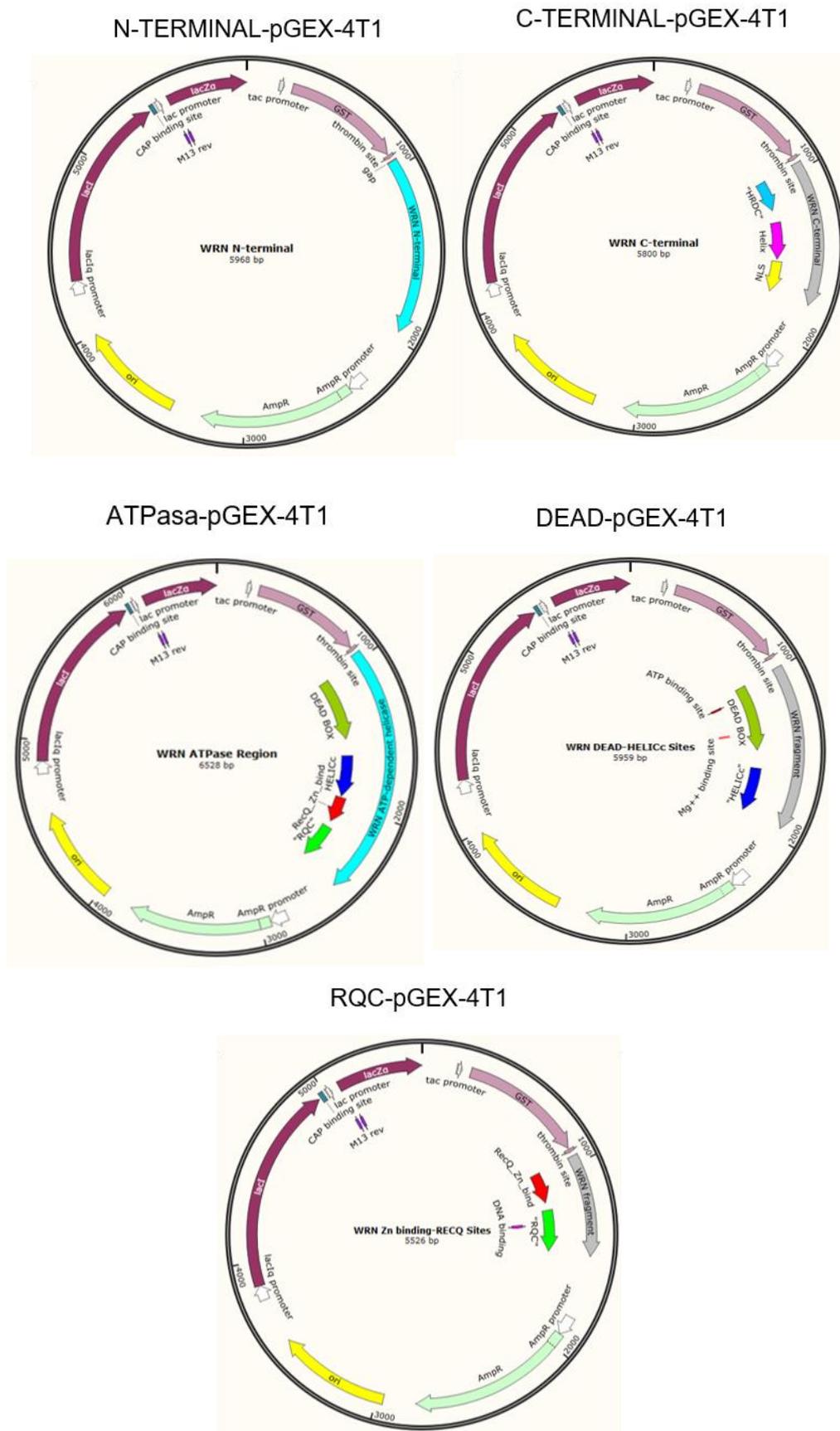
**Figura 9. Construcciones de los dominios de la proteína de Werner.** Se realizó una PCR con la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) utilizando como molde de ADN el vector GFP-WRN y primers específicos para cada dominio.



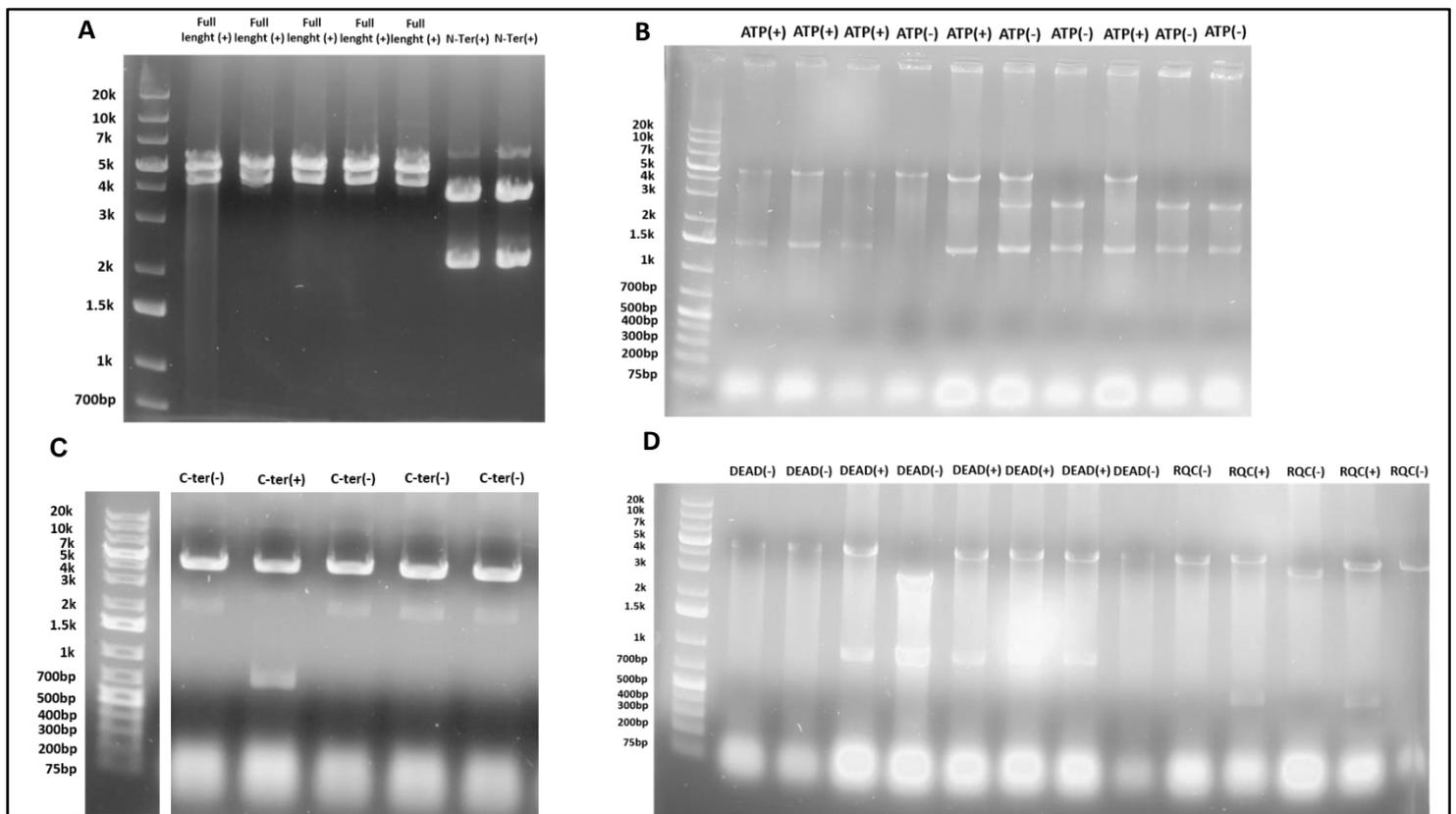
**Figura 10. Análisis por Western Blot y gel de agarosa de los ensayos de pulldown.** **A.** Análisis por Western Blot de los extractos celulares (Inp) y los eluados del *pulldown* (Elu) utilizando los anticuerpos anti WRN, CBP80, NXF1, TUB. Las muestras fueron cargadas de acuerdo al tipo de tratamiento (RVC o RNasa A). **B.** Gel de agarosa mostrando la integridad de los ARNs tras los tratamientos de protección con RVC o de degradación con RNasa A.



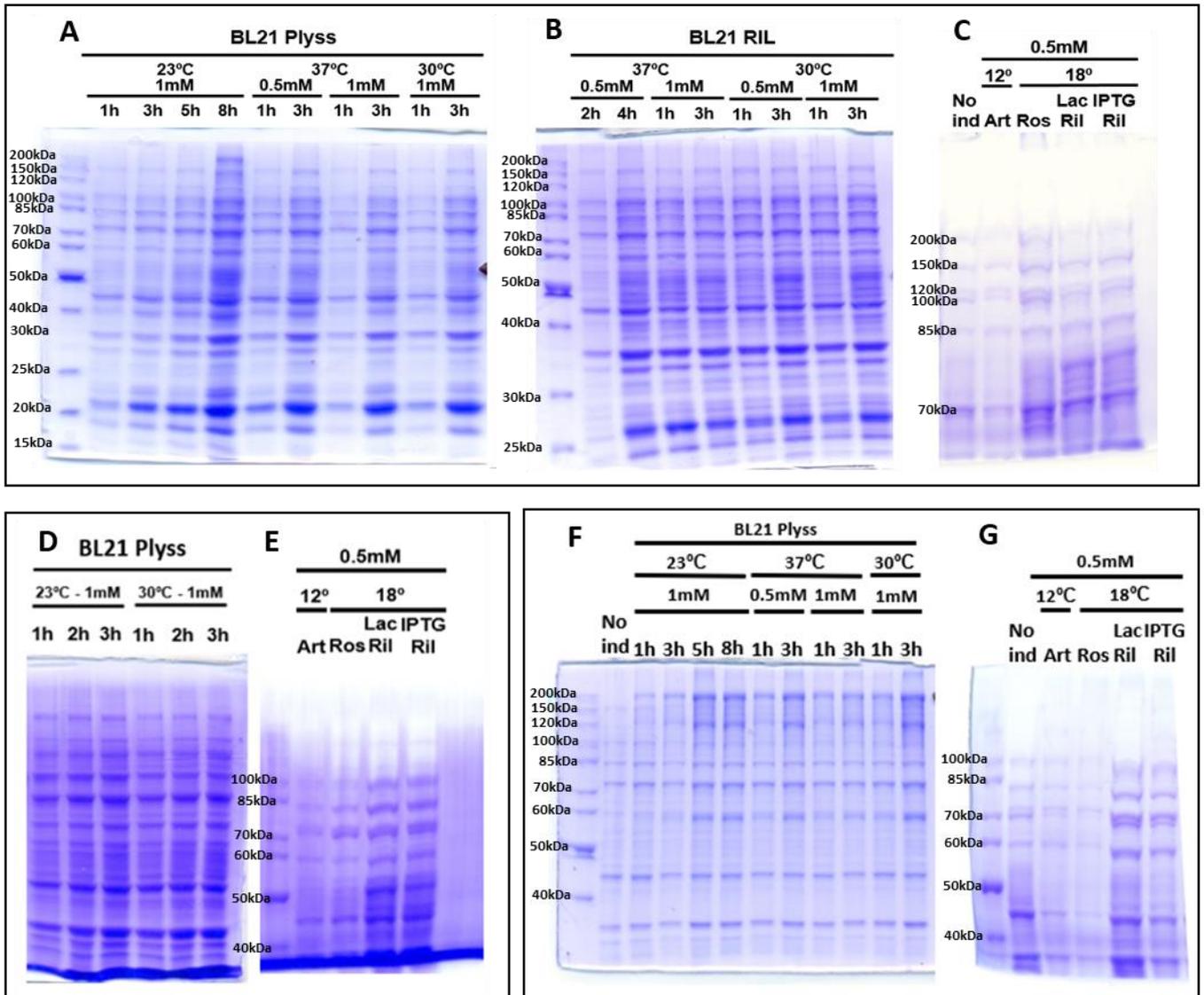
**Figura 11. Dominios de WRN amplificados por PCR convencional con la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (*Thermo Scientific*).** Los dominios corresponden con los pesos esperados: WRN Full lenght 4296 bp, WRN C-Terminal 831 bp WRN N-Terminal 999 bp, WRN ATPasa 1543 bp, WRN Dead 951 bp, y WRN RQC 540 bp.



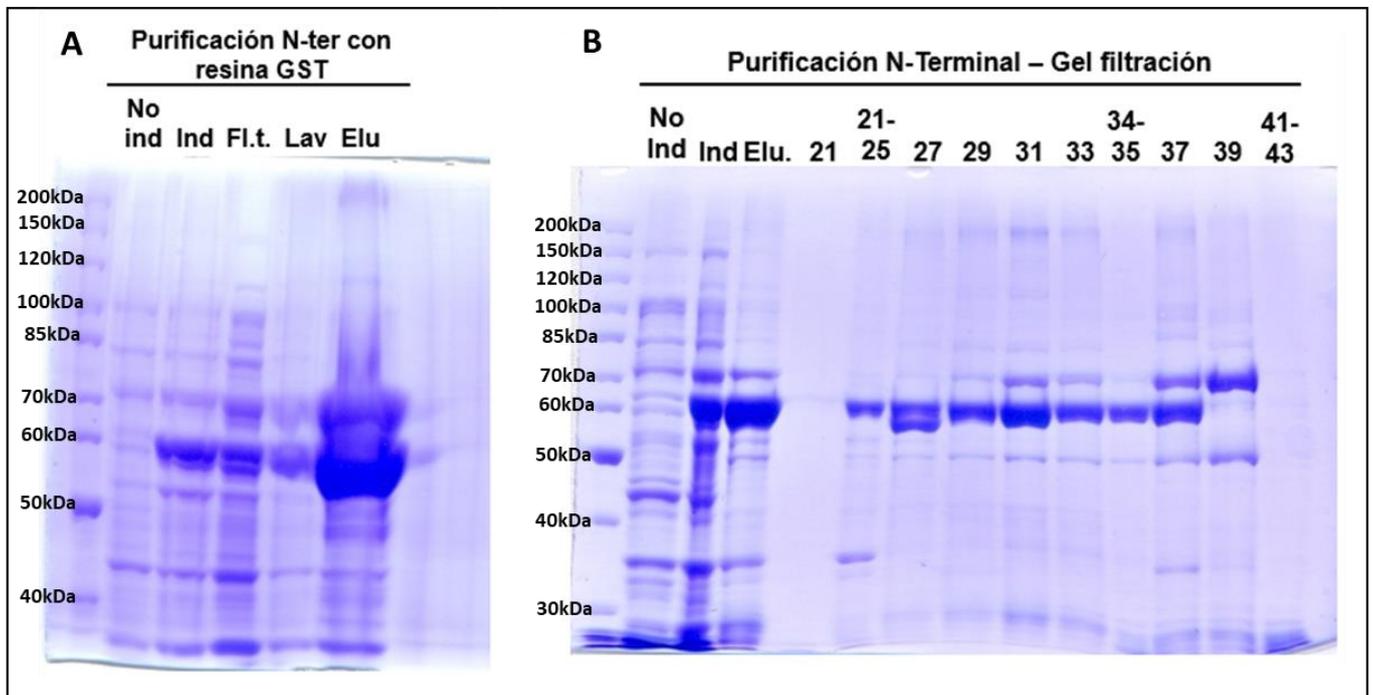
**Figura 12. Mapas de las construcciones de cada uno de los dominios en el vector pGEX-4T1.**



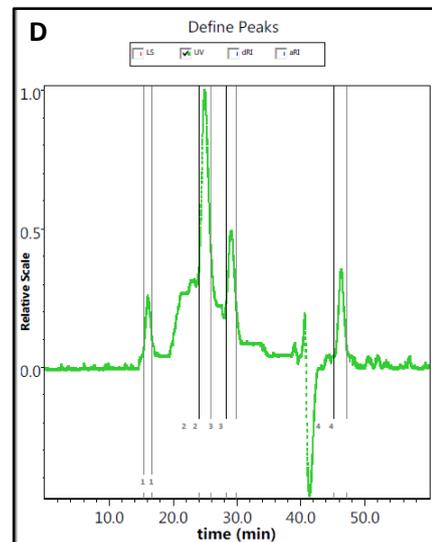
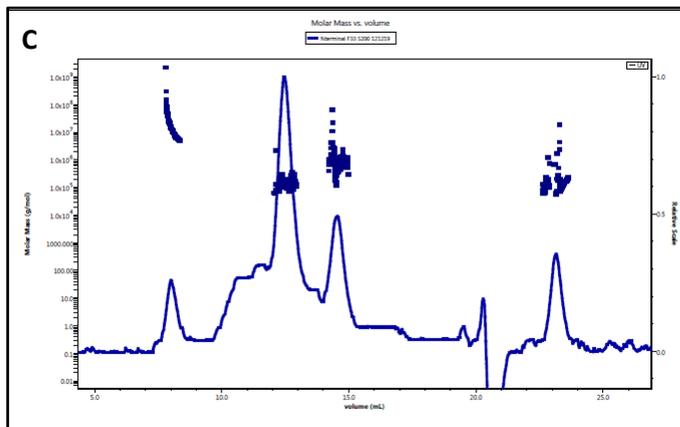
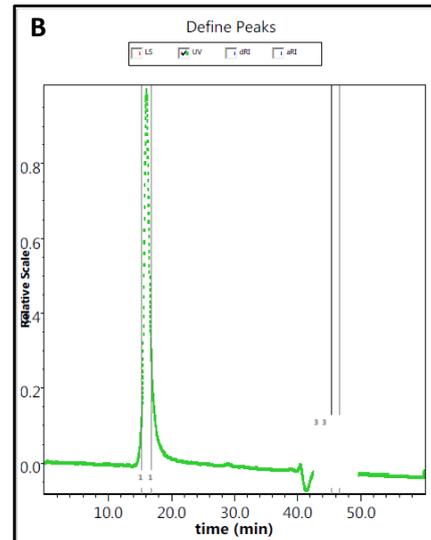
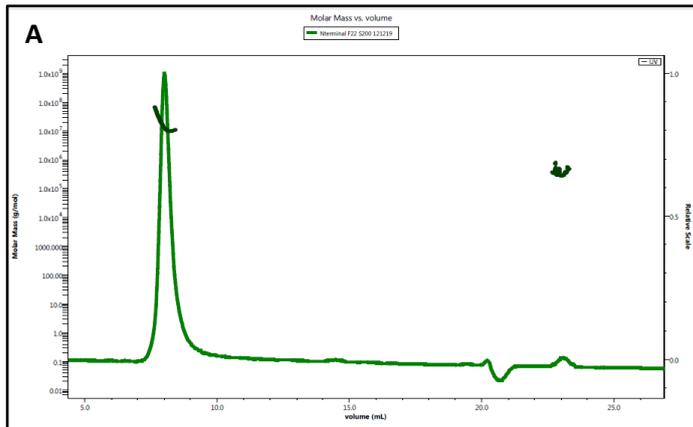
**Figura 13. Digestiones con enzimas de restricción de cada uno de los dominios en el vector pGEX-4T1.** A. Digestiones de la región *Full length* con las enzimas Not I y Sal I (Las bandas obtenidas corresponden a fragmentos de 4975bp y 4308) y N-Terminal con la enzima Ssp I (2192bp y 3776bp). B. Digestiones de la región ATP con las enzimas Sal I y Not I (4975bp y 1553bp). C. Digestiones de la región C-Terminal con las enzimas Not I y Sal I (842bp y 4958bp). D. Digestiones de la región DEAD (1001bp y 4958bp) y de la región RQC con las enzimas Sal I y Not I (4975bp y 551bp)



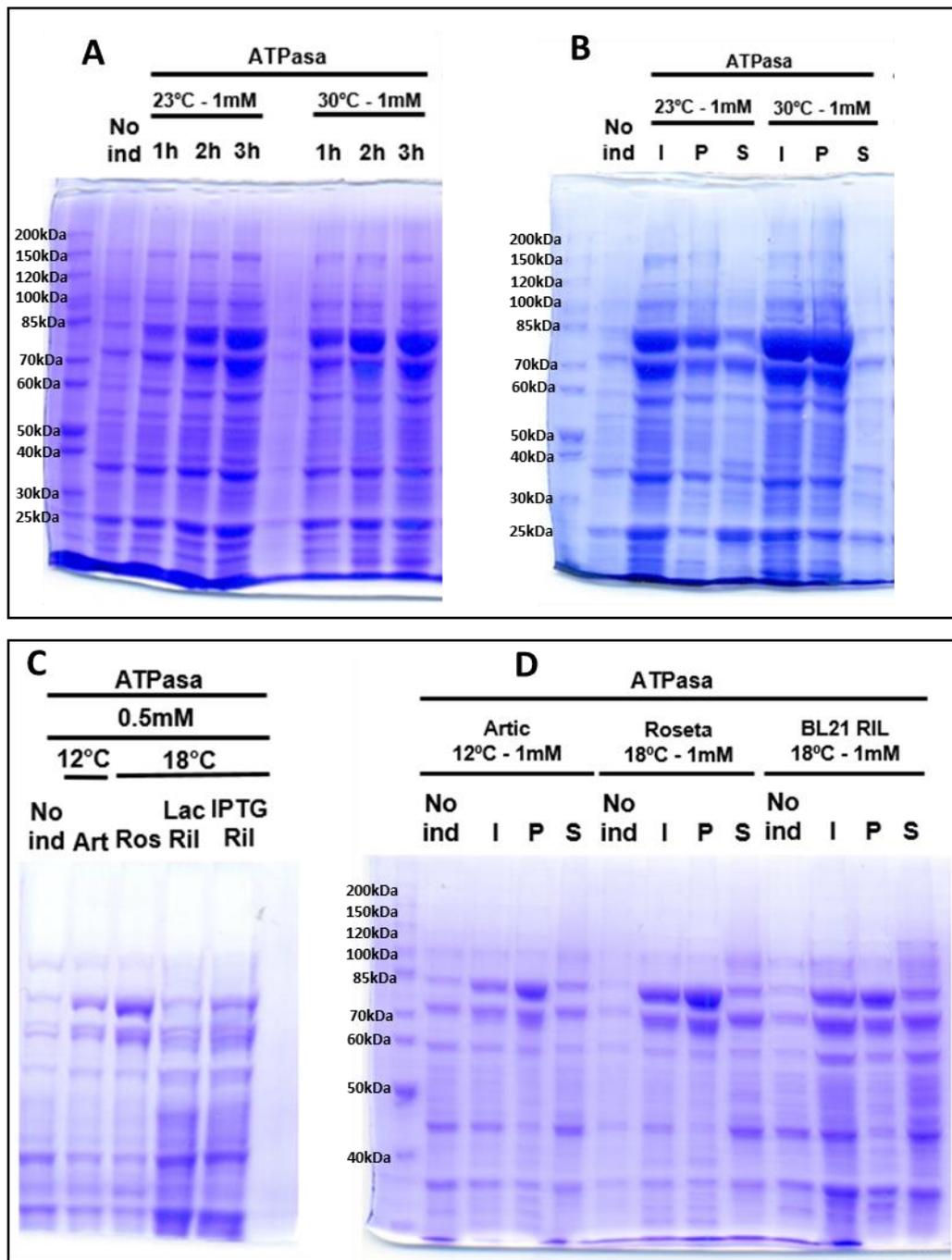
**Figura 14. Test de expresión de los dominios C-Terminal, RQC y Full Length.** Se transformaron por choque térmico en cepas de *E. coli* BL21 RIL, Plyss, Artic y Rosseta. Se probó la inducción de la expresión a diferentes temperaturas: 12°C, 18°C, 23 °C, 30 °C y 37 °C, con diferentes concentraciones de IPTG: 0.5 mM y 1 mM e inducciones con lactosa para determinar qué cepa, cultivo y la condición de inducción fue la más apropiada para obtener la proteína soluble. A, B y C: dominio C-terminal. D y E: dominio RQC. F y G: Full Length. Tamaños esperados de las proteínas de fusión: C-Terminal 54kDa, RQC 48 kDa, Full length 182kDa.



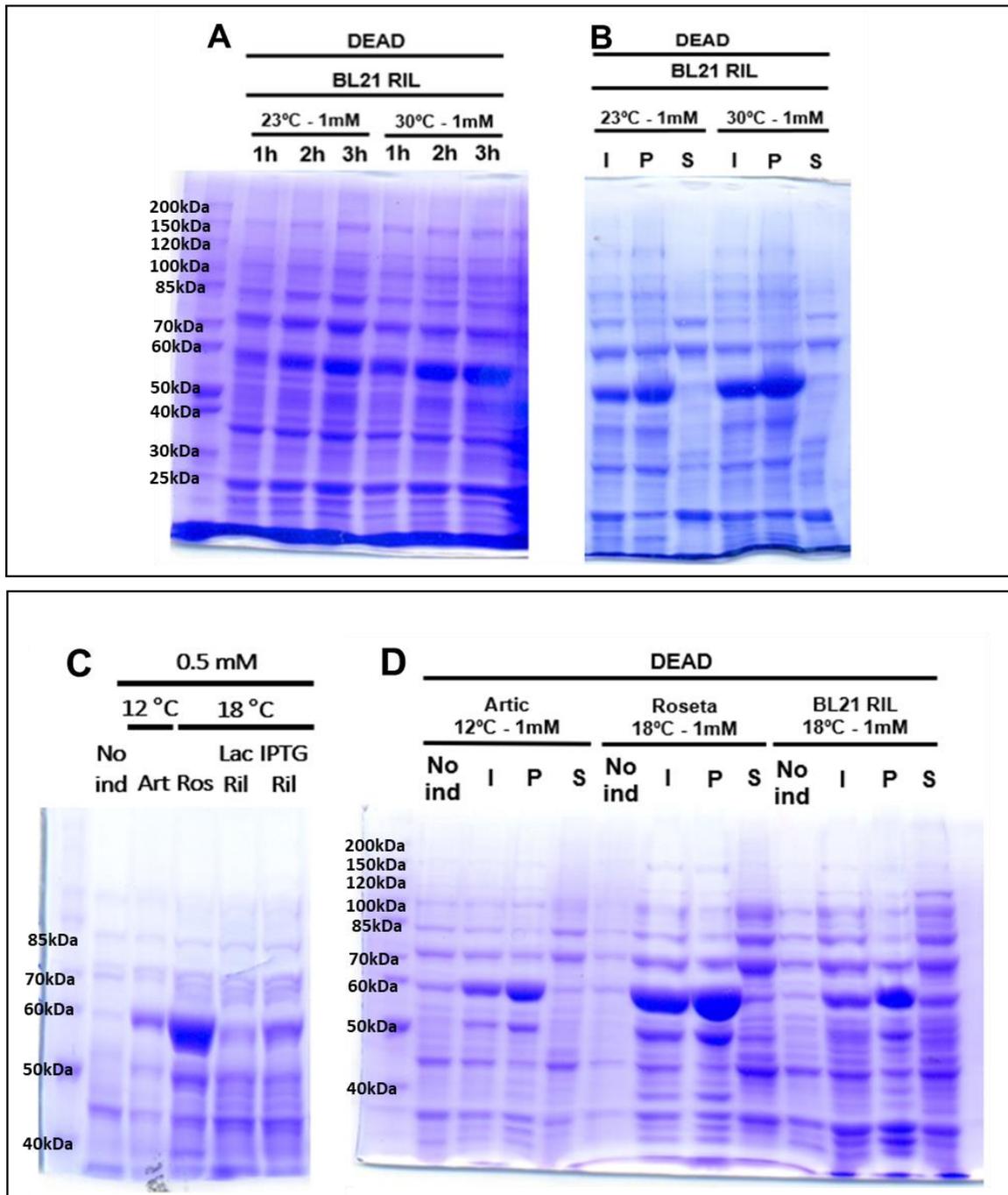
**Figura 15. Expresión del dominio N-Terminal.** *E. coli* DH5 $\alpha$  se transformó usando el plásmido pGEX-4T1-NTerminal y se indujo a 37°C durante 8 horas. El pellet bacteriano se resuspendió en 1x PBS, NaCl 150 mM, Glicerol al 5%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM y se lisó usando un Avestin. Se tomó 1 mL de resina de glutationa sefarosa y se incubó con el lisado bacteriano durante dos horas. La proteína N-terminal se purificó por cromatografía de filtración en gel en una columna High Load 26600 Superdex 200pg. Las fracciones que se seleccionaron para los siguientes experimentos fueron: 21-25 y 34-35. Tamaño esperado para la proteína de fusión: 65kDa.



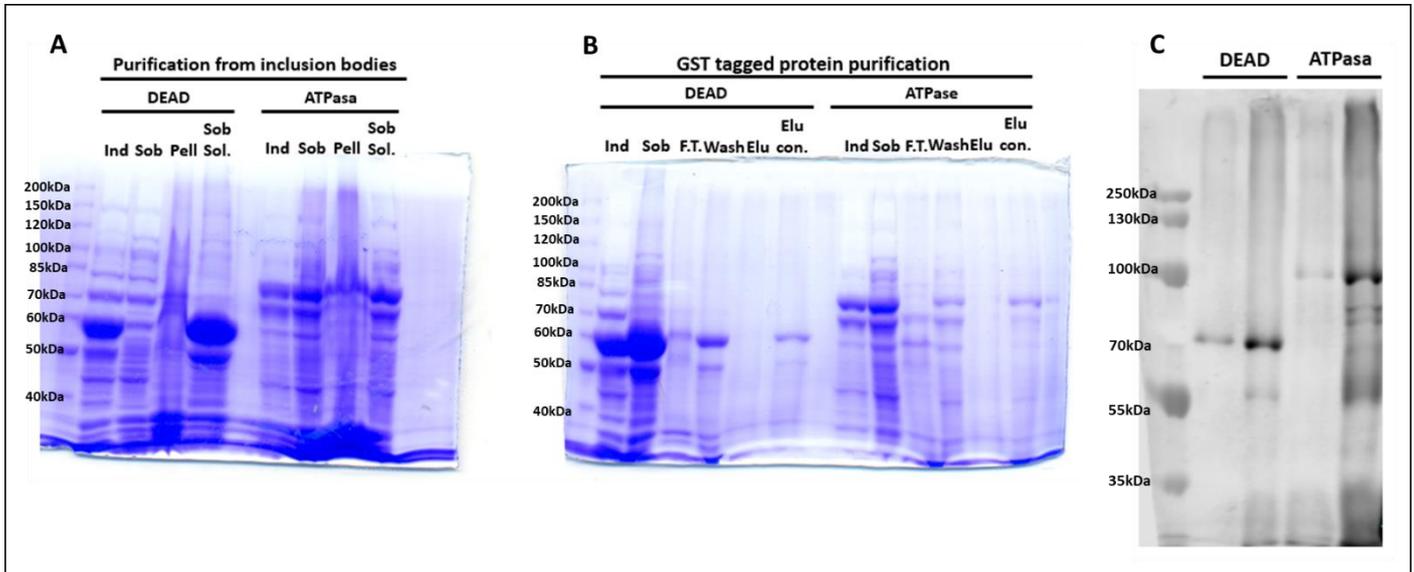
**Figura 16. Cromatograma UV 280nm del dominio N-terminal.** Figuras A y B corresponden a la conformación en dímero del dominio N-Terminal. En las figuras C y D se muestran los picos analizados que responden a la conformación en estado oligomérico.



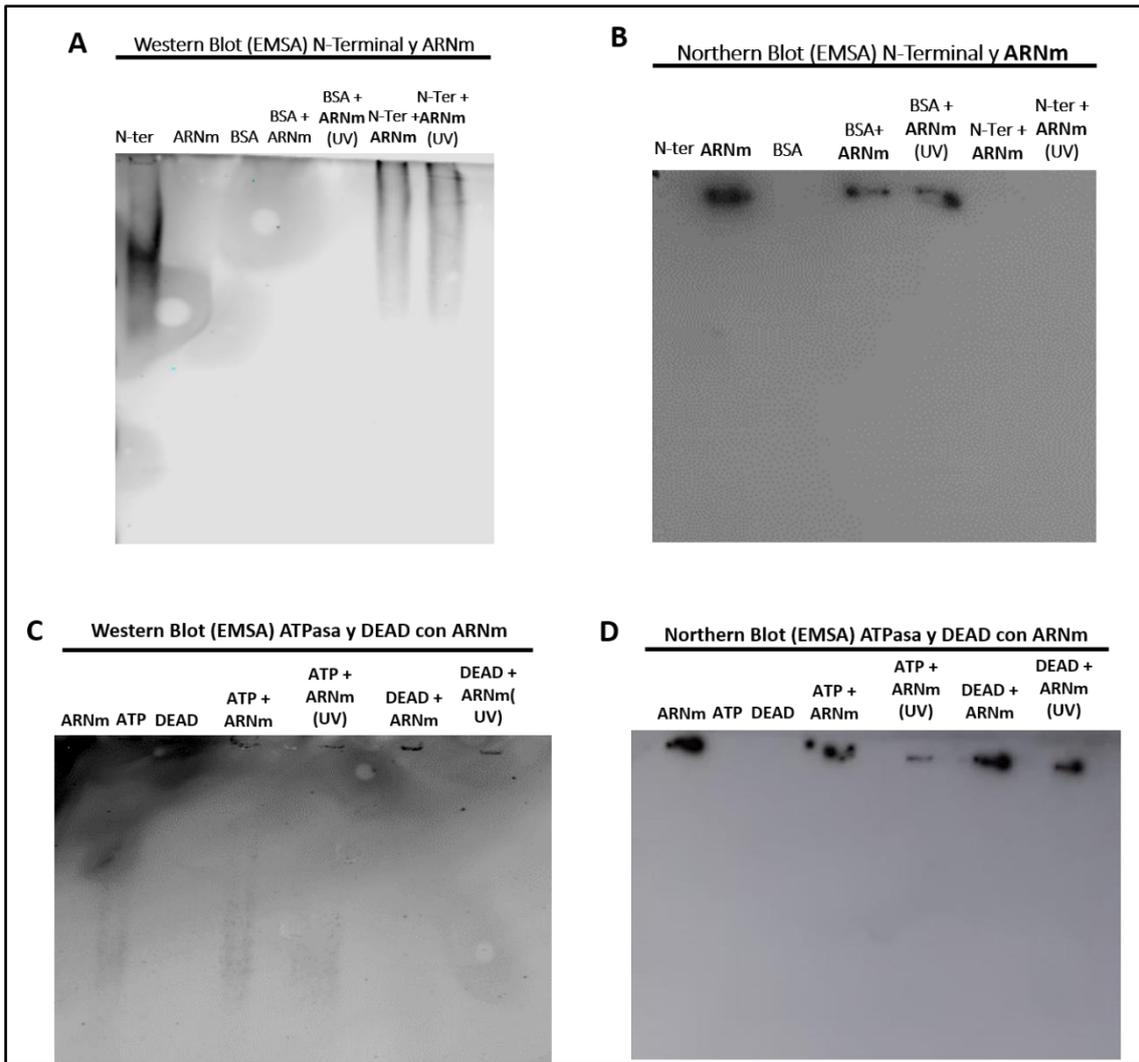
**Figura 17. Prueba de inducción y solubilización del dominio ATPasa.** **A:** Se transformó la cepa *E. coli* BL21 Plyss con el plásmido pGEX-4T1-ATPasa por choque térmico y se indujo con 1 mM IPTG a 23°C y 30°C. **B:** Ambas condiciones se colectaron y lisaron con tampón de lisis y se corrieron en un SDS-PAGE para verificar la solubilidad. **C:** La expresión del dominio ATPasa se evaluó utilizando diferentes cepas de *E. coli* (Artic, Rosseta y RIL) a diferentes temperaturas. **D:** Todas las expresiones se lisaron y evaluaron mediante SDS-PAGE para verificar la solubilidad. Tamaño esperado para la proteína de fusión: 86.5 kDa. En la imagen: I (Input), P (Pellet lisado), S (Sobrenadante).



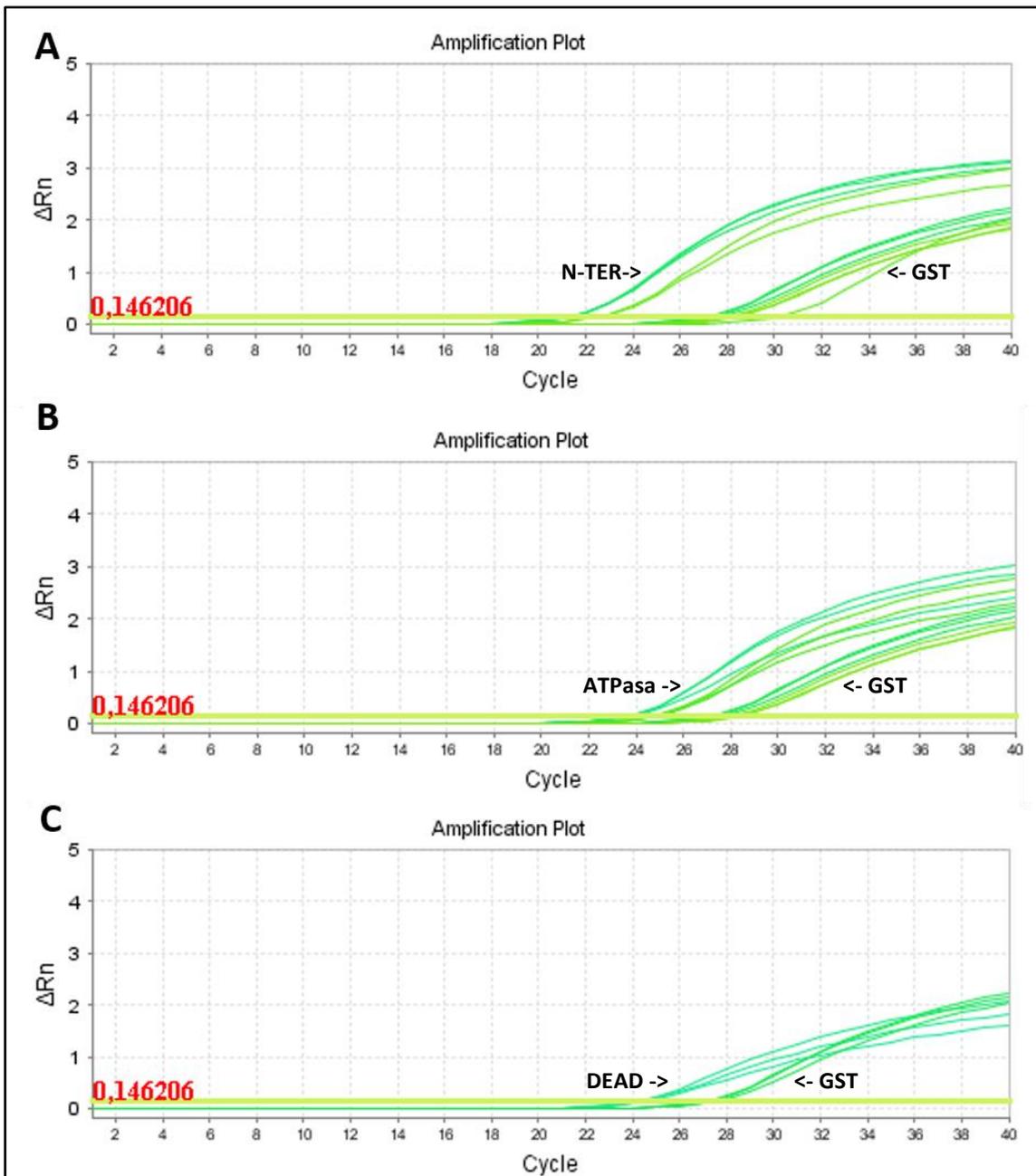
**Figura 18. Prueba de inducción y solubilización del dominio DEAD.** **A:** *E. coli* BL21 Plyss se transformó con plásmido pGEX-4T1-DEAD por choque térmico y se indujo con 1 mM de IPTG a 23°C y 30°C. **B.** Ambas condiciones se colectaron y se lisaron con tampón de lisis y se corrieron en un SDS.PAGE para verificar la solubilidad. **C.** La expresión del dominio DEAD se evaluó utilizando diferentes cepas de *E. coli* (Artic, Rosseta y RIL) a diferentes temperaturas. **D.** Todas las expresiones fueron lisadas y evaluadas por SDS-PAGE para verificar la solubilidad. Tamaño esperado para la proteína de fusión: 65 kDa.



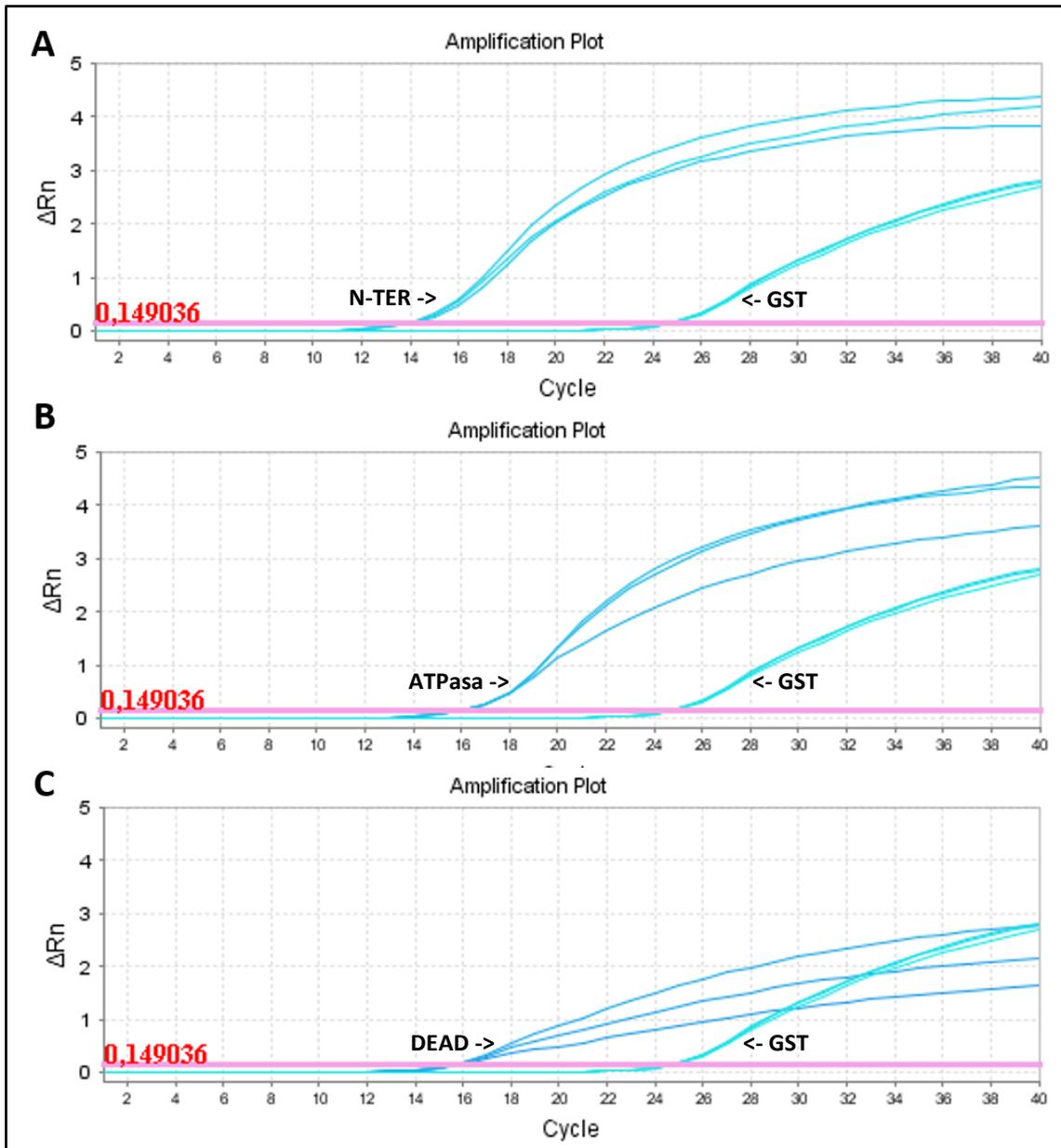
**Figura 19. Obtención de proteínas solubles.** Se siguió el protocolo de solubilización de los cuerpos de inclusión utilizando sarkosyl, triton X-100 y CHAPS (Massiah, Wright y Du, 2016). **A.** Se pesaron 4 gramos de pellet bacteriano y se resuspendieron en tampón de lisis (1x PBS, NaCl 150 mM,  $\beta$ -Mercaptoetanol 20 mM). La suspensión se incubó en hielo durante 30 minutos y se añadió lisozima a una concentración final de 1 mg / mL. Luego se añadieron 10  $\mu$ l de DNasa I (0,1 mg / mL) y se incubaron durante 30 minutos más en hielo con agitación constante. Se añadió 1% de sarkosyl a la suspensión y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. **B.** Se añadió 2% de Triton-100 y 20 mM de CHAPS a la suspensión y luego la mezcla se incubó con resina de glutatión sepharose durante dos horas. **C.** Wester Blot. Se cargaron 10  $\mu$ l de la elución concentrada de ATPasa y DEAD en un gel de poliacrilamida y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana se hibridó con anticuerpo anti-GST. Tamaños esperados para las proteínas de fusión: DEAD 65 kDa, ATPasa 86,6 kDa.



**Figura 20. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).** Se incubó 1  $\mu\text{g}$  de cada proteína purificada con 1  $\mu\text{g}$  de ARNm con tampón de unión (1X PBS, NaCl 150 mM). Se analizó  $\text{MgCl}_2$  50 mM como cofactor para la reacción del dominio N-Terminal y 2 mM de ATP para los dominios ATPasa y DEAD. A. Se evidenció un cambio en la movilidad electroforética del dominio N-Terminal en los tratamientos con ARNm comparado con los controles. B. Se pudo verificar la presencia de ARNm en los controles, pero no en los tratamientos que fueron hibridados con el dominio N-Terminal. C y D. Dominios ATPasa y DEAD: al analizar las membranas por Western Blot y Northern Blot, no fue posible visualizar claramente un cambio en la movilidad electroforética.



**Figura 21. Comparación de las curvas de amplificación del gen G6PD.** Tras los ensayos de unión, las resinas fueron lavadas y los ARN extraídos, transformados a ADNc y analizados por qPCR usando cebadores específicos de los genes indicados. **A.** Control de ARNm de GST vs dominio N-Terminal. **B.** Control de ARNm de GST vs Dominio ATPasa. **C.** Control de ARNm de GST vs Dominio DEAD.



**Figura 22. Comparación de curvas de amplificación de RPS3.** Similar que en la Fig. 20, los ARN capturados en las resinas fueron convertidos a ADNc y analizados por qPCR. **A.** Control de ARNm de GST vs dominio N-Terminal. **B.** Control de ARNm de GST vs Dominio ATPasa. **C.** Control de ARNm de GST vs Dominio DEAD.