

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



“Estudio Preliminar de la Alteración en la Distribución Espacial de los ARN Mensajeros (ARNm) de Genes de la Generación de Antioxidantes tras el Silenciamiento Génico de la Proteína Werner (WRN) en Células de Cáncer”.

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado  
en Biología

**JUAN MANUEL IGLESIAS PEDRAZ**

Asesora de Tesis: Dra. Lidia Luz Cruz Neyra

Lima, Perú  
2019

## **DEDICATORIA**

*“A mis hijos, Juan Manuel y Piero Andrés, Rodrigo y Diego como una muestra de amor cuya finalidad es la de enseñar que con dedicación y tenacidad se pueden lograr cada uno de los objetivos que nos trazamos en la vida”.*

## AGRADECIMIENTOS

- *A la memoria de mi padre y a mi querida madre por sus sabias palabras de aliento.*
- *Especial agradecimiento a mi familia por su incondicional apoyo en cada uno de los pasos que he dado por la senda de la vida.*
- *A Giuli, por toda la paciencia y el apoyo entregado en mi proceso de repatriación y reincorporación al Perú.*
- *Al programa de Repatriación de Investigadores Peruanos Residentes en el Extranjero de INNOVATE PERU por la Beca de Repatriación que me fue otorgada para iniciar mi carrera como investigador en el Perú y que gracias a ésta fue posible dar origen al presente proyecto de Tesis.*
- *A la Universidad Científica del Sur por participar como ente Auspiciador del Programa de Repatriación.*
- *A mis compañeros de trabajo por sus muestras de apoyo, inclusive en momentos críticos del desarrollo del proyecto.*
- *A mis profesores de la Facultad por formarme con una visión amplia en la Biología.*
- *A mi Directora de Tesis, Dra. Lidia Cruz por sus muestras de apoyo y sabias y acertadas críticas a mi proyecto.*

## ÍNDICE

	Pág.
ABREVIACIONES.....	1
RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
I. INTRODUCCIÓN .....	4
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	6
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	7
1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
1.4 OBJETIVOS.....	8
1.4.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
II. MARCO TEÓRICO .....	9
III. ANTECEDENTES.....	10
3.1 El Síndrome de Werner (WS).....	10
3.1.1 Familia de las helicasas RecQ.....	11
3.1.2 El gen del Síndrome de Werner.....	12
3.1.3 La proteína del Síndrome de Werner (WRN) .....	¡Error! Marcador no definido.
3.2 El Transporte Núcleo-Citoplasma .....	14
3.2.1 El Transporte de los ARNm .....	15
IV. HIPÓTESIS.....	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1 Lugar de ejecución.....	17
5.2 Material biológico.....	17
5.3 Identificación de las posibles alteraciones en la distribución espacial de los ARNm de los genes implicados en la generación de equivalentes reductores tras la depleción de WRN en células de cáncer HeLa.....	17
5.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de células HeLa shCTR y shWRN y Fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS .....	¡Error! Marcador no definido.
5.3.2 Desregulación de WRN con doxiciclina (dox) en HeLa shCTR y shWRN .....	18
5.3.3 Fraccionamiento celular .....	18
5.3.4 Western Blot.....	19

5.3.5	Análisis de la distribución espacial núcleo-citoplasma de los transcritos de interés .....	20
VI.	RESULTADOS .....	21
6.1	Desregulación de la proteína WRN en células HeLa y verificación de la ausencia de expresión de la proteína WRN en fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS. ....	21
6.2	Distribución espacial de la proteína WRN.....	21
6.3	Integridad de los ARN purificados de shCTR y shWRN .....	21
6.4	Tratamiento de los ARN con DNasa.....	22
6.5	Análisis de la distribución espacial de los ARNm en células HeLa silenciadas para WRN .....	22
6.6	Análisis de la distribución espacial de los ARNm en fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS .....	23
VII.	DISCUSIÓN .....	24
VIII.	CONCLUSIONES .....	28
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30

## ABREVIACIONES

aa – amino ácidos	OMS – Organización Mundial de la Salud
ADN – Ácido desoxirribonucleico	pb – Pares de bases
ARN – Ácido ribonucleico	PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
ARNm – ARN mensajero	PIC – Coctel de inhibidores de proteasas
ARNr – ARN ribosomal	PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
$\beta$ -GP – Beta-glicerofosfato de sodio	qPCR – Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
cDNA – ADN complementario	ROS – Especies reactivas de oxígeno
DEPC – Dietil pirocarbonato	RPM – Revoluciones por minuto
DTT – Ditioneitol	RT-PCR – Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa
dox – doxiciclina	SDS – Dodecilsulfato de sodio
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético	shARN – Horquilla pequeña de ARN para inducir silenciamiento génico
g – Gravedades	TE – Tris-EDTA
HEPES - ácido 4-(2-hidroxi)etil piperazin-1-iletanosulfónico	U – Unidades
HRP – enzima peroxidasa de rábano (por sus siglas en inglés)	$\mu$ L – Microlitro
IDH1 – Isocitrato deshidrogenasa 1	WS – Síndrome de Werner (por sus siglas en inglés).
M – Molar	X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
mM – Milimolar	
$\mu$ M – Micromolar	
NP-40 – Nonil fenoxipolietoxietanol	
NSC 19630 - 1-((1-Oxopropoxy)methyl)-maleimide	

## RESUMEN

Las células somáticas normales solo pueden dividirse un número de veces, esto es conocido como límite de Hayflick o senescencia replicativa y al que las células de cáncer escapan. Este fenómeno se asocia al acortamiento de los telómeros, los cuales son afectados por varios factores, incluyendo las especies reactivas de oxígenos (ROS), típico en pacientes con el Síndrome de Werner (WS). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación han demostrado que la depleción de WRN inhibe la síntesis de proteínas, sin alterar la abundancia de los ARN mensajeros (ARNm). Así mismo se ha observado que, una fracción de WRN se asocia con la maquinaria traduccional en el citoplasma, sedimentando junto a marcadores ribosomales en el Perfil Polisomal, lo que indicaría que WRN es requerido para la correcta traducción de los ARNm a proteínas en el citoplasma. Sin embargo, datos preliminares muestran que los ARNm de las especies analizadas se acumulan en el núcleo de células deplecionadas para WRN, lo que sugiere una relación entre WRN y la distribución espacial de los ARNm. A la fecha no se ha descrito un vínculo entre WRN y los ARNm o los componentes del transporte de éstos. Así, el objetivo en el presente proyecto es demostrar que, la depleción de WRN dispara el fenotipo de senescencia replicativa a consecuencia de la baja capacidad de regeneración proteica, esto debido a un defecto en el transporte de los ARNm hacia el citoplasma. Esta respuesta es previa al daño a los telómeros inducidos por la sobre producción de ROS, por lo que definir la relación funcional de WRN en el transporte de los ARN supone la descripción de un nuevo mecanismo, orientado a generar nuevas terapias dirigidas a inhibir la proliferación de células tumorales.

Palabras clave: Síndrome de Werner, senescencia, cáncer, ARN mensajero, transporte.

## ABSTRACT

Normal somatic cells can only divide for a certain number of times. This feature is known as the Hayflick limit, or replicative senescence and to which the cancer cells escape. This phenomenon associated with the shortening of telomeres, which are affected by several factors, including reactive oxygen species (ROS), typical for Werner Syndrome (WS) patients. Results obtained in our laboratory show that the depletion of WRN inhibits the synthesis of proteins, without altering the abundance of messenger RNAs (mRNA). It has also observed that a fraction of WRN is accomplished with the translational machinery in the cytoplasm, co-sedimenting along with ribosomal markers in the Polysomal Profile, which would indicate that WRN is required for the correct translation of mRNAs into proteins in the cytoplasm. However, preliminary data show that the mRNAs of the species analysed accumulate in the nucleus of WRN-depleted, suggesting a relationship between WRN and the spatial distribution of the mRNA. To date, no link between WRN and the mRNAs or their transport components has been describing. Thus, the present project aims to demonstrate that, the depletion of WRN triggers the phenotype of replicative senescence as a consequence of the low capacity of protein regeneration, this due to a defect in the transport of mRNAs to the cytoplasm. This response is before any damage to the telomeres induced by the overproduction of ROS so that defining the functional relationship between WRN and the mRNA transport represent a description of a new mechanism, aimed to generate new therapies leaded to inhibition of tumour cells proliferation.

Key words: Werner Syndrome, senescence, cancer, messenger RNA, transport.

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer se puede definir como un grupo de enfermedades en la que células anormales crecen o proliferan descontroladamente sin tener en cuenta las reglas normales de la división celular. Mientras que en células normales existen señales precisas que determinan el número de divisiones posibles o límite de Hayflick, en células de cáncer se desarrolla un grado de autonomía que desregulan estas señales y que resulta en un incontrolado crecimiento y proliferación. Si se permite que, este estado alterado altamente proliferativo continúe y se disemine, las consecuencias son fatales. De hecho, casi el 90% de las muertes relacionadas con el cáncer son debidas a una condición de diseminación, un proceso llamado metástasis.

El síndrome de Werner (WS) es un desorden genético recesivo autosomal progeroide hereditario, el cual está causado por mutaciones en el gen que codifica la proteína Werner (WRN). Pacientes portadores de estas mutaciones envejecen rápidamente después de la pubertad y desarrollan rasgos fenotípicos típicos del proceso normal de envejecimiento a edades tempranas, incluyendo canosidad capilar y pérdida del cabello, aterosclerosis, arterioesclerosis, diabetes mellitus tipo II, cataratas, osteoporosis, hipogonadismo y están propensos a diferentes formas de cáncer, especialmente mesenquimales. La gran variedad de las posibles funciones que tiene la proteína WRN se han asociado al ADN, e implican procesos de reparación del daño al ADN, mantenimiento de los telómeros y la transcripción. También se han descrito alteraciones en las modificaciones post-traduccionales y varias interacciones proteína-proteína. Sin embargo, las funciones precisas de WRN en estos procesos, no son del todo entendidos. Se ha descrito que, Fibroblastos derivados de pacientes con (WS) poseen una duración de vida replicativa corta (senescencia replicativa) y exhiben una inestabilidad genómica, la cual se manifiesta con un incremento en el grado de translocación cromosomal y deleciones debido a procesos oxidativos bien documentado en este Síndrome.

Se ha demostrado que, muchas líneas celulares de cáncer expresan elevados niveles de WRN, lo cual es requerido para el crecimiento y formación de tumores en modelos animales. Todos estos datos apuntan a que WRN es necesaria para la proliferación de la mayoría de las células de cáncer y que, la senescencia replicativa

observada en ausencia de WRN, apuntaría a que es un proceso mediado por especies reactivas de oxígeno o ROS. Sin embargo, nuestros resultados previamente publicados muestran que, la depleción de la WRN en células humanas resulta en una reducción de los niveles de enzimas metabólicos involucrados en la producción de energía, la síntesis de macromoléculas y el control redox. Se ha visto que, estas alteraciones anteceden cualquier cambio en los niveles de p53, p21 y p16 (principales proteínas inductoras de la senescencia celular) y de respuesta al daño al DNA ( $\gamma$ -H2AX), sugiriendo que este análisis captura eventos tempranos que no son causados por la activación de las vías de respuesta al daño oxidativo del ADN.

Las principales proteínas afectadas por la depleción de WRN incluyen la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH1). Estas dos enzimas son claves, ya que son requeridas para la regeneración de la glutatona mediante la producción del equivalente reductor NADPH.

La disminución de los niveles de estas proteínas (G6PD e IDH1), tras el silenciamiento de WRN, fue confirmada por western blot en múltiples líneas celulares incluyendo fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS y líneas celulares de cáncer como células HeLa y MCF7. Sin embargo, los análisis bioquímicos no reflejan cambios en la estabilidad proteínica tras la depleción de WRN y los datos obtenidos mediante técnicas moleculares por RT-qPCR, de los niveles de abundancia de sus ARNm, tampoco demuestran una disminución en la transcripción de dichos genes.

En resumen, estos datos en su conjunto fuertemente apuntan a que, la reducción de los niveles de las proteínas G6PD e IDH1 podría deberse a una alteración en la maquinaria de transporte tras el silenciamiento génico de la proteína WRN. Con el fin de demostrar esta hipótesis, en la presente Tesis se han planteado una serie de aproximaciones moleculares y bioquímicas con el fin de definir la funcionalidad de la proteína de WRN en el transporte núcleo-citoplasma de los ARNm. Desarrollar una investigación destinada a desvelar la alteración molecular observada, que implica la disminución de la síntesis de proteínas en células de cáncer deplecionadas para WRN, representaría la ganancia de un entendimiento detallado de la relación de WRN con la distribución espacial de estos genes metabólicos, el cual podría sustentar la hipótesis de que la senescencia replicativa en células de cáncer, a consecuencia de la

depleción de WRN, no sería causado por el aumento de ROS, sino que estaría directamente relacionada la alteración de la homeostasis de los ARNm de genes implicados en la generación de equivalentes reductores.

## **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El cáncer es el grupo de enfermedades con mayor incidencia de morbilidad y mortalidad en todo el mundo dentro de las enfermedades no transmisibles. En el año 2012 la OMS estimó cerca de 14.1 millones de nuevos casos de cáncer conduciendo a 8.2 millones de muertes asociadas a este proceso. Sin embargo, se estima que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años, representando un impacto económico substancial que para el año 2010 ascendió a US\$ 1.16 mil millones de dólares.

La alta tasa replicativa observada en células de cáncer se ve soportada, en gran parte, por el incremento en la síntesis de proteínas. La desregulación de esta vía metabólica garantiza a la célula de cáncer contar con los bloques de construcción necesarios para soportar su descontrolada capacidad divisoria. Para que la célula cancerosa se asegure con una alta capacidad de síntesis proteica, debe existir un delicado y equilibrado balance entre la transcripción de los genes a ARNm y su transporte al citoplasma para su traducción a proteínas. Estos representan procesos celulares importantes finamente regulados. Se ha observado que, la depleción de WRN en células HeLa, induce desregulación de la síntesis de proteínas, incluido los genes metabólicos relacionados en la homeostasis redox como la G6PD e IDH1, lo que podría deberse a una alteración en el transporte de los ARNm desde el núcleo al citoplasma (Li et al 2014).

Así, el deterioro en el transporte de estos ARNm clave implica, necesariamente, la acumulación de ROS debido a un defecto en la alteración en la síntesis de éstas proteínas y que consecuentemente conducen a la muerte celular. Este defecto podría ser el gatillo que dispara la senescencia replicativa observada en ausencia de WRN, por lo que estudiar y entender este defecto podría significar una ganancia significativa en la comprensión de nuevas funciones para la proteína WRN que ayuden a controlar la diseminación de células cancerosas.

## **1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

Dados los datos expuestos, la pregunta a formular se presenta en el siguiente enunciado:

¿Es el defecto en el transporte de los ARNm de los transcritos génicos de G6PD e IDH1, causada por la depleción de la proteína WRN, la responsable de alterar su traducción a proteínas y consecuentemente disparar el fenotipo senescente?

## **1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

Dada la alta tasa replicativa que tienen las células de cáncer y la continua generación de multi-drogo resistencia a los fármacos, es que se hace necesario la identificación de nuevas dianas terapéuticas que sean más efectivas, a fin de frenar el avance de los procesos oncológicos, evitando así la metástasis.

Actualmente, muchos investigadores están visualizando a los componentes de varios procesos biológicos, que van desde el procesamiento de los ARNm en los núcleos, pasando por los mecanismos de transporte de los ARNm y finalmente la traducción, específicamente la iniciación, como potenciales dianas terapéuticas. La identificación del posible vínculo funcional entre la proteína WRN y el transporte de los ARNm desde el núcleo, lo cual altera finalmente la síntesis proteica, junto al hecho de que la pérdida de función de la proteína WRN induce senescencia replicativa de las células cancerosas, representa una oportunidad de estudio valiosa, con miras a desarrollar nuevas terapias antineoplásicas.

Descifrando las posibles funciones de WRN dentro de estos procesos celulares vitales, podría generar nuevos proyectos de Investigación Básica, destinados a la identificación de compuestos activos con capacidades de bloquear las actividades enzimáticas de WRN e inhibir la proliferación de las células de cáncer. Una investigación con este impacto, abriría nuevas oportunidades de investigación en el Perú financiadas ya sea, con fondos nacionales como extranjeros. Definir si es la deficiencia en el transporte de los ARNm de genes clave la responsable del defecto en la síntesis de proteínas en células de cáncer silenciadas para WRN y si éste defecto

es la causa de disparar los fenotipos senescentes, es un pre-requisito y un paso fundamental previo a la búsqueda de tratamientos. Por lo tanto, el presente proyecto está destinado a identificar y definir, mediante una serie de aproximaciones moleculares y bioquímicas el posible rol que tiene la proteína WRN en la homeostasis de los ARNm de genes metabólicos clave.

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar la posible alteración, como consecuencia de la depleción de la proteína WRN, en el transporte de los ARNm desde el núcleo al citoplasma para su traducción y que explique la disminución de la síntesis de proteínas observada en células HeLa silenciadas para WRN.

### **1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar la posible acumulación de los ARNm de los genes G6PD e IDH1 en las líneas celulares HeLa silenciadas para WRN.
2. Determinar si en fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS se observa retención de los ARNm de los genes G6PD e IDH1.
3. Determinar si la reinserción de WRN (Flag-WRN) en fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS se revierte o alivia la retención de los ARNm en el núcleo.

## II. MARCO TEÓRICO

Las células somáticas normales se dividen un número limitado de veces. Esto es conocido como senescencia replicativa o límite de Hayflick (Hayflick 1965), el cual se asocia al acortamiento de los telómeros, y que las células tumorales evaden. Con cada división celular los telómeros se acortan hasta alcanzar tamaños mínimos críticos que dispara la senescencia vía la respuesta de daño al ADN (DDR) (Collado et al 2007, Raynaud et al 2008). Varios factores afectan el tamaño de los telómeros, incluyendo ROS, típico en pacientes con WS (Coluzzi et al 2014). El transporte de los ARNm desde el núcleo está finamente regulado e involucra un gran número de pasos. La alteración de esta vía afecta la homeostasis celular que, en última instancia altera la longevidad. Entre estas proteínas accesorias algunas sirven de puente para el anclaje de los ARNm a los poros nucleares y asegurar su translocación al citoplasma (Culjkovic-Kraljacic & Borden 2013). Muchos de estos componentes se encuentran desregulados en procesos oncológicos (Culjkovic-Kraljacic & Borden 2013, Siddiqui & Borden 2012, van der Watt et al 2009). Por ejemplo, CRM1 está incrementado en varios tipos de tumores, incluido el cáncer de cérvix (van der Watt et al 2009), mientras que el silenciamiento de muchos de estos factores inhibe la proliferación de células de cáncer e inducen la acumulación de los ARNm en el núcleo. El WS es un desorden genético causado por mutaciones en el gen que codifica WRN (Epstein et al 1966, Goto et al 1992, Yu et al 1996). WRN pertenece a la familia de las RecQ helicasas (Gray et al 1997, Huang et al 1998, Machwe et al 2000, Shen et al 1998, Shen & Loeb 2000) y está implicada en procesos relacionados al ADN como mantención de los telómeros y reparación de daños al ADN (Bernstein et al 2010, Choi et al 2001, Crabbe et al 2007, Crabbe et al 2004, Li & Comai 2000, Multani & Chang 2007, Opresko et al 2002, Rossi et al 2010, Wyllie et al 2000). Varios estudios indican que las funciones de WRN están mediadas por modificaciones post-traduccionales e interacciones proteína-proteína (Kamath-Loeb et al 2000, Lachapelle et al 2011, Li & Comai 2000), describiéndose además su asociación con los poros nucleares (Li et al 2013). Sin embargo, no se ha descrito la asociación de WRN con los ARNm. Pacientes WS desarrollan tempranamente fenotipos de envejecimiento, incluidas enfermedades relacionadas con la edad y predisposición al desarrollo de tipos raros de cáncer (Sarcomas) (Epstein et al 1966, Goto 1997, Goto et al 1996, Huang et al 2006). Muchas líneas de cáncer expresan elevados niveles de WRN, el cual es necesario para el crecimiento y la formación de

tumores en modelos animales (Arai et al 2011, Futami et al 2008, Opresko et al 2007). Recientes resultados revelan que tras de depleción de WRN, enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la Isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) se ven afectados, sin mostrar una alteración en la abundancia de sus ARNm (Li et al 2014). Los ensayos *in vitro* destinados a medir la capacidad de síntesis de proteínas muestran que, células HeLa silenciadas para WRN poseen menos síntesis *de novo* que las células control sugiriendo que, en ausencia de WRN se inhibe, por un mecanismo aún por determinar, la síntesis de proteínas. La inhibición de la síntesis de proteínas puede deberse a un gran número de factores, entre ellos el transporte núcleo-citoplasma de los ARNm. Sin embargo, sí la depleción de WRN en células de cáncer afecta el transporte o distribución espacial de los ARNm que, consecuentemente reduce la síntesis de proteínas, es una pregunta aún por resolver.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 El Síndrome de Werner

El Síndrome de Werner (WS) es un raro desorden autosómico, recesivo y hereditario de progeria adulta (del griego “pro” que significa “antes” o “prematureo”, y “gēras” que significa “vejez”) o también conocido como Síndrome de envejecimiento prematuro segmental progeroide.

La carencia en la expresión del producto génico del gen *WERNER* conduce al WS, el cual es causado por mutaciones en dicho gen. Según la base de datos mutacional para el Síndrome de Werner de la University of Washington, (<http://www.pathology.washington.edu/research/werner/database/>). Hasta la fecha se han identificado 92 distintas mutaciones en el gen. La mayoría de ellas genera un ARNm truncado que es rápidamente degradado por el sistema llamado “non-sense mediated decay, el cual elimina los ARNm imperfectos que contienen codones de terminación de la traducción prematuro (Kashino et al 2001) (Figura 1). La mayoría de estas mutaciones ocurren dentro de la secuencia codificante y unas pocas ocurren en los intrones (Huang et al 2006).

Portadores de estas mutaciones desarrollan un fenotipo de envejecimiento prematuro que empieza a manifestarse a edades juveniles tempranas (Goto 1997), desarrollando muchas enfermedades asociadas a la vejez como diabetes mellitus tipo 2, fallo cardíaco, osteoporosis y desarrollan formas raras de cáncer(sarcomas) con mayor frecuencia que la población normal (Goto et al 1996, Massip et al 2006, Moore et al 2008, Muftuoglu et al 2008), siendo el cáncer y el fallo cardíaco dos de las principales causas de muerte entre los 46-54 años de edad (Agrelo 2007, Epstein et al 1966, Goto 1997, Huang et al 2006) (Figura 2).

Varios estudios indican que las funciones que tiene WRN en procesos que implican el ADN están mediadas por modificaciones post-traduccionales, así como interacciones proteína-proteína ,(Agrelo 2007, Bohr et al 2000, Lachapelle et al 2011, Li & Comai 2000, Li et al 2004), sin embargo las funciones precisas en estos procesos no son del todo entendidas. Ratones carentes de la actividad helicasa de WRN (*wrn* hel<sup>-/-</sup>) muestran inestabilidad genómica debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Massip et al 2006) y el daño por ROS al ADN está bien documentado entre los pacientes con el WS (Li et al 2014, Pagano et al 2005). Estudios proteómicos llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Comai diseñados para identificar los cambios tempranos (previos a los daños ocurridos por ROS) inducidos por la reducción de la expresión de WRN revelaron una imprevista alteración de varias vías metabólicas en múltiples líneas celulares, incluyendo fibroblastos humanos, células Hela y MCF7A, células madre mesénquimales de ratón (MSC) y fibroblastos embrionicos de ratón (MEF) derivados de ratones *wrn*<sup>-/-</sup>. Entre las alteraciones observadas se presentan la reducción de enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) (Li et al 2014), importantes también en la generación del cofactor y equivalente reductor NADPH, lo que conlleva a un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) elevando el nivel por daño oxidativo al ADN y a otras macromoléculas (Sohal 2002).

### **3.1.1 Familia de las helicasas RecQ**

Las RecQ helicasas es un grupo de enzimas que tienen actividad helicasa sobre el ADN. Esta familia está bastante conservada desde *E. coli* hasta humanos (Figura 3).

Se conocen varios ortólogos, así en levaduras, los ortólogos de WRN son: Sg1 en *Saccharomyces cerevisiae* y Rqph1 en *Saccharomyces pombe*. En *Caenorhabditis elegans*, Werner recibe el nombre de Wrn-1 y en *Xenopus levis*, XI FFA-1. En humanos, esta familia está compuesta por 5 miembros (WRN, RecQ4, BLM, RECQL, RECQ5 $\beta$ ) (Croteau et al 2014) y la alteración ocurrida en cada uno de estos genes conlleva a una serie de síndromes muy bien documentados (Bernstein et al 2010).

Esta familia recibe su nombre debido a un dominio altamente conservado helicasa presente en todos sus miembros. Sin embargo, a diferencia de otros miembros de esta familia, WRN posee un dominio extra con actividad 3'-5' exonucleasa, solo presente en humanos y *Xenopus*, el cual está fuertemente vinculado a funciones relacionadas con el ADN, por lo que se establecen funciones putativas vinculadas a los ácidos desoxirribonucleicos o ADN. La actividad de ambos dominios, helicasa y exonucleasa son dependiente de ATP (Huang et al 1998, Shen & Loeb 2000), usando la energía derivada de la hidrólisis del ATP para catalizar el desenrollamiento de los ácidos nucleicos bicatenarios, las cuales pueden ser de ADN, ARN dúplex o híbridos ADN:ARN (Vindigni et al 2010). La pérdida en la función de un miembro de las RecQ, incluido WRN, da como resultado alteraciones en los procesos de recombinación (Croteau et al 2014, Prince et al 2001). Por lo tanto, las RecQ cumplen un papel primordial en el mantenimiento de la estabilidad del genoma.

### **3.1.2 El gen del Síndrome de Werner**

El gen que codifica a la proteína WRN se localiza en el cromosoma 8, en la región 8p12 (Goto et al 1992, Nakura et al 1994, Yu et al 1996) y la pauta de lectura abierta que codifica para la proteína de 1,432 aminoácidos (aa) (Anexo 1) contiene 4,299 pb (Figura 4 y Anexo 2). Este gen fue inicialmente descrito por ligamiento genético en pacientes con el WS (Goto et al 1992) que mediante clonación posicional, se pudo identificar el gen responsable del WS. La identificación de mutaciones en el dominio helicasa conllevó a la definición de que un metabolismo defectuoso como consecuencia de esta mutación estaba involucrado en el proceso de envejecimiento en los pacientes con WS (Yu et al 1996). Se ha definido que, mutaciones con pérdida de función para la proteína de WRN predispone a los pacientes a diferentes tipos de cáncer (Goto et al 1996).

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

La proteína de WRN es una proteína multifuncional de gran tamaño (1,432 aa) con varias funciones catalíticas debido a sus múltiples dominios incluyendo los dominios helicasa (ATPasa), exonucleasa, RecQ C-terminal (RQC) y helicasa-RNasesD- C-terminal (HRDC) (Figura 5), siendo el único miembro de la familia de las helicasas RecQ humanas que contiene un dominio exonucleasa (Gray et al 1997, Huang et al 1998, Kamath-Loeb et al 1998, Shen et al 1998), el cual es responsable de corregir los errores de la ADN polimerasa I mediante la hidrólisis de nucleótidos desapareados o no apareados. Este dominio consta de 174 aa que se encuentran entre los amino ácidos 57 a 230 de la proteína WRN. El dominio helicasa DEAD/DEAH-box tiene como propósito la de relajar la doble cadena del ADN para su transcripción. Adicionalmente este dominio se encuentra relacionado con procesos que implican el metabolismo del ARN como el splicing del pre-ARN, biogénesis de los ribosomas, el transporte núcleo-citoplasma, traducción y el deterioro del ARN (Cordin et al 2006, Gilman et al 2017, Linder 2006, Schutz et al 2010). Este dominio contiene 164 aa y se encuentra entre los aa 550 y 713 de la proteína WRN. El dominio helicasa conservado C-terminal está presente en muchos tipos de helicasas y otras proteínas relacionadas a esta actividad. Este dominio identificado puede ser considerado como parte integral del dominio helicasa DEAD/DEAH box. Posee una longitud de 78 aa y se encuentra entre los aa 782 y 859 de la proteína WRN. El dominio RQC está compuesta por una estructura de hélice-vuelta-hélice y posee una alta afinidad por el ADN especialmente por estructuras complejas como G-cuádruplex de ADN (G4), siendo también responsable de las interacciones proteína-proteína (Bohr 2008). El dominio C-terminal helicasa RNaseD (HRDC) se encuentra ente los aa 1153 y 1219 de la secuencia aminoacídica de WRN. Las funciones de este dominio no están claras, pero muestra una afinidad por loa ácidos nucleicos e interviene en interacciones proteína-proteína (Kitano et al 2007). Finalmente, existe una señal de localización nuclear en el extremo C-terminal en la posición 1370-1375 aa (Matsumoto et al 1997), la cual hace que esta proteína sea preferentemente nuclear.

### 3.2 El Transporte Núcleo-Citoplasma

La principal función de la envoltura nuclear (EV) es la de proteger el genoma de elementos citoplásmicos y mediar el transporte núcleo-citoplasma de una gran variedad de moléculas como solutos, proteínas, ARN y partículas de ribonucleoproteínas (RNP) a través del complejo de poros nucleares (CPN). Mediante esta barrera, el sitio de transcripción queda espacialmente separado del sitio de la síntesis de proteínas, requiriendo el transporte de los nuevos transcritos sintetizado hacia el citoplasma para su traducción.

Los CPN están conformados aproximadamente por unas 30 proteínas diferentes en múltiplos de 8 copias cada una, lo que hacen un total de aproximadamente 400 proteínas (Lim & Fahrenkrog 2006), conocidas como nucleoporinas (Nups) (Krull et al 2004). El centro de estos poros está compuesto por Nups que contienen secuencias ricas en repeticiones de fenilalanina-glicina (FG) que forman una densa red hidrofóbica que actúa como barrera y evita el intercambio no deseado entre el núcleo y el citoplasma (Noble & Wentte 2010, Strambio-De-Castilla 2013, Wentte & Rout 2010) (Figura 6). El transporte de moléculas desde el núcleo hacia el citoplasma y viceversa, a través de los CPN, requiere una familia conservada de receptores nucleares de transporte conocidos como carioferinas o importinas- $\beta$  (exportinas, importinas o transportinas) las cuales reconocen secuencias específicas cortas en las proteínas cargo, ya sean señales de localización nuclear (NSL) o señales de exporte nuclear (NES). La característica más resaltante de las carioferinas es su regulación por la pequeña molécula Ran GTPasa (Moore & Blobel 1993). Ran existe en el núcleo en un estado unido a GTP (guanosina trifosfato) mientras que en el citoplasma se encuentra en un estado unido a GDP. Este gradiente RanGTP-RanGDP a través de la membrana nuclear es generado por dos reguladores, RanGEF (Ran-GDP-exchange factor) en el núcleo y RanGAP (Ran-GTPase-activating protein) en el citoplasma. De esta forma el continuo intercambio crea la fuerza motora para el proceso de transporte núcleo-citoplasma (Wentte & Rout 2010) (Figura 7). Así, las importinas se unen a sus cargos en el citoplasma y los liberan luego de ser transportados en el núcleo una vez unidos a Ran-GTP. Por su parte las exportinas se unen a sus cargos en el núcleo sólo cuando Ran-GTP está presente. Este complejo ternario es translocado al citoplasma donde la hidrólisis de Ran-GTP a Ran-GDP ocurre gracias a RanGAP y el cargo es liberado.

### 3.2.1 El Transporte de los ARNm

El transporte al citoplasma de los ARN mensajeros (ARNm) es más complicado que el simple transporte Ran-dependiente observado para las proteínas. Aunque muchas especies de ARNs como los ARNt, ARNsn, microARNs y ARNr siguen esta misma ruta (Katahira 2015, Okamura et al 2015, Rodriguez et al 2004), los ARNm (moléculas más grandes y complejas) de manera general, siguen una vía mecnicamente distinta, usando receptores de transporte y otros adaptadores en lugar de las carioferinas y son, además, independientes del sistema RanGTP-RanGDP (Kohler & Hurt 2007, Reed & Hurt 2002).

Previo al transporte de los ARNm desde el núcleo para su traducción en el citoplasma, los transcritos tienen que atravesar una serie de pasos de maduración que incluyen la adición de la estructura metil-7-guanosina (m7G) o cap en el extremo 5', proceso conocido como "capping". A medida que los ARNm van sintetizándose una tropa de proteínas inician los procesos de corte de intrones y empalme de los exones o splicing, para finalmente poliadenilarlos en sus extremos 3' terminal. Estos procesos son llevados a cabo por diferentes proteínas accesorias que se unen y procesan los ARNm durante la transcripción y que finalmente forman la partícula ribonucleoproteica del mensajero (PRNm) que será translocada al citoplasma para su traducción y que en algunos casos la expresión génica se ve controlada por los procesos de importación (Bonnet & Palancade 2014, Delaleau & Borden 2015, Katahira 2015, Wickramasinghe & Laskey 2015). Las propiedades del exporte están asociadas a las reacciones de procesamiento de los pre-ARNm, el liberado de la PRNm del sitio de la transcripción y el reclutamiento de los receptores de exporte que, en última instancia, interactúan con los dominios FG de la nucleoporinas en los CPN (Figura 8). Los receptores o transportadores más comunes implicados en el exporte de los ARNm son el NXF1 (Nuclear RNA Export Factor 1 o también conocido como TAP) (Aibara et al 2015, Katahira et al 2015) y el CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) (Delaleau & Borden 2015, Hutten & Kehlenbach 2007). Ambos transportadores sirven para anclar los ARNm a los CPN, sin embargo, el transportador CRM1 solo es usado para el transporte de ARNm específicos y otros tipos de ARNs como ARNr, su interacción con proteínas de unión al ARN (Okamura et al 2015, Siddiqui & Borden 2012).

La desregulación de la translocación desde el núcleo al citoplasma de los ARNm está bien documentada en muchos tipos de cáncer. Muchos factores de transporte y otros componentes de los CPN y que contribuyen al transporte de transcritos que codifican para proteínas implicadas en la supervivencia, metástasis e invasión, están desreguladas en células de cáncer (Culjkovic-Kraljacic & Borden 2013, Siddiqui & Borden 2012, van der Watt et al 2009).

Este evento es un proceso finamente regulado que involucra un gran número de proteínas que se unen a los ARNm y que dictan las pautas de transporte de los ARNm hacia el citoplasma para finalmente ser traducidos a proteínas. La alteración de esta importante vía juega un papel crítico en la homeostasis celular que, en última instancia, afecta a la longevidad celular. Entre estas proteínas accesorias algunas sirven de puente para el anclaje a los poros nucleares y asegurar su translocación al citoplasma (Culjkovic-Kraljacic & Borden 2013). Se han descrito que muchos de estos componentes se encuentran desregulados en procesos oncológicos y el silenciamiento de muchos de estos factores inhiben la proliferación de células de cáncer e induce la acumulación de los ARNm en los núcleos (Culjkovic-Kraljacic & Borden 2013, Guo et al 2005, Li et al 2007, Siddiqui & Borden 2012, van der Watt et al 2009).

#### **IV. HIPÓTESIS**

Si WRN está implicado en los procesos de transporte de los ARNm desde el núcleo al citoplasma para su traducción, entonces la depleción de WRN induciría una acumulación de las especies de ARNm en los núcleos de las células silenciadas para WRN.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Cultivo Celular e Inmunología y el laboratorio de Genética Molecular y Bioquímica de la Universidad Científica del Sur (UCSUR), ubicado en el distrito de Villa El Salvador, provincia de Lima y departamento de Lima.

### **5.2 Material biológico**

Para el presente trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: Células de cáncer HeLa conteniendo la construcción de silenciamiento para WRN shWRN y células HeLa control shCTR. Así mismo se utilizaron las líneas celulares de fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS (AG00780) y estas mismas líneas a las cuales se les reinserto WRN, las cuales fueron generadas en el laboratorio del Dr. Lucio Comai en al University of Southern California en Los Angeles y amablemente cedidas.

### **5.3 Identificación de las posibles alteraciones en la distribución espacial de los ARNm de los genes implicados en la generación de equivalentes reductores tras la depleción de WRN en células de cáncer HeLa**

#### **5.3.1 Cultivo *in vitro* de células HeLa shCTR y shWRN y Fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS**

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

### **5.3.2 Desregulación de WRN con doxiciclina (dox) en HeLa shCTR y shWRN**

Para la inducción la depleción de WRN, las células HeLa portadoras de la construcción de silenciamiento condicional shWRN fueron tratadas con dox (1.5 µg/ml) por 3 días. El nivel de desregulación de la proteína WRN se determinó mediante análisis por Western Blot utilizando el anticuerpo policlonal anti-Werner de conejo (Bethyl Inc., Montgomery, TX, USAA300-329). Como control de carga se usó el anticuerpo anti  $\alpha$ -tubulina, clone (10D8): sc-5286 y anti Actina, clone (C-11): sc-1615 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA).

### **5.3.3 Fraccionamiento celular**

El fraccionamiento subcelular está bastante bien establecido en nuestro laboratorio, por lo que se usa un protocolo general para mantener la consistencia en las extracciones. Las células fueron tratadas 20 minutos con cicloheximida (CHX) a una concentración final de 100µg/ml. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS suplementado con 100µg/ml CHX frío y colectadas mediante el uso de un raspador celular. El pellet celular se resuspendió en el tampón de lisis hipotónico (10 mM HEPES-KOH, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM PMSF, 5 mM  $\beta$ -GP, 1 mM DTT, 1 U/µL RNase Inhibitor Murine, 10 µL/ml PIC, 100 µg/ml CHX, pH 7.6) y se incubaron por 15 minutos en hielo y luego se agregó NP-40 a una concentración final de 0.1%. Se dejaron incubando por 15 minutos adicionales en hielo. El lisado celular se centrifugó a 4,000 RPM por 5 minutos a 4°C, se colectó el sobrenadante y centrifugo a 13,000 RPM por 20 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante (fracción citoplasmática) y se guardó en hielo hasta su uso. El pellet (fracción nuclear) fue extraído utilizando el tampón hipotónico suplementado con 420 mM de NaCl por 40 minutos en hielo con ocasionales golpes de vortex. Para la obtención de los ARN totales, los núcleos fueron separados y directamente lisados usando TRIzol (Thermo Fisher).

De cada fracción (total, nuclear y citoplasmática) se tomaron alícuotas para el análisis por Western Blot con el fin de determinar la presencia de proteínas nucleares en el citoplasma mediante el uso del anticuerpo anti TRF2 (D1Y5D) monoclonal de conejo mAb #13136 u ORC2 (3G6) monoclonal de rata mAb #4736 (Cell Signaling

Technology, Danvers, MA, USA). Como marcadores citoplásmicos y ribosomales se usaron los anticuerpos monoclonales de conejo anti G6PD (D5D2) mAb #12263 y anti-RPL7a (E109) mAb#2415 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), respectivamente. Los anticuerpos anti  $\alpha$ -tubulina, clone (10D8): sc-5286 y/o anti Actina, clone (C-11): sc-1615 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA), fueron usados como control de carga y distribución espacial. El resto del material fue usado para la extracción de los ARN totales.

#### **5.3.4 Western Blot**

Las alícuotas de los extractos obtenidos tanto de los ensayos de desregulación como de fraccionamiento subcelular fueron desnaturalizados a 95°C por 5 minutos en presencia del tampón de carga conteniendo 10% beta-mercaptoetanol. Las muestras fueron previamente cuantificadas utilizando el ensayo e Bradford y cantidades equivalentes de proteína fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 8% mediante electroforesis a 100 V por 1 hora. Para los extractos derivados del fraccionamiento subcelular, se utilizó en mismo número de células y las separaciones por electroforesis se realizó usando volúmenes equivalentes de cada una de las fracciones obtenidas.

Para la visualización de las proteínas de interés, los geles de separación fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa utilizando el tampón carbonato de sodio pH  $\geq$  9.8 (6.275 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.325 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), a 250 V por 1 hora y 20 minutos. Las membranas fueron bloqueadas después de la transferencia usando 5% de leche descremada (SERVA) en PBS-T (PBS 1X, 0.5 % Tween-20) por 1 hora a temperatura ambiente. La detección de las proteínas de interés se realizó mediante la incubación de las membranas con los anticuerpos indicados toda la noche a 4°C. Las membranas fueron posteriormente lavadas e incubadas con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) por 1 hora a temperatura ambiente.

El revelado del western blot mediante reacción de quimioluminiscencia se llevó a cabo utilizando el kit de SERVALight Polaris (SERVA) y exposición de las membranas a películas de rayos X.

### **5.3.5 Análisis de la distribución espacial núcleo-citoplasma de los transcritos de interés**

Las fracciones nucleares y citoplásmicas fueron incubadas en 800µl de TRIzol (*Thermo Fisher*) por 5 minutos a temperatura ambiente y los ARN totales fueron purificados siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los ARN totales fueron visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa-formaldehido para confirmar su integridad y cuantificados mediante espectrometría a 260 nm utilizando el NanoDrop.

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

Para la reacción de qPCR se utilizaron *primers* (cebadores) específicos para cada una de las secuencias a analizar (Tabla 1). La reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 10 µL con los siguientes reactivos: 100 pg del producto de la reacción de transcripción inversa (cDNA), 5 µL de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (*Thermo Fisher*), 0.5 µL de cada primer (0.2µM de concentración final) y H<sub>2</sub>O hasta completar los 10 µL de volumen final. La reacción se llevó a vado usando un termociclador StepOne Real-Time PCR (*Applied Biosystems*) con un programa de 95°C x 10 minutos de desnaturalización por un ciclo, luego 95°C x 5 segundos de desnaturalización, 60°C de anillado y 72°C de extensión por 40 ciclos. Finalmente se generó la curva de disociación iniciandoce a 95°C con una reducción de 0.5°C cada 1 segundo. Los resultados fueron generados utilizando las líneas basales inversamente proporcionales al nivel de expresión de los genes de interés (Ct), las cuales fueron normalizadas utilizando los resultados de expresión de la enzima GAPDH en cada ensayo.

## **IV. RESULTADOS**

### **6.1 Desregulación de la proteína WRN en células HeLa y verificación de la ausencia de expresión de la proteína WRN en fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS.**

Para confirmar que la proteína de WRN se encuentra desreguladas en las líneas celulares de cáncer HeLa conteniendo el factor de silenciamiento por shRNA, los extractos de las células control y las células shWRN fueron analizadas mediante western blot tras tres (3) días de incubación es presencia de dox. El análisis muestra que, las células HeLa portadoras de la construcción de silenciamiento shWRN contienen menos niveles de WRN comparadas con las células control (shCTR) luego de ser incubadas en prescencia de dox por 3 días, (Figura 9). Por su parte, el análisis de los extractos proteicos de los fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS muestran una reactividad negativa hacia el anticuerpo anti WRN, el cual si es claramente detectado en las líneas parentales a las cuales se les ha introducido la proteína WRN (Figura 10).

### **6.2 Distribución espacial de la proteína WRN**

El análisis de los resultados del fraccionamiento subcelular demuestra que, una fracción de WRN se localiza en los citoplasmas de células HeLa. Los resultados obtenidos con los fraccionamientos de fibroblastos derivados de pacientes con WS también muestran que una fracción de WRN se localiza en el citoplasma de dichas células tras su inserción como proteína de fusión Flag-WRN (Figuras 9 y 10).

### **6.3 Integridad de los ARN purificados de shCTR y shWRN**

Para confirma que la extracción de los ARN totales ha sido adecuada y los ARNs no han sufrido un proceso de degradación, los ARN derivados de células HeLa shCTR y shWRN y los ARNs derivados de los fibroblastos, fueron sometidos a una electroforesis horizontal en gel de agarosa-formaldehido al 1 % y tinción con bromuro de etídio. Los resultados muestran que lo ARNs extraídos a partir de las 2 líneas celulares se encuentran en condiciones óptimas, es decir no degradados,

permitiéndonos realizar los pasos sucesivos de experimentación (Figuras 11 y 12). Estos ARNs fueron finalmente cuantificados utilizando el nanodrop y usados directamente para el tratamiento con DNasa y posterior síntesis de los ADN complementarios (cDNA) o bien guardados a -80°C hasta su posterior uso.

#### **6.4 Tratamiento de los ARN con DNasa**

Para eliminar cualquier residuo de contaminación con DNA genómico ocurrido durante la extracción de los ARN, los ARN purificados fueron tratados con DNase I (*Ambion*). Para confirmar la ausencia de contaminación genómica, se realizó una PCR utilizando estos ARN tratados, sin tratar y cDNA como control positivo. Se usaron primers específicos contra tubulina y actina que hibridan entre exones contiguos. La reacción de PCR sobre el ARN tratado con DNase I mostró que los ARN usados para los análisis por qPCR no contienen contaminación con ADN genómico (Figuras 13 y 14).

#### **6.5 Análisis de la distribución espacial de los ARNm en células HeLa silenciadas para WRN**

Con el fin de demostrar que la depleción de WRN altera la distribución espacial de los ARNm de interés en células de cáncer HeLa, se analizaron los transcritos cuyos productos génicos se ven afectados tras la depleción de WRN. Los resultados fueron generados como una relación entre el núcleo y el citoplasma, es decir el ratio derivado del valor de los núcleos entre el valor obtenido de las muestras del citoplasma. Los resultados demuestran que, la depleción de WRN afecta el transporte de los ARNm, acumulándose estos en los núcleos de las células deplecionadas para WRN, lo que genera un índice mayor de señal. La depleción de WRN parece ser que solo afecta a las especies de los ARNm dado que, el análisis de los resultados obtenidos por qPCR, usando los cebadores específicos diseñados para amplificar un segmento del ARNr 18S, no muestran que esta especie de ARN sea afectada tras el silenciamiento de WRN (Figura 15). Más aún, tras la remoción del tratamiento por 3 días y la recuperación de la expresión de WRN (Figura 16, recuadro interno) estas mismas células muestran un alivio en la retención de los ARNm analizados, recuperándose nuevamente la

distribución núcleo/citoplasma observada en el control y previo al tratamiento con dox en células portadoras de la construcción shWRN (Figura 16 y recuadro interno).

## **6.6 Análisis de la distribución espacial de los ARNm en fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS**

Para descartar que la observación de la retención de los ARNs en el núcleo de células de cáncer deplecionadas para WRN no se debe a una interferencia externa como el tratamiento con dox, fibroblastos humanos derivados de pacientes portadores del WS sobre-expresando la proteína WRN (ws/F-WRN) y sus parentales ws, fueron sometidos al mismo análisis. Los resultados demuestran que la proteína WRN es requerida para la correcta distribución espacial de los ARNm y que la pérdida de función de WRN induce una acumulación de las especies de ARNm, al menos de estos transcritos analizados, en el núcleo celular, el cual es revertido tras la introducción como una sobre-expresión de la proteína de WRN (Figura 17).

## VII. DISCUSIÓN

En este estudio se planteó la hipótesis de que sí la proteína WRN estaba implicada en los procesos de transporte de los ARNm desde el núcleo al citoplasma para su traducción, entonces la depleción de WRN induciría una acumulación de las especies de ARNm en los núcleos de las células silenciadas para WRN. Los datos obtenidos con la experimentación propuesta en la presente Tesis han demostrado que, la alteración en los niveles de enzimas metabólicas implicadas en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno como la G6PD e IDH1, se corresponde con una acumulación de sus transcritos génicos o ARNm en el núcleo en células HeLa deplecionadas para WRN. Esta alteración se observa también en fibroblastos derivados de pacientes con el WS y cuyo fenotipo de acumulación de los ARN en los núcleos, puede ser revertido tras la re inserción de WRN en estas últimas líneas celulares.

En una célula eucariota típica, entre el 80-90% de los ARNm se encuentran en el citoplasma, mientras que solo entre el 10-20% se ubica en el núcleo. La observación de la relación de WRN con el transporte núcleo-citoplasma de los ARNm no es del todo extraña, ya que se ha descrito la asociación de WRN con los poros nucleares (Kaur et al 2010, Li et al 2013). Dentro de los dominios presentes en la proteína WRN, el dominio helicasa DEAD/DEAH-box se alinea con esta putativa función relacionada a los ARN. Este tipo de dominios está estrechamente relacionado con la homeostasis de los ARN cuyas funciones incluyen la biogénesis de los ribosomas, el procesamiento y plegamiento de los ARN, el remodelamiento de las partículas ribonucleoproteicas (RNP), el exporte nuclear de los ARNs, la regulación de la traducción y transcripción y la degradación de los ARN (Schutz et al 2010).

Según HUGO (Genome Nomenclature Committee o HGNC, <https://beta.genenames.org>), el genoma humano codifica 58 DEAD/H-box RNA helicasas no redundantes y 11 RNA helicasa independientes del dominio DEAD/H-box (Umate et al 2011), estando muchas de ellas implicadas en el exporte del ARNm desde el núcleo al citoplasma (Awasthi et al 2018, Hodroj et al 2017, Schmitt et al 1999, Snay-Hodge et al 1998, Tseng et al 1998). Así, el análisis bioinformático comparativo del alineamiento de la secuencia aminoacídica de esta región, demuestran que el motivo

DEAD/H-box de WRN se encuentran bastante conservado al compararlo con otros miembros de la familia RNAs helicasa DEAD/H-box, sugiriendo que este motivo en WRN, podría mostrar una actividad sobre sustratos del tipo ARN (Anexo 3).

Las células cancerosas (incluidas las células HeLa) sobre producen especies reactivas de oxígeno debido principalmente a una disfunción mitocondrial (Pelicano et al 2004). Este desbalance redox es rápidamente controlado por un potente sistema de detoxificación exacerbado en las células de cáncer, que de no ser controlado genera un estrés oxidativo por daño a las macromoléculas, incluido el ADN (Trachootham et al 2009). Previos estudios utilizando nuestro sistema lentiviral de silenciamiento génicos para WRN, han demostraron que existe un daño oxidativo al ADN tras 5 días de exposición a la droga dox (Li et al 2014). Este daño no es debido a una prolongada exposición a dox, sino a los efectos acumulativos causados por la sobreacumulación de ROS a consecuencia del silenciamiento de WRN. Este daño al ADN medido mediante la acumulación de los marcadores de daño oxidativo al ADN, 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHdG) y  $\gamma$ -H2AX, no se presenta tras 3 días de inducción, donde obtenemos una reducción de más del 80% de la proteína WRN (Li et al 2014) y manuscrito sometido a revisión. Estos resultados indican que estamos capturando eventos tempranos previos al daño al ADN y que, la retención observada de los ARNm en los núcleos tras la depleción de WRN, no se debe a una respuesta al daño al ADN.

Los protocolos de fraccionamiento subcelulares bien establecidos en nuestro laboratorio, nos han permitido obtener extractos citoplásmicos libres de contaminantes nucleares, lo que nos indica que la presencia de WRN no se debe a una ruptura de los núcleos y que esta localización citoplásmica podría deberse a las funciones extra nucleares que cumple WRN y que podrían involucrar el transporte de los ARNm y la traducción de los mismos a proteínas.

La relación de WRN en el transporte de los ARNm podría ser evidenciada por la interacción demostrada entre WRN y varias proteínas ribosomales a partir de extractos totales de células 293HEK (Lachapelle et al 2011). Nuestros previos estudios han demostrado que la fracción citoplásmica de WRN es capaz de interactuar con RPS3, tanto *in vitro* como *in vivo* (manuscrito sometido a revisión). RPS3 es un componente de la subunidad ribosomal 40S que se une directamente a ARNr 18S y

juega un papel crucial en la iniciación de la traducción (Passmore et al 2007). Además, la asociación de WRN con los poros nucleares cuya depleción induce desorganización de los mismos sugieren que WRN estaría cumpliendo un rol crítico en la organización de los PN y posiblemente en el transporte de algunos, sino todos, los ARNm (Li et al 2013). Así, la deficiencia en el exporte de los ARNm desde el núcleo al citoplasma, a consecuencia del silenciamiento de WRN, podría estar afectando las capacidades regenerativas de la célula de cáncer HeLa, afectando a varias macromoléculas incluidas aquellas proteínas implicadas en la reparación del daño oxidativo causado por la acumulación de ROS. Esta alteración en la síntesis de proteínas está bien documentada en los procesos de envejecimiento y se considera un sello distintivo del mismo (Lautrup et al 2019, Lopez-Otin et al 2013).

Un control exacto de la expresión génica es crítico para todas las células. Este control está destinado a responder a diferentes tipos de estrés celular debido a factores internos o externos, el cual permiten a la célula generar procesos adaptativos que le ayudan a regular apropiadamente la proliferación y el crecimiento y asegurar su supervivencia bajo dichos estímulos. La expresión génica puede ser controlada de no solo a nivel transcripcional y traduccional, sino que además puede ser controlada por el exporte de los ARNm (Delaleau & Borden 2015). La alteración en la síntesis de proteínas observada tras la depleción de WRN en células de cáncer (Li et al 2014) y manuscrito sometido a revisión, podría deberse a un defecto en el transporte de los ARNm. Sin embargo, está aún por definir si la alteración de la síntesis de proteínas en células de cáncer HeLa tras la depleción de WRN, sería la responsable de alterar el transporte núcleo-citoplasma de los ARNm o, si por el contrario, es el propio defecto en el correcto transporte de los ARNm desde el núcleo al citoplasma, a consecuencia del silenciamiento de WRN, la responsable de alterar la síntesis de proteínas.

Los resultados obtenidos mediante RT-qPCR usando las líneas celulares HeLa a las cuales se les ha desregulado WRN de manera condicional, demuestran que WRN es requerido para el transporte núcleo-citoplasma de los ARNm. Estos resultados están soportados por las observaciones que demuestran que, tras el retiro del estímulo inductor del silenciamiento WRN, dox, la distribución espacial de los ARNm de los genes analizados se restablece. Estos datos fuertemente apuntan a considerar a la proteína WRN como una proteína clave y necesaria para la correcta síntesis de

proteínas en células de cáncer, debido a su rol crucial en la distribución espacial de los ARN. Más aun, fibroblastos humanos derivados de pacientes con el WS muestran que, la ausencia de WRN podría estar induciendo la senescencia replicativa debido a la acumulación nuclear de los ARNm, lo cual impide que la célula renueve su pool de macromoléculas alterando la proteostásis celular, un sello distintivo del envejecimiento (Lautrup et al 2019). Al igual que lo observado en células de cáncer HeLa, la retención nuclear de los ARNm en fibroblastos derivados de pacientes con el WS se ve aliviada cuando se reintroduce WRN al sistema.

La observación de que en células HeLa, sólo los ARNm y no los ARNr como el 18S se ven afectados, mientras que en fibroblastos humanos derivados de pacientes con el WS si se detecta una diferencia significativa en la distribución espacial de este tipo de ARN, podría responder a que en fibroblastos de pacientes con el WS se han acumulado una serie de alteraciones génicas, debido al proceso de replicación normal y a los procesos de reparación alterados, que en ausencia de WRN resulta en un daño mayor comparado con las células HeLa silenciadas para WRN de manera condicional. Así, los tres días de inducción del silenciamiento de WRN con dox en células HeLa, ha demostrado que no inducen una respuesta al daño al DNA, por lo tanto, la maquinaria de respuesta a dicho daño no se activa y claramente indican estos datos que, se están capturando eventos tempranos, previos al daño ocurrido por la sobre generación de radicales libres.

Las conclusiones alcanzadas con las aproximaciones genéticas y bioquímicas planteadas en el presente trabajo de Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología, demuestran que WRN es requerido para la correcta distribución espacial de los ARNm cuya inhibición altera la apropiada síntesis de proteínas. De esta forma, se establecen pautas iniciales que inducen fuertemente a definir a WRN como una potencial diana terapéutica, capaz de inhibir la proliferación de las células de cáncer, a través del bloqueo de las funciones celulares de la proteína WRN.

Finalmente, la senescencia replicativa observada en células de cáncer HeLa, tras la depleción de WRN, podría deberse básicamente a la inhibición del correcto transporte núcleo-citoplasma de los ARNm, lo que indicaría que el ROS no sería la causa de la senescencia replicativa observada en células de cáncer silenciadas para

WRN, sino que el ROS sería una consecuencia de la falta de proteínas generadoras de equivalentes reductores y proteínas implicadas en la reparación del daño al ADN, a consecuencia de la falta de una síntesis proteica adecuada. Así, la causa de la senescencia replicativa en células de cáncer HeLa, estaría más relacionada al defecto del transporte núcleo-citoplasma de los ARNm que en última instancia afecta la síntesis global de proteínas.

## VIII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Una pequeña fracción de WRN se localiza en el citoplasma asociada a la maquinaria traduccional.
- La depleción de WRN afecta la correcta distribución espacial de los ARNm en células de cáncer HeLa, sin afectar el transporte de otras especies de ARN como los ARNr.
- La eliminación del estímulo de silenciamiento condicional, dox, demuestra que WRN es necesario para la función del transporte núcleo-citoplasma de los ARNm en células de cáncer HeLa, obteniéndose una distribución espacial similar a la observada en las células control.
- La re inserción de WRN en fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS, demuestra que WRN es requerido para el correcto transporte, desde el núcleo, de los ARNm para su traducción a proteínas en el citoplasma.
- La retención nuclear de los ARNr, como el 18S, en células derivadas de pacientes con el WS y no en células de cáncer HeLa deplecionadas condicionalmente para WRN, sugieren que se están capturando eventos tempranos, previo al daño ocurrido por la sobreproducción de radicales libres y que disparan la respuesta al daño celular por ROS.
- La retención de los ARNm en el núcleo de las células HeLa de cáncer conduce, necesariamente, a una alteración en los patrones de expresión proteica, agotando el

pool de nuevas macromoléculas que sustenten la alta demanda de nuevos bloques de construcción requeridos por las altamente proliferativas células de cáncer HeLa.

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación nos llevan a deducir que: la alteración en los patrones de expresión proteica debido a la retención de los ARNm en los núcleos a consecuencia de la depleción de WRN reduce las capacidades regenerativas de las propias células, la cual sería la responsable de disparar o inducir la senescencia replicativa observada en células de cáncer HeLa silenciadas para WRN. Por lo tanto, estos datos indican que WRN podría servir como una potencial diana terapéutica cuyo bloqueo estaría orientado a inhibir la proliferación o metástasis de procesos neoplásicos.

## IX. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS

- Agrelo R. 2007. A new molecular model of cellular aging based on Werner syndrome. *Med Hypotheses* 68: 770-80
- Aibara S, Katahira J, Valkov E, Stewart M. 2015. The principal mRNA nuclear export factor NXF1:NXT1 forms a symmetric binding platform that facilitates export of retroviral CTE-RNA. *Nucleic acids research* 43: 1883-93
- Arai A, Chano T, Futami K, Furuichi Y, Ikebuchi K, et al. 2011. RECQL1 and WRN proteins are potential therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research* 71: 4598-607
- Awasthi S, Verma M, Mahesh A, MI KK, Govindaraju G, et al. 2018. DDX49 is an RNA helicase that affects translation by regulating mRNA export and the levels of pre-ribosomal RNA. *Nucleic acids research*
- Bernstein KA, Gangloff S, Rothstein R. 2010. The RecQ DNA helicases in DNA repair. *Annual review of genetics* 44: 393-417
- Bohr VA. 2008. Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends in biochemical sciences* 33: 609-20
- Bohr VA, Cooper M, Orren D, Machwe A, Piotrowski J, et al. 2000. Werner syndrome protein: biochemical properties and functional interactions. *Exp Gerontol* 35: 695-702
- Bonnet A, Palancade B. 2014. Regulation of mRNA trafficking by nuclear pore complexes. *Genes* 5: 767-91
- Choi D, Whittier PS, Oshima J, Funk WD. 2001. Telomerase expression prevents replicative senescence but does not fully reset mRNA expression patterns in Werner syndrome cell strains. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15: 1014-20
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. 2007. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130: 223-33
- Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, Leone S, Meneghini C, et al. 2014. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS one* 9: e110963
- Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P. 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367: 17-37
- Crabbe L, Jauch A, Naeger CM, Holtgreve-Grez H, Karlseder J. 2007. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 2205-10
- Crabbe L, Verdun RE, Haggblom CI, Karlseder J. 2004. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* 306: 1951-3
- Croteau DL, Popuri V, Opresko PL, Bohr VA. 2014. Human RecQ helicases in DNA repair, recombination, and replication. *Annual review of biochemistry* 83: 519-52
- Culjkovic-Kraljacic B, Borden KL. 2013. Aiding and abetting cancer: mRNA export and the nuclear pore. *Trends in cell biology* 23: 328-35
- Delaleau M, Borden KL. 2015. Multiple Export Mechanisms for mRNAs. *Cells* 4: 452-73
- Epstein CJ, Martin GM, Schultz AL, Motulsky AG. 1966. Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine* 45: 177-221
- Futami K, Ishikawa Y, Goto M, Furuichi Y, Sugimoto M. 2008. Role of Werner syndrome gene product helicase in carcinogenesis and in resistance to genotoxins by cancer cells. *Cancer science* 99: 843-8

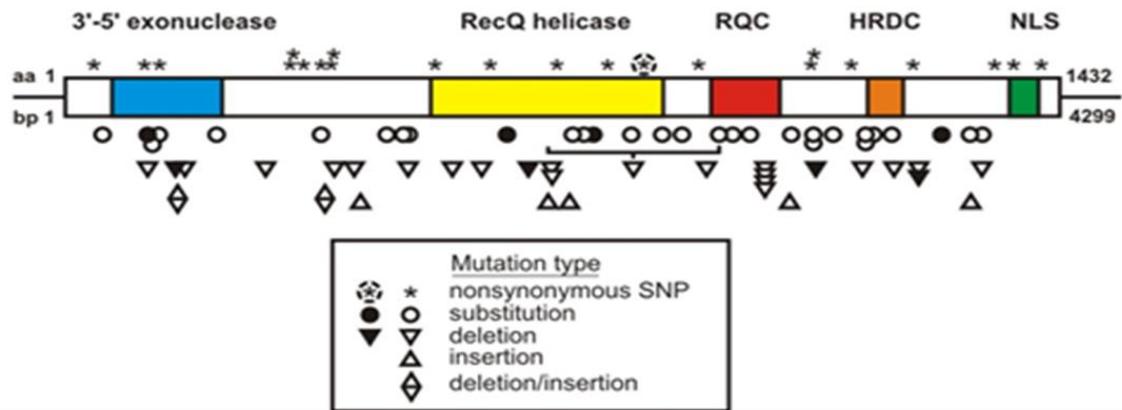
- Gilman B, Tijerina P, Russell R. 2017. Distinct RNA-unwinding mechanisms of DEAD-box and DEAH-box RNA helicase proteins in remodeling structured RNAs and RNPs. *Biochemical Society transactions* 45: 1313-21
- Goto M. 1997. Hierarchical deterioration of body systems in Werner's syndrome: implications for normal ageing. *Mechanisms of ageing and development* 98: 239-54
- Goto M, Miller RW, 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: 239-46
- Goto M, Rubenstein M, Weber J, Woods K, Drayna D. 1992. Genetic linkage of Werner's syndrome to five markers on chromosome 8. *Nature* 355: 735-8
- Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS, Blank A, Sopher BL, et al. 1997. The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nature genetics* 17: 100-3
- Guo S, Hakimi MA, Baillat D, Chen X, Farber MJ, et al. 2005. Linking transcriptional elongation and messenger RNA export to metastatic breast cancers. *Cancer research* 65: 3011-6
- Hayflick L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research* 37: 614-36
- Hodroj D, Serhal K, Maiorano D. 2017. Ddx19 links mRNA nuclear export with progression of transcription and replication and suppresses genomic instability upon DNA damage in proliferating cells. *Nucleus* 8: 489-95
- Huang S, Lee L, Hanson NB, Lenaerts C, Hoehn H, et al. 2006. The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Human mutation* 27: 558-67
- Huang S, Li B, Gray MD, Oshima J, Mian IS, Campisi J. 1998. The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'-->5' exonuclease. *Nature genetics* 20: 114-6
- Hutten S, Kehlenbach RH. 2007. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in cell biology* 17: 193-201
- Kamath-Loeb AS, Johansson E, Burgers PM, Loeb LA. 2000. Functional interaction between the Werner Syndrome protein and DNA polymerase delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4603-8
- Kamath-Loeb AS, Shen JC, Loeb LA, Fry M. 1998. Werner syndrome protein. II. Characterization of the integral 3' --> 5' DNA exonuclease. *The Journal of biological chemistry* 273: 34145-50
- Kashino G, Kodama S, Suzuki K, Oshimura M, Watanabe M. 2001. Preferential expression of an intact WRN gene in Werner syndrome cell lines in which a normal chromosome 8 has been introduced. *Biochemical and biophysical research communications* 289: 111-5
- Katahira J. 2015. Nuclear export of messenger RNA. *Genes* 6: 163-84
- Katahira J, Dimitrova L, Imai Y, Hurt E. 2015. NTF2-like domain of Tap plays a critical role in cargo mRNA recognition and export. *Nucleic acids research* 43: 1894-904
- Kaur S, White TE, DiGuilio AL, Glavy JS. 2010. The discovery of a Werner Helicase Interacting Protein (WHIP) association with the nuclear pore complex. *Cell Cycle* 9: 3106-11
- Kitano K, Yoshihara N, Hakoshima T. 2007. Crystal structure of the HRDC domain of human Werner syndrome protein, WRN. *The Journal of biological chemistry* 282: 2717-28
- Kohler A, Hurt E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8: 761-73

- Krull S, Thyberg J, Bjorkroth B, Rackwitz HR, Cordes VC. 2004. Nucleoporins as components of the nuclear pore complex core structure and Tpr as the architectural element of the nuclear basket. *Molecular biology of the cell* 15: 4261-77
- Lachapelle S, Gagne JP, Garand C, Desbiens M, Coulombe Y, et al. 2011. Proteome-wide identification of WRN-interacting proteins in untreated and nuclease-treated samples. *Journal of proteome research* 10: 1216-27
- Lautrup S, Caponio D, Cheung HH, Piccoli C, Stevnsner T, et al. 2019. Studying Werner syndrome to elucidate mechanisms and therapeutics of human aging and age-related diseases. *Biogerontology*
- Li B, Comai L. 2000. Functional interaction between Ku and the werner syndrome protein in DNA end processing. *The Journal of biological chemistry* 275: 28349-52
- Li B, Iglesias-Pedraz JM, Chen LY, Yin F, Cadenas E, et al. 2014. Downregulation of the Werner syndrome protein induces a metabolic shift that compromises redox homeostasis and limits proliferation of cancer cells. *Aging cell* 13: 367-78
- Li B, Navarro S, Kasahara N, Comai L. 2004. Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem* 279: 13659-67
- Li Y, Lin AW, Zhang X, Wang Y, Wang X, Goodrich DW. 2007. Cancer cells and normal cells differ in their requirements for Thoc1. *Cancer research* 67: 6657-64
- Li Z, Zhu Y, Zhai Y, M RC, Bao Y, et al. 2013. Werner complex deficiency in cells disrupts the Nuclear Pore Complex and the distribution of lamin B1. *Biochim Biophys Acta* 1833: 3338-45
- Lim RY, Fahrenkrog B. 2006. The nuclear pore complex up close. *Current opinion in cell biology* 18: 342-7
- Linder P. 2006. Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic acids research* 34: 4168-80
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194-217
- Machwe A, Ganunis R, Bohr VA, Orren DK. 2000. Selective blockage of the 3'-->5' exonuclease activity of WRN protein by certain oxidative modifications and bulky lesions in DNA. *Nucleic acids research* 28: 2762-70
- Massip L, Garand C, Turaga RV, Deschenes F, Thorin E, Lebel M. 2006. Increased insulin, triglycerides, reactive oxygen species, and cardiac fibrosis in mice with a mutation in the helicase domain of the Werner syndrome gene homologue. *Experimental gerontology* 41: 157-68
- Matsumoto T, Shimamoto A, Goto M, Furuichi Y. 1997. Impaired nuclear localization of defective DNA helicases in Werner's syndrome. *Nature genetics* 16: 335-6
- Moore G, Knoblauch S, Gollahon K, Rabinovitch P, Ladiges W. 2008. Hyperinsulinemia and insulin resistance in Wrn null mice fed a diabetogenic diet. *Mech Ageing Dev* 129: 201-6
- Moore MS, Blobel G. 1993. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 365: 661-3
- Muftuoglu M, Oshima J, von Kobbe C, Cheng WH, Leistriz DF, Bohr VA. 2008. The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis. *Hum Genet* 124: 369-77
- Multani AS, Chang S. 2007. WRN at telomeres: implications for aging and cancer. *Journal of cell science* 120: 713-21

- Nakura J, Wijsman EM, Miki T, Kamino K, Yu CE, et al. 1994. Homozygosity mapping of the Werner syndrome locus (WRN). *Genomics* 23: 600-8
- Noble KN, Wenthe SR. 2010. Nuclear mRNA on the move. *Nature cell biology* 12: 525-7
- Okamura M, Inose H, Masuda S. 2015. RNA Export through the NPC in Eukaryotes. *Genes* 6: 124-49
- Opresko PL, Calvo JP, von Kobbe C. 2007. Role for the Werner syndrome protein in the promotion of tumor cell growth. *Mech Ageing Dev* 128: 423-36
- Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA. 2002. Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *The Journal of biological chemistry* 277: 41110-9
- Pagano G, Zatterale A, Degan P, d'Ischia M, Kelly FJ, et al. 2005. In vivo prooxidant state in Werner syndrome (WS): results from three WS patients and two WS heterozygotes. *Free radical research* 39: 529-33
- Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, Applefield DJ, Acker MG, et al. 2007. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Molecular cell* 26: 41-50
- Pelicano H, Carney D, Huang P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 7: 97-110
- Prince PR, Emond MJ, Monnat RJ, Jr. 2001. Loss of Werner syndrome protein function promotes aberrant mitotic recombination. *Genes & development* 15: 933-8
- Raynaud CM, Jang SJ, Nuciforo P, Lantuejoul S, Brambilla E, et al. 2008. Telomere shortening is correlated with the DNA damage response and telomeric protein down-regulation in colorectal preneoplastic lesions. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 19: 1875-81
- Reed R, Hurt E. 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108: 523-31
- Rodriguez MS, Dargemont C, Stutz F. 2004. Nuclear export of RNA. *Biology of the cell* 96: 639-55
- Rossi ML, Ghosh AK, Bohr VA. 2010. Roles of Werner syndrome protein in protection of genome integrity. *DNA Repair (Amst)* 9: 331-44
- Schmitt C, von Kobbe C, Bachi A, Pante N, Rodrigues JP, et al. 1999. Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *The EMBO journal* 18: 4332-47
- Schutz P, Karlberg T, van den Berg S, Collins R, Lehtio L, et al. 2010. Comparative structural analysis of human DEAD-box RNA helicases. *PLoS one* 5
- Shen JC, Gray MD, Oshima J, Kamath-Loeb AS, Fry M, Loeb LA. 1998. Werner syndrome protein. I. DNA helicase and dna exonuclease reside on the same polypeptide. *The Journal of biological chemistry* 273: 34139-44
- Shen JC, Loeb LA. 2000. Werner syndrome exonuclease catalyzes structure-dependent degradation of DNA. *Nucleic acids research* 28: 3260-8
- Siddiqui N, Borden KL. 2012. mRNA export and cancer. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 3: 13-25
- Snay-Hodge CA, Colot HV, Goldstein AL, Cole CN. 1998. Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *The EMBO journal* 17: 2663-76

- Sohal RS. 2002. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med* 33: 37-44
- Strambio-De-Castilla C. 2013. Jumping over the fence: RNA nuclear export revisited. *Nucleus* 4: 95-9
- Trachootham D, Alexandre J, Huang P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews. Drug discovery* 8: 579-91
- Tseng SS, Weaver PL, Liu Y, Hitomi M, Tartakoff AM, Chang TH. 1998. Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)+ RNA export. *The EMBO journal* 17: 2651-62
- Umate P, Tuteja N, Tuteja R. 2011. Genome-wide comprehensive analysis of human helicases. *Communicative & integrative biology* 4: 118-37
- van der Watt PJ, Maske CP, Hendricks DT, Parker MI, Denny L, et al. 2009. The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation. *International journal of cancer* 124: 1829-40
- Vindigni A, Marino F, Gileadi O. 2010. Probing the structural basis of RecQ helicase function. *Biophysical chemistry* 149: 67-77
- Wente SR, Rout MP. 2010. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2: a000562
- Wickramasinghe VO, Laskey RA. 2015. Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. *Nature reviews. Molecular cell biology* 16: 431-42
- Wyllie FS, Jones CJ, Skinner JW, Haughton MF, Wallis C, et al. 2000. Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nature genetics* 24: 16-7
- Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, et al. 1996. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272: 258-62

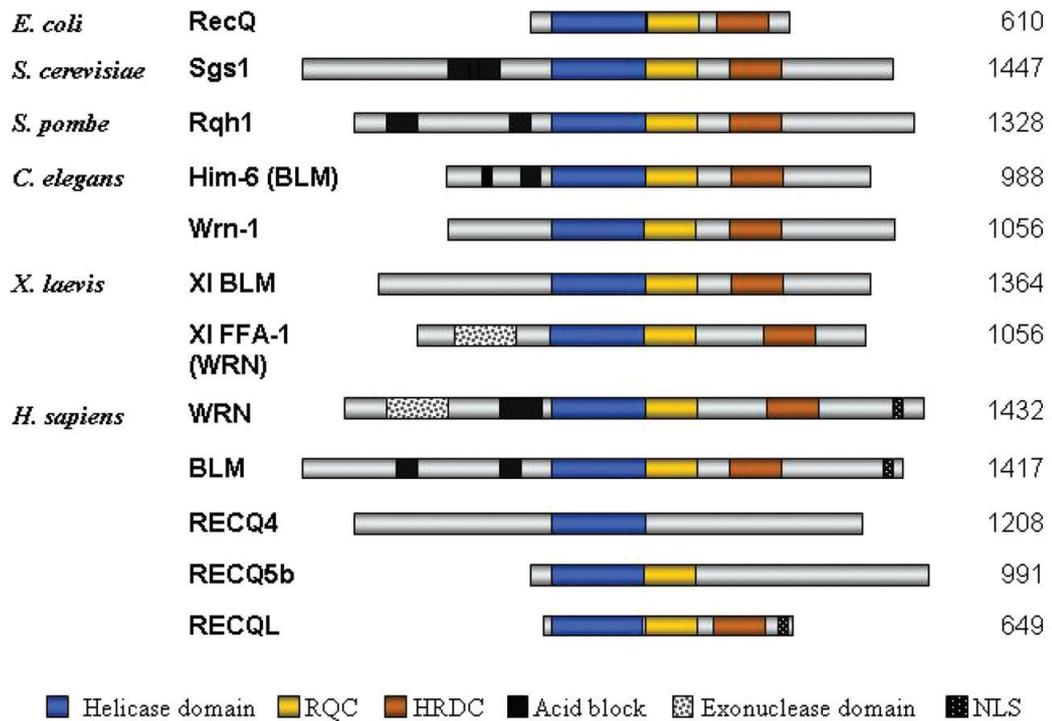
## FIGURAS



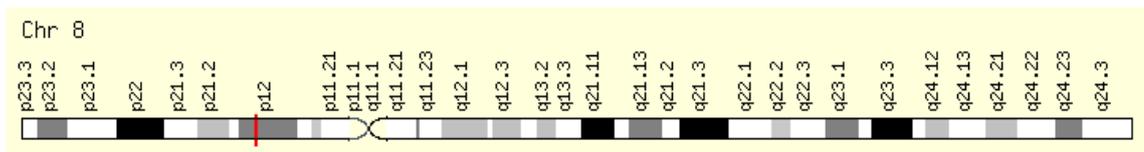
**Figura 1.** Mutaciones en el gen Werner. 85 distintas mutaciones han sido identificadas hasta la fecha. Todas ellas generan un ARNm truncado que es rápidamente degradado por el sistema conocido como Non-Sence Mediated Decay.



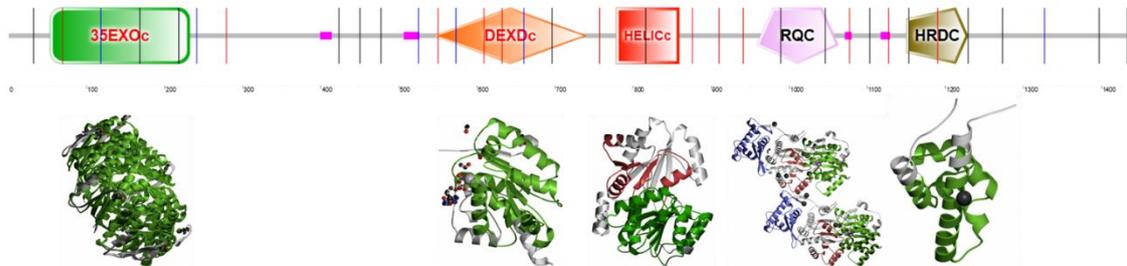
**Figura 2.** Paciente con WS. Se muestra una persona aparentemente normal a los 8 años, sin embargo, a la edad de 36 años ya se evidencian los fenotipos de la enfermedad (Hisama et al., 2006).



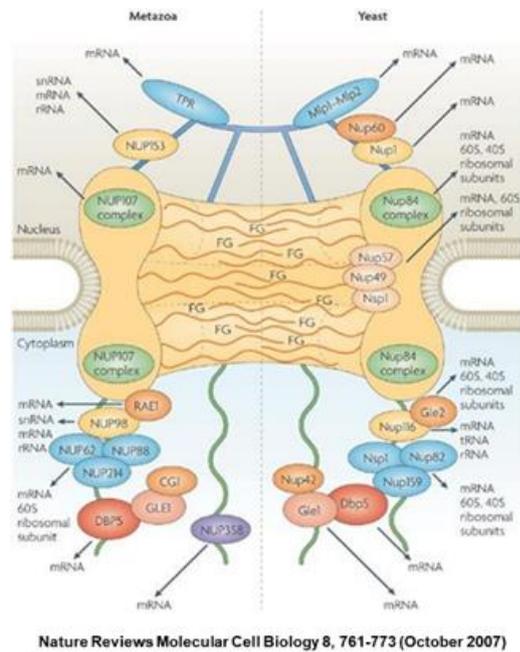
**Figura 3.** Miembros de la familia de las helicasas RecQ. Se muestra el tamaño de cada proteína con su número de aminoácidos. En azul y amarillo se observa las regiones conservadas RQC y HRDC respectivamente (Cobb, Bjergbaek 2006).



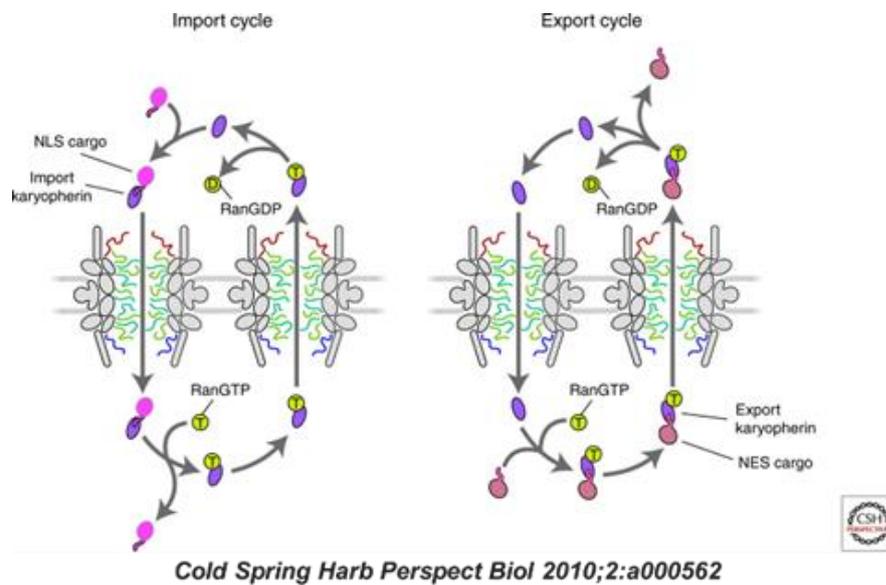
**Figura 4.** Cromosoma 8. Localización del gen del Síndrome de Werner en la posición p12 (Base de datos de NCBI).



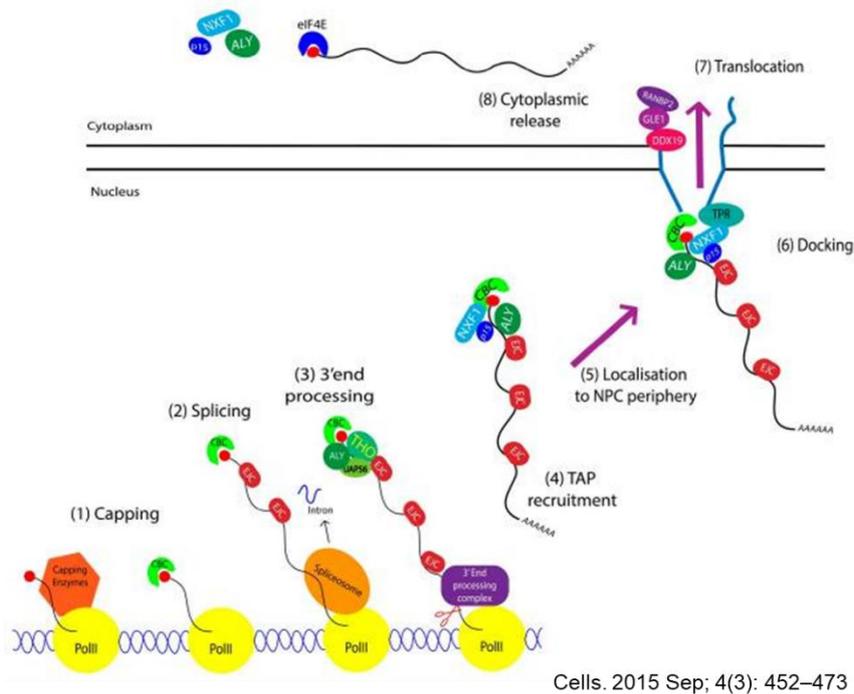
**Figura 5.** Estructura de la proteína Werner. Generación de los dominios presentes en la proteína WRN utilizando el programa SMART. Se muestran los principales dominios de la proteína. Representación de la estructura tridimensional de cada uno de estos dominios.



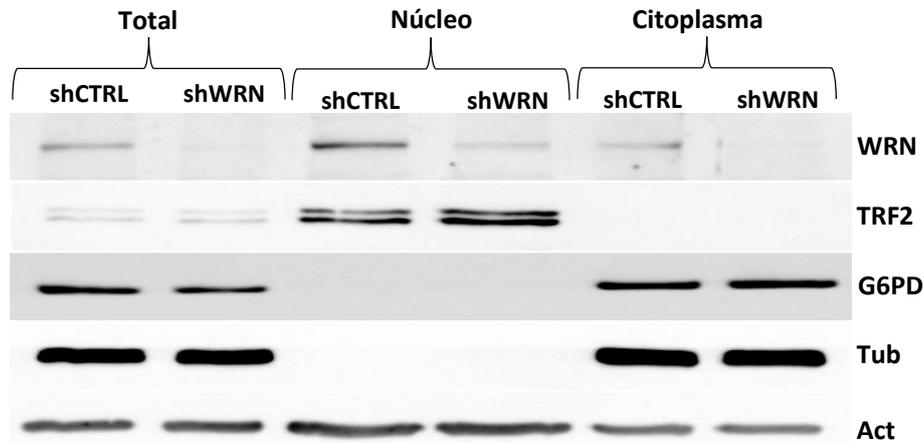
**Figura 6.** Estructura molecular del Complejo del Poro Nuclear o CPN.



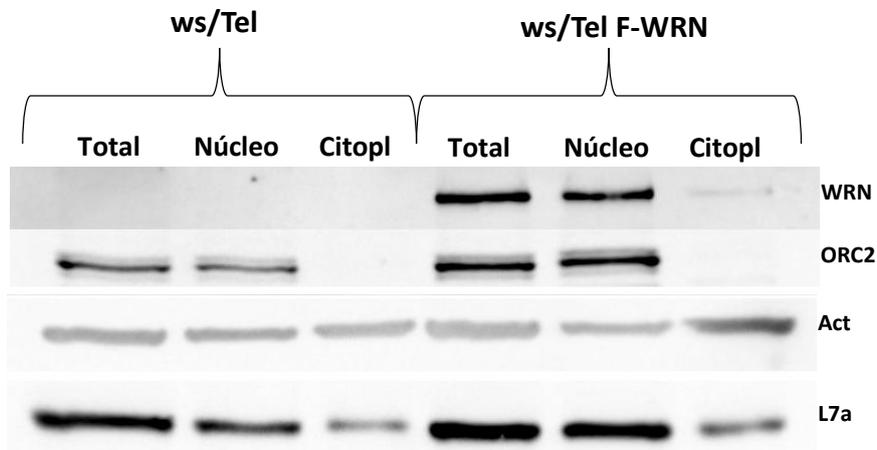
**Figura 7.** Mecanismo molecular del requerimiento y dependencia de energía requerida para generar la fuerza motora en el transporte núcleo/citoplasma y viceversa.



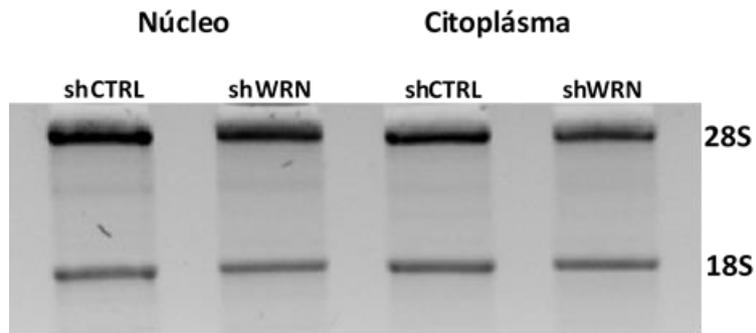
**Figura 8.** Proceso resumido del transporte núcleo/citoplasma detallándose los pasos más importantes. El ARNm recién sintetizado es rápidamente reconocido en su extremo 5' por la estructura conocida como cap. A medida que el ARNm es sintetizado se van adicionando factores implicados en el splicing y otros factores que forman la ribonucleopartícula mensajera o RNPm madura y que es rápidamente translocada al citoplasma a través de receptores (NXF1) que se acoplan con el CPN y facilitan su transporte.



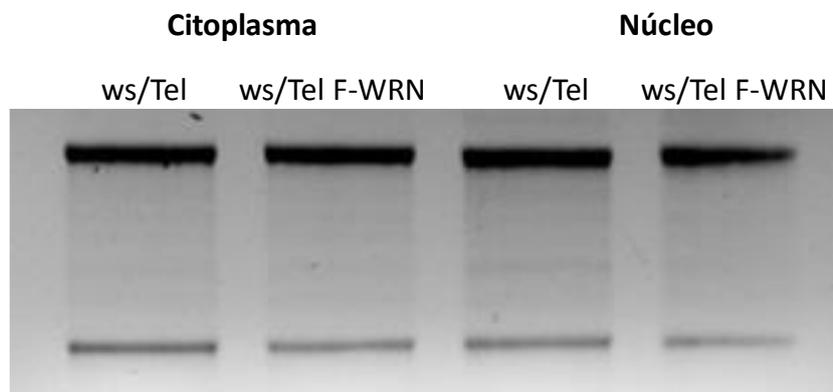
**Figura 9.** Fraccionamiento subcelular en células HeLa conteniendo la construcción de silenciamiento para la proteína WRN (shWRN) y las células control (shCTRL) tras 3 días de tratamiento con doxiciclina (Dox). La calidad del fraccionamiento fue analizada mediante el uso de proteínas marcadoras de núcleo (TRF2) y citoplasma (G6PD y Tub) y se confirma la ausencia de contaminación nuclear en la fracción citoplásmica.



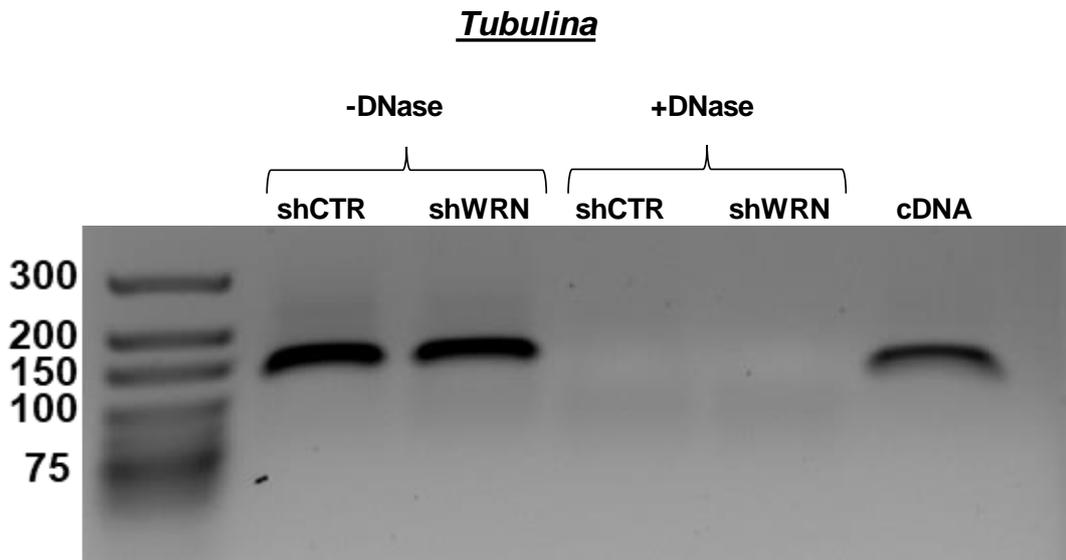
**Figura 10.** Fraccionamiento subcelular en fibroblastos humanos derivados de pacientes con WS. La calidad del fraccionamiento fue analizada mediante el uso de proteínas marcadoras de núcleo (ORC2) y duales núcleo-citoplasma Actina y rpl7a. La detección de WRN en estos extractos demuestra que los fibroblastos derivados de pacientes con WS no expresan la proteína de interés, la cual es fuertemente detectada tras su re inserción en dichas células parentales.



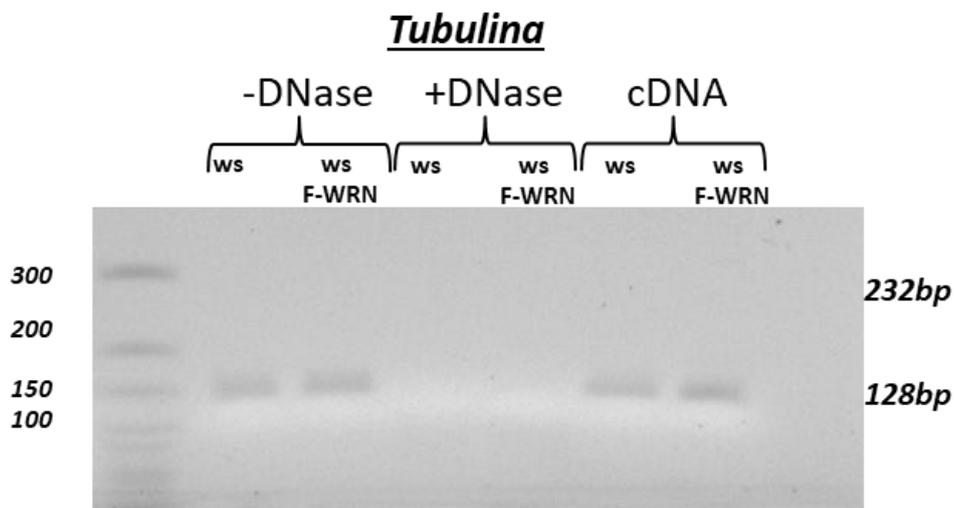
**Figura 11.** RNAs totales extraídos de células HeLa shCTRL y shWRN tras el tratamiento por 3 días con Dox. Los ARNs fueron separados en un gel de agarosa-formaldehído para visualizar su integridad previo a los análisis por RT-qPCR.



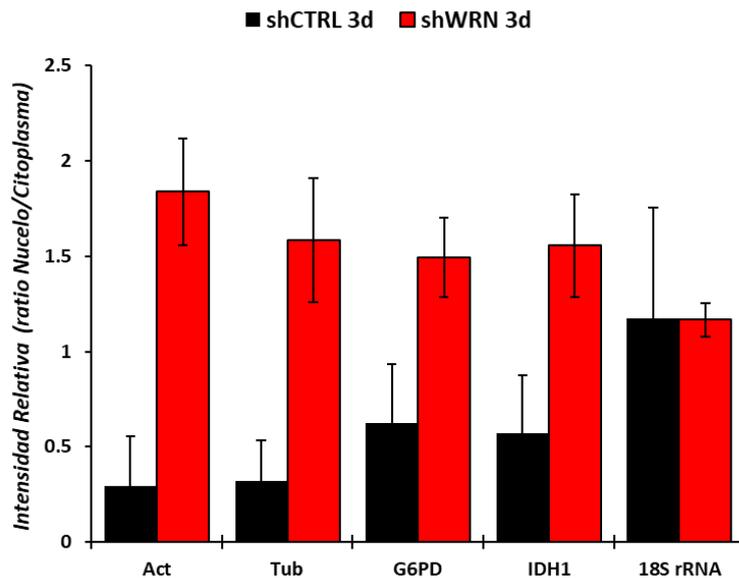
**Figura 12.** RNAs totales extraídos de fibroblastos humanos derivados de pacientes con el Síndrome de Werner (WS). Los ARNs fueron extraídos mediante TRIzol y analizados en un gel de agarosa-formaldehído.



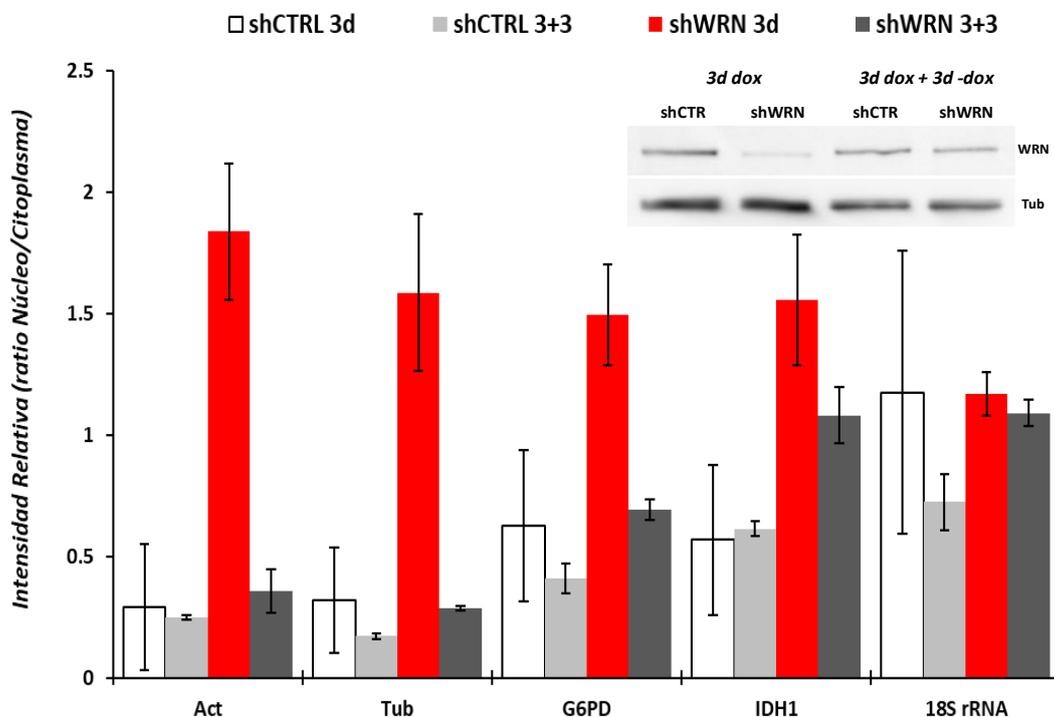
**Figura 13.** Tratamiento de los ARN con DNasa. Los ARN extraídos de células HeLa shCTR y shWRN fueron sometidos a tratamiento con DNase siguiendo las especificaciones del fabricante. Se usó el primer de tubulina usado en los ensayos de qPCR debido a que este hibrida entre exones contiguos. El cDNA se usa como control positivo de la amplificación.



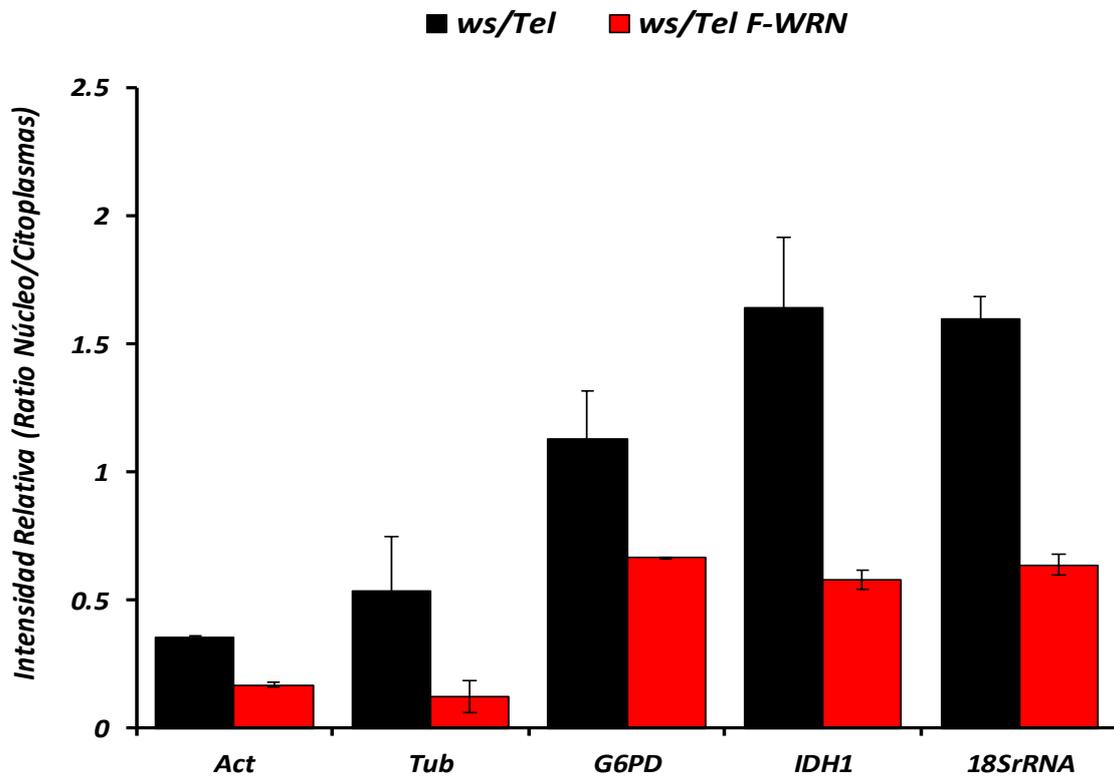
**Figura 14.** Tratamiento de los ARN con DNasa. Los ARN extraídos de fibroblastos derivados de pacientes con WS y las células parentales sobre expresando WRN fueron sometidos a tratamiento con DNase siguiendo las especificaciones del fabricante. Se usó el primer de actina usado en los ensayos de qPCR debido a que este hibrida entre exones contiguos.



**Figura 15.** PCR en tiempo real de los ARNs obtenido del fraccionamiento subcelular en células HeLa. Los ARNs fueron analizados mediante qPCR utilizando primers contra Actina, tubulina, G6PD, IDH1 y ARNr 18S. Los valores representan el ratio de los valores obtenidos entre el núcleo y el citoplasma. A mayor valor, más retención de los RNAs en el núcleo.



**Figura 16.** PCR en tiempo real de los ARNs obtenido del fraccionamiento subcelular en células HeLa. Los ARNs fueron analizados mediante qPCR utilizando primers contra Actina, tubulina, G6PD, IDH1 y ARNr 18S. Los valores representan el ratio de los valores obtenidos entre el núcleo y el citoplasma. A mayor valor, más retención de los RNAs en el núcleo.



**Figura 17.** PCR en tiempo real de los ARNs obtenido del fraccionamiento subcelular de fibroblastos humanos derivados de pacientes con el Síndrome de Werner y estas mismas células sobre expresando la proteína de fusión Flag-WRN. Los ARNs fueron analizados mediante qPCR utilizando primers contra Actina, tubulina, G6PD, IDH1 y ARNr 18S. Los valores representan el ratio de los valores obtenidos entre el núcleo y el citoplasma. A mayor valor, más retención de los RNAs en el núcleo.

## ANEXO 1

Werner protein sequence and physico-chemicals parameters calculated by ExPASy Bioinformatics Resource Portal.

```
MSEKKLETTA  QQRKCPWWMN  VQNKRCAVEE  RKACVRKSVF  EDDLPFLEFT  GSIVYSYDAS  60
DCSFLSEDIS  MSLSDGDVVG  FDMEWPLYN  RGKLGKVALI  QLCVSESKCY  LFHVSSMSVF  120
PQGLKMLLEN  KAVKKAGVGI  EGDQWKLLR  FDIKLNKFN  LTDVANKKLL  CTETWSLNSL  180
VKHLLGKQLL  KDKSIRCSN  SKFPLTEDQ  LYAATDAYAG  FIIYRNLEIL  DDTVQRFAIN  240
KEEEILLSDM  NKQLTSISEE  VMDLAKHLP  AFSKLENPR  VSILLKDISE  NLYSLRRMII  300
GSTNIETELR  PSNNLNLSF  EDSTTGGVQ  KQIREHEVLI  HVEDETDWPT  LDHLAKHDGE  360
DVLGNKVERK  EDGFEDGVED  NKLKENMERA  CLMSLDITEH  ELQILEQQSQ  EEYLSDIAYK  420
STEHLSPNDN  ENDTSYVIES  DEDLEMEMLK  HSPNDNEND  TSYVIESDED  LEMEMLSLE  480
NLNSGTVEPT  HSKCLMERN  LGLPTKEEEE  DDENEANEGE  EDDDKDFLWP  APNEEQVTCL  540
KMYFGHSSFK  PVQWKVIHSV  LEERRDNVAV  MATGYGKSLC  FQYPPVYVGK  IGLVISPLIS  600
LMEDQVLQLK  MSNIPACFLG  SAQSENVLTD  IKLGKYRIVY  VTPEYCSGNM  GLLQQLEADI  660
GITLIAVDEA  HCISEWGHDF  RDSFRKLGSL  KTALPMVPIV  ALTATASSSI  REDIVRCLNL  720
RNPQITCTGF  DRPNLYLEVR  RKTGNILQDL  QPFLVKTSSH  WEFEGPTIY  CPSRKMTQQV  780
TGELRKLNLS  CGTYHAGMSF  STRKDIHHRF  VRDEIQCVIA  TIAFGMGINK  ADIRQVIHYG  840
APKDMESYYQ  EIGRAGRDL  QSSCHVLWAP  ADINLNRHLL  TEIRNEKFRL  YKLKMAKME  900
KYLHSSRCRR  QIILSHFEDK  QVQKASLGIM  GTEKCCDNC  SRLDHCYSMD  DSEDTSWDFG  960
PQAFKLLSAV  DILGEKFGIG  LPILFLRGSN  SQRLADQYRR  HSLFGTGKQD  TESWWKAFSR  1020
QLITEGFLVE  VSRYNKFMKI  CALTKKGRNW  LHKANTESQS  LILQANEELC  PKKLLLPSSK  1080
TVSSGTKEHC  YNQVPVELST  EKKSNEKLY  SYKPCDKISS  GSNISKKSIM  VQSPEKAYSS  1140
SQPVISAQEQ  ETQIVLYGKL  VEARQKHANK  MDVPPAILAT  NKILVDMAKM  RPTTVENVKR  1200
IDGVSEGKAA  MLAPLLEVIK  HFCQTNVQ  DLFSSTKPQE  EQKTSLVAKN  KICTLSQSMA  1260
ITYSLFQEKK  MPLKSAESR  ILPLMTIGMH  LSQAVKAGCP  LDLERAGLTP  EVQKIIADVI  1320
RNPPVNSDMS  KISLIRMLVP  ENIDTYLIHM  AIEILKHGPD  SGLQPSCDVN  KRRCFPGSEE  1380
ICSSSKRSKE  EVGINTESS  AERKRRLPV  FAKGSDTSKK  LMDKTKRGGL  FS  1432
```

Number of amino acids: 1432

Molecular weight: 162460.87 Da or 162,5 kDa

Theoretical pI: 5.96

## ANEXO 2

NCBI Reference Sequence: Homo sapiens Werner syndrome RecQ like helicase (WRN), mRNA, NM\_000553.5 4,299 BP; 1400 A; 760 C; 952 G; 1187 T.

ATGAGTGAAA	AAAAATTGGA	AACAAC TGCA	CAGCAGCGGA	AATGTCTCGA	ATGGATGAAT	60
GTGCAGAATA	AAAGATGTGC	TGTAGAAGAA	AGAAAGGCAT	GTGTTCCGAA	GAGTGTTTTT	120
GAAGATGACC	TCCCCTTCTT	AGAATTTCACT	GGATCCATTG	TGTATAGTTA	CGATGCTAGT	180
GATTGCTCTT	TCCTGT CAGA	AGATATTAGC	ATGAGTCTAT	CAGATGGGGA	TGTGGTGGGA	240
TTTGACATGG	AGTGGCCACC	ATTATACAAT	AGAGGGAAAC	TTGGCAAAGT	TGCACTAATT	300
CAGTTGTGTG	TTTCTGAGAG	CAAATGTTAC	TTGTTCCACG	TTTCTCCAT	GTCAGTTTTT	360
CCCAGGGAT	TAAAAATGTT	GCTTGAAAT	AAAGCAGTTA	AAAAGGCAGG	TGTAGGAATT	420
GAAGGAGATC	AGTGGAAACT	TCTACGTGAC	TTTGATATCA	AATTGAAGAA	TTTTGTGGAG	480
TTGACAGATG	TTGCCAATA	AAAGCTGAAA	TGCACAGAGA	CCTGGAGCCT	TAACAGCTCG	540
GTTAAACACC	TCTTAGGTAA	ACAGCTCCTG	AAAGACAAGT	CTATCCGCTG	TAGCAATTGG	600
AGTAAATTTT	CTCTCACTGA	GGACCAGAAA	CTGTATGCAG	CCACTGATGC	TTATGCTGGT	660
TTTATTATTT	ACCGAAATTT	AGAGATTTTG	GATGATACTG	TGCAAAGGTT	TGCTATAAAT	720
AAAGAGGAAG	AAATCCTACT	TAGCGACATG	AACAACAGT	TGACTTCAAT	TCCTAGGAGAA	780
GTGATGGATC	TGGCTAAGCA	TCTTCCTCAT	GCTTTCAGTA	AATTGGAAAA	CCCACGGAGG	840
GTTTCTATCT	TACTAAAGGA	TATTT CAGAA	AATCTATATT	CACTGAGGAG	GATGATAATT	900
GGTCTACTA	ACATTGAGAC	TGAAC TGAGG	CCCAGCAATA	ATTTAAACTT	ATTATCCTTT	960
GAAGATTCAA	CTACTGGGGG	AGTACAACAG	AAACAATTA	GAGAACATGA	AGTTTAAAT	1020
CACGTTGAAG	ATGAAACATG	GGACCCAACA	CTTGATCATT	TAGCTAAACA	TGATGGAGAA	1080
GATGTACTTG	GAAATAAAGT	GGAACGAAAA	GAAGATGGAT	TTGAAGATGG	AGTAGAAGAC	1140
AACAAATTTGA	AAGAGAATAT	GGAAAGAGCT	TGTTTTGATGT	CGTTAGATAT	TACAGAACAT	1200
GAACTCCAAA	TTTTGGAACA	GCAGTCTCAG	GAAGAATATC	TTAGTGATAT	TGCTTATAAA	1260
TCTACTGAGC	ATTTATCTCC	CAATGATAAT	GAAAACGATA	CGTCCATATG	AAATTGAGAGT	1320
GATGAAGATT	TAGAAATGGA	GATGCTTAAG	CATTTATCTC	CCAATGATAA	TGAAAACGAT	1380
ACGTCTATG	TAATTGAGAG	TGATGAAGAT	TTAGAAATGG	AGATGCTTAA	GTCTTTAGAA	1440
AACCTCAATA	GTGGCACGGT	AGAACCAACT	CATTTCTAAAT	GCTTAAAAAT	GGAAAGAAAT	1500
CTGGGCTCTT	CTACTAAAGA	AGAAGAGAGAA	GATGATGAAA	ATGAAGCTAA	TGAAGGGGAA	1560
GAAGATGATG	ATAAGGACTT	TTTGTGGCCA	GCACCCAATG	AAGAGCAAGT	TACTTGCCCTC	1620
AAGATGTACT	TTGGCCATTC	CAGTTTTTAAA	CCAGTTCAGT	GGAAAGTGAT	TCATTCAGTA	1680
TTAGAAGAAA	GAAGAGATAA	TGTTGCTGTC	ATGGCAACTG	GATATGGAAA	GAGTTTGTGC	1740
TTCCAGTATC	CACCTGTTTA	TGTAGGCAAG	ATTGGCCTTG	TTATCTCTCC	CCTTATTTCT	1800
CTGATGGAAG	ACCAAGTGCT	ACAGCTTAAA	ATGTCCAACA	TCCCAGCTTG	CTTCCCTGGA	1860
TCAGCACAGT	CAGAAAATGT	TCTAACAGAT	ATTAATTTAG	GTAATACCGG	GATTGTATAC	1920
GTAACTCCAG	AATACTGTTC	AGGTAACATG	GGCCTGCTCC	AGCAACTTGA	GGCTGATATT	1980
GGTATCAGCG	TCATTGCTGT	GGATGAGGCT	CACTGTATTT	CTGAGTGGGG	AGTTGATTTT	2040
AGGGATT CAT	TCAGGAAGTT	GGGCTCCCTA	AAGACAGCAC	TGCCAATGGT	TCCAATCGTT	2100
GCACTTACTG	CTACTGCAAG	TTCTTCAATC	CGGGAAGACA	TTGTACGTTG	CTTAAATCTG	2160
AGAAATCCTC	AGATCACCTG	TACTGGTTTT	GATCGACCAA	ACCTGTATTT	AGAAGTTACC	2220
CGAAAACAG	GGAAATCCT	TCAGGATCTG	CAGCCATTTT	TTGTCAAAAC	AAGTTCAGG	2280
TGGGAATTTG	AAGGTCCAAC	AATCATCTAC	TGTCCCTCTA	GAAAAATGAC	ACAACAAGTT	2340
ACAGGTGAAC	TTAGGAAACT	GAATCTATCC	TGTGGAACAT	ACCATGCGGG	CATGAGTTTT	2400
AGCAACAAGGA	AAGACATTTA	TCATAGT TTT	GTAAGAGATG	AAATTCAGTG	TGTCATAGCT	2460
ACCATAGCTT	TTGGAATGGG	CATTAATAAA	GCTGACATTC	GCCAAGTCAT	TACATCCGGT	2520
GCTCCTAAGG	ACATGGAATC	ATATTATCAG	GAGATTGGTA	GAGCTGGTCG	TGATGGACTT	2580
CAAAGTTCTT	GTCACGTCTC	CTGGGCTCCT	GCAGACATTA	ACTTAAATAG	GCACCTTCTT	2640
ACTGAGATAC	GTAATGAGAA	GTTTCGATTA	TACAAAT TAA	AGATGATGGC	AAAGATGGAA	2700
AAATATCTTC	ATCTAGCAG	ATGTAGGAGA	CAAATCATCT	TGCTCTATTT	TGAGGACAAA	2760
CAAGTACAAA	AAGCCTCCTT	GGGAATTATG	GGAAC TGAAA	AATGCTGTGA	TAATTGCAGG	2820
TCCAGATTGG	ATCATTGCTA	TTCCATGGAT	GACTCAGAGG	ATACATCCTG	GGACTTTGGT	2880
CCACAAGCAT	TTAAGCTTTT	GTCTGCTGTG	GACATCTTAG	GCGAAAAATT	TGGAATTGGG	2940
CTTCCAATTT	TATTTCTCCG	AGGATCTAAT	TCTCAGCGTC	TTGCCGATCA	ATATCGCAGG	3000
CACAGTTTAT	TTGGCACTGG	CAAGGATCAA	ACAGAGAGTT	GGTGGAAAGC	TTTTTCCCCT	3060
CAGCTGATCA	CTGAGGGATT	CTTGGTAGAA	GTTTCTCGGT	ATAACAAATT	TATGAAGATT	3120
TGCGCCCTTA	CGAAAAAGGG	TAGAAATTTG	CTTCATAAAG	CTAATACAGA	ATCTCAGAGC	3180
CTCATCCTTC	AAGCTAATGA	AGAAATGTGT	CCAAAAGAGT	TGCTTCTGCC	TAGTTCGAAA	3240
ACTGTATCTT	CGGGCACCAA	AGAGCATTTG	TATAATCAAG	TACCAGTTGA	ATTAAGTACA	3300
GAGAAGAAGT	CTAACTTGGA	GAAGTTATAT	TCTTATAAAG	CATGTGATAA	GATTTCTTCT	3360
GGGAGTAACA	TTTCTAAAAA	AAGTATCATG	GTACAGTCAC	CAGAAAAAGC	TTACAGTTCC	3420
TCACAGCCTG	TTATTTCCGG	ACAAGAGCAG	GAGACTCAGA	TTGTGTTATA	TGGCAAAATT	3480
GTAGAAGCTA	GGCAGAAACA	TGCCAATAAA	ATGGATGTTT	CCCCAGCTAT	TCTGGCAACA	3540
AACAAGATAC	TGGTGGATAT	GGCCAAAATG	AGACCAACTA	CGGTTGAAAA	CGTAAAAAGG	3600
ATTGATGGTG	TTTCTGAAGG	CAAAGCTGCC	ATGTTGGCCC	CTCTGTTGGA	AGTCATCAA	3660
CATTTCTGCC	AAACAAATAG	TGTT CAGACA	GACCTCTTTT	CAAGTACAAA	ACCTCAAGAA	3720
GAACAGAAGA	CGAGTCTGGT	AGCAAAAAAT	AAAATATGCA	CACTTTCACA	GTCTATGGCC	3780
ATCACATACT	CTTTATTTCCA	AGAAAAGAGG	ATGCCTTTGA	AGAGCATAGC	TGAGAGCAGG	3840
ATTCTGCCTC	TCATGACAAT	TGGCATGCAC	TTATCCCAAG	CGGTGAAAGC	TGGCTGCCCC	3900

CTGATTTGG	AGCGAGCAGG	CCTGACTCCA	GAGGTTGAGA	AGATTATTGC	TGATGTTATC	3960
CGAAACCCTC	CCGTCAACTC	AGATATGAGT	AAAATTAGCC	TAATCAGAAT	GTTAGTTCCT	4020
GAAAACATG	ACACGTACCT	TATCCACATG	GCAATTGAGA	TCCTTAAACA	TGGTCCTGAC	4080
AGCGGACTTC	AACCTTCATG	TGATGTCAAC	AAAAGGAGAT	GTTTTCCCGG	TTCTGAAGAG	4140
ATCTGTTCAA	GTTCTAAGAG	AAGCAAGGAA	GAAGTAGGCA	TCAATACTGA	GACTTCATCT	4200
GCAGAGAGAA	AGAGACGATT	ACCTGTGTGG	TTTGCCAAAG	GAAGTGATAC	CAGCAAGAAA	4260
TTAATGGACA	AAACGAAAAG	GGGAGGTCTT	TTTAGTTAA			4299

### ANEXO 3

Análisis del alineamiento de las secuencias correspondiente al dominio DEAD/H-box de las proteínas WRN, DDX19A y eIF4A usando la herramienta bioinformática T-Coffee (Nucleic Acids Res. 2011 Jul;39(Web Server issue): W13-7. doi: 10.1093/nar/gkr245. Epub 2011 May 9). Se indica en el recuadro rojo el motivo DEAD/H altamente conservado entre las proteínas.

