

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS  
(ARN<sub>m</sub> Y PROTEÍNAS) DE GENES IMPLICADOS EN EL  
TRANSPORTE DE LOS ARN<sub>m</sub> TRAS EL SILENCIAMIENTO DE LA  
PROTEÍNA WRN EN CÉLULAS HELA

SERGIO RAFAEL MAURICIO CRUZ VISALAYA

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Asesora: Lidia Cruz Neyra

Lima, Perú

2020



UNIVERSIDAD RICARDO PALMA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS  
(ARN<sub>m</sub> Y PROTEÍNAS) DE GENES IMPLICADOS EN EL  
TRANSPORTE DE LOS ARN<sub>m</sub> TRAS EL SILENCIAMIENTO DE LA  
PROTEÍNA WRN EN CÉLULAS HELA

SERGIO RAFAEL MAURICIO CRUZ VISALAYA

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Asesora: Lidia Cruz Neyra

Lima, Perú

2020

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS  
(ARN<sub>m</sub> Y PROTEÍNAS) DE GENES IMPLICADOS EN EL  
TRANSPORTE DE LOS ARN<sub>m</sub> TRAS EL SILENCIAMIENTO DE LA  
PROTEÍNA WRN EN CÉLULAS HELA

SERGIO RAFAEL MAURICIO CRUZ VISALAYA

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR

PRESIDENTE: HUGO GONZALES FIGUEROA

SECRETARIO: FLOR DE MARIA MADRID

VOCAL: HUGO GONZALES MOLFINO

ASESORA: LIDIA CRUZ NEYRA

**Dedicatoria**

*A Irma y Rafael*

*A mis abuelos Carmen, Abraham, Martha y Alfredo*

**Agradecimientos**

- Al Dr. Juan Manuel Iglesias Pedraz por brindarme la oportunidad de participar en el proyecto subvencionado por FONDECYT–CONCYTEC (150-2017) y por compartir sus conocimientos y experiencias en la investigación.
- Al Dr. Javier Enciso, jefe del Laboratorio de Cultivo Celular, por el apoyo en la realización de la tesis.
- A la Dra. Lidia Cruz por el apoyo en las correcciones de la tesis.
- A mis padres Irma y Rafael, por siempre creer en mí y apoyarme.
- A mis hermanas Nadia, Eloá y Renata, por el gran cariño que nos tenemos.
- A mis amigos Marco y Nelson, por esos momentos en los que tenía que desconectar y darme un respiro, y por el apoyo que siempre nos hemos dado el uno al otro, gracias por todos esos momentos, hermanos.
- A mis amigos Valeria, Rosario, Barbara, Michella, Jocelyn, Jose y Matia, por todas las ocurrencias tanto dentro como fuera del laboratorio, sé que siempre voy a poder contar con ustedes.

## ÍNDICE

	Pág.
Abreviaciones.....	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
I. Introducción.....	6
1.1 Planteamiento del problema.....	7
1.2 Formulación del problema.....	7
1.3 Justificación de la investigación.....	8
1.4 Objetivos.....	8
1.4.1 Objetivo general.....	8
1.4.2 Objetivos específicos.....	9
II. Marco teórico.....	9
III. Antecedentes.....	13
3.1 Familia RecQ helicasas.....	13
3.2 Gen de la proteína del Síndrome de Werner.....	15
3.3 La proteína del Síndrome de Werner.....	15
3.4 El Síndrome de Werner.....	15
3.5 El transporte de los ARNm y WRN.....	17
IV. Hipótesis.....	18
V. Materiales y métodos.....	18
5.1 Lugar de ejecución.....	18
5.2 Tipo y diseño de la investigación.....	19
5.3 Variables.....	19
5.4 Operacionalización de las variables.....	20
5.5 Procedimiento y análisis de datos.....	20
5.5.1 Procedimiento.....	20
5.5.1.1. Material biológico.....	20
5.5.1.2 Cultivo celular y preparación de muestras.....	21
5.5.1.3 Comparación de los niveles de los transcritos de proteínas de la maquinaria de transporte mediante RT-qPCR tras el silenciamiento de WRN.....	21
5.5.1.3.1 Extracción de ARN total.....	21
5.5.1.3.2 Tratamiento de DNasa y Síntesis de ADNc.....	22
5.5.1.3.3 Análisis de abundancia de los ARNm por RT-qPCR.....	22
5.5.1.4 Evaluación de los niveles de proteínas implicadas en la maquinaria de transporte de los ARNm mediante Western blot en células HeLa silenciadas para WRN.....	23
5.5.1.4.1 Western blot para comprobar depleción de WRN y proteínas de la maquinaria de transporte de los ARNm.....	23
5.5.1.5 Determinación de la posible interacción entre WRN y proteínas implicadas en la maquinaria de transporte de los ARNm mediante ensayos de Co-Inmunoprecipitación (CO-IP).....	24
5.5.1.5.1 Cultivo celular.....	24
5.5.1.5.2 Co-Inmunoprecipitación.....	25
5.5.2 Análisis de datos.....	26
5.5.3 Análisis estadístico.....	27
5.6 Aspecto ético.....	27
VI. Resultados.....	27
6.1 Desregulación de la proteína WRN.....	27

<b>6.2 Análisis de los niveles de expresión de proteínas implicadas en el transporte de los ARNm.....</b>	<b>28</b>
<b>6.3 Análisis de los transcritos de genes implicados en el transporte de los ARNm.....</b>	<b>28</b>
<b>6.4 Interacción de la proteína WRN con proteínas implicadas en el transporte de los ARNm.....</b>	<b>29</b>
<b>VII. Discusión.....</b>	<b>30</b>
<b>VIII. Conclusiones.....</b>	<b>33</b>
<b>IX. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>34</b>
<b>X. Figuras.....</b>	<b>50</b>
<b>XI. Tablas.....</b>	<b>56</b>
<b>XII. Anexos.....</b>	<b>58</b>

## Abreviaciones

<b>aa</b>	<b>Aminoácidos</b>
<b>ADN</b>	<b>Acido Desoxirribonucleico</b>
<b>ADNc</b>	<b>Acido Desoxirribonucleico complementario</b>
<b>ALY/Ref</b>	<b>THO complex subunit 4</b>
<b>ARN</b>	<b>Acido Ribonucleico</b>
<b>ARNm</b>	<b>Acido Ribonucleico mensajero</b>
<b>β-GP</b>	<b>Beta-glicerofosfato</b>
<b>β-Me</b>	<b>Beta-mercaptoetanol</b>
<b>CBP80</b>	<b>Nuclear cap-binding protein subunit 1</b>
<b>Co-IP</b>	<b>Co-inmunoprecipitación</b>
<b>CPN</b>	<b>Complejo de poro nuclear</b>
<b>CRM1</b>	<b>Chromosomal Maintenance 1</b>
<b>CVR</b>	<b>Complejo vanadil ribonucleósido</b>
<b>DEPC</b>	<b>Dietil pirocarbonato</b>
<b>dox</b>	<b>doxiciclina</b>
<b>DTT</b>	<b>Ditiotreitol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido etilendiaminotetraacético</b>
<b>g</b>	<b>Gravedades</b>
<b>GANP</b>	<b>Germinal-center associated nuclear protein</b>
<b>HEPES</b>	<b>Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico</b>
<b>IDH1</b>	<b>Isocitrato deshidrogenasa 1</b>
<b>kDA</b>	<b>Kilodaltons</b>
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>mA</b>	<b>Miliamperios</b>
<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>NP-40</b>	<b>Nonil fenoxipolietoxiletanol</b>
<b>NXF1</b>	<b>Nuclear RNA Export Factor 1</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>
<b>PICS</b>	<b>Coctel de inhibidores de proteasas</b>
<b>PMSF</b>	<b>Fluoruro de fenilmetilsulfonilo</b>
<b>PVDF</b>	<b>Fluoruro de polivinilideno</b>
<b>RNPm</b>	<b>Ribonucleoproteína mensajera</b>
<b>ROS</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b>RPM</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RT-qPCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con retrotranscriptasa</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecilsulfato de sodio</b>
<b>shARN</b>	<b>Horquilla pequeña de ARN</b>
<b>TE</b>	<b>Tris-EDTA</b>
<b>THOC1</b>	<b>THO complex subunit 1</b>
<b>THOC2</b>	<b>THO complex subunit 2</b>
<b>U</b>	<b>Unidades</b>
<b>UAP56</b>	<b>U2AF65-associated protein</b>
<b>μg</b>	<b>Microgramo</b>
<b>μl</b>	<b>Microlitro</b>
<b>WS</b>	<b>Síndrome de Werner</b>
<b>WRN</b>	<b>La proteína del Síndrome de Werner</b>

## Resumen

El propósito de la presente investigación fue evaluar la existencia de un vínculo funcional entre WRN y componentes de la maquinaria de transporte de los ARNm, que pudiera explicar la alteración en la distribución espacial de los ARNm tras el silenciamiento génico de WRN observada en estudios previos. Esto se logró analizando los niveles de productos génicos (ARNm y proteína) de componentes de la maquinaria de transporte de los ARNm (NXF1, CRM1, GANP, CBP80, UAP56, Aly/REF, eIF4E, THOC1, THOC2) tras el silenciamiento génico de WRN con un sistema lentiviral inducido con doxiciclina en células HeLa, mediante ensayos de RT-qPCR y Western Blot. Los resultados indicaron que, tras depleción de WRN, los niveles de transcritos en la mayoría de genes analizados tienen una variación significativa, los cuales no corresponden con sus niveles de expresión proteicos. Así mismo, se comprobó que WRN es capaz de unirse a un componente clave de la maquinaria de transporte de los ARN mensajeros, específicamente a NXF1, tal como se demostró mediante el ensayo cualitativo de Co-inmunoprecipitación, comprobando que hay un vínculo funcional entre WRN y la maquinaria de transporte de los ARNm.

**Palabras clave:** Proteína del Síndrome de Werner, ARN mensajeros, traducción, interacción proteína-proteína, transporte de los ARNm

## **Abstract**

The purpose of the present investigation was to evaluate the existence of a functional link between WRN and components of the mRNA transport machinery, which could explain the alteration in the spatial distribution of mRNAs after WRN gene silencing observed in previous studies. This was achieved by analyzing the levels of gene products (mRNA and protein) of components of the mRNA transport machinery (NXF1, CRM1, GANP, CBP80, UAP56, Aly / REF, eIF4E, THOC1, THOC2) after gene silencing of WRN with a doxycycline-induced lentiviral system in HeLa cells, using RT-qPCR and Western Blot assays. The results indicated that, after WRN depletion, the levels of transcripts in most of the genes analyzed have a significant variation, which do not correspond to their levels of protein expression. Likewise, it was found that WRN is capable of binding to a key component of the messenger RNA transport machinery, specifically NXF1, as demonstrated by the qualitative Co-immunoprecipitation assay, proving that there is a functional link between WRN and the mRNA transport machinery.

**Keywords:** Werner syndrome protein, messenger RNA, translation, protein-protein interaction, mRNA transport

## I. INTRODUCCIÓN

La proteína del Síndrome de Werner (WRN) juega un papel importante en la reparación, replicación y transcripción del ADN, y en consecuencia en la estabilidad genómica de las células a través de su actividad helicasa y exonucleasa. Diversas mutaciones en el gen que codifica para la proteína WRN causan el síndrome de Werner (WS), un síndrome progeroide adulto (Goto *et al.* 1996) en el cual, los pacientes portadores presentan rasgos fenotípicos de un proceso normal de envejecimiento a edades cronológicamente tempranas, como la arterioesclerosis, diabetes mellitus tipo II, osteoporosis, hipogonadismo, entre otros, y están propensos a desarrollar diferentes formas de cáncer, especialmente del tipo mesenquimales (Epstein *et al.* 1966; Goto *et al.* 1996; Oshima *et al.* 2017) . Estudios previos han demostrado que tras la depleción de WRN, los niveles proteicos de las enzimas Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) e Isocitrato-deshidrogenasa 1 (IDH1), entre otros, se ve reducida, sin mostrar alteración en los niveles de expresión de sus transcritos génicos, lo cual reduce la capacidad de síntesis proteica (Li *et al.* 2014). Datos más recientes (Iglesias-Pedraz *et al.* 2020) muestran que la depleción de WRN afecta la distribución espacial de los ARN mensajeros (ARNm). Estos datos sugieren que la depleción de WRN podría estar afectando el transporte nucleocitoplasmático de los ARNm, lo cual apunta a que WRN podría estar relacionado con la maquinaria de transporte del ARNm, aunque aún no se han descrito una relación funcional entre WRN y los ARNm. El objetivo de esta investigación fue demostrar que la depleción de WRN en células HeLa activa el fenotipo de senescencia replicativa debido a un defecto de la maquinaria de transporte de los ARNm, el cual agota la capacidad de regeneración proteica celular. Para evidenciar lo propuesto se utilizaron una serie de aproximaciones moleculares y bioquímicas destinadas a descubrir, por un lado, si la depleción de WRN altera la expresión génica o los niveles proteicos de proteínas clave en este transporte o si WRN es requerida para

el correcto transporte de los ARNm desde el núcleo al citoplasma para su traducción, a través de una interacción directa con componentes de la maquinaria de transporte.

## **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido al crecimiento rápido e incontrolado de las células cancerosas, estas son metabólicamente más exigentes que las células normales. Estas altas demandas metabólicas en las células de cáncer a menudo están acopladas a su elevada tasa de síntesis proteica (Dolfi *et al.* 2013). Para asegurar esta alta capacidad de síntesis es necesario mantener los procesos de transcripción y traducción finamente regulados. Muchas líneas de cáncer presentan altos niveles de WRN, lo que sugiere que esta proteína es necesaria para el mantenimiento del desarrollo proliferativo de sus células (Opresko *et al.* 2007). A medida que el metabolismo de células neoplásicas gana atención científica, nuevos medicamentos contra el cáncer se centran en la maquinaria de traducción de proteínas (Grzmil & Hemmings 2012; Roux & Topisirovic 2018; Ruggero 2013). Por lo tanto, descifrar como WRN interviene dentro de la traducción del ARNm será gran utilidad para generar nuevas terapias oncológicas que ayuden a frenar la proliferación de células cancerígenas y evitar la metástasis, la principal causa de muerte para este grupo de enfermedades.

## **1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

Tras la problemática planteada surge la siguiente pregunta: ¿Existe una relación funcional entre WRN y la maquinaria de transporte de los ARNm que explique la alteración de la distribución espacial de estas especies de ARN en células HeLa deplecionadas para WRN?

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

La identificación de la alteración de la síntesis proteica como consecuencia del defecto en el transporte nucleocitoplásmico de los ARNm observado en células HeLa tras el silenciamiento génico de WRN, podría ser el responsable de activar el mecanismo de senescencia replicativa observado en estas células cancerosas. Definir esta relación nos brinda la oportunidad de generar nuevos conocimientos y a desarrollar nuevas terapias antineoplásicas. Por lo tanto, identificar la interacción de WRN con la maquinaria de transporte de los ARNm, representaría un objetivo que podría entregarnos información valiosa destinada a entender un proceso biológico fundamental, con miras a desarrollar nuevas estrategias de bloqueo molecular que inhiba la proliferación de células neoplásicas.

### **1.4 OBJETIVOS**

#### **1.4.1 GENERAL**

- Evaluar los niveles de los productos génicos (ARNm y proteínas) de genes implicados en el transporte de los ARNm tras el silenciamiento de la proteína WRN en células HeLa.

#### **1.4.2 ESPECÍFICOS**

- Determinar los niveles de los transcritos génicos de genes implicados en la maquinaria de transporte de los ARNm mediante RT-qPCR tras el silenciamiento de la proteína WRN en células HeLa.
- Determinar los niveles de proteínas de la maquinaria de transporte de los ARNm mediante Western blot en células HeLa tras el silenciamiento de WRN.
- Comprobar la posible interacción entre WRN y proteínas de la maquinaria de transporte de los ARNm mediante ensayos de Co-IP.

## II. MARCO TEÓRICO

Los pre-ARNm siguen una serie de procesos de maduración previos a su translocación desde el núcleo al citoplasma (Eckner *et al.* 1991). Los ARNm nacientes se transcriben como ARNm precursores (pre-ARNm) en el núcleo por la ARN polimerasa II (ARNPII). Los pre-ARNm se someten a una serie de procesos de maduración para convertirse en ARNm maduros los que posteriormente darán lugar a las partículas ribonucleoproteicas (RNPm, por sus siglas en inglés), las cuales serán transportadas al citoplasma a través del Complejo de Poros Nucleares (CPN) para ser traducidas en proteínas por los ribosomas (Okamura *et al.* 2015).

El proceso de maduración del pre-ARNm se inicia co-transcripcionalmente y contempla la adición de la estructura metil-7-guanosina (m7G) o cap en el extremo 5' del ARNm a través del Cap Binding Complex (CBC) conformado por las proteínas CBP20 y CBP80 y que evitan la degradación del pre-ARNm (Izaurrealde *et al.* 1994; Shuman 2000, Topisirovic *et al.* 2011; Ramanathan *et al.* 2016); la eliminación de intrones y la unión de exones por splicing (Sharp 1994) y la modificación del extremo 3' por escisión endonucleolítica y adición de la cola poli (A) (Wahle 1995; Proudfoot 2011).

Diferentes tipos de ARN son transportados por diferentes factores. Los mayores factores que participan en este proceso en células de mamíferos son NXF1 (Nuclear RNA export factor 1) (Aibara *et al.* 2015; Williams *et al.* 2018), que es considerado el mayor transportador de ARNm (Kohler & Hurt 2007; Stutz & Izaurralde 2003); y CRM1 (Chromosome region maintenance 1) (Hutten & Kehlenbach 2007; Monecke *et al.* 2013), que transporta proteínas, rRNA, snRNA y ciertos tipos de ARNm.

NXF1 se une al ARNm a través del complejo de Transcripción-Transporte 1 (TREX-1, por sus siglas en inglés). El complejo TREX-1 consiste en las proteínas AlyRef (Aly/Thoc4), Uap56, Cip29, pDIP3, ZC11A y el subcomplejo THO, el cual contiene a las proteínas Thoc1 (THO1), Thoc2 (THO2), Thoc3 (THO3), Thoc5 (THO5), Thoc6 (THO6) y Thoc7 (THO7) (Strasser *et al.* 2002; Masuda *et al.* 2005; Katahira 2012; Okamura *et al.* 2015). El subcomplejo THO se ensambla de manera dependiente de ATP con la ARN helicasa Uap56, Aly y Cip29 (Dufu *et al.* 2010). Dos componentes TREX, Aly y Thoc5, se unen directamente a NXF1. La forma cerrada de NXF1 tiene una baja afinidad por el ARNm y la unión de Thoc5 y Aly al NXF1 inducen un cambio conformacional que le confieren una mayor afinidad por los ARNm (Viphakone *et al.* 2012). Aly se asocia con los dominios RBD (RNA Binding Domain) N-terminal y el  $\psi$ RRM de NXF1 (Huang *et al.* 2003). A su vez, Aly se une al ARNm a través de un péptido rico en arginina (Golovanov *et al.* 2006) que también funciona como el sitio de unión para NXF1. NXF1 se une al ARN a través de un dominio de unión al ARN (RBD) rico en arginina en el N-terminal y esta actividad es esencial para el transporte del ARNm (Zolotukhin *et al.* 2002; Hautbergue *et al.* 2008). Una vez unido al ARNm, NXF1 escolta a la RNPm hacia el poro nuclear, donde NXF1 interactúa con las nucleoporinas (Nups) del NPC a

través de los dominios similares a NTF2 (NTF2L) y asociados a ubiquitina (UBA) (Fribourg *et al.* 2001).

Otro complejo se une a NXF1 es el complejo de Transcripción-Transporte 2 (TREX-2, por sus siglas en inglés). Este complejo está compuesto por las proteínas GANP, PCID2, DSS1, ENY2 y Centrina. GANP (proteína nuclear asociada al centro germinal) integra la transcripción/procesamiento con el transporte nucleocitoplásmico al facilitar el movimiento hacia los poros nucleares de las RNPm generadas en el núcleo. GANP se une directamente a NXF1 a través de su dominio N-terminal y se cree que se transporta entre CPN y centros de procesamiento nuclear donde se reubica cuando se inhibe la transcripción (Wickramasinghe *et al.* 2014). (Anexo 1).

CRM1, por su parte, es miembro de la superfamilia de las Importinas  $\beta$ , el cual interactúa con las señales de exportación nuclear ricas en leucina (NESs) que se encuentran en una gran variedad de proteínas, así como en el transporte de diferentes tipos de ARN (Hutten & Kehlenbach 2007). CRM1 necesita de proteínas adaptadoras para interactuar con el ARN, ya que no es una proteína de unión al ARN (Okamura *et al.* 2015). Se han identificado 3 proteínas adaptadoras de CRM1, la proteína de unión a ARN antígeno humano R (HuR) (Gallouzi *et al.* 2001), la proteína de repeticiones de pentatricopeptido rica en leucinas (LRPPRC) (Dong *et al.* 2009; Volpon *et al.* 2017) que interactúa con CRM1, eIF4E y el elemento de ARN 4E-SE (Topisirovic *et al.* 2009), y finalmente con el factor de exportación nuclear 3 (NXF3) (Yang *et al.* 2001; Weis 2002). Muchos factores participan en el transporte de las RNPm mediado por CRM1, incluidos Ran de unión a GTP (Ran-GTP), RanBP1, RanBP2 (Nup358), RanBP3 y RanGAP. CRM1 interactúa con la señal de transporte nuclear (NES) de su carga, de una manera dependiente de RanGTP y apoyada por RanBP3 (Englmeier *et al.* 2001). CRM1 puede

interactuar con las Nups de los poros nucleares que contienen repetición de FG y pasar a través del canal central del NPC, por lo que el ARN unido al CRM1 puede transferirse a la cara citoplasmática. RanBP2 está asociado con la cara citoplasmática del CPN, mientras que RanBP1 y RanGAP son solubles en el citoplasma. Se requiere de hidrólisis del GTP para disociar el ARN de los receptores de exportación, el cual es conseguido gracias a la participación e interacción con RanBP1 y RanGAP, los cuales promueve esta hidrólisis y el desacoplamiento posterior (Kehlenbach *et al.* 1999). (Anexo 2).

En células eucariotas, la separación del material genómico nuclear de otros compartimentos intracelulares se da por una doble barrera física que forma el núcleo y que recibe el nombre de envoltura nuclear. Este compartimento requiere de la entrada y salida controlada de sustancias, como por ejemplo proteínas y ácidos nucleicos, que permita llevar a cabo procesos biológicos básicos (Terry *et al.* 2007). El paso de moléculas entre el núcleo y el citoplasma se logra a través de los poros nucleares que se encuentran en los sitios donde se fusionan las membranas nucleares interna y externa (Suntharalingam & Wentz 2003; Fichtman *et al.* 2010; Otsuka *et al.* 2016). Estas aberturas están formadas por un gran número de proteínas (en vertebrados llegan a pesar ~120 MDa) que es su conjunto reciben el nombre de complejo de poro nuclear (CPN) (Anexo 3) (Strambio de castilla *et al.* 2010). 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 (Ibarra & Hetzer 2015; Noble & Wentz 2010; Wentz & Rout 2010).

Por su parte, WRN es una proteína nuclear que pertenece a la familia de las RecQ Helicasas, un grupo altamente conservado de Helicasas de ADN con diversos papeles en

múltiples procesos metabólicos relacionados con el ADN (Bohr 2008). WRN cumple múltiples funciones en el metabolismo del ADN, como la replicación, reparación, transcripción y mantención de los telómeros (Croteau *et al.* 2014). WRN posee un peso molecular aproximado de 163 kDa que se puede detectar mediante análisis por Western blot en líneas celulares y muestras de tejido de individuos normales, y a un nivel reducido en portadores heterocigotos de alelos patogénicos de WRN (Moser *et al.* 2000; Muftuoglu *et al.* 2008).

Aunque a la fecha no existe información referente a la participación de WRN en procesos que impliquen a los ARNs, investigaciones recientes han demostrado el vínculo entre WRN y componentes de los poros nucleares (nucleoporinas) (Kaur *et al.* 2010; Lachapelle *et al.* 2011; Li *et al.* 2013). Sin embargo, se desconoce la importancia de estas interacciones, sugiriendo estos hallazgos que WRN podría contribuir en procesos, como el transporte de ARNm que implica su translocación e a través del poro nuclear.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Familia RecQ Helicasas**

Las Helicasas son enzimas ATPasa-dependientes que actúan desenrollando sustratos dúplex de ADN, ARN o híbridos ADN-ARN (Hickson 2003). Desempeñan diferentes funciones en casi todos los procesos celulares que involucran ácidos nucleicos, como la replicación y reparación de ADN, transcripción, traducción, síntesis de ribosomas, maduración del ARN, corte de intrones y empalme de exones, y en procesos de transporte nuclear (Singleton *et al.* 2007; Umate *et al.* 2011). Dentro del grupo de las helicasas se encuentra la familia de las Helicasas RecQ. Mientras que los genomas de las bacterias normalmente

codifican un solo gen RecQ, el genoma humano contiene cinco genes RecQ que codifican para la proteína del síndrome de Werner (WRN), la proteína del síndrome de Bloom (BLM), RECQ1, RECQ4 y RECQ5. (Anexo 4). Mutaciones en los genes de tres miembros de esta familia en humanos están vinculadas a trastornos genéticos bien definidos y asociados con la inestabilidad genómica, predisposición al cáncer y características del envejecimiento prematuro como son el síndrome de Bloom (mutaciones del gen BLM), el síndrome de Werner (mutaciones del gen WRN) y el síndrome de Rothmund-Thomson, el síndrome Rapadilino y el síndrome de Baller-Gerold (todos causados por la mutación de RECQ4) (Ellis *et al.* 1995; Kitao *et al.* 1999; Siitonen 2003; Van Maldergem 2005; Yu *et al.* 1996). El nombre de la familia deriva del Dominio RQC que comprende aproximadamente 400 aminoácidos e incluye siete motivos que son característicos de una amplia variedad de helicasas de ADN y ARN (Hickson 2003). El dominio RQC es exclusivo de las helicasas de la familia RecQ. Este dominio está compuesto por un módulo de unión a zinc y un pliegue de hélice-vuelta-hélice, un motivo denominado hélice alada (Kitano *et al.* 2010), el cual es importante para la función de la proteína, ya que su eliminación resulta en una disminución significativa en la actividad helicasa de WRN (Lee *et al.* 2005) y BLM (Janscak *et al.* 2003). Este tipo de dominio se conoce como el principal dominio de unión al ADN de doble cadena (ds) y se encuentran en muchas proteínas nucleares. Además, se ha demostrado que este dominio está involucrado en interacciones proteína-proteína, incluyendo FEN1 (Brosh *et al.* 2001), NEIL1 (Das *et al.* 2007), PARP1 (Von Kobbe *et al.* 2003), p97/VCP (Indig *et al.* 2004) y TRF2 (Opresko *et al.* 2002).

### **3.2 El gen de la proteína del Síndrome de Werner**

El gen encargado de codificar la proteína de Werner fue identificado por medio de clonación posicional, localizándose en el cromosoma 8, en la región p12 (Goto *et al.* 1992;

Nakura *et al.* 1994). El gen codifica para una proteína de 1423 aminoácidos con características similares a las helicasas (Yu *et al.* 1996), contiene más de 150 kb y consta de 35 exones (34 exones codificantes) (Yokote *et al.* 2016). Este gen fue inicialmente descrito por ligamiento genético mediante clonación posicional (Goto *et al.* 1992), permitiendo identificar el gen responsable del WS. (Anexo 5).

### **3.3 La proteína del síndrome de WRN**

La proteína del Síndrome de Werner (WRN) es el único miembro de la familia RecQ helicasas humanas que posee un dominio exonucleasa (Luo 2010). Dos dominios funcionales principales de la proteína WRN son el dominio de exonucleasa 3' → 5' (60-288 aa) en su región N-terminal y el dominio helicasa 3' → 5' dependiente de ATP (551-859 aa) en la región central (Gray *et al.* 1997; Huang *et al.* 1998). Seguido al dominio helicasa, hay dos regiones de consenso: una región conservada de helicasa RecQ (RQC) (956-1,064 aa) y una región conservada de helicasa parecida a la ARNasa D, C-terminal (HRDC) (1,142-1,235 aa) (Kitano *et al.* 2007). RQC es compartido por otras helicasas RecQ (RECQL1, BLM, RECQL4 y RECQL5) mientras que HRDC es compartido solo por BLM. (Croteau *et al.* 2014). El dominio RQC forma una estructura de hélice-vuelta-hélice que interactúa con el ADN con alta afinidad, mientras que el dominio HRDC contiene 5 hélices alfa que se cree que median las interacciones con el ADN y otras proteínas (Kitano 2014; Tadokoro *et al.* 2012). Por último, una señal de localización nuclear (NLS), se encuentra cerca del extremo C-terminal (1,370-1,375 aa) (Matsumoto *et al.* 1997; Suzuki, *et al.* 2001). (Anexo 6).

### **3.4 El Síndrome de Werner**

El síndrome de Werner (WS) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, poco frecuente en humanos que muestra características clínicas sugestivas de envejecimiento rápido o prematuro (Oshima *et al.* 2017; Tollefsbol & Cohen 1984; Goto *et al.* 1997). Fue identificada por primera vez por Otto Werner en su tesis doctoral en 1904 (Werner 1985). El WS es causado por la carencia en la expresión de la proteína del gen WRN, que es producido por mutaciones en dicho gen. A la fecha, se han registrado 83 distintas mutaciones que afectan los niveles de expresión del gen, la mayoría de ellas conduce a una pérdida de función al generar codones de parada prematuro o un ARNm truncado debido a alteraciones en la pauta de lectura abierta del gen, lo que conlleva a definir esta enfermedad como una enfermedad por pérdida de función del gen (Department of Pathology, 2019). Así, la mayoría de las mutaciones en WRN generan un ARNm mutante que es rápidamente degradado por el sistema “Nonsense Mediated Decay”, o que truncan la señal de localización nuclear, lo que da como resultado una proteína no funcional (Matsumoto *et al.* 1997; Yamabe *et al.* 1997). (Anexo 7).

Este síndrome tiene un inicio aparente en la adolescencia o en la edad adulta (a partir de los 20 años, donde la salud se deteriora rápidamente), lo que demuestra un retraso marcado en la aparición de los rasgos característicos del síndrome y distinguiendo al WS de casi todos los demás síndromes y trastornos progeroídes que a menudo son evidentes en la infancia o niñez (Oshima *et al.* 2018) (Anexo 8).

Los pacientes con WS desarrollan muchas enfermedades asociadas a la vejez como Diabetes mellitus tipo 2, fallo cardíaco, osteoporosis y formas raras de cáncer (sarcomas) con mayor frecuencia que la población normal (Goto *et al.* 1996; Massip *et al.* 2006), siendo el cáncer y problemas cardíacos dos de las principales causas de muerte entre los 46-54 años de edad (Huang *et al.* 2006).

### **3.5 El transporte de los ARNm y WRN**

El transporte nucleocitoplásmico eficiente de ARNm es importante para la proliferación de todas las células y en especial para las células cancerosas. Se ha observado una regulación al alza de algunos de los factores de transporte de ARNm en muchos tipos de células tumorales y la reducción de los niveles de estos factores mediante silenciamiento génico (shRNA) inhibe la proliferación de dichas células mediado por una inhibición del transporte de los ARNm (Guo *et al.* 2005; Borden & Culjkovic 2010; Dominguez-Sanchez *et al.* 2011; Culjkovic *et al.* 2012; Siddiqui & Borden *et al.* 2012; Saito *et al.* 2013; Culjkovic *et al.* 2016). Estos factores de transporte juegan un papel clave en el transporte de las RNPM a través del complejo de poros nucleares (NPC) para su traducción a proteínas en el citoplasma (Beck & Hrut 2017; Okamura *et al.* 2015; Coyle *et al.* 2011; Soheilypour & Mofrad 2016). Se ha reportado que WRN interactúa con algunas proteínas de los poros nucleares (Lachapelle *et al.* 2011; Kaur *et al.* 2010; Li *et al.* 2013), incluyendo NDC1, una nucleoporina transmembrana (Li *et al.* 2013). Aunque se desconoce la importancia de estas interacciones, estos hallazgos sugirieron que WRN podría contribuir a procesos como el transporte de los ARNm que implica el transporte a través del poro nuclear. Así, para comprender mejor la relación entre WRN y la maquinaria de transporte de los ARNm, se formuló la pregunta de si la disminución en los niveles proteicos de enzimas involucradas en las vías metabólicas que controlan la síntesis macromolecular y protegen del estrés oxidativo en las células silenciadas para WRN, reportadas por Li *et al.* 2014, podrían ser el resultado de un transporte núcleo/citoplasma alterado.

## **IV. HIPÓTESIS**

Se ha descrito que el silenciamiento génico de WRN conduce a las células de cáncer a entrar en un estado de senescencia replicativa que eventualmente conlleva a la muerte celular por apoptosis (Comai & Li 2004, Davis *et al.* 2007). La identificación de la asociación de WRN con los poros nucleares (Kaur *et al.* 2010, Li *et al.* 2013) junto a la observación de una altera distribución nucleocitoplásmica de los ARNm en células deplecionadas para WRN (Iglesias-Pedraz *et al.* 2020) permiten plantear la siguiente hipótesis: “Si los niveles de los productos génicos (ARNm y proteínas) de genes implicados en el transporte de ARNm se ven afectados tras la depleción de WRN, y hay interacción proteína-proteína entre WRN y proteínas implicada en el transporte de los ARNm, entonces WRN interviene de manera activa en el transporte de los ARNm”.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Lugar de Ejecución**

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Genética Molecular y Bioquímica y de Cultivo Celular e Inmunología de la Universidad Científica del Sur (UCSUR), ubicados en el Distrito de Villa el Salvador, Provincia y Departamento de Lima, bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Iglesias Pedraz, y el seguimiento de la tesis se realizó bajo la supervisión y coordinación de la Dra. Lidia Cruz Neyra en el laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma (URP), ubicado en el distrito de Surco, Provincia y Departamento de Lima.

### **5.2 Tipo y Diseño de la Investigación**

De acuerdo al enfoque de esta investigación, es cuantitativa que corresponde a un diseño experimental de laboratorio.

### 5.3 Variables

- Variables Independientes: niveles de expresión proteica en células HeLa, niveles de expresión génica en células HeLa.
- Variable Dependiente: silenciamiento génico de WRN en células HeLa

### 5.4 Operacionalización de las variables

Objetivos específicos	Variable	Indicador	Escala de medida	Instrumento	Categorización de la variable
Comparar los niveles de los transcritos de genes implicados en la maquinaria de transporte mediante RT-qPCR tras el silenciamiento de WRN.	V.D. Silenciamiento génico de WRN en células HeLa V.I. Niveles de expresión génica	Ciclo umbral (ct)	Razón	Equipo de Western blot - BIORAD	Cuantitativa

<p>Evaluar los niveles de proteínas implicadas en la maquinaria de transporte del ARNm mediante Western blot en células HeLa tras el silenciamiento de WRN.</p>	<p>V.D. Silenciamiento génico de WRN en células HeLa V.I. Niveles de expresión proteica</p>	<p>Unidades de Intensidad relativa (AU)</p>	<p>Razón</p>	<p>StepOne Real-Time PCR Systems</p>	<p>Cuantitativa</p>
<p>Determinar la posible interacción entre WRN y proteínas implicadas en la maquinaria de transporte de los ARNm mediante ensayos de Co-immunoprecipitación.</p>	<p>V.D. Silenciamiento génico de WRN en células HeLa V.I. Niveles de expresión proteica</p>	<p>Unidades de Intensidad relativa (AU)</p>	<p>Razón</p>	<p>Equipo de Western blot - BIORAD</p>	<p>Cualitativa</p>

## 5.5 Procedimiento y análisis de datos

### 5.5.1 Procedimiento

#### 5.5.1.1 Material Biológico

Se utilizó la línea celular HeLa (ATCC® CCL-2™) modificadas genéticamente por transfección lentiviral con shARN para silenciar el gen WRN (shWRN) usando la región 3'UTR de dicho gen, lo cual permite tener células con un sistema inducible de silenciamiento mediante la adición de doxiciclina (dox). Como control se usaron células HeLa con un sistema lentiviral conteniendo una secuencia de ARN sin ninguna homología a cualquier parte del genoma humano (shCTR) (Li *et al.* 2014).

#### 5.5.1.2 Cultivo Celular y preparación de muestras

Todas las células fueron cultivadas en placas Petri tratadas especialmente para cultivo celular, usando el medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor y 1% de penicilina/estreptomicina. Para la inducción del silenciamiento

de WRN, el medio fue suplementado con doxiciclina (dox) a una concentración de 1.5 µg/mL. Las células fueron mantenidas a 37°C en una incubadora humidificada al 95% y a una presión de oxígeno del 95% y 5% de CO<sub>2</sub> por tres días. Se recuperaron las células mediante raspado de placa con ayuda de un raspador celular y se obtuvo el pellet de células mediante centrifugación. Este pellet fue separado en dos (2) fracciones, una fracción destinada a la confirmación de la depleción de la proteína de WRN y el análisis de las proteínas implicadas en el transporte del ARNm mediante Western blot, y la otra fracción fue usada para la extracción de ARNm, para comparar los niveles de expresión génica de genes implicados en la maquinaria del transporte de los ARNm mediante RT-qPCR.

### **5.5.1.3 Comparación de los niveles de los transcritos de proteínas de la maquinaria de transporte mediante RT-qPCR tras el silenciamiento de WRN**

#### **5.5.1.3.1 Extracción de ARN total**

Para la extracción del ARN total se usó el reactivo de TRIzol™ Cat. No. 15596026 (Invitrogen™) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los ARNm purificados fueron cuantificados por NanoDrop y su integridad se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **5.5.1.3.2 Tratamiento de DNasa y Síntesis de ADNc**

Dos microgramos de los ARN extraídos y purificados en el paso anterior fueron tratados con el kit TURBO DNA-free™ Cat. No. AM1907 (Ambion®) siguiendo las especificaciones del fabricante. La confirmación de contaminación con material genómico se realizó mediante

análisis por PCR usando cebadores del gen Tubulina (128 pb). Para las PCR se usó el kit 2X PCR Taq MasterMix Cat. No. G013 (abm®). Posteriormente estos ARN fueron transformados a ADN Complementario (ADNc) utilizando el kit OneScript® cDNA Synthesis SuperMix Cat. No. G452 (abm®) siguiendo las especificaciones del fabricante.

#### **5.5.1.3.3 Análisis de abundancia de los ARNm por RT-qPCR**

Los ADNc recién preparados fueron sometidos a análisis por qPCR utilizando el reactivo BrightGreen 2X qPCR MasterMix Cat. No. MasterMix-R (abm®) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Se utilizó el equipo StepOne Real-Time PCR System, con el software StepOne Software v2.3. Se realizaron las curvas estándar para determinar la eficiencia de los cebadores diseñados. Los valores Ct (Cycle threshold, por sus siglas en inglés) obtenidos de las reacciones se analizaron para obtener la abundancia relativa de ARNm en cada una de las muestras (shCTR y shWRN) usando cebadores previamente confirmados para su eficiencia (Figura 1). Los cebadores fueron diseñados sobre genes que intervienen en el transporte de los ARNm (ver Tabla 1) usando el RNA ribosomal 18S como control endógeno para cada una de las muestras en tres replicas biológicas.

#### **5.5.1.4 Evaluación de los niveles de proteínas implicadas en la maquinaria de transporte del ARNm mediante Western blot en células HeLa silenciadas para WRN**

Para medir los niveles de proteínas clave implicadas en el transporte nucleocitoplásmico de los ARNm, las células HeLa portando las construcciones shCTR y shWRN tras tres días de tratamiento con dox, fueron lisadas en el Buffer de Lisis total suplementado con inhibidores de proteasas (ver Tabla 2) por 30 minutos en hielo. Los lisados celulares fueron centrifugados a

13,000 x g por 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes fueron recuperados en nuevos tubos enfriados en hielo. Para cuantificar el contenido proteico de las muestras se usó el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich B6916), usando una curva estándar preparada con concentraciones conocidas de albumina sérica bovina (BSA) (Figura 2).

#### **5.5.1.4.1 Western blot para comprobar la depleción de WRN y proteínas de la maquinaria de transporte de los ARNm**

Para el análisis de las proteínas mediante Western blot, los extractos proteicos se desnaturalizaron con tampón de carga 2X (ver Tabla 3) a 95°C por 5 minutos. Antes de analizar los niveles de proteínas implicadas en la maquinaria de transporte del ARNm, se procedió a realizar un Western blot para comprobar la depleción de WRN. Luego se procedió a analizar las proteínas de interés. Los extractos proteicos fueron resueltos en geles de poliacrilamida (PAA) al 5, 8 y 10% dependiendo del tamaño de la proteína a estudiar a voltaje constante (150V). Tras la corrida electroforética, los geles de PAA fueron equilibrados con el tampón de transferencia por 5 minutos. La transferencia se realizó en tampón carbonato de sodio pH 9.8 (6.275 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.325 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) usando membranas de nitrocelulosa, a amperaje constante (380 mA) por 1 hora en una cama de hielo. Las membranas se bloquearon en 5% de leche descremada (SERVA) en PBS-T (PBS 1x, 0.5 % Tween-20) por 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se utilizó el anticuerpo primario anti-WRN (Bethyl A300-239A-Rabbit) para comprobar la depleción de la proteína Werner, y se utilizaron los anticuerpos específicos contra proteínas implicadas en el sistema de transporte de los ARNm: anti-NXF1 (Santa Cruz sc-28377-Mouse), anti-CRM1 (Santa Cruz sc-74454-Mouse), THO4/ALY (Cell Signaling 12655S-Rabbit), NCBP1/CBP80 (Cell Signaling 24964-Rabbit), UAP56 (GeneTex GTX55829-Rabbit), THOC1 (Bethyl A302-839A-Rabbit), THOC2 (Bethyl A303-630A-

Rabbit), GANP (Bethyl A303-128A-Rabbit) e eIF4E (Cell Signaling 2067S-Rabbit). Como control de carga se usaron los anticuerpos anti Tubulina (Santa Cruz sc-53646-Mouse) y Actina (Santa Cruz sc-1615-Goat). Los anticuerpos primarios fueron detectados con sus respectivos anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en ingles), lo cual sirvió para detectar la presencia de las proteínas mediante reacción de quimioluminiscencia usando el kit SERVA Light Polaris. Las señales quimioluminiscentes generadas de la reacción fueron capturadas usando películas para rayos X. Se hicieron las comparaciones respectivas usando tres replicas biológicas.

#### **5.5.1.5 Determinación de la posible interacción entre WRN y proteínas implicadas en la maquinaria de transporte de los ARNm mediante ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-IP)**

##### **5.5.1.5.1 Cultivo Celular**

Se cultivaron células de la línea HeLa de cáncer cervical (ATCC® CCL-2™) en 4 frascos de cultivo celular T-175, en medio DMEM suplementadas con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina. Las células fueron mantenidas a 37°C en una incubadora humidificada y a una presión de oxígeno del 95% y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 80%.

##### **5.5.1.5.2 Co-Inmunoprecipitación**

Para los ensayos de Co-IP, las células HeLa fueron lavadas 3 veces en 1X PBS-DEPC y tratadas con Tripsina 1X para recuperarlas de las placas. Las células fueron sedimentadas por

centrifugación a 1,500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 1 mL de Buffer de Lisis total para Co-IP (ver Tabla 4) y se incubaron en hielo por 30 minutos. Se extrajo una alícuota para control de los totales. Se dividió el lisado celular en dos (2) tubos conteniendo volúmenes equivalentes de muestra: un tubo se trató con 10 mM de Complejo Vanadil Ribonucleósido (CVR) que inhibe la actividad de las ARNasas endógenas, evitando así que se degraden los ARN, mientras que el segundo fue incubado con 250 U de Benzonasa, que degrada todas las formas de ADN y ARN sin tener actividad proteolítica. Ambas incubaciones se realizaron por 1 hora en hielo, transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron los tubos a 14,000 x g por 30 minutos a 4°C.

Cada uno de los tratamientos fue separado en volúmenes equivalentes de 200 µL, en tubos de 0,5 mL rotulados adecuadamente. De los 100 µL restantes del lisado se tomaron 20 µL para el Input y 20 µL para la determinación de la integridad de los ARN. Cada uno de los tubos se enrazó para igualar los volúmenes, con 400 µL con Buffer de Lisis total conteniendo, ya sea CVR o Benzonasa. A cada uno de los tubos se le adiciono 5 µg de anticuerpo primario. Para ambos tratamientos se usaron los anticuerpos IgG Isotipo control, α-CRM1 y α-NXF1 y se incubaron en rotación a 4°C toda la noche. Al día siguiente se procedió a bloquear la resina magnética conteniendo Proteína G acoplada con 2% de BSA acetilado preparado con Buffer de Lisis total por 1 hora a 4°C en rotación. Se repartieron 30 µL de resina magnética a cada uno de los tubos y se incubaron durante 2 horas a 4°C en rotación. Transcurrido el tiempo, las resinas fueron capturadas usando un soporte magnético y se tomó una alícuota del sobrenadante para verificar la integridad de los ARNs. Los tubos fueron lavados 3 veces con Buffer de Lisis total con incubaciones de 5 minutos cada una. Luego se procedió a eluir las proteínas de la resina magnética con 10 µL de 200 mM de Glicina a pH 2.8 y se neutralizó con Tris-HCl 1 M. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida reductor (SDS-PAGE) con las proteínas

eluidas y se procedió a visualizarlas por Western blot luego de la electrotransferencia usando los anticuerpos mencionados.

### **5.5.2 Análisis de datos**

Los datos obtenidos de los ensayos de Western blot fueron procesados con el programa “Image J” el cual permitió cuantificar la intensidad de las bandas de expresión. Este tipo de análisis permite realizar un análisis cuantitativo de los ensayos de Western blot realizados normalizándolos a sus respectivos controles de carga. Los datos obtenidos por RT-qPCR fueron analizados por su ciclo umbral (Ct) el cual se define como el punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal y se considera como el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo, con estos datos se compara si existe alguna diferencia en la expresión de los ARNm analizados entre las células HeLa shCTR y shWRN.

### **5.5.3 Análisis estadístico**

Los datos generados fueron analizados para determinar su significancia estadística utilizando la prueba “t de Student” para los análisis de RT-qPCR en tiempo real y la expresión de proteínas por Western blot a partir de tres replicas biológicas.

## **5.6 Aspecto ético**

El mantenimiento de las células HeLa se realiza de acuerdo a los protocolos establecidos por la OMS, previo compromiso con los laboratorios que lo comercializan, y se respeta la ley Moratoria al ingreso de transgénicos (OVM - Organismo Vivo Modificado) ley N° 29811. Las células HeLa son una línea celular proveniente de una paciente con cáncer de cuello uterino llamada Henrietta Lacks, en 1951. Estas células fueron extraídas a partir del tejido tumoral de la biopsia que se le practicó. Estas células tienen una capacidad de replicación diferente a otras líneas celulares. Por más de 60 años, se viene realizando estudios con células HeLa, lo que ha permitido grandes avances en la producción de medicamentos contra el cáncer, la leucemia y la enfermedad de Parkinson.

## **VI. RESULTADOS**

### **6.1 Desregulación de la proteína WRN**

Con el fin de determinar los niveles de expresión de la proteína WRN en la línea celular HeLa portadora de las contracciones shWRN y shCTR tras el tratamiento con dox, se realizaron ensayos de Western blot de manera rutinaria. El análisis de intensidad realizado con el programa ImageJ (NIH) nos muestra que hay una depleción de WRN de más del 80% (Figura 3).

### **6.2 Análisis de los niveles de expresión de proteínas implicadas en el transporte de los ARNm**

Dado que la depleción de WRN conduce a una alteración en los niveles proteicos de genes metabólicos sin mostrar alteración en la expresión génica (Li, *et al.* 2014), se propuso evaluar

si los niveles de proteínas clave implicadas en el proceso de transporte núcleo-citoplasma de los ARNm se encontraban alterados tras la depleción de WRN. Los resultados obtenidos de los ensayos de Western blot nos indican que el grupo de proteínas clave analizadas e implicadas en el transporte de los ARNm (NXF1, CRM1, GANP, CBP80, UAP56, Aly/REF, eIF4E, THOC1, THOC2) mantiene los niveles de expresión proteica tras la depleción de WRN, semejantes a los observados en las muestras control (shCTR). El análisis de intensidad de bandas realizado con el programa ImageJ (NIH) nos muestra que no hay variación significativa en los niveles de estas proteínas tras la depleción de WRN (Figura 4).

### **6.3 Análisis de los transcritos de genes implicados en el transporte de los ARNm**

Para definir que la depleción de WRN no altera la expresión génica de las proteínas analizadas se realizó un análisis por RT-qPCR de los ARNs derivados de células control y células deplecionadas para WRN. Posteriormente a la extracción de ARN, se comprobó la integridad de estos mediante electroforesis en gel de agarosa, confirmándose la correcta integridad de los ARN tras la extracción y purificación, observándose las bandas 28S y 18S bien definidas (Figura 5). Para garantizar la ausencia de ADN genómico (ADNg) durante la extracción de los ARN y que puedan interferir con el análisis final de qPCR, las muestras fueron tratadas con DNasa I y analizadas mediante PCR convencional usando el cebador específico de Tubulina genómica (producto de 128 pares de bases) (Figura 6). Este análisis confirma la ausencia de contaminación por ADNg. Los ADN complementarios (ADNc) generados fueron analizados por qPCR y normalizados con el ARNr 18S. Los resultados muestran que, tras depleción de WRN (shWRN), existe una variación significativa a nivel de transcritos en la mayoría de genes analizados, los cuales no se corresponden con sus niveles proteicos observados (Figura 7) y comparados con el grupo control (shCTR).

#### **6.4 Interacción de la proteína WRN con proteínas implicadas en el transporte de los ARNm**

Puesto que la depleción de WRN no altera los niveles de proteínas clave del transporte nucleocitoplásmico de los ARNm como un evento temprano, se propuso estudiar si la proteína WRN era requerida para el transporte de los ARNm desde el núcleo hacia el citoplasma. Para definir la participación de WRN en este proceso de transporte se realizaron ensayos de Co-IP. Estas aproximaciones nos permitirán identificar la interacción de WRN con los componentes de la maquinaria de transporte de los ARNm. Los extractos proteicos derivados de las células HeLa fueron primero tratadas con CVR y Bensonaza previo a los ensayos de Co-IP. Los resultados del análisis del gel de agarosa confirman que los tratamientos han funcionado, observándose que el tratamiento con CVR muestra una correcta integridad de los ARN, mientras que en el tratamiento con Bensonaza se observa la degradación total de los ARN (Figura 8). Tras los ensayos de Co-IP y la confirmación de los tratamientos, los resultados obtenidos demuestran que WRN es capaz de unirse a componentes clave de la maquinaria de transporte de los ARN mensajeros, específicamente a NXF1, de manera independiente de los ácidos nucleicos (Figura 9).

### **VII. DISCUSIÓN**

Los ensayos moleculares realizados en la presente investigación han sido dirigidos para contrastar la hipótesis de que, en células HeLa, tras el silenciamiento génicos de la proteína WRN, los productos de la expresión génica (ARNm y proteína) de genes implicados en el transporte nucleocitoplásmico de los ARNm se ven afectados y si WRN participa, de manera

activa, en dicho transporte mediante la interacción proteína-proteína con alguno de los principales transportadores de ARNm. Para lo cual se cuantificaron los niveles de la expresión génica mediante RT-qPCR en células HeLa al tercer día después de la depleción de la proteína WRN, observándose una disminución significativa de los componentes de la maquinaria de transporte de los ARNm (NXF1, CRM1, GANP, CBP80, UAP56, Aly/REF, eIF4E, THOC1, THOC2). La alteración de la expresión génica tras la depleción de WRN no es del todo desconocido, ya que se sabe que WRN también participa en la regulación de la expresión génica, según los estudios de Kyng & Bohr (2005).

Estos resultados son coherentes con lo reportado por Li *et al.* (2014) e Iglesias *et al.* (2020), los cuales demuestran que la depleción de WRN estaría afectando procesos celulares post-transcripcionales, como el transporte núcleo-citoplásmico de los ARNm, alterando en última instancia a la síntesis de proteínas.

Por otro lado, para determinar la posible alteración de los niveles de expresión proteica de genes implicados en el transporte nucleocitoplásmico de los ARNm tras la depleción de WRN, se realizaron ensayos de Western Blot, indicando que los niveles de las proteínas analizadas no se ven afectadas, incluso en algunas de ellas se ve un ligero incremento.

Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Kyng & Bohr (2005) e indica que, dicho incremento de algunas proteínas probablemente se deba a una respuesta compensatoria a la reducción en el transporte nucleocitoplásmico de los ARNm o a una vida media prolongada de los componentes proteicos analizados, tal como lo señala Boisvert *et al.* (2011).

En consecuencia, podemos discernir que, estos resultados nos indican que una alteración en la expresión proteica de genes implicados en la maduración y transporte de los ARNm, tras la depleción de WRN, no son los responsables de la deficiencia en la síntesis de proteínas, al menos no como una respuesta temprana al silenciamiento génico de WRN en células de cáncer HeLa.

Con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares responsables de la alteración en la expresión proteica generada por la depleción de WRN en células HeLa, estudiamos la posible interacción de WRN con los dos principales factores de exportación de los ARNm, NXF1 y CRM1. Los resultados obtenidos mediante los ensayos de Co-inmunoprecipitación muestran que WRN es capaz de interactuar con el NXF1, pero no con CRM1, lo que demuestra una especificidad en las funciones de WRN asociadas a la homeostasis de los ARNm. De manera interesante, la interacción entre WRN y NXF1 no está mediada por los ARN, ya que el tratamiento de la muestra con Bensonaza no inhibe esta interacción, lo que demuestra que dicha interacción ocurre de manera directa entre ambas proteínas.

Estos resultados apuntan a que WRN podría ser requerido para el correcto transporte nucleocitoplásmico de los ARNm, al menos en esta línea celular de cáncer, indicando que el silenciamiento génico de WRN podría estar alterando las funciones de transporte de la proteína NXF1, explicándose así la reducción en la expresión proteica de los enzimas G6PD e IDH1 y soportando nuestra hipótesis de la posible función de WRN en el transporte nucleocitoplásmico mediado por NXF1.

Las posibles funciones de WRN en la homeostasis de los ARNm y en especial en el transporte de éstos, se ven reforzados por previos hallazgos que demuestran la interacción entre

WRN y el complejo de poro nuclear (NPC) a través de varias Nups (Lachapelle *et al.* 2011) y en especial con la proteína transmembrana del centro del poro nuclear NDC1 (Li *et al.* 2013), sugiriendo que WRN podría estar relacionada con el transporte de los ARNm. Así mismo, Lachapelle *et al.* (2011) describe la interacción entre WRN y THOC mediante ensayos de Co-IP con extractos celulares totales, sentando el primer precedente del posible vínculo entre WRN y los ARNm.

Asimismo, existen evidencias previas que demuestran que diversos tipos de células cancerosas muestran niveles proteicos más elevados de WRN (Opresko *et al.* 2007; Futami *et al.* 2008) y su silenciamiento o inactivación en varias de estas líneas celulares provoca rápidamente senescencia o apoptosis (Opresko *et al.* 2007; Aggarwal *et al.* 2011; Comai & Li 2004; Li *et al.* 2014), lo que reflejaría un mayor requerimiento de transporte de ARNm en estas células, similar a lo observado con otras proteínas del transporte (Culjkovic *et al.* 2012; Culjkovic *et al.* 2016; Dominguez-Sanchez *et al.* 2011; Saito *et al.* 2013).

Finalmente, no se ha descrito hasta la fecha una relación funcional entre WRN y los ARNm, por lo que los resultados que demuestran que WRN interacciona con el principal receptor de transporte de los ARN, NXF1, son novedosos y nos ayudarían a comprender la funcionalidad de WRN en el proceso de transporte de los ARNm y su vínculo con la senescencia replicativa observada en células de cáncer tras la depleción de WRN.

## **VIII. CONCLUSIONES**

De los resultados encontrados podemos concluir que:

- Los niveles de los transcritos génicos de genes implicados en la maquinaria de transporte de los ARNm mediante RT-qPCR tras el silenciamiento de la proteína WRN en células HeLa, demuestran que existe una alteración en los niveles de los ARNm (NXF1, CRM1, GANP, CBP80, UAP56, Aly/REF, eIF4E, THOC1, THOC2), de los principales componentes de la maquinaria de transporte nucleocitoplásmico.
- Los niveles de proteínas (NXF1, CRM1, GANP, CBP80, UAP56, Aly/REF, eIF4E, THOC1, THOC2), de la maquinaria de transporte de los ARNm mediante Western blot en células HeLa tras el silenciamiento de WRN, demuestran que no existe una alteración en los niveles proteicos de los principales componentes de la maquinaria de transporte nucleocitoplásmico, al menos no tras tres días silenciamiento del gen WRN.
- La proteína WRN interacciona con el principal factor de exportación de los ARNm, NXF1, como se evidencia por análisis de Co-IP.
- La alteración en el transporte núcleo-citoplasma sería la probable causa de la senescencia replicativa inducida por la depleción de WRN en células de cáncer HeLa.

## **IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aggarwal M., Sommers J.A., Shoemaker R.H., Brosh R.M. Jr. (2011). Inhibition of helicase activity by a small molecule impairs Werner syndrome helicase (WRN) function in the cellular response to DNA damage or replication stress. *Proceedings of the National Academy of Science*. 108(4):1525-1530.

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(3), 1883-1893.

- Beck M, Hurt E. (2017). The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(2):73-89.
- Bohr V. (2008). Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(12), 609–620.
- Boisvert F.-M., Ahmad Y., Gierliński M., Charrière F., Lamont D., Scott M., Barton G., Lamond A. I. (2011). A Quantitative Spatial Proteomics Analysis of Proteome turnover in Human Cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(3) M111.011429.
- Borden KL, Culjkovic-Kraljacic B. (2010). Ribavirin as an anti-cancer therapy: acute myeloid leukemia and beyond? *Leuk Lymphoma*, 51(10):1805-1815.
- Brosh, Jr, R. M., Von Kobbe, C., Soomers, J. A., Karmakar, P., Opresko, P. L., Piotrowski, J., Dionava, I., Dianov, G. L., Bohr, V. A. (2001). Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *The EMBO Journal*, 20(20), 5791–5801.
- Comai L, Li B. (2004). The Werner syndrome protein at the crossroads of DNA repair and apoptosis. *Mechanisms of Ageing Development*, 125(8):521-528.
- Coyle J.H., Bor Y.C., Rekosh D., Hammarskjöld M.L. (2011). The Tpr protein regulates export of mRNAs with retained introns that traffic through the Nxf1 pathway. *RNA*, 17(7):1344-1356.
- Croteau, D. L., Popuri, V., Opresko, P. L., & Bohr, V. A. (2014). Human RecQ Helicases in DNA Repair, Recombination, and Replication. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 519–552.

- Culjkovic-Kraljacic B., Baguet A., Volpon L., Amri A., Borden K.L. (2012). The oncogene eIF4E reprograms the nuclear pore complex to promote mRNA export and oncogenic transformation. *Cell Reports*, 2(2):207-215.
- Culjkovic-Kraljacic B., Fernando T.M., Marullo R., Calvo-Vidal N., Verma A., Yang S., Tabbò F., Gaudiano M., Zahreddine H., Goldstein R., Patel J., Toldone T., Chiosis G., Ladetto M., Ghione P., Machiorlatti R., Elemento O., Inghirami G., Melnick A., Borden K., Cerchietti L. (2016). Combinatorial targeting of nuclear export and translation of RNA inhibits aggressive B-cell lymphomas. *Blood*, 127(7):858-868.
- Das A., Boldogh I., Lee J. W., Harrigan J. A., Hegde M. L., Piotrowski J., Pinto N., Ramos W., Greenberg M. M., Hazra T. K., Mitra S., Bohr V. A. (2007). The Human Werner Syndrome Protein Stimulates Repair of Oxidative DNA Base Damage by the DNA Glycosylase NEIL1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26591–26602.
- Davis T., Wyllie F.S., Rokicki M.J., Bagley M.C., Kipling D. (2007). The role of cellular senescence in Werner syndrome: toward therapeutic intervention in human premature aging. *Annals of the New York Academy of Science*, 455-469.
- Department of Pathology (2019). Werner Syndrome Mutational Database. Recuperado de <http://www.pathology.washington.edu/research/werner/database/>
- Dolfi S. C., Chan L. L., Qiu J., Tedeschi P. M., Bertino J. R., Hirshfield K. M., Oltvai Z. N., Vazquez A. (2013). The metabolic demands of cancer cells are coupled to their size and protein synthesis rates. *Cancer & Metabolism*, 1 (1), 20-33.
- Dominguez-Sanchez M.S., Saez C., Japon M.A., Aguilera A., Luna R. (2011). Differential expression of THOC1 and ALY mRNP biogenesis/export factors in human cancers. *BMC Cancer*, 11,77-88.

- Dong X., Biswas A., Süel K. E., Jackson L. K., Martinez R., Gu H., & Chook Y. M. (2009). Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature*, 458(7242), 1136–1141.
- Dufu K., Livingstone M. J., Seebacher J., Gygi S. P., Wilson S. A., & Reed R. (2010). ATP is required for interactions between UAP56 and two conserved mRNA export proteins, Aly and CIP29, to assemble the TREX complex. *Genes & development*, 24(18), 2043–2053.
- Eckner R., Ellmeier W., & Birnstiel M. L. (1991). Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus. *The EMBO journal*, 10(11), 3513–3522.
- Ellis N. A., Groden J., Ye T.-Z., Straughen J., Lennon D. J., Ciocci S., M Proytcheva; German J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*, 83(4), 655–666.
- Englmeier, L., Fornerod, M., Bischoff F.R., Petosa, C., Mattaj I.W., Kutay, U. (2001). RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Reports*, 2, 926–932.
- Epstein C. J., Martin G. M., Schultz A. L., & Motulskys A. G. (1966). A Review of its Symptomatology, Natural History, Pathologic Features, Genetics and Relationship to the Natural Aging Process. *Medicine*, 45(3), 177–221.
- Fichtman B., Ramos C., Rasala B., Harel A., Forbes D. J. (2010). Inner/Outer Nuclear Membrane Fusion in Nuclear Pore Assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 21(23), 4197–4211.

- Fribourg, S., Braun, I. C., Izaurralde, E. & Conti, E. (2001). Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/ p15 mRNA nuclear export factor. *Molecular Cell*, 8, 645–656.
- 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(5):843-8.20, 21.
- Gallouzi I. E., Brennan C. M., & Steitz J. A. (2001). Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA*, 7(9), 1348-1361.
- Genetic Human reference (2019). WRN gene, EE.UU. Recuperado de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/WRN#>
- German J., Sanz M. M., Ciocci S., Ye T. Z., & Ellis N. A. (2007). Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's Syndrome Registry. *Human Mutation*, 28(8), 743–753.
- Golovanov A. P., Hautbergue G. M., Tintaru A. M., Lian L.-Y., & Wilson S. A. (2006). The solution structure of REF2-I reveals interdomain interactions and regions involved in binding mRNA export factors and RNA. *RNA*, 12(11), 1933–1948.
- Goto M., Imamura O., Kuromitsu J., Matsumoto T., Yamabe Y., Tokutake Y., Suzuki N., Mason B., Drayna D., Sugawara M., Sugimoto M., Furuichi Y. (1997). Analysis of helicase gene mutations in Japanese Werner's syndrome patients. *Human Genetics*, 99(2):191–193.
- Goto M., Rubenstein M., Weber J., Woods K., & Drayna D. (1992). Genetic linkage of Werner's syndrome to five markers on chromosome 8. *Nature*, 355(6362), 735–738.

- Goto M., Miller R. W., Ishikawa Y., Sugano H., (1996). Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5 (4), 239-246.
- Gray M.D., Shen J.C., Kamath-Loeb A.S., Blank A., Sopher B.L., Martin G. M., Oshima J., Loeb L. A. (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nature genetics*, 17: 100-103.
- Grzmil M., Hemmings B. A. (2012). Translation regulation as a therapeutic target in cancer. *Cancer Research*, 72 (16), 3891-3900.
- Guo S., Hakimi M.A., Baillat D., Chen X., Farber M.J., Klein-Szanto A.J., Cooch N. S., Godwin A. K., Shiekhattar R. (2005). Linking transcriptional elongation and messenger RNA export to metastatic breast cancers. *Cancer Research*, 65(8):3011-3016.
- Hautbergue G. M., Hung M. L., Golovanov A. P., Lian L. Y. & Wilson S. A. (2008). Mutually exclusive interactions drive handover of mRNA from export adaptors to TAP. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105, 5154–5159.
- Hickson, I. D. (2003). RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nature Reviews Cancer*, 3(3), 169–178.
- 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: 114-116
- Huang S., Lee L., Hanson N. B., Lenaerts C., Hoehn H., Poot M., Rubin C. D., Chen D. F., Yang C. C., Juch H., Dorn T., Spiegel R., Oral E. A., Abid M., Battisti C., Lucci-Cordisco E., Neri G., Steed E. H., Kidd A., Isley W., Showalter D., Vittone J. L., Konstantinow A., Ring J., Meyer P., Wenger S. L., von Herbay A., Wollina U., Schuelke, M., Huizenga, C. R., Leistritz, D. F., Martin, G. M., Mian, I. S., Oshima, J.

- (2006). The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Human Mutation*, 27 (6), 558-567.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stévenin, J., & Steitz, J. A. (2003). SR Splicing Factors Serve as Adapter Proteins for TAP-Dependent mRNA Export. *Molecular Cell*, 11(3), 837–843.
- Hutten, S., & Kehlenbach, R. H. (2007). CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in Cell Biology*, 17(4), 193-201.
- Ibarra, A., & Hetzer, M. W. (2015). Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes & Development*, 29(4), 337–349.
- Iglesias-Pedraz, J. M., Fossatti-Jara, D. M., Valle-Riestra-Felice, V., Cruz-Visalaya, S. R., Felix, J. A. A., & Comai, L. (2020). WRN modulates translation by influencing nuclear mRNA export in HeLa cancer cells. *BMC molecular and cell biology*, 21(1), 1-16.
- Indig F. E., Partridge J. J., Kobbe C. V., Aladjem M. I., Latterich M., & Bohr V. A. (2004). Werner syndrome protein directly binds to the AAA ATPase p97/VCP in an ATP-dependent fashion. *Journal of Structural Biology*, 146(1-2), 251–259.
- Izaurralde E., Lewis J., McGuigan C., Jankowska M., Darzynkiewicz E., & Mattaj I. W. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell*, 78(4), 657–668.
- Janscak P., Garcia P. L., Hamburger F., Makuta Y., Shiraiishi K., Imai Y., Ikeda H., Bickle T. A. (2003). Characterization and Mutational Analysis of the RecQ Core of the Bloom Syndrome Protein. *Journal of Molecular Biology*, 330(1), 29–42.

- Katahira J. (2012). mRNA export and the TREX complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(6), 507-513.
- Kaur S., White T.E., DiGuilio A.L., Glavy J.S. (2010). The discovery of a Werner Helicase Interacting Protein (WHIP) association with the nuclear pore complex. *Cell Cycle*, 9(15):3106-3111.
- Kehlenbach R.H., Dickmanns A., Kehlenbach A., Guan T., Gerace L. (1999). A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. *J. Cell Biology*, 145, 645–657.
- Kitao S., Lindor N. M., Shiratori M., Furuichi Y., & Shimamoto A. (1999). Rothmund–Thomson Syndrome Responsible Gene, RECQL4: Genomic Structure and Products. *Genomics*, 61(3), 268–276.
- Kitano K., Kim S.-Y., Hakoshima T. (2010). Structural Basis for DNA Strand Separation by the Unconventional Winged-Helix Domain of RecQ Helicase WRN. *Structure*, 18(2), 177–187.
- 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: 2717-2728
- Kitano K. (2014). Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM. *Frontiers in Genetics*, 5, 366-378.
- Kitao S., Shimamoto A., Goto M., Miller R. W., Smithson W. A., Lindor N. M., Furuichi Y. (1999). Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nature Genetics*, 22(1), 82–84.

- Kohler A., Hurt E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 761–773.
- Kyng K. J., Bohr V. A. (2005). Gene expression and DNA repair in progeroid syndromes and human aging. *Ageing Research Reviews*, 4(4), 579–602.
- Lachapelle S., Gagné J.-P., Garand C., Desbiens M., Coulombe Y., Bohr V. A., Hendzel M. J., Masson J., Poirier G.G., Lebel M. (2011). Proteome-wide Identification of WRN-Interacting Proteins in Untreated and Nuclease-Treated Samples. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 1216–1227.
- Lee J. W., Kusumoto R., Doherty K. M., Lin G.-X., Zeng W., Cheng W.-H., Von Kobbe C.; Brosh R. M.; Hu J.; Bohr V. A. (2005). Modulation of Werner Syndrome Protein Function by a Single Mutation in the Conserved RecQ Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39627–39636.
- Li B.; Iglesias-Pedraz J. M.; Chen L. Y.; Yin F.; Cadenas E.; Reddy S.; Comai L., (2014). Downregulation of the Werner syndrome protein induces a metabolic shift that compromises redox homeostasis and limits proliferation of cancer cells. *Aging Cell*, 13 (2), 367-378.
- Li Z., Zhu Y., Zhai Y., M R. C., Bao Y., White T. E., Glavy J. S. (2013). Werner complex deficiency in cells disrupts the Nuclear Pore Complex and the distribution of lamin B1. *Biochim Biophys Acta*, 1833 (12), 3338-3345.
- Liu Z., Macias MJ., Bottomley MJ., Stier G., Linge JP., Nilges M., Bork P., Sattler M. (1999). The three-dimensional structure of the HRDC domain and implications for the Werner and Bloom syndrome proteins. *Structure Fold. Des.* 7, 1557–1566

- Luo J. (2010). Werner protein and Werner syndrome. *North American journal of medicine & science*. 3(4):205-207.
- Massip L., Garand C., Turaga R. V., 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 (2), 157-168.
- Masuda S., Das R., Cheng H., Hurt E., Dorman N., Reed R. (2005). Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing, *Genes & Development*, 19: 1512-1517.
- Matsumoto T., Imamura O., Yamabe Y., Kuromitsu J., Tokutake Y., Shimamoto A., Suzuki N., Satoh M., Kitao S., Ichikawa K., Kataoka H., Sugawara K., Thomas W., Mason B., Tsuchihashi Z., Drayna D., Sugawara M., Sugimoto M., Furuichi Y., Goto M. (1997). Mutation and haplotype analyses of the Werner's syndrome gene based on its genomic structure: genetic epidemiology in the Japanese population. *Hum Genet a*; 100:123–130.
- Monecke T., Haselbach D., Voß B., Russek A., Neumann P., Thomson E., Hurt E., Zachariae U., Stark H., Grubmuller H., Dickmanns A., Ficner A. (2013). Structural basis for cooperativity of CRM1 export complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 960-965.
- Morozov V., Mushegian A. R., Koonin E. V., Bork P. (1997). A putative nucleic acid-binding domain in Bloom's and Werner's syndrome helicases. *Trends in Biochemical Science*, 22, 417–418.
- Moser M.J., Bigbee W.L., Grant S.G., Emond M.J., Langlois R.G., Jensen R.H., Oshima J., Monnat R.J. (2000). Genetic instability and hematologic disease risk in Werner syndrome patients and heterozygotes. *Cancer Research*, 60:2492–2496.

- Muftuoglu M., Oshima J., Von Kobbe C., Cheng W.-H., Leistriz D. F., Bohr, V. A. (2008). The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis. *Human Genetics*, 124(4), 369–377.
- Nakura J., Wijsman E.M., Miki T., Kamino K., Yu C.E., Oshima J., Fukuchi K., Weber J.L., Piussan C., Melaragno M.I. (1994). Homozygosity mapping of the Werner syndrome locus (WRN). *Genomics*, 23: 600-608
- Noble K. N., Wente S. R. (2010). Nuclear mRNA on the move. *Nature Cell Biology*, 12(6), 525–527.
- Okamura M., Inose H., Masuda S. (2015). RNA Export through the NPC in Eukaryotes. *Genes*, 6(1), 124–149.
- Opresko P. L., Calvo J. P., Von Kobbe C. (2007). Role for the Werner syndrome protein in the promotion of tumor cell growth. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128 (7-8), 423-436.
- Opresko P. L., Von Kobbe C., Laine J.-P., Harrigan J., Hickson I. D., Bohr V. A. (2002). Telomere-binding Protein TRF2 Binds to and Stimulates the Werner and Bloom Syndrome Helicases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 41110–41119.
- Oshima J., Hisama F. M., Monnat R. J. (2018). Werner Syndrome as a Model of Human Aging. *Conn's Handbook of Models for Human Aging*, 3–19.
- Oshima J., Sidorova J. M., Monnat R. J. (2017). Werner syndrome: Clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions. *Ageing Research Reviews*, 33, 105–114.

- Otsuka S., Bui K. H., Schorb M., Hossain M. J., Politi A. Z., Koch B., Eltsov M., Beck M., Ellenberg, J. (2016). Nuclear pore assembly proceeds by an inside-out extrusion of the nuclear envelope. *eLife*, 5, 19071-19094.
- Proudfoot N.J. (2011). Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes & Development*, 25, 1770–1782
- Ramanathan A., Robb G. B., Chan S.-H. (2016). mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7511–7526.
- Ramon Y. C. S., Castellvi J., Hummer S., Peg V., Pelletier J., Sonenberg, N. (2018). Beyond molecular tumor heterogeneity: protein synthesis takes control. *Oncogene*, 37 (19), 2490-2501.
- Ren X., Lim S., Smith M. T., Zhang, L. (2009). Werner syndrome protein, WRN, protects cells from DNA damage induced by the benzene metabolite hydroquinone. *Toxicological Science*, 107 (2), 367-375.
- Roux P. P., Topisirovic I. (2018). Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Molecular Cell Biology*, 38 (12), 1-85.
- Saito Y., Kasamatsu A., Yamamoto A., Shimizu T., Yokoe H., Sakamoto Y., Ogawara K., Shiiba M., Tanzawa H., Uzawa K. (2013). ALY as a potential contributor to metastasis in human oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(4):585-594.
- Sharp P. (1994). Split genes and RNA splicing. *Cell*, 77(6), 805–815.
- Shen J.-C., Loeb, L. A. (2000). The Werner syndrome gene: the molecular basis of RecQ helicase-deficiency diseases. *Trends in Genetics*, 16(5), 213–220.

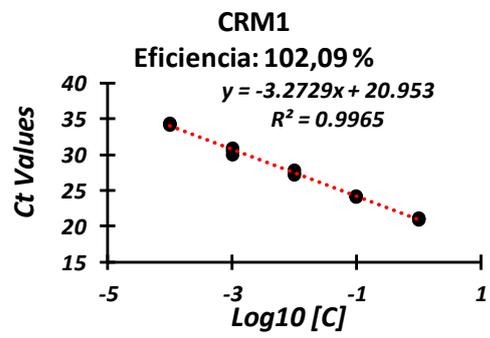
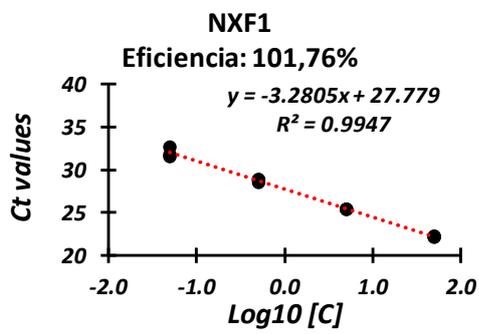
- Shuman S. (2000). Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1–40.
- Siddiqui N., Borden K.L. (2012). mRNA export and cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(1):13-25.
- Siitonen H. A. (2003). Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL diseases. *Human Molecular Genetics*, 12(21), 2837–2844.
- Singleton M. R., Dillingham M. S., Wigley, D. B. (2007). Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases. *Annual Review of Biochemistry*, 76 (1), 23–50.
- Soheilypour M., Mofrad M.R. (2016). Regulation of RNA-binding proteins affinity to export receptors enables the nuclear basket proteins to distinguish and retain aberrant mRNAs. *Scientific Reports*, 6 (1), 53805391.
- Strambio-De-Castillia C., Niepel M., Rout M. P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(7), 490–501.
- Strasser K., Masuda S., Mason P., Pfannstiel J., Oppizzi M., Rodriguez-Navarro S., Rondon A.G., Aguilera A., Struhl K., Reed R, Hurt E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export, *Nature*, vol. 417 (pg. 304-308)
- Stutz F., Izaurralde E. (2003). The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends in Cell Biology*. 13, 319–327.
- Suntharalingam M., Wentz S. R. (2003). Peering through the Pore. *Developmental Cell*, 4(6), 775–789.

- Suzuki T., Shiratori M., Furuichi Y., Matsumoto T. (2001). Diverged nuclear localization of Werner helicase in human and mouse cells. *Oncogene*, 20(20), 2551–2558.
- Szekely A. M., Bleichert F., Numann A., Van Komen S., Manasanch E., Ben Nasr A., Canaan A., Weissman S. M. (2005). Werner protein protects nonproliferating cells from oxidative DNA damage. *Molecular Cell Biology*, 25 (23), 10492-10506.
- Tadokoro T., Kulikowicz T., Dawut L., Croteau D. L., Bohr V. A. (2012). DNA binding residues in the RQC domain of Werner protein are critical for its catalytic activities. *Aging*, 4(6), 417-429.
- Terry L.J., Shows E.B., Wentz S.R. (2007) Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science*, 318, pp. 1412-1416.
- Tollefsbol T.O., Cohen H.J. (1984). Werner's syndrome: an underdiagnosed disorder resembling premature aging. *AGF*, 7:75–88.
- Topisirovic I., Siddiqui N., Lapointe V. L., Trost M., Thibault P., Bangeranye C., Piñol-Roma S., Borden K. L. B. (2009). Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *The EMBO Journal*, 28(8), 1087–1098.
- Topisirovic I., Svitkin Y.V., Sonenberg N., Shatkin, A.J. (2011). Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews*. 2, 277–298
- Umate P., Tuteja N., Tuteja R. (2011). Genome-wide comprehensive analysis of human helicases. *Communicative & integrative biology*, 4(1), 118–137.
- Van Maldergem L. (2005). Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *Journal of Medical Genetics*, 43(2), 148–152.

- Viphakone N., Hautbergue G.M., Walsh, M., Chang C.T., Holland A., Folco E.G., Reed R., Wilson S.A. (2012). TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export. *Nature communications*, 3(1), 1-14.
- Volpon L., Culjkovic-Kraljacic B., Sohn H. S., Blanchet-Cohen A., Osborne M. J., Borden K. L. (2017). A biochemical framework for eIF4E-dependent mRNA export and nuclear recycling of the export machinery. *RNA*, 23(6), 927-937.
- Von Kobbe C., Harrigan J. A., May A., Opresko P. L., Dawut L., Cheng W.-H., Bohr V. A. (2003). Central Role for the Werner Syndrome Protein/Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Complex in the Poly(ADP-Ribosyl)ation Pathway after DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), 8601–8613.
- Wahle E. (1995). 3'-End cleavage and polyadenylation of mRNA precursors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1261(2), 183–194.
- Weis K. (2002). Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Current opinion in cell biology*, 14(3), 328-335.
- Wente S. R., Rout M. P. (2010). The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10), 562-582.
- Werner O. (1985). On cataract in conjunction with scleroderma. In *Werner's syndrome and human aging*. Springer, Boston, MA, 1-14.
- Wickramasinghe V. O., Andrews R., Ellis P., Langford C., Gurdon J. B., Stewart M., Venkitaraman A. R., Laskey R. A. (2014). Selective nuclear export of specific classes of mRNA from mammalian nuclei is promoted by GANP. *Nucleic acids research*, 42(8), 5059-5071.

- Williams T., Ngo L. H., Wickramasinghe V. O. (2018). Nuclear export of RNA: Different sizes, shapes and functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 75, 70–77.
- Yamabe Y., Sugimoto M., Satoh M., Suzuki N., Sugawara M., Goto M., Furuichi Y. (1997). Down-regulation of the defective transcripts of the Werner's syndrome gene in the cells of patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236:151–154.
- Yang J., Bogerd H. P., Wang P. J., Page D. C., Cullen B. R. (2001). Two closely related human nuclear export factors utilize entirely distinct export pathways. *Molecular Cell*, 8, 397–406.
- Yokote K., Chanprasert S., Lee L., Eirich K., Takemoto M., Watanabe A., Koizumi N., Lessel D., Mori T., Hisama F. M., Ladd P. D., Angle B., Baris H., Cefle K., Palanduz S., Ozturk S., Chateau A., Deguchi K., Easwar T. K. M., Federico A., Fox A., Grebe T. A., Hay B., Nampoothiri S., Seiter K., Streeten E., Piña-Aguilar R. E., Poke G., Poot M., Posmyk R., Martin G. M., Kubisch C., Schindler D., Oshima, J. (2016). WRN Mutation Update: Mutation Spectrum, Patient Registries, and Translational Prospects. *Human Mutation*, 38(1), 7–15.
- Yu C.-E., Oshima J., Fu Y.-H., Wijsman E. M., Hisama F., Alisch R., Matthews S., Nakura J., Miki T., Ouais S., Martin G. M., Mulligan J., Schellenberg G. D. (1996). Positional Cloning of the Werner's Syndrome Gene. *Science*, 272(5259), 258–262.
- Zolotukhin A. S., Tan W., Bear J., Smulevitch S., Felber B. K. (2002). U2AF participates in the binding of TAP (NXF1) to mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 3935–3942.

X. FIGURAS



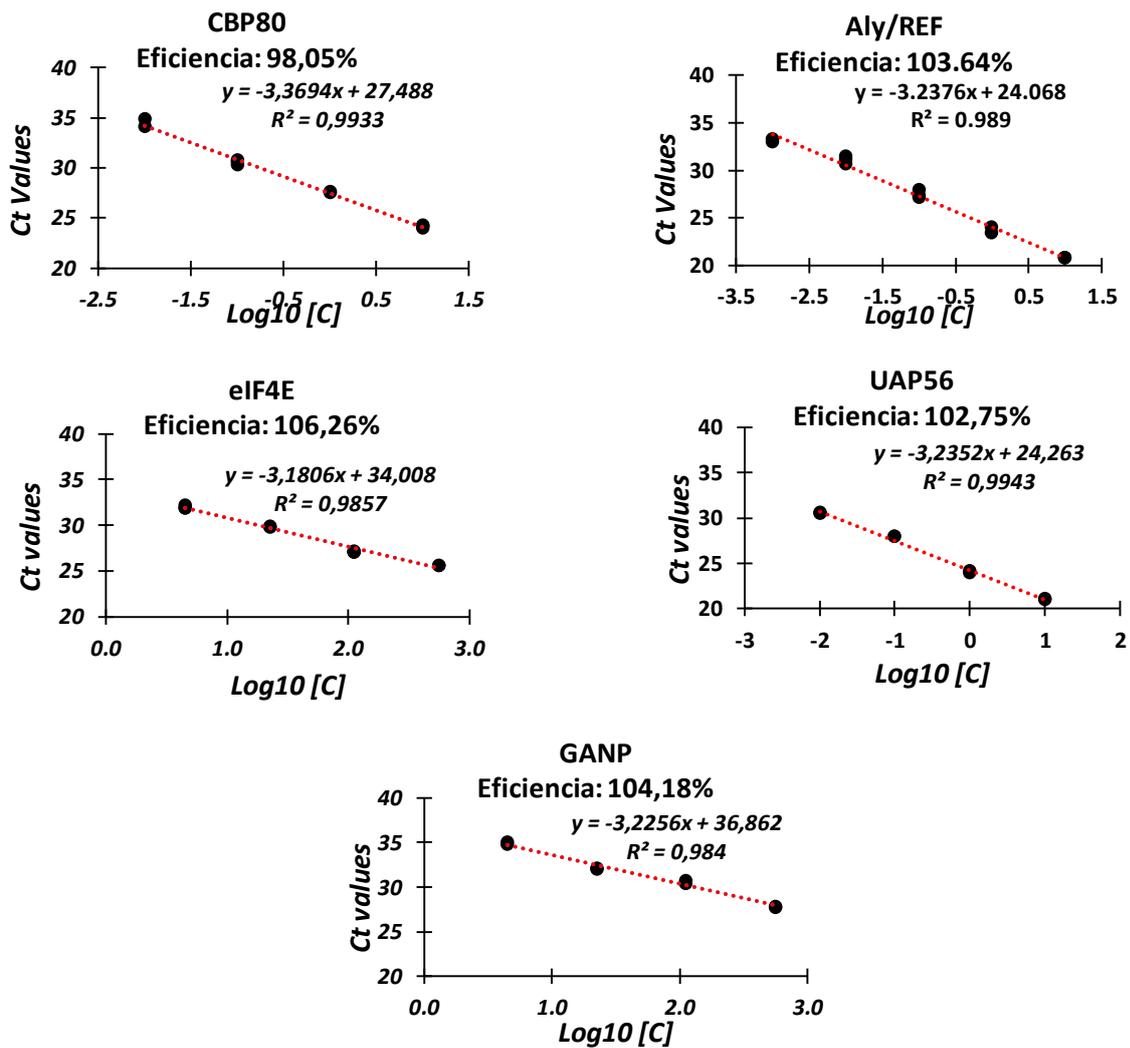
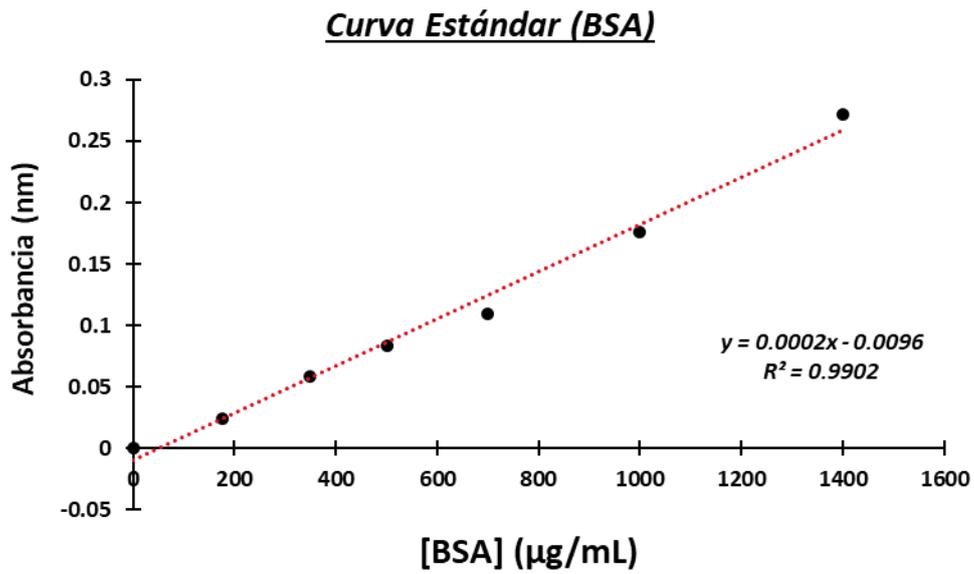
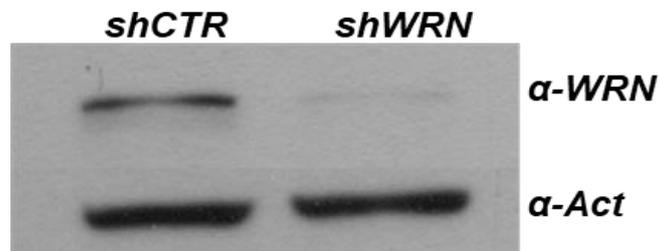


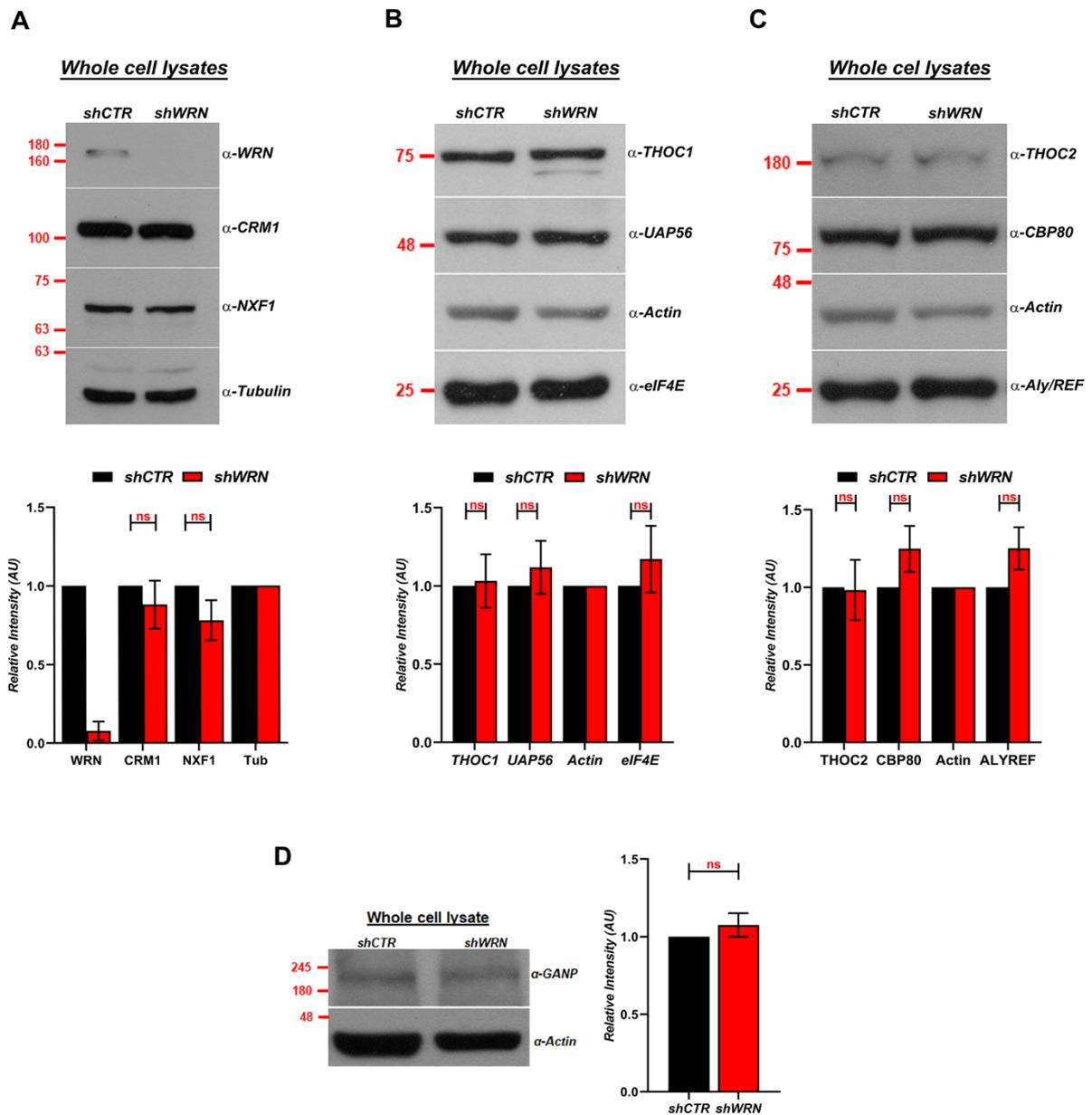
Figura 1. Curvas de eficiencia de cebadores de genes del sistema de transporte de los ARNm. Cada uno de los cebadores utilizados en los ensayos fueron sometidos a un análisis usando diluciones seriadas de muestras de ADNc para calcular su eficiencia según la ecuación de la recta.



*Figura 2.* Cuantificación de proteínas extraídas después de la lisis celular. Análisis de la concentración de proteínas usando el reactivo de Bradford y cuantificados mediante espectrometría con el equipo Biotek-SYNERGY/LX a una longitud de onda de 595 nm. Se usaron diluciones seriadas de BSA para generar la curva estándar.



*Figura 3.* Análisis por Western Blot de la depleción de WRN tras tres días de inducción con doxiciлина. Se confirma la depleción de WRN de más del 80 % en células shWRN con respecto a shCTR.



**Figura 4.** Análisis por Western blot semicuantitativo de los niveles de expresión de las principales proteínas implicadas en el transporte los ARNm células control (shCTR) y células silenciadas para WRN (shWRN). (A) Análisis de los niveles de expresión de las proteínas WRN, NXF1 y CRM1 tras tres días de incubación en presencia de dox. (B, C y D) Análisis comparativo de las proteínas accesorias indicadas. Las gráficas representan la cuantificación de las intensidades de las bandas y normalizadas contra la actina o tubulina como controles de carga. Este ensayo se realizó en tres muestras biológicas. Los datos mostrados representan intensidades relativas  $\pm$  SEM usando la estadística *t* de Student para datos no apareados (ns, sin diferencia significativa) de tres repeticiones biológicas.

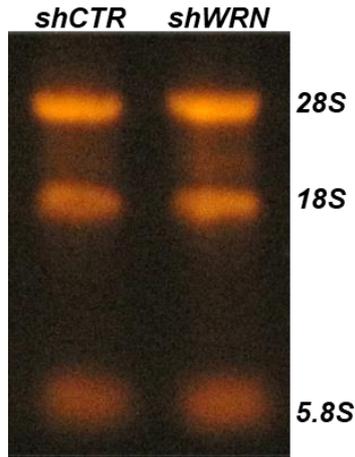


Figura 5. Integridad de los ARN extraídos.

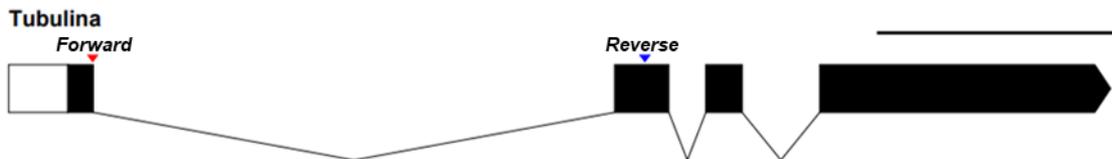
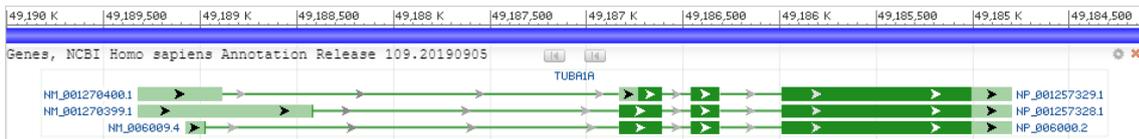
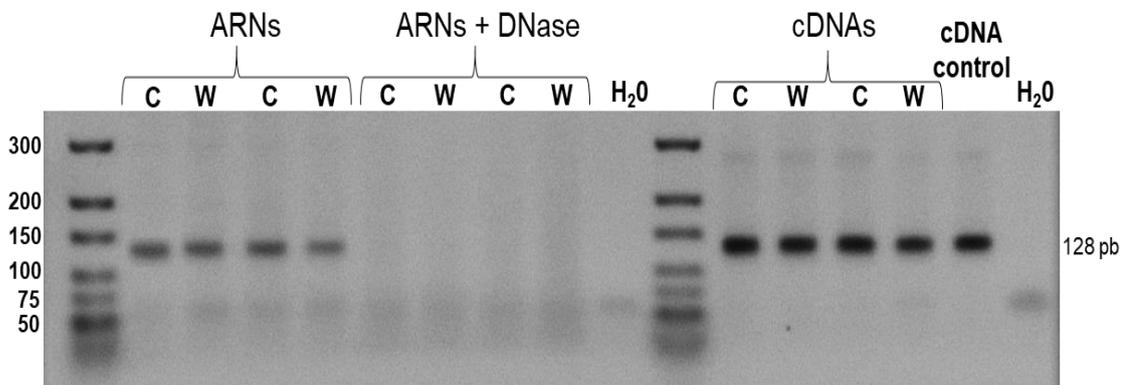


Figura 6. Confirmación del tratamiento con DNasa de los ARN y amplificación de los ADNc recién sintetizados usando cebadores para el gen tubulina como control de amplificación. Abajo, localización de los cebadores del gen tubulina (128 pb) en la secuencia genómica del gen.

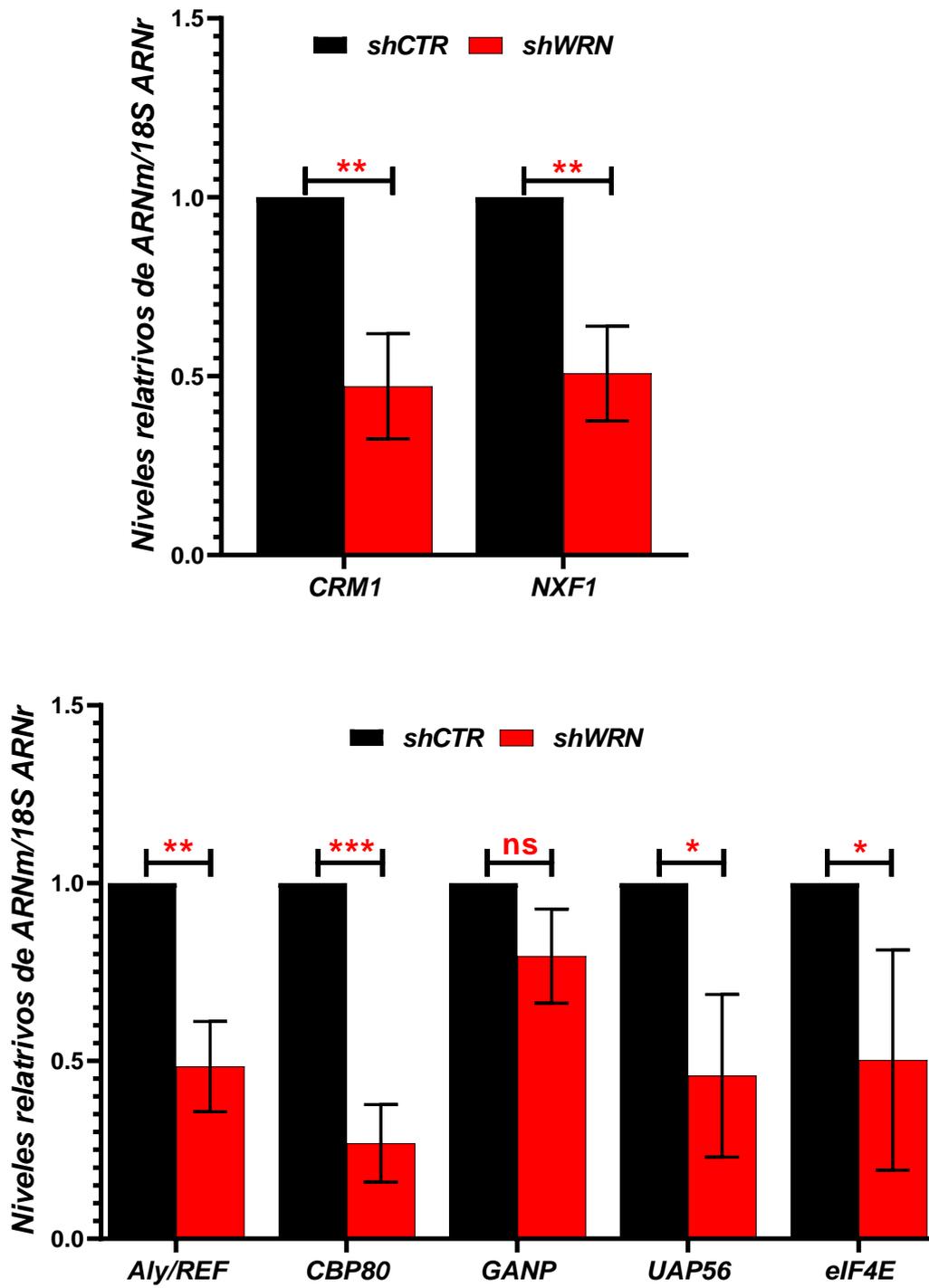
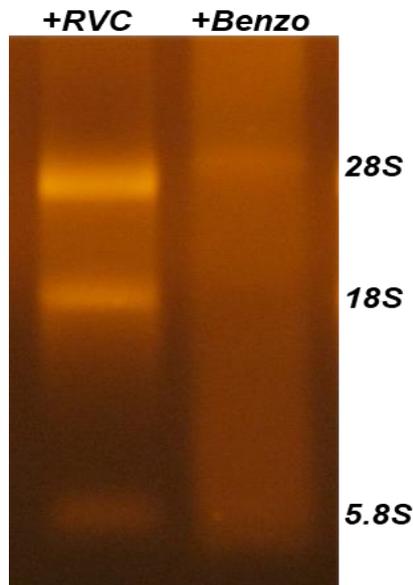
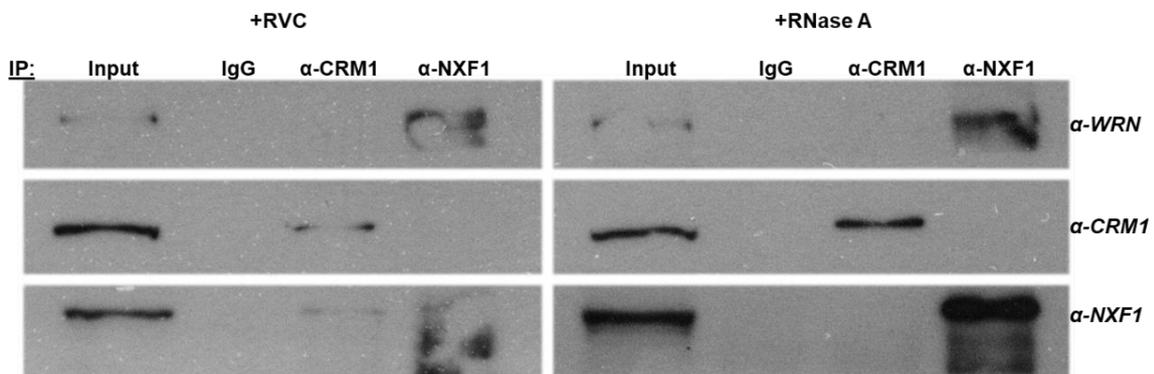


Figura 7. Niveles de expresión de los genes implicados en el transporte de los ARNm tras la depleción de WRN mediante RT-qPCR. Los valores de Ct obtenidos fueron normalizados a los valores de Ct del 18S y comparados entre shCTR y shWRN a los 3 días de inducción de la depleción de WRN.



*Figura 8.* Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, mostrando la confirmación de protección y degradación de los ARNs con los tratamientos de RVC y Benzo (Benzonasa).



*Figura 9.* Ensayo de Co-Imunoprecipitación usando los anticuerpos mencionados. El extracto proteico derivado de las células de cáncer HeLa fue dividido en partes iguales y cada alícuota fue tratada o bien con RVC o bien con Benzonasa. Tras la incubación con los anticuerpos indicados, los inmunocomplejos capturados fueron resueltos en un gel de poliacrilamida y analizados usando los respectivos anticuerpos. Las muestras cargadas en los geles representan el sobrenadante proveniente de las muestras incubadas con los anticuerpos toda la noche.

## XI. Tablas

*Tabla 1*

Lista de cebadores usado en la presente Tesis.

Gen	Secuencias
NXF1	Forward:5-TGAAGTCTGAGCGGGAATTGG-3 Reverse:5-CGAATGGCGCTGATGTAGGT-3
CRM1	Forward:5-GATCCAATGATCCACAGATGG-3 Reverse:5-CACTTCTGGTTCTCTAGCAGC-3
GANP	Forward:5-CATACGGAAGGATATCACGCA-3 Reverse: 5-CATCAAAGGAGGACATGGGC-3
CBP80	Forward: 5-CTGGGAAGATTGGTCAGATTGTC-3 Reverse: 5-CTGATGGTAAGACAACCTCATAAC-3
UAP56	Forward: 5-CCAATGTCAAGGTTGCTGTTT-3 Reverse:5-TGTGTTTGAGGTTGAGGCTCT-3
eIF4E	Forward: 5-CTACAGAACAGATGGGCACTC-3 Reverse: 5-CTGGATATGGTTGTACAGAGC-3
ALY/Ref	Forward: 5-GACGCCGATATTCAGGAACTC-3 Reverse: 5-CATCTGCCTTCCGCTCAAAGT-3
Tubulina	Forward: 5-ATGCGTGAGTGCATCTCCATCCA-3 Reverse:5-CCAATGGTCTTGTCACTTGGCATCT-3
18s rRNA	Forward: 5-CGGCGACGACCCATTTCGAAC-3 Reverse: 5-GAATCGAACCCCTGATCCCCGTC-3

*Tabla 2*

Buffer de lisis Total

Componentes	Concentración final
Tris HCl pH 7,6	25 mM
NaCl	420 mM
NP-40	0,2 %
EDTA	1 mM
PMSF	1 mM
Orto-Vanadato	1 mM
NaF	1 mM
$\beta$ GP	1 mM
PICS	10 ul/mL

*Tabla 3*

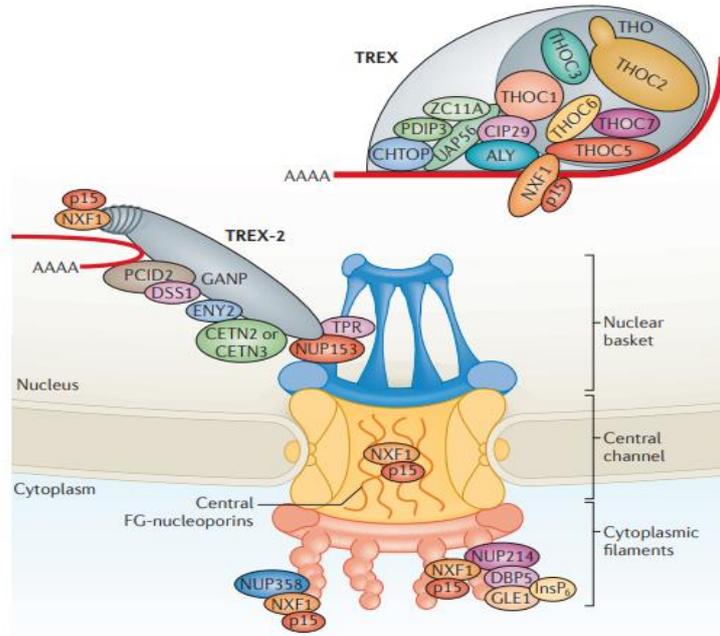
Tampón de carga 2x

Componentes	Para 100 ml
Tris	50 mM
SDS al 20%	150 mM
Bromofenol	50mM
Glicerol 87%	0,5%
$\beta$ -Me	10 ml

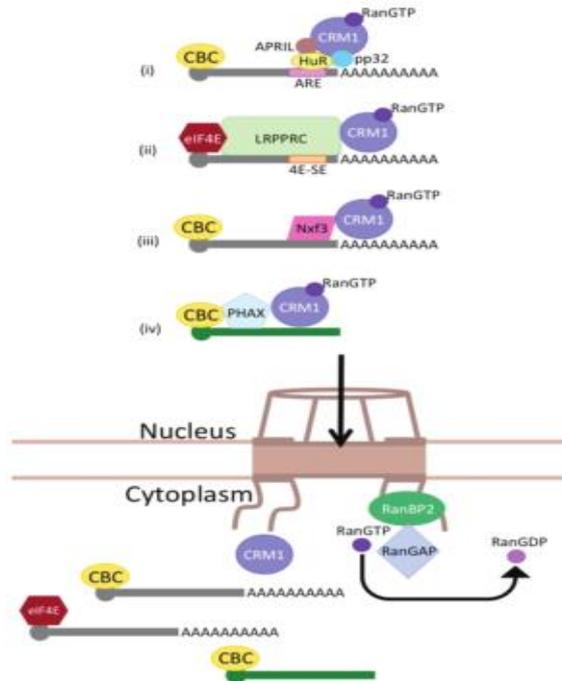
*Tabla 4*

Buffer de lisis total para Co-IP

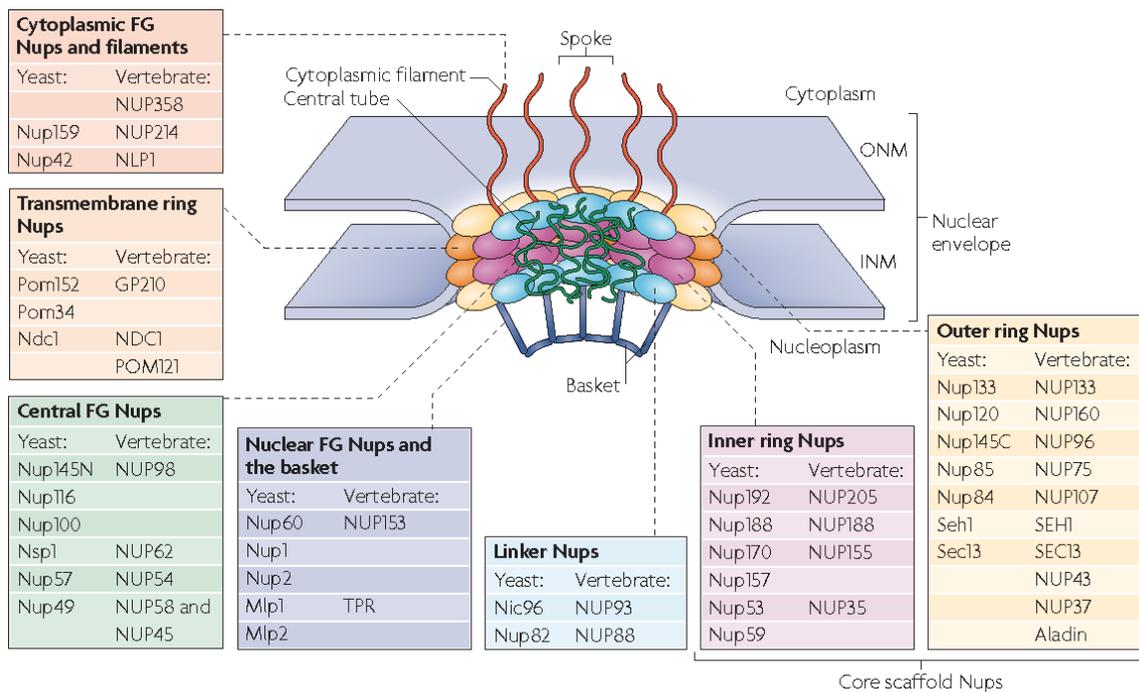
Componentes	Concentración final
HEPES K-OH pH7.5	50 mM
NaCl	150 mM
Acetato de Potasio	50mM
Tx-100	0,5%
NP-40	0,5%
EDTA	2mM



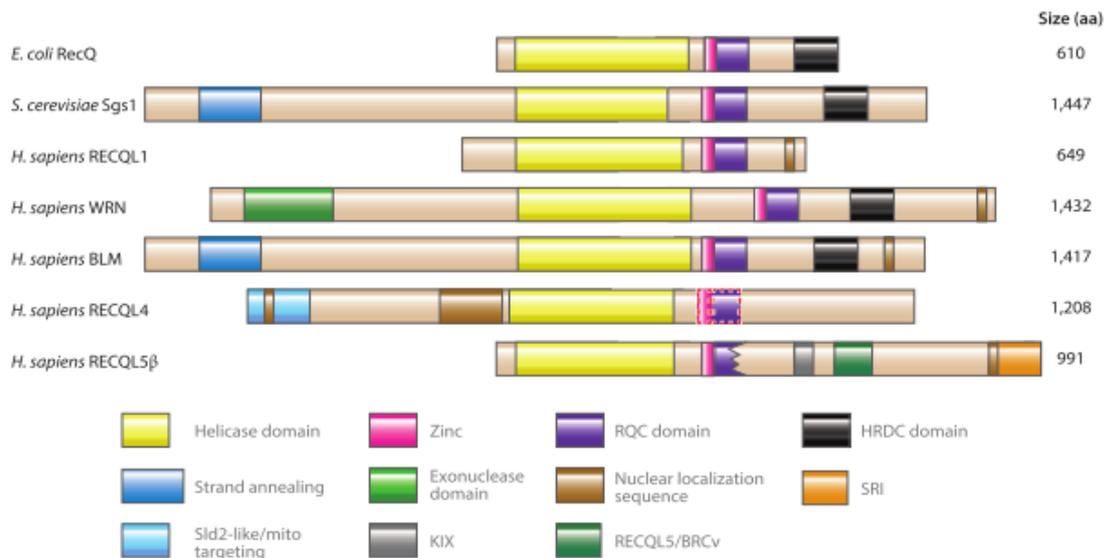
Anexo 1. Complejo TREX 1 y TREX 2. Estos grandes complejos, compuestos por varias proteínas accesorias, se encuentran dentro de la maquinaria de transporte de los ARNm. (Wickramasinghe & Laskey, 2015).



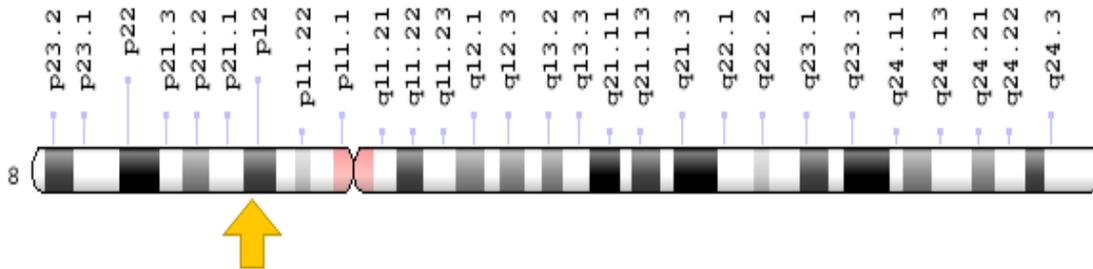
Anexo 2. Exportación de ARNm dependiente de CRM1. CRM1 exporta varios tipos de ARNm. Hay cuatro vías conocidas: (i) mediadas por HuR; (ii) mediada por LRPPRC; (iii) mediada por Nxf3; y (iv) exportación de U snRNA. Cada vía requiere la unión de Crm1 y RanGTP. La Hidrólisis de GTP por RanGAP en la cara citoplasmática del CPN libera ARNm en el citoplasma. (Okamura *et al.* 2015).



Anexo 3. Complejo de poro nuclear. Cada CPN es una estructura cilíndrica que rodea un tubo central que conectan el nucleoplasma y el citoplasma. Se muestran los NUPS con sus homólogos en levaduras y vertebrados (Strambio *et al.* 2010).

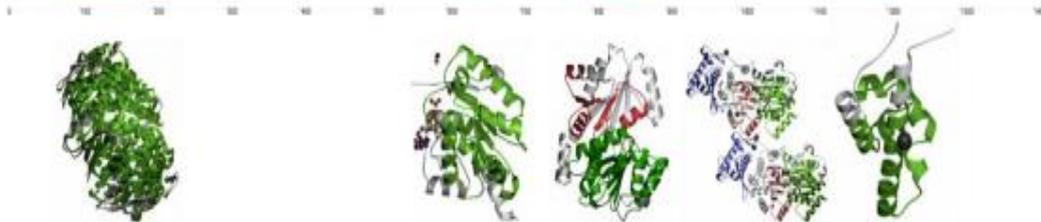


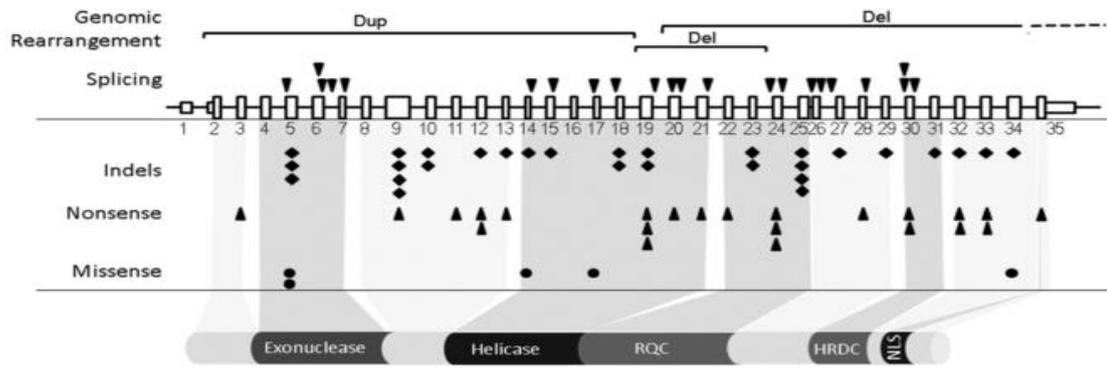
Anexo 4. Miembros de la familia RecQ Helicasas. Se muestran los respectivos dominios característicos de la familia. Se puede apreciar que WRN es el único miembro de la familia que tiene un dominio adicional con actividad 3'-5' exonucleasa. (Croteau *et al.* 2014).



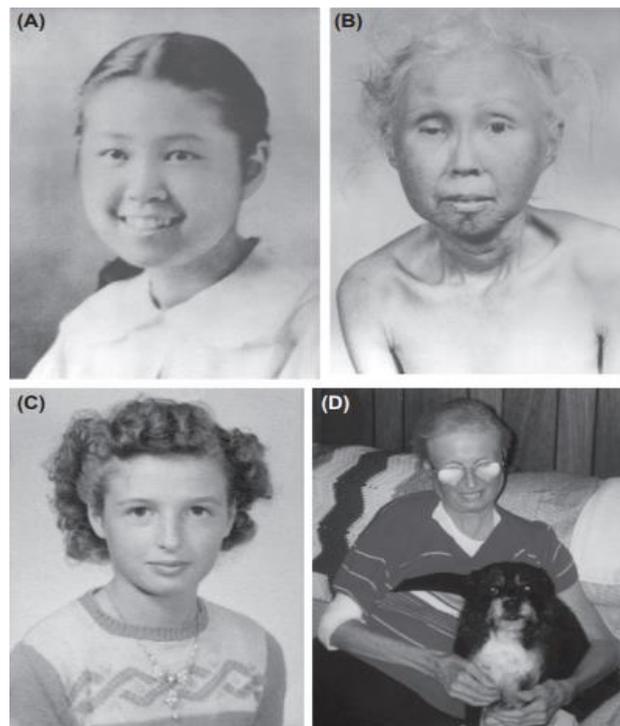
*Anexo 5.* Localización citogenética de la Proteína del Síndrome de Werner: 8p12, brazo corto (p) del cromosoma 8 en la posición 12. Localización molecular: Pares de bases del 31,033,262 al 31,175,871 del cromosoma 8. Imagen tomada de la base de datos del NCBI (Genetic human reference 2019).

*Anexo 6.* Proteína del Síndrome de Werner. Se muestran sus respectivos dominios. La figura fue generada usando la secuencia de la proteína WRN con el programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool).





Anexo 7. Mutaciones en la Proteína del Síndrome de Werner. Las mutaciones se agrupan por los tipos que se muestran a la izquierda. Los reordenamientos genómicos grandes se muestran en la parte superior usando corchetes horizontales, etiquetados como "Dup" para duplicación o "Del" para eliminación. Las mutaciones que afectan el corte y empalme se indican con triángulos invertidos sobre el locus WRN. (Oshima *et al.* 2018).



Anexo 8. Progresión Clínica y características del Síndrome de Werner. (A y B) Caso 1 reportado (A) 15 años y (B) 48 años. (C y D) Fotografías de un segundo paciente a la edad de 13 años (C) y 56 años (D) (Oshima *et al.*,2018).