



Trabajo Final de Carrera de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Desarrollo de un sistema para estudiar la formación de
G-quadruplex de ARN y su eventual rol en la interacción con la
proteína supresora de tumores p53

Fabio Saavedra

Tutor: Ignacio López

Co-orientación técnica: Catalina Barbot

Sección Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo

Octubre 2024

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera expresar mi enorme agradecimiento a mi tutor, Ignacio Lopez, por su amabilidad, vocación de enseñar y amistad que realmente hicieron que este trabajo resultara tanto disfrutable como inmensamente enriquecedor, y mencionar que ha sido un fuerte alentador y orientador en las etapas finales de formación de la carrera. Agradecer a Catalina Barbot, quien me ha orientado de forma muy enriquecedora, por su paciencia y compañerismo.

Agradecer a todo el equipo del laboratorio 305, que me han recibido de forma estupenda y en especial a Andrea Villarino y todo el equipo de estudio de tuberculosis que me han dado la oportunidad de participar en un proyecto de extensión que requería para obtener créditos en esa área.

Mencionar en esta sección, a Juan Pablo Tosar que amablemente nos proporcionó algunos de los reactivos necesarios para realizar determinados ensayos propuestos en este trabajo, que realmente hicieron que los experimentos se realizarán de forma más rápida.

Por último, de más está mencionar el profundo agradecimiento que tengo hacia mi familia que siempre estuvo firme apoyando incondicionalmente y bancando momentos desafiantes.

ÍNDICE

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	7
2.1. La proteína supresora de tumores p53.....	7
2.1.1. Estructura de p53.....	7
2.1.2. Un circuito de retroalimentación controla los niveles celulares de p53.....	9
2.1.3. Isoformas de p53.....	9
2.1.4. La vía p53 se activa en condiciones de estrés celular: La respuesta al daño en el ADN como ejemplo mejor caracterizado.....	11
2.2. El estrés en RE desencadena la respuesta a proteínas desplegada (UPR).....	13
2.2.1. Las tres ramas de la UPR canónica: IRE1, PERK y ATF4.....	13
2.2.2. Durante la UPR se pueden identificar dos fases: temprana y tardía.....	16
2.3. La respuesta de la familia p53 en el estrés del RE: Una vía poco caracterizada en comparación con la respuesta al daño en el ADN.....	16
2.4. ARN G-quadruplex (G4).....	19
2.4.1. La estructura G-quadruplex.....	19
2.4.2. Funciones propuestas de los ARN G4.....	21
2.4.3. Abordajes <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> para identificar ARN G4.....	22
3. Objetivos.....	23
3.1. Objetivo General.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. Materiales y métodos.....	24
4.1. Producción y purificación de plásmidos de interés.....	24
4.2. Evaluación cuantitativa y cualitativa de los plásmidos generados.....	26
4.2.1. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	26
4.2.2. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.....	26
4.2.3. Secuenciación y verificación de las secuencias.....	26
4.3. Expresión de p53 fusionada a APEX en células H1299.....	27
4.3.1. Cultivo de línea celular.....	27
4.3.2. Transfección transitoria y tratamiento con tapsigargina.....	28
4.3.3. Extracción y cuantificación de proteínas.....	29
4.3.4. Western Blot.....	30
4.3.4.1. SDS-PAGE.....	30
4.3.4.2. Transferencia.....	31
4.3.4.3. Stripping.....	31
4.4. Predicción de G-quadruplex <i>in silico</i>	32
4.5. Análisis <i>in vitro</i> de secuencias potenciales formadoras de G4.....	33
4.5.1. Preparación de los oligonucleótidos.....	33
4.5.2. Electroforesis de ARN.....	34
5. Resultados y discusión.....	36
5.1. Obtención de los plásmidos de interés.....	36
5.2. Validación de la expresión y funcionalidad de las proteínas p53 fusionada a APEX2 en células H1299.....	37
5.2.1. Cuantificación de proteínas totales.....	37

5.2.2. Western Blot.....	39
5.3. Evaluación de la formación de estructuras G-quadruplex en secuencias ricas en guaninas.....	44
5.3.1. Predicción de G-quadruplex <i>in silico</i>	44
5.3.2. Análisis <i>in vitro</i> de secuencias potenciales formadoras de G4.....	47
6. Conclusiones y perspectivas.....	53
7. Bibliografía.....	55
8. Anexos.....	60
8.1. Secuencias obtenidas de los plásmidos generados.....	60
8.2. Soluciones gel de agarosa.....	66
8.3. Medio de cultivo:.....	66
8.4. Solución extracción de proteínas.....	66
8.5. Soluciones y marcador de peso molecular utilizado Western Blot.....	67
8.6. Soluciones utilizadas en electroforesis de ARN.....	68

1. Resumen.

La proteína supresora de tumores p53 contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular modulando respuestas a distintos tipos de estrés, como daño en el ADN, activación de oncogenes o estrés oxidativo, actuando principalmente como factor de transcripción. p53 posee dominios de unión a ADN y de transactivación que contribuyen con su capacidad de regular la expresión de genes vinculados a funciones celulares vitales, actividad afectada por muchísimas mutaciones descritas en cáncer. De hecho, *TP53*, el gen que codifica para p53, ha sido reconocido como el gen con mayor frecuencia de alteraciones somáticas en cáncer en humanos. En células humanas, el gen *TP53* podría producir 12 isoformas de p53 con funciones biológicas específicas y no superpuestas, lo que contribuye a diversificar la función de p53 en respuesta a diferentes situaciones de estrés. En particular, la isoforma p47 carece de los primeros 39 aa de p53, quienes constituyen el dominio de transactivación I, en donde se encuentran importantes sitios de unión a proteínas que regulan su actividad transcripcional y su estabilidad. Llamativamente, la expresión de p47 se induce específicamente mediante mecanismos de inicio alternativo de la traducción independientes de la caperuza (5'Cap) durante la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) activada para resolver el estrés en el retículo endoplásmico (RE).

La UPR es una respuesta adaptativa desencadenada para restaurar la homeóstasis del RE cuando ocurre una acumulación excesiva de proteínas mal plegadas o agregadas en su lumen. Esto puede ocurrir en condiciones fisiológicas en células que sintetizan y secretan elevada cantidad de proteínas y también en situaciones patológicas dentro de las que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer y la diabetes.

En contexto de estrés en el RE, parece de particular relevancia la regulación post transcripcional por la vía p53. Se ha reportado que tanto p53 como p47 suprimen la traducción de *p21*, *MDM2*, *MDMX* y *BIP*, en algunos casos mediante interacción directa con los ARNm. Estas observaciones ilustran la capacidad de unión al ARN de p53, una propiedad mucho menos caracterizada que la de unión al ADN que media la función de p53 como regulador transcripcional.

Datos no publicados del laboratorio sugieren que p53 controla la expresión de un conjunto amplio de ARNm de forma post-transcripcional en la UPR. Algunos de estos ARNm tienen en sus regiones 5' no traducidas (5'UTRs) secuencias ricas en guaninas con potencial de formar G-quadruplex (G4). Los G4 son estructuras no canónicas de ácidos nucleicos implicadas en muchos procesos celulares esenciales como transcripción, splicing, ensamblaje de ribonucleoproteínas (RNPs), localización y traducción de ARNs. El enriquecimiento de estas secuencias en ARNm con expresión controlada por p53 permite

plantear la hipótesis de que actúen como una plataforma de regulación, tal vez a través de interacciones directas con la proteína p53.

Para estudiar eventuales interacciones entre p53 y G4 en ARNm, en este trabajo desarrollamos en paralelo las herramientas para identificar ARNm cercanos a p53 y su isoforma p47 durante la UPR en un modelo celular y desarrollamos un sistema *in vitro* para estudiar la formación de G4 en oligos de ARN. Los ARNs cercanos a p53 y p47 se identificarán por una aproximación de marcaje con la enzima ascorbato peroxidasa APEX2 acoplado a secuenciación masiva. Para ello, generamos construcciones de p53 fusionada a APEX2 y validamos su patrón de expresión y funcionalidad. En paralelo, determinamos *in silico* que las 5'UTRs de ARNm candidatos con posible regulación traduccional mediada por p53 tienen potencial para formar G4. Por último, generamos un sistema que nos permitió identificar la formación de ARN G4 *in vitro*, mediante una sonda fluorescente específica en electroforesis en gel de poliacrilamida.

2. Introducción.

2.1. La proteína supresora de tumores p53

La proteína p53 se describió por primera vez en 1979 como una proteína asociada al antígeno T grande del virus de simio 40 en células transformadas. Inicialmente fue considerada como un oncogén pero estudios posteriores establecieron que en realidad es un supresor de tumores. El nombre hace referencia a su masa molecular aparente, debido a que migra como una banda de 53 kDa en electroforesis desnaturalizante [1,2]. p53 funciona principalmente como un factor de transcripción que puede regular la expresión de múltiples genes y desempeña un rol fundamental en el control del ciclo celular, la apoptosis y la estabilidad genómica. Por esto último, ha recibido el nombre de "guardián del genoma" [1,3]. Estudios más recientes han demostrado que p53 también regula el metabolismo celular, la ferroptosis, el microambiente tumoral y la autofagia, entre otras funciones que contribuyen a la supresión tumoral [1,4,5].

p53 está codificada en el gen *TP53*, que ha sido reconocido como el gen con mayor frecuencia de alteraciones somáticas en cáncer en humanos. Las alteraciones encontradas con mayor frecuencia incluyen la pérdida de alelos y las mutaciones puntuales que generan pérdida o ganancia de función. De las mutaciones reportadas, el 90 % son puntuales y principalmente están localizadas en el dominio de unión al ADN (DBD). Además, la proteína también puede ser inactivada mediante secuestro por antígenos virales y por proteínas reguladoras propias de la célula huésped u oncogenes [1,6].

2.1.1. Estructura de p53.

p53 humana es una proteína multidominio que consta de 393 aminoácidos. Contiene 5 dominios: i) Dominio de transactivación I (TADI), ii) Dominio de transactivación II (TADII), iii) Dominio de unión al ADN (DBD), iv) Dominio de oligomerización o tetramerización (TET) y v) Dominio carboxi-terminal de regulación. Además tiene una región rica en prolinas (PRD) que actúa como bisagra entre los TAD y el DBD. La forma transcripcionalmente activa de p53 es un homotetrámero, teniendo cada uno de sus monómeros un peso molecular aparente 53 kDa (Figura 2.1) [3,5,7]. A continuación se describen algunas características generales de cada uno de los dominios.

i) El TADI se localiza entre los aminoácidos 1 y 42 del extremo amino terminal, puede unirse a componentes de la maquinaria de transcripción y a reguladores transcripcionales. Es el sitio de unión con las proteínas MDM2 y MDMX [7,8].

ii) El TADII comprende la región entre los aminoácidos 42 y 92 y también puede unirse a los componentes que controlan la transcripción y a otros interactores. En conjunto con TADI constituyen importantes sitios de modificaciones postraduccionales que regulan la actividad de p53. En particular, la fosforilación de TAD sirve como un interruptor para activar y desactivar rápidamente la función de p53 [3,7,8].

A pesar de no estar definida como un dominio *per se*, la PRD, que se extiende entre los aminoácidos 92 y 102, es de gran importancia en la función de p53. Por ejemplo, es necesaria para que p53 promueva la detención del ciclo celular y la apoptosis, principalmente desempeñando un rol en la transducción de señales mediante la unión a los dominios de homología Src3 [7,8].

iii) El DBD se localiza entre los aminoácidos 102 y 316, es responsable de la unión a secuencias específicas en el ADN diana, y por lo tanto es fundamental para la función biológica de p53 como factor de transcripción. A su vez, el DBD también es capaz de interactuar con diversas proteínas [3,5,7].

iv) El TET comprende los aminoácidos 316 al 363, permite la formación del homotetrámero funcionalmente activo a nivel de la transcripción. Contiene una señal de localización nuclear (NLS) rica en leucina altamente conservada [3,7].

v) El CTD se extiende entre los aminoácidos 363 y 393. Está implicado en múltiples funciones reguladoras, incluida la unión al ADN, el reclutamiento de cofactores y la estabilización de la proteína. Presenta una extenso repertorio de modificaciones postraduccionales, incluyendo acetilación, metilación y fosforilación [7,9].



Figura 2.1. Esquema de la estructura de p53. Se muestran las regiones de la proteína que constituyen los dominios funcionales de p53. TAD1: Dominio de transactivación 1. TAD2: Dominio de transactivación 2. PRD: Dominio rico en prolina. DBD: dominio de unión al ADN. NLS: Señal de localización nuclear. TD: Dominio de tetramerización. REG: Dominio regulador C-terminal. Modificado de [7].

2.1.2. Un circuito de retroalimentación controla los niveles celulares de p53.

p53 es una proteína de vida media corta cuya actividad está regulada a diferentes niveles de la expresión génica, siendo los más relevantes la transcripción, el splicing, traducción, modificaciones post-traduccionales, localización sub-celular y la degradación. En condiciones normales, los niveles celulares de p53 son muy bajos debido al estricto control por parte de sus reguladores negativos, MDM2 y MDMX [10,11] .

MDM2 inhibe la actividad de p53 principalmente a dos niveles. Por un lado, la simple unión con p53 actúa como un mecanismo de secuestro, disminuyendo la concentración efectiva de p53. Por otro lado, MDM2 contiene un dominio RING C-terminal y es una ubiquitina ligasa E3 que promueve la degradación de p53 por el proteasoma. MDMX contiene un dominio RING similar que carece de actividad ubiquitina ligasa E3 e inhibe la actividad de p53 uniéndose y enmascarando su dominio de activación transcripcional. Ambas proteínas tienen actividad no superpuestas y se complementan en la regulación negativa de p53 [10–12].

Por el contrario, cuando las células se exponen a algunos tipos de tensiones, como el daño en el ADN o la activación de oncogenes, p53 se activa por una serie de modificaciones postraduccionales, principalmente fosforilación en el dominio de transactivación (TAD). Esto conduce a la disociación de MDM2 y de MDMX, exposición de la señal de localización nuclear (NLS) y translocación al núcleo para regular una amplia gama de genes. A su vez, p53 es capaz de inducir la transcripción de *MDM2*, conformando un circuito de retroalimentación que controla los niveles celulares de p53 [12,13].

2.1.3. Isoformas de p53.

Además del extenso repertorio de interacciones con diversas macromoléculas y modificaciones post-traduccionales que ocurren sobre p53, la integración de señales y la organización de respuestas celulares abarcadas por p53 también son moduladas por la existencia de isoformas proteicas. A partir del gen *TP53* podrían producirse hasta 12 isoformas de p53 en células humanas con algunas funciones biológicas distintivas y no superpuestas. Las isoformas se producen mediante una variedad de mecanismos, incluidos promotores alternativos, sitios de empalme alternativos e inicio de traducción alternativo. Todas las isoformas de p53 conservan el DBD (aunque algunas de forma incompleta) y difieren principalmente en las regiones N- y C-terminal. Los estudios existentes hasta el momento sugieren que la modulación de la expresión génica es específica de cada isoforma de p53 y depende de la célula y del contexto. No obstante, la caracterización de las respuestas promovidas y la relevancia biológica de algunas de las isoformas es incierta, ver Figura 2.2 [7,14–16].

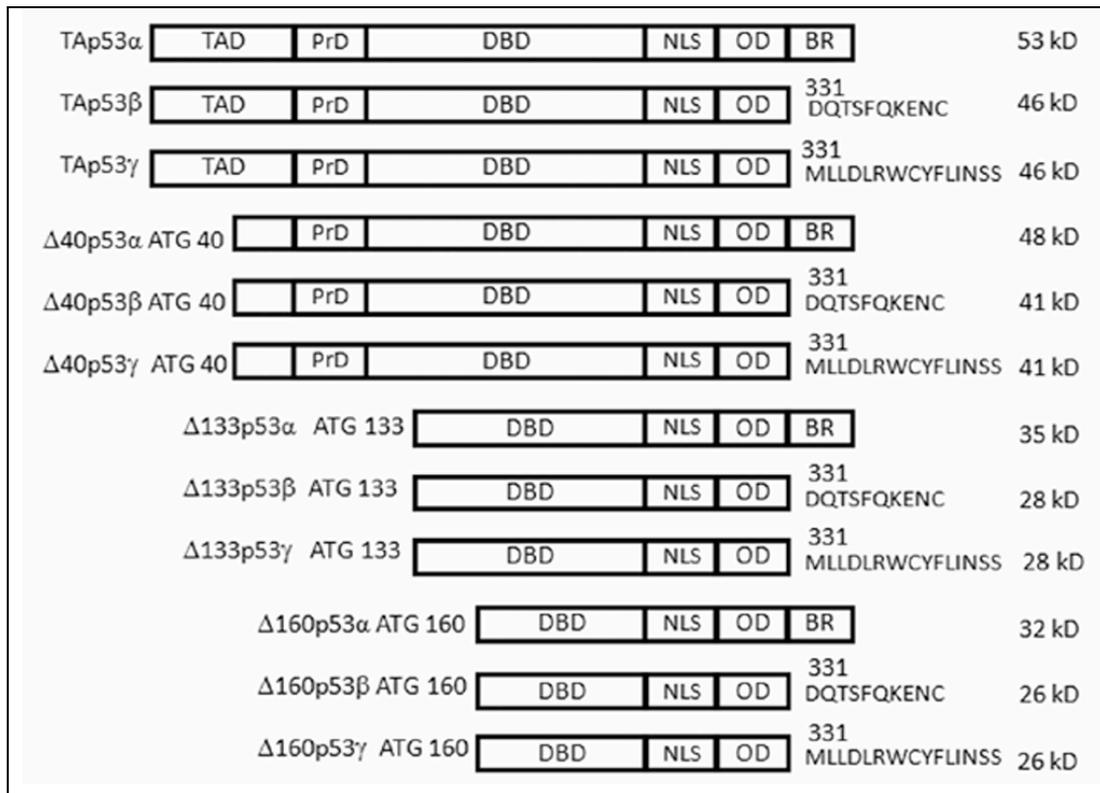


Figura 2.2. Esquema de las 12 isoformas propuestas de la proteína p53. Se muestran los diferentes dominios que las componen. Las isoformas son generadas mediante empalme alternativo, el uso alternativo de promotores y de sitios de iniciación de la traducción. La isoforma p47, también denominada Δ 40p53 α , se produce por inicio alternativo de la traducción a partir del AUG40. TAp53: Isoforma de longitud completa. TAD: Dominio de transactivación. PrD: Dominio rico en prolina. DBD: dominio de unión al ADN. NLS: Señal de localización nuclear. OD: Dominio de oligomerización. BR: Región básica o C-terminal regulador. Modificado de [15]

En particular, la isoforma p47 (p53/47, Δ 40p53, Δ 40p53 α , p53 Δ N40) se produce por inicio alternativo de la traducción inducido específicamente durante la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) después del estrés del RE por la proteína PERK o quinasa del RE similar a la proteína quinasa activada por ARN doble hebra (PKR), ver esquema de la Figura 2.3 [17]. La región codificante comprendida entre el +1 y el +118 del ARNm de p53 corresponde a la región 5' no traducida (5'UTR) de p47 y contiene un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) que promueve la traducción cuando la síntesis general de proteínas dependiente del 5'cap se ve comprometida en el estrés en el RE [16–18]. La proteína p47 carece de los primeros 39 aa de p53, que corresponden íntegramente con el dominio TAD1, en donde se encuentran los sitios de unión de varias proteínas, siendo de particular

importancia los de algunos factores de la maquinaria de transcripción y los de los reguladores negativos MDM2 y MDMX. Como resultado, p47 parece tener una vida media prolongada y controlar un conjunto de genes diferentes con respecto a p53. Esto es particularmente relevante en condición de estrés en el RE dado el cambio relativo de expresión entre estas isoformas. Sin embargo, p47 conserva los dominios de oligomerización y puede formar heterooligómeros con p53, lo que sugiere una capacidad adicional de control de la actividad de la familia p53 [16–18].

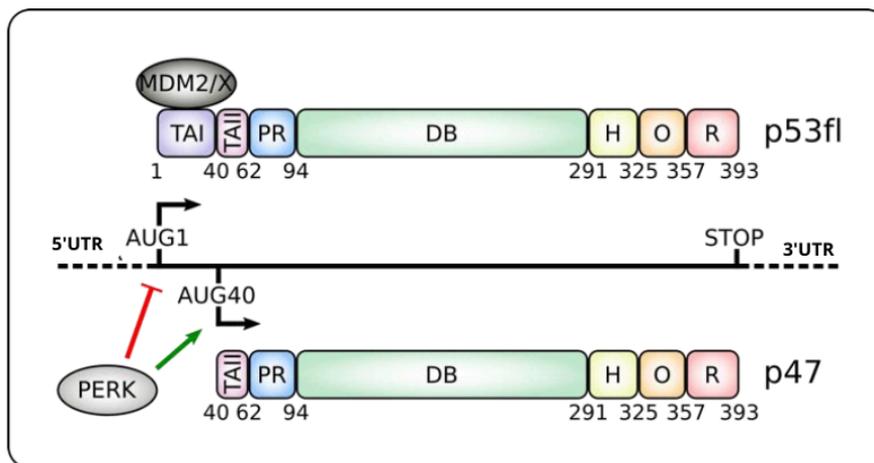


Figura 2.3. Isoformas relevantes para este trabajo producidas a partir del mismo ARNm de p53. El inicio alternativo de la traducción a partir de los codones AUG1 o AUG40 da lugar a las isoformas p53 o p47, respectivamente. El estrés del RE y la inducción de la UPR conducen a la activación de PERK que favorece el inicio de la traducción dependiente de IRES de p47. UTRs de 3' y 5': Regiones no traducidas. Modificado de [17].

2.1.4. La vía p53 se activa en condiciones de estrés celular: La respuesta al daño en el ADN como ejemplo mejor caracterizado.

La activación de la vía p53 en respuesta a daños y tensiones celulares sirve para detener las células en diferentes fases del ciclo celular donde puede tener lugar la reparación adecuada o para inducir fenotipos irreversibles como senescencia o apoptosis [19,20].

La respuesta al daño del ADN (DDR, del inglés DNA damage response) consiste en un conjunto de cascadas de señalización que modulan la expresión génica a diferentes niveles y de sistemas efectores que promueven la reparación del ADN. La DDR desencadena distintas vías de reparación, cada una específica para una clase particular de lesión en el ADN [20,21].

La activación de p53 durante la DDR ha sido bien estudiada y en parte está mediada por la fosforilación del TAD N-terminal por las quinasas ATM o ATR. En consecuencia, la

modificación postraduccional impide la interacción con los reguladores negativos MDM2 y MDMX, y por consiguiente, p53 se estabiliza y acumula. Sucesivamente, p53 estimula y suprime la expresión de diferentes conjuntos de genes que tienen como objetivo prevenir el crecimiento anormal de las células mediante la detención reversible del ciclo celular. En particular, p53 activa a nivel transcripcional a *p21* (*p21WAF1/CIP1*), un inhibidor de los complejos ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) de fase G1 y S. De esta manera se prolonga la fase G1 para permitir que ocurran los procesos de reparación del ADN antes de la replicación del genoma, lo que se esquematiza en la Figura 2.4 [19–21]. En caso de daño extenso e irreparable en el ADN, p53 promueve procesos más drásticos como apoptosis mediante inducción de moduladores proapoptóticos como Puma, Bax y Noxa. A su vez, se sugiere que p53 se une directamente a las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1) en determinados contextos celulares de estrés e inhibe su función, por tanto contribuyendo aún más al desencadenamiento de la apoptosis [20,21].

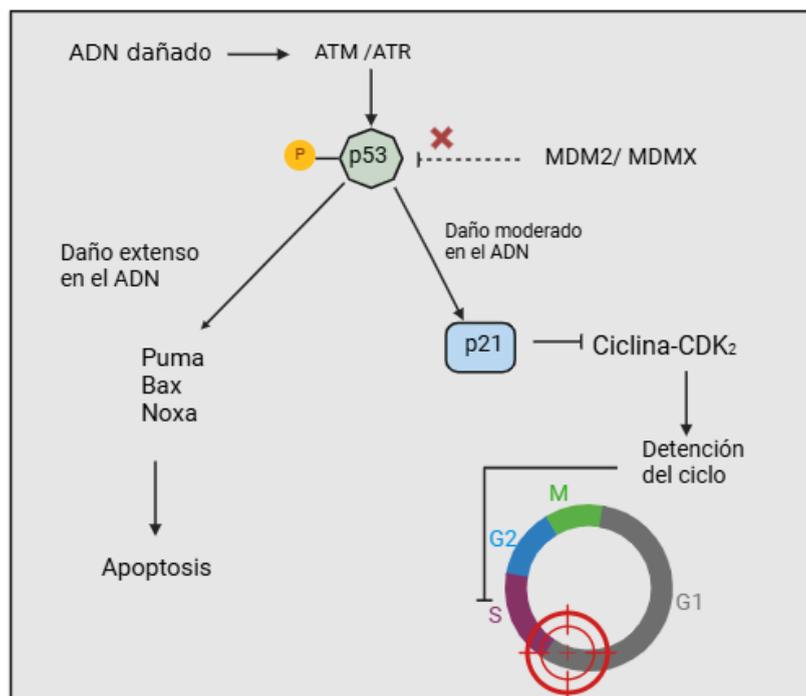


Figura 2.4. Esquema simplificado del rol de p53 en la respuesta al daño en el ADN. p53 fosforilado se acumula e induce la expresión de p21, lo que conduce a la detención del ciclo celular en fase G1. En caso de daño extenso en el ADN, p53 desencadena la apoptosis al modular la expresión de proteínas pro-apoptóticas. Creado en BioRender.com.

2.2. El estrés en RE desencadena la respuesta a proteínas desplegada (UPR).

El RE es el compartimento subcelular involucrado en la síntesis, plegamiento, maduración, control de calidad y degradación de proteínas de secreción y transmembrana, y garantiza que solo las proteínas correctamente plegadas lleguen a su sitio de acción. Las proteínas mal plegadas son potencialmente perjudiciales para las células y, por lo tanto, están estrictamente controladas. Cuando la capacidad de plegamiento de proteínas del RE es insuficiente y un desequilibrio entre la demanda celular y la función del RE amenaza la homeostasis, las células activan la respuesta a proteínas desplegadas [22,23]. Existen varias condiciones fisiológicas y patológicas que pueden desencadenar estrés del RE, dentro de las que se encuentran inanición de glucosa, modificación del flujo de calcio a través de la membrana del RE, síntesis y secreción elevada de proteínas, falla del plegamiento, transporte o degradación de proteínas, estrés oxidativo, entre otros [23,24]. La función del RE se ve comprometida en condiciones patológicas como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y la diabetes. En el cáncer, el crecimiento rápido e incontrolado de las células tumorales requiere altas tasas de producción de proteínas que satura la capacidad de plegamiento del RE y activa la consiguiente UPR. A su vez, el cáncer se caracteriza por inestabilidad genética y alta tasa de mutaciones, que pueden afectar el sistema de procesamiento de proteínas del RE [23,24].

La UPR tiene como objetivos reducir la síntesis de proteínas, eliminar las proteínas desplegadas y/o mal plegadas y aumentar la capacidad del RE para plegar proteínas. En caso de no poder restaurar la homeostasis del RE, las vías de señalización promueven la muerte celular [22–24].

2.2.1. Las tres ramas de la UPR canónica: IRE1, PERK y ATF4.

En eucariotas superiores, la UPR está controlada principalmente por tres sensores transmembrana del RE: la enzima 1 que requiere inositol (IRE1), PERK o quinasa del RE similar a la proteína quinasa activada por ARN doble hebra (PKR) y el factor de transcripción activador 6 (ATF6). Estos tres sensores, en condiciones normales, se encuentran inactivos por unión de su dominio luminal a la chaperona residente del RE, la proteína de unión a inmunoglobulina (Bip), también conocida como Hsp70 y GRP78. En condición de acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, se activa BiP y se asocia a las proteínas desplegadas, liberando los tres sensores transmembrana. Sucesivamente, se desencadenan las vías de señalización adaptativas iniciadas por IRE1, PERK y ATF6, como se describe a continuación y se esquematiza en la Figura 2.5.

IRE1 disociada de BiP forma homo-oligómeros, los que se trans-autofosforilan por proximidad resultando en la activación de sus dominios RNasa citosólicos. Sucesivamente, IRE1 activado realiza una escisión selectiva de un intrón no canónico de 26 nucleótidos del ARNm de la proteína de unión a la caja X 1 (XBP1). El empalme de *XBP1* es independiente del espliceosoma y se produce la isoforma *XBP1s*. La proteína *XBP1s* es un factor de transcripción de una amplia gama de genes, cuyos productos proteicos están implicados en aliviar el estrés y restaurar la homeostasis del RE. En particular, promueve la expresión de chaperonas, foldasas y componentes de la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD). La actividad RNasa de IRE1 también puede dirigirse eficientemente a otros ARNm a través de un mecanismo llamado desintegración regulada dependiente de IRE1 (RIDD). Es un mecanismo conservado en eucariotas que permite degradar ARNm que contienen la secuencia consenso “*CUGCAG*” acompañada de una estructura de bucle de tallo. En consecuencia, RIDD es un mecanismo que permite reducir la carga proteica en el RE a través de la degradación de múltiples ARNm [23,24].

La proteína quinasa **PERK** libre de BIP también se activa por oligomerización en la membrana del RE y se trans-autofosforila. Sucesivamente, PERK fosforila la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 (eIF2 α), implicado en la regulación del primer paso de iniciación de la síntesis de proteínas al promover la unión del ARN de transferencia (ARNt) iniciador a las subunidades ribosómicas 40S. Esto determina una regulación a la baja de la síntesis global de proteínas dependientes de 5'Cap. El bloqueo de la traducción durante el estrés del RE reduce la carga de proteínas en la maquinaria de plegado del RE contribuyendo con la resolución del estrés. Sin embargo, algunos ARNm se traducen de manera eficiente durante la represión global ejercida por PERK, principalmente a través de mecanismos independientes de 5'Cap, como se ha descrito para la isoforma p47. Otro ejemplo es el factor de transcripción activador 4 (ATF4) que se traduce mediante un mecanismo de escaneo en un marco abierto de lectura (ORF) alternativo favorecido en el contexto de UPR [23,24]. De forma similar, Bip presenta elementos reguladores en su 5'UTR y en el ORF que permiten su traducción sostenida en contexto de UPR. La célula debe asegurar que los ARNm que codifican factores de reparación o de resolución de la UPR sean debidamente traducidos [24,25].

Las estructuras secundarias del ARN son dinámicas, pueden ser moduladas por múltiples proteínas y desempeñan un papel esencial en la regulación de la expresión génica. En particular, los elementos estructurados en 5' UTR y 3'UTR tienen un rol fundamental en la regulación traduccional mediante una amplia gama de mecanismos [26,27]. Como se ha mencionado anteriormente, los IRES constituyen el mecanismo principal de inicio de la traducción independiente de 5'Cap, que promueve el reclutamiento de las subunidades

ribosomales y factores de iniciación eucariotas. Por otro lado, los elementos estructurados pueden determinar el escaneo e inicio de la traducción en codones AUG alternativos, como es el caso de ATF4. Además, las estructuras secundarias formadas en los ARNm pueden ocultar o exponer sitios de unión para los reguladores de la traducción [26,27]. En el contexto de este trabajo, es importante señalar que los G-quadruplex (G4), estructuras no canónicas de ácidos nucleicos, podrían estar implicadas en la regulación traduccional, de particular relevancia en contextos en los que la traducción iniciada por 5'Cap se encuentra suprimida (ver más abajo).

ATF4 induce a nivel transcripcional la expresión del factor de transcripción homólogo de la proteína de unión a CAAT/potenciador (CHOP). En conjunto, ATF4 y CHOP inducen directamente genes implicados en la síntesis de proteínas y en la UPR [24].

ATF6 pertenece a una extensa familia de proteínas que presentan el motivo estructurado de cremallera de leucina (bZIP), es activado en UPR e induce la transcripción de chaperonas moleculares destinadas a aliviar el estrés en el RE. La vía ATF6 involucra su translocación al Golgi luego de haberse dissociado de BiP, donde primero es clivado por la proteasa del sitio-1(S1P), separando ATF6 en dos mitades. El extremo amino terminal permanece anclado a la membrana y posteriormente es escindido por la proteasa del sitio-2 (S2P). El dominio citosólico denominado ATF6f se libera de la membrana y se transloca al núcleo para activar los genes diana en respuesta al estrés del RE [24,28]. De hecho, ATF6f induce la expresión de *XBP1* y *CHOP*, lo que determina una convergencia con las cascadas de señalización IRE1 y PERK, promoviendo una amplificación de la UPR [24,29].

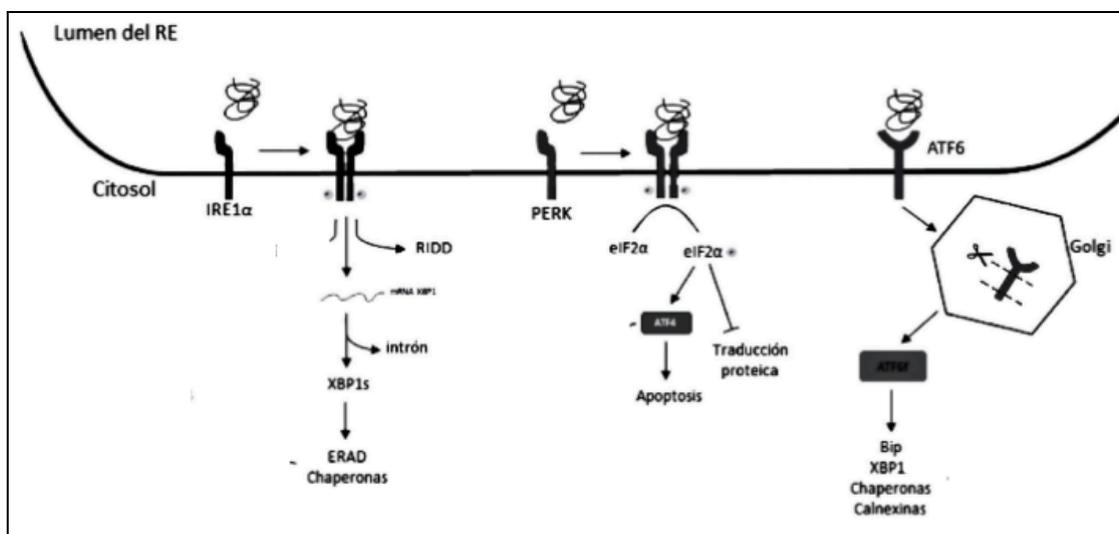


Figura 2.5. Esquema simplificado de las 3 vías canónicas de la UPR en mamíferos. El objetivo de la señalización de la UPR consiste en reducir la síntesis de proteínas, eliminar las proteínas desplegadas y aumentar la capacidad del RE para plegar proteínas. RIDD: desintegración regulada dependiente de IRE1. Modificado de [30].

2.2.2. Durante la UPR se pueden identificar dos fases: temprana y tardía.

En conjunto, las tres vías de la UPR estimulan muchas respuestas adaptativas para restaurar la función del RE y mantener la supervivencia celular. El impacto temprano de la activación de la UPR implica la puesta en marcha de programas de regulación transcripcionales, traduccionales, degradación de proteínas, regulación de membranas asociadas a mitocondrias (MAM) e impacto global en el metabolismo [23,24,30].

Los dos programas activados de degradación de proteínas en la UPR incluyen la degradación mediada por ubiquitina-proteasoma a través de ERAD y la degradación de proteínas mediada por lisosomas a través de la autofagia. La ERAD conforma un complejo proteico que promueve la translocación de proteínas mal plegadas del RE al citosol, donde son degradadas por el proteasoma. Sin embargo, cuando la acumulación de proteínas mal plegadas supera a la capacidad del ERAD, se induce la autofagia para limitar la acumulación de proteínas [24,29].

La activación prolongada de la UPR y la incapacidad para restaurar la homeostasis celular promueve un cambio de señal de pro-supervivencia a pro-muerte. En consecuencia, se induce a las células a la apoptosis, la necrosis/necroptosis o la muerte celular por autofagia.

La apoptosis se puede desencadenar por dos vías: vía intrínseca (mitocondrial) o extrínseca (vía receptor de muerte). Por medio de ambas vías, se desencadena la activación de las proteínas caspasas, en donde las tres ramas de la UPR convergen, con la participación de un conjunto amplio de reguladores, entre los que podría estar incluida la proteína p53 [24,29].

2.3. La respuesta de la familia p53 en el estrés del RE: Una vía poco caracterizada en comparación con la respuesta al daño en el ADN.

La expresión de p53 de longitud completa se ve atenuada dado la condición de inhibición global de la traducción dependiente de 5' cap en el estrés del RE y algunos artículos sugieren que su distribución es principalmente citoplasmática en este contexto [17,31,32]. Sin embargo, la expresión de la isoforma traduccional p47 se ve favorecida dado que se traduce de forma independiente de 5'Cap, como se mencionó anteriormente. Por otra parte, múltiples factores de traducción se unen a las secuencias de ARNm y ajustan la expresión

tanto de p53 como de p47. En oposición a lo que ocurre durante la DDR, el aumento de la expresión de p47 conduce a la detención del ciclo celular en G2. La detención en G2 resulta más beneficiosa para resolver el tipo de problemas asociados al estrés en el RE, ya que esta fase del ciclo celular se caracteriza por una disminución general de la traducción y un aumento relativo de la traducción independiente de 5'cap [33–35]. Por consiguiente, se reduce la síntesis general de proteínas aliviando la carga de procesamiento en el RE.

La detención del ciclo celular en G2 es en parte consecuencia del efecto inhibitorio ejercido por p47 sobre la transcripción de *p21* normalmente inducida por p53. Además, ambas isoformas reprimen la traducción del ARNm de *p21* en el estrés del RE, lo que contrasta con la regulación positiva de p21 en el daño al ADN [33,34,36]. La inhibición de p21 por p53 y p47 evita la degradación de 14-3-3 sigma ($14-3-3\sigma$) mediada por la proteína ubiquitina ligasa E3 COP1. $14-3-3\sigma$ pertenece a la familia 14-3-3 conservada, implicada en la regulación de importantes procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, crecimiento celular y apoptosis. La proteína $14-3-3\sigma$ estabilizada promueve el arresto del ciclo celular en G2 mediante el secuestro del complejo ciclina B1/CDC2 en el citoplasma. No obstante, el mecanismo molecular por el cual p21 regula la actividad de COP1 es desconocido [33,34].

En caso de estrés prolongado en el RE, se dirige a la célula a la apoptosis, siendo uno de los procesos involucrados la inhibición de la traducción de Bip mediada por p53. El mecanismo implica la unión específica de p53 a los primeros 346 nucleótidos del ARNm de *bip*. En consecuencia, disminuye la interacción represiva entre BiP y BIK (del inglés, BCL2 interacting killer). Bik es una proteína perteneciente a la familia BCL-2 que controla la apoptosis directamente promoviendo la oligomerización de BAK y BAX en la membrana del RE, por lo que una disminución de la interacción entre BiP y Bik contribuye con la inducción de la apoptosis [34,37] (ver Figura 2.6).

De forma similar, se ha reportado que p53 suprime la traducción de otros ARNm durante el estrés en el RE, cómo es *MDM2* [38–40]. Además, p53 parece interactuar con su propio ARNm y con el de otros genes como *cdk4* y *fgf-2* [41]. En conjunto, estos reportes ilustran la importancia de la regulación postranscripcional por la vía p53, particularmente a nivel de la traducción en el estrés del RE y demuestran la capacidad de unión al ARN de p53. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la regulación traduccional por p53 y/o su isoforma p47 son en gran parte desconocidos [34,38,39]. También resta por dilucidar cuáles son las regiones de las proteínas y los ARNm involucradas en las interacciones y si están involucrados motivos estructurales tridimensionales o de secuencia particulares.

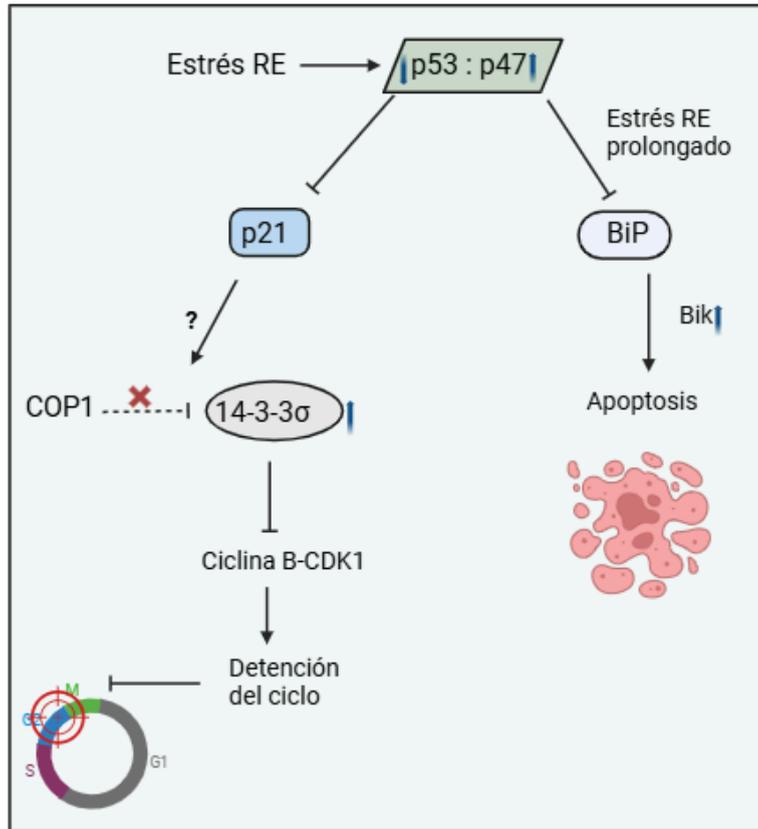


Figura 2.6. Esquema de la vía p53 en respuesta al estrés en el RE. El aumento de la isoforma p47 promueve la inhibición de p21 y la detención del ciclo celular en G2. En caso de estrés prolongado en el RE, la inhibición de Bip desencadena la apoptosis. Creado en BioRender.com.

Estudios no publicados, realizados por la Lic. Irene Larghero identificaron un conjunto amplio de ARNm que parecen estar regulados por p53 a nivel postranscripcional en UPR, mediante caracterización del transcriptoma y proteoma en condiciones normales y de estrés en el RE, tanto en presencia como en ausencia de p53/p47. A su vez, el estudio de las secuencias de las 5'UTRs de estos ARNm develó un motivo compartido rico en guanina que tiene el potencial para formar G-quadruplex. Los ARN G-quadruplex (G4), como se describe más adelante, han ganado cada vez más importancia en la biología del ARN, siendo de particular relevancia en la regulación de la expresión génica en todos los pasos postranscripcionales. Por otro lado, se sugiere que las proteínas de unión a ARN (RBP) son los principales candidatos para regular el plegamiento de ARN G4 en las células y se han caracterizado un conjunto amplio de proteínas de unión a G4 [42]. De hecho, se ha reportado que p53 es capaz de unir G4 en ADN y de regular la expresión de algunos ARNm que contienen G4 de forma indirecta a través de metabolitos [43,44]. En conjunto, estos estudios nos posicionan en la hipótesis de que p53 podría unirse a ARN G4 para regular la expresión génica en determinados contextos celulares como el estrés del RE.

2.4. ARN G-quadruplex (G4).

Los G-quadruplex son estructuras secundarias de ADN o ARN extremadamente estables formadas por secuencias ricas en guanina. Están implicadas en muchos procesos celulares esenciales, como el control del final de la transcripción, splicing, ensamblaje de RNPs, localización y traducción de ARNs. Los ADN G-quadruplex han sido ampliamente estudiados y se conocen bien a nivel estructural y, en gran medida, su implicancia funcional. Sin embargo, los G4 de ARN han sido menos caracterizados y su función biológica es controversial [45,46].

2.4.1. La estructura G-quadruplex.

La unidad estructural fundamental del G-quadruplex es una tétrada de guaninas (G) (Figura 2.7). Cada una de las cuatro bases de guanina es donadora de dos enlaces de hidrógeno en el borde de Watson-Crick y aceptora de dos enlaces de hidrógeno en el borde de Hoogsteen. Como resultado, cuatro átomos de oxígeno carbonilo quedan orientados al centro de la tétrada G, formando un núcleo central cargado negativamente [46,47].

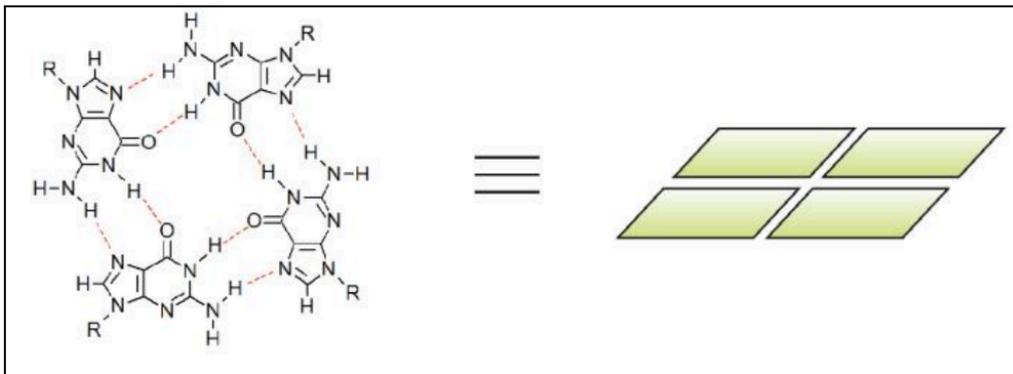


Figura 2.7. Estructura de una tétrada de guanosina. Tomado de [47]

El apilamiento de dos o más tétradas G forman una estructura G-quadruplex. Los iones metálicos como los cationes monovalentes pueden intercalarse en el núcleo aniónico central de una tétrada G y coordinar cuatro átomos de oxígeno. Alternativamente, el ion puede acomodarse entre dos tétradas G y coordinar ocho átomos de oxígeno, lo que es el caso de algunos cationes más grandes, como K^+ o NH_4^+ . Los iones permiten estabilizar y mejorar las interacciones de apilamiento de bases en el G4 [42,47].

Los G4 se describen dependiendo de la orientación de la cadena de ácido nucleico. Así, existen G4 paralelo, antiparalelo o tipo híbrido (Figura 2.8). A su vez, la orientación de la cadena determina la conformación del enlace glucosídico de los nucleótidos, por ejemplo,

los G4 paralelos tienen conformación anti en todas las guaninas que lo conforman. Los G4 de ARN se pliegan en orientación paralela, salvo excepciones puntuales reportadas [42,47].

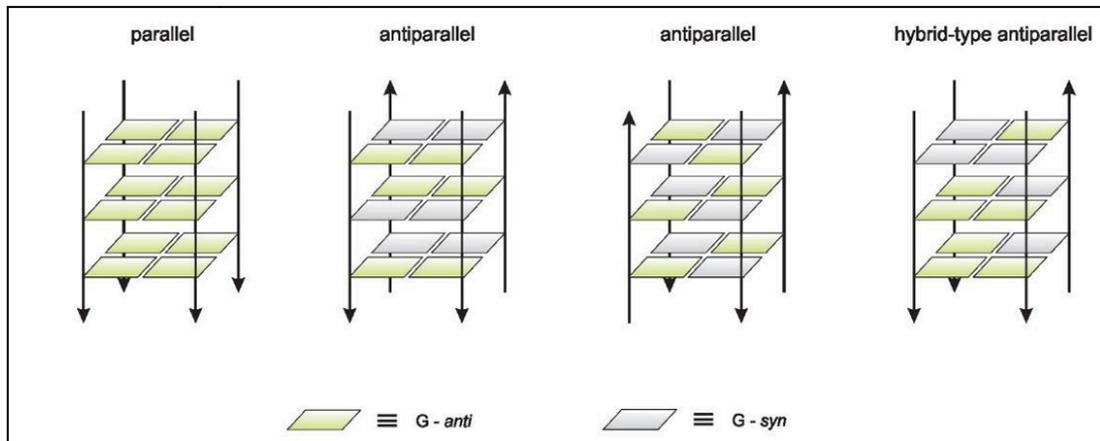


Figura 2.8. Polaridad de las hebras que conforman los G-quadruplex. Se muestra la orientación syn o anti de los residuos de guanosina. Los ARN G4 están conformados por estructuras paralelas. Tomado de [47].

Los G4 pueden generarse en una hebra rica en G formando una estructura intramolecular o pueden estar formados por dos o cuatro hebras separadas que se combinan en un G4 intermolecular. En el G4, las tétradas G pueden estar conectadas mediante bucles de tamaño y secuencia variables. Como se esquematiza en la figura 2.9, se pueden distinguir tres tipos principales de bucles: bucle de inversión, que conecta las hebras paralelas adyacentes, bucle diagonal que conecta dos hebras antiparalelas opuestas y un bucle de borde o lateral, que conecta dos hebras antiparalelas adyacentes [45–47].

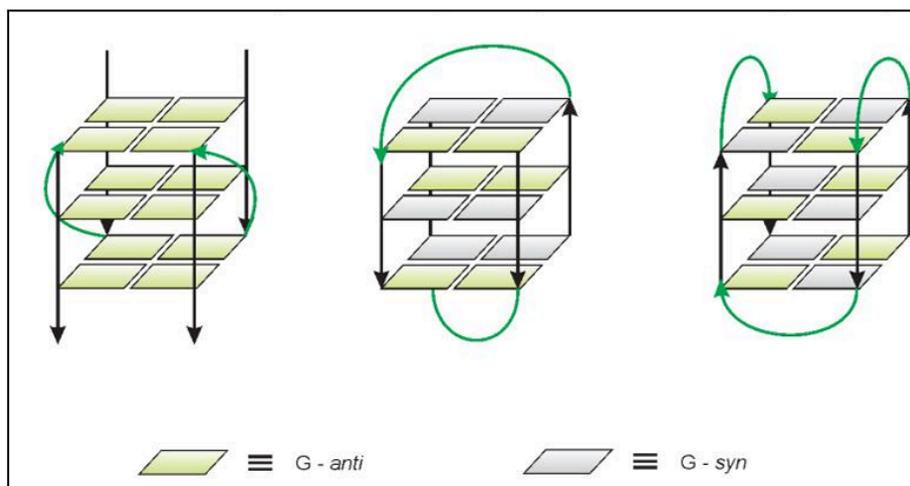


Figura 2.9. Disposición de los bucles en el G-quadruplex. Tomado de [47].

2.4.2. Funciones propuestas de los ARN G4.

Los ARN G4 se distribuyen tanto en regiones codificantes como en secuencias no codificantes. Sin embargo, se ha demostrado que se encuentran ampliamente enriquecidos en regiones de ARNm con funciones reguladoras, como los extremos 5'UTR y 3'UTR, lo que sugiere que están implicados en la regulación del metabolismo del ARN. Por ejemplo, durante la transcripción, el ARN recién sintetizado puede emparejarse con la hebra de ADN molde complementaria para formar una estructura G4 híbrida ARN-ADN que puede regular la expresión génica (Figura 2.10 A). En particular, estos G4 híbridos inhiben la transcripción y también han sido propuestos como un mecanismo de terminadores de la transcripción [42,48,49]. Además, algunos ARN pueden formar G4 en señales de poliadenilación e interactuar con el factor de empalme y poliadenilación para regular su procesamiento. A su vez, los G4 ensamblados en las proximidades de los sitios de empalme pueden afectar directamente la unión de proteínas reguladoras del procesamiento del pre-ARNm [39,40]. De hecho, se ha caracterizado un G4 ubicado en el intrón 3 del pre-ARNm de *TP53* que estimula el empalme del intrón 2 y conduce a la expresión diferencial de transcritos que codifican distintas isoformas de p53 [50].

Más importante en el contexto de este trabajo, los G4 en ARNm pueden inhibir o estimular la traducción y en particular se encuentran sobrerrepresentados en las regiones reguladoras 5'UTR y 3'UTR. Los mecanismos moleculares implicados son en gran parte desconocidos pero pueden depender de proteínas específicas que interaccionan con las estructuras G4. A su vez, pueden actuar como un obstáculo para los ribosomas en la traducción y estimular el cambio de marco de lectura (Figura 2.10 B) [48,49].

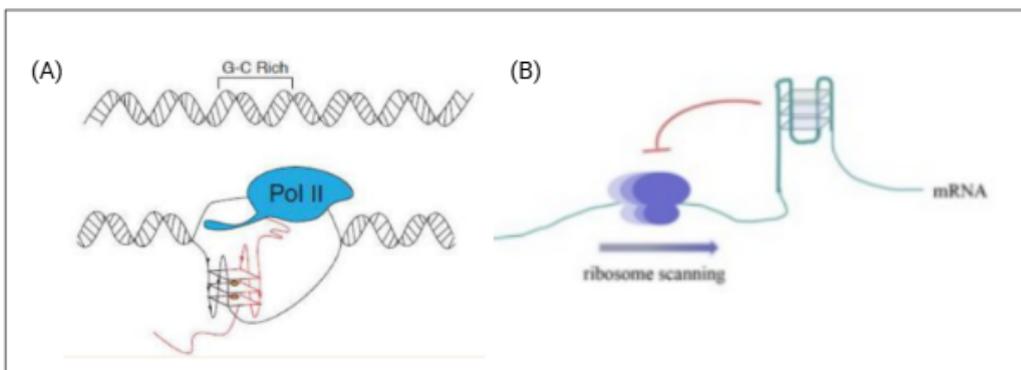


Figura 2.10. Esquema de funciones reguladoras de ARN G4. (A) Los G4 híbridos ARN-ADN pueden regular la transcripción. (B) Los ARNm pueden formar G4 y regular su traducción. Modificado de [48,49].

2.4.3. Abordajes *in silico* e *in vitro* para identificar ARN G4.

Las estrategias principales para determinar la presencia de G4 incluyen: identificación de secuencias formadoras de G4 mediante el uso de herramientas bioinformáticas predictivas, análisis *in vitro* mediante estudios biofísicos, mutagénesis dirigida y el uso de ligandos estabilizadores de G4[51,52] .

Existen una variedad de métodos computacionales que se fundamentan en diferentes propiedades de las estructuras G4s. En particular, los principales abordajes implican: la búsqueda de la secuencia consenso propia de los G4, las características de las secuencias flanqueantes, ensamblajes de orden superior y enfoques de aprendizaje automático. En el presente trabajo se utiliza una combinación de estos enfoques, como se detalla en la sección 4.4 [52].

Los estudios biofísicos incluyen análisis mediante dicroísmo circular (CD), fusión ultravioleta y estudios de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Los ARN G4 paralelos muestran un espectro CD característico con una señal negativa a 240 nm y una señal positiva a 265 nm. La cristalografía de rayos X y la espectroscopia RMN en solución pueden obtener estructuras de G4 con resolución atómica [51,53].

Los estudios funcionales como la unión de ligandos específicos de G4, la mutagénesis específica del sitio de las secuencias de G4, el uso de reporteros de ARN y enfoques bioquímicos para determinar la estructura secundaria son también ampliamente utilizados [51–54].

El enfoque adoptado en el presente trabajo para el estudio *in vitro* de secuencias potenciales formadoras de G4 consistió en el análisis mediante electroforesis de poliacrilamida utilizando un ligando fluorescente específico. Mediante este abordaje se pueden visualizar diferentes conformaciones de un determinado ácido nucleico, determinar si el G4 es intra o intermolecular, topología y presencia de posibles estructuras secundarias potencialmente competidoras [54].

3. Objetivos.

3.1. Objetivo General.

El presente trabajo se enmarca en un línea de investigación que propone explorar la actividad de regulación post transcripcional de la familia p53 en UPR, buscando aportar más información que apoye el concepto de p53 como un regulador traduccional. En concreto, el objetivo general de este trabajo es contribuir a generar las herramientas necesarias para usar un modelo celular que permita identificar ARNm cercanos a p53 y su isoforma p47 durante la UPR y desarrollar un sistema *in vitro* para estudiar la formación de G4 en oligonucleótidos de ARN. Ambas aproximaciones contribuirán a evaluar si las eventuales interacciones p53-ARNm están mediadas por estructuras de tipo G4 en los ARNm involucrados y su posible rol en la regulación post transcripcional mediada por p53 en UPR.

3.2. Objetivos específicos.

- Desarrollo y validación de vectores de expresión eucariotas con la secuencia de p53 y su isoforma p47 fusionada a APEX2 para usar en un modelo celular que permita identificar ARNm cercanos a p53 y p47 en UPR.
- Estudiar *in silico* el potencial para formar G-quadruplex de secuencias de ARN seleccionadas a partir de 5'UTRs de ARNm de interés.
- Desarrollar un sistema para estudiar la formación de ARN G-quadruplex *in vitro*.

construcciones se diferencian en el extremo 3' terminal del inserto como se detalla en la Figura 4.2.

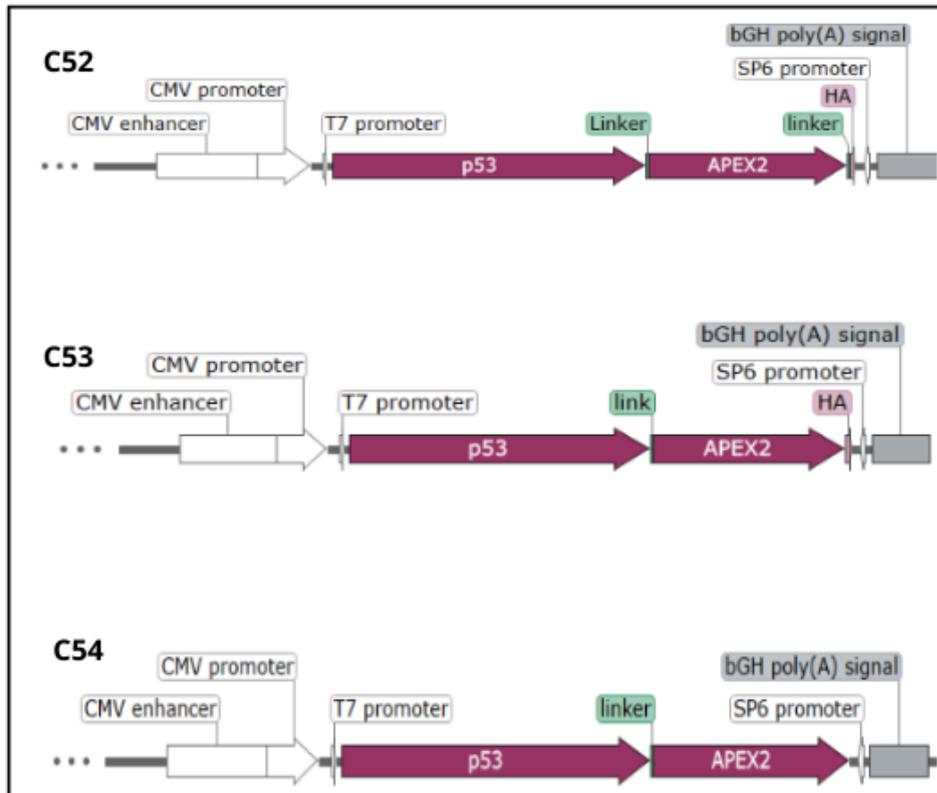


Figura 4.2. Construcciones generadas en el plásmido pCDNA3.1. Se muestran las tres construcciones insertas en el bloque de expresión del plásmido pCDNA3.1. Los plásmidos C52 y C53 contienen una etiqueta derivada de hemaglutinina del virus influenza (HA), en cambio C54 no contiene la etiqueta HA. Los tres plásmidos contienen un pequeño enlace de 12 pb entre p53 y APEX2 (link) y solo C52 contiene un segundo link entre APEX2 y HA de 9pb. Estas tres construcciones de p53 fusionadas a APEX2 se realizaron para comparar y evaluar el plásmido con mejor calidad de expresión y funcionalidad.

Para la expansión y posterior purificación de los plásmidos C52, C53 y C54, se realizaron cultivos en medio LB (Luria-Bertani) a partir de colonias de *E. coli DH5 α* desarrolladas en medio LB-agar ya transformadas, conservadas a 4°C. Se inoculó una colonia en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina 100 μ g/mL, para cada una de las cepas transformadas y se incubaron 8 horas a 37 °C con agitación a 250 rpm. Sucesivamente se realizó un pasaje de los 5 mL del cultivo crecido a un matraz con 350 mL de LB suplementado con ampicilina y se incubó durante la noche a 37 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo, se recuperaron las células bacterianas mediante centrifugación a 5000 x g

durante 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El pellet de células obtenido se lisó para purificar los plásmidos siguiendo el protocolo del kit comercial GeneJET Endo-Free Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Scientific, #K0861).

4.2. Evaluación cuantitativa y cualitativa de los plásmidos generados.

4.2.1. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Las preparaciones de cada plásmido purificado se cuantificaron por espectrofotometría a 260 nm en espectrofotómetro NanoDrop™ Lite Spectrophotometer. Este equipo permite determinar la pureza de la muestra usando la relación de absorbancia a 260nm y 280nm (Abs_{260nm}/Abs_{280nm}). Se considera que un ADN tiene una pureza óptima cuando el valor de Abs_{260nm}/Abs_{280nm} se encuentra entre 1,8 y 2,0. Por el contrario, un valor menor a 1,6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas y una relación Abs_{260nm}/Abs_{280nm} mayor a 2,1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

4.2.2. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los ADN plasmídicos purificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Las migraciones se realizaron a 80 V durante 40 minutos aproximadamente. El marcador de tamaño molecular utilizado fue el GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific™).

La tinción se realizó posterior a la corrida electroforética con colorante GoodView™ (GoodView, SBS HGV-II) a una concentración de 2,5 μ L en 50 mL de buffer TAE 1X, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las moléculas de ADN se visualizaron por exposición en un transiluminador UV. Las muestras sembradas se prepararon en buffer de carga 6X conteniendo glicerol y marcadores coloreados para seguir la migración en tiempo real (6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific™ #R0611).

4.2.3. Secuenciación y verificación de las secuencias.

Enviamos los vectores purificados a secuenciar a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) con primers CMV-F, BHG-R y p53-h-F-P9, que aseguran una cobertura completa del inserto generado en el plásmido.

<i>Primers</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Posición de annealing</i>	<i>Sentido</i>
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	promotor CMV	forward
BHG-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	señal poli(A) BGH	reverse
p53-h-F-P9	ACAGCTTTGAGGTGCGTGTTT	p53	forward

Una vez obtenida la secuencia se corroboró la identidad del inserto mediante BLAST contra la secuencia de referencia disponible en el laboratorio en archivo SGD, compatible con SnapGene DNA.

4.3. Expresión de p53 fusionada a APEX en células H1299.

4.3.1. Cultivo de línea celular.

La línea de células H1299 derivada de cáncer de pulmón posee una delección parcial homocigótica del gen *TP53*, por lo tanto, no produce ninguna isoforma de p53. Por consiguiente, constituyen un modelo adecuado para evaluar el rol de cada isoforma de p53 mediante transfección de ADN.

Inicialmente se preparó un stock de células a partir de una alícuota semilla conservada a -140 °C, se realizaron sucesivos pasajes hasta obtener dos botellas de 175 cm² de superficie cultivadas en medio completo RPMI 1640 suplementado con GlutaMax (Gibco™, #61870036) y 10% de suero fetal bovino (SFB).

Para los pasajes de células se procedió a retirar el medio de cultivo, se agregó tampón fosfato salino (PBS) para lavar las células y posteriormente se agregó tripsina-EDTA (Gibco™, #25200056) que permite disociarlas y desprenderlas del soporte. La tripsina se dejó actuar 5 minutos a 37 °C y el cambio de morfología y desprendimiento de las células del soporte se corroboró bajo microscopio invertido. Por último, la tripsina se diluyó en una proporción 1:5 en medio completo y se procedió al pasaje de células. Los sucesivos pasajes se realizaron en volúmenes de reactivos y cantidad de células acorde a cada tamaño de placa.

Las células crecidas en dos botellas de 175 cm² suspendidas en medio completo se cuantificaron por recuento en cámara Neubauer, empleando la tinción con colorante azul de tripano en proporción 1:1. Se obtuvo un valor de 6x10⁵ células/mL. Sucesivamente se centrifugó 50 mL de células suspendidas en medio de cultivo a 1200 rpm durante 5 minutos.

El pellet se resuspendió en 15 mL de RPMI en 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 20% de SFB y se prepararon en alícuotas de 1mL, lo que corresponde a 2×10^6 células/mL. Se guardaron las alícuotas por procedimiento de congelamiento lento, primero 2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a continuación se dejaron durante la noche a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y por último se guardó a $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$. El DMSO impide la formación de cristales de hielo, lo que contribuye a la preservación de las células. De forma paralela, se sembraron 175.000 células por pocillo en dos placas de 6 pozos con 2 mL de RPMI suplementado con 10% SFB para la transfección con los plásmidos de interés.

4.3.2. Transfección transitoria y tratamiento con taspigargina.

Luego de plaqueadas, las células fueron incubadas durante 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 5% CO_2 . Luego de corroborar, observando al microscopio invertido que los cultivos tenían una confluencia aproximada de 30-40%, las células fueron transfectadas usando diferentes vectores: el plásmido control pcDNA3-Empty vector (C30), pcDNA3-P53 wt (C1), C52, C53 y C54.

El reactivo de transfección utilizado fue GeneJuice (GeneJuice® Transfection Reagent, Merck), compuesto por una proteína celular no tóxica y una pequeña cantidad de una poliamina. La relación entre el reactivo de transfección y el ADN plasmídico, así como la densidad celular, fueron optimizados previamente por el laboratorio siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación se describen los volúmenes utilizados en el ensayo.

- Para 1 pocillo:

ADN a transfectar (250 ng/ μL) _____ 2,0 μL

Gene Juice _____ 1,5 μL

Medio de cultivo RPMI virgen _____ 96,5 μL

- Mix X13:

Gene Juice _____ 19,5 μL

RPMI virgen _____ 1254,5 μL

La mezcla se incubó 2 minutos a temperatura ambiente.

A cada uno de 5 tubos eppendorf diferentes, conteniendo 5 μL de ADN de los vectores C30, C1, C52, C53 y C54 respectivamente, se agregó 245 μL de la mezcla del reactivo de transformación diluido en RPMI virgen (Mix) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Sucesivamente, se agregaron 100 μL de la mezcla de reacción por cada pocillo y las células se incubaron durante 24 horas a 37°C en 5% CO_2 . Transcurrido este tiempo, se indujo el estrés en el RE mediante el agregado de 50 nM de tapsigargina (THAP, Invitrogen™ Fisher Scientific, disuelta en DMSO), un compuesto con actividad inhibitoria sobre la bomba de calcio de RE (ATPasa/ Ca^{2+}). Como consecuencia, aumenta la concentración de calcio en el citosol al impedir su transporte hacia el interior del RE y desencadena la UPR. Para el tratamiento se incubaron las células 24 horas a 37°C en 5% CO_2 . De forma paralela se agregó la misma cantidad de DMSO a las células en condición sin estrés, de acuerdo a como se esquematiza en la Figura 4.3.

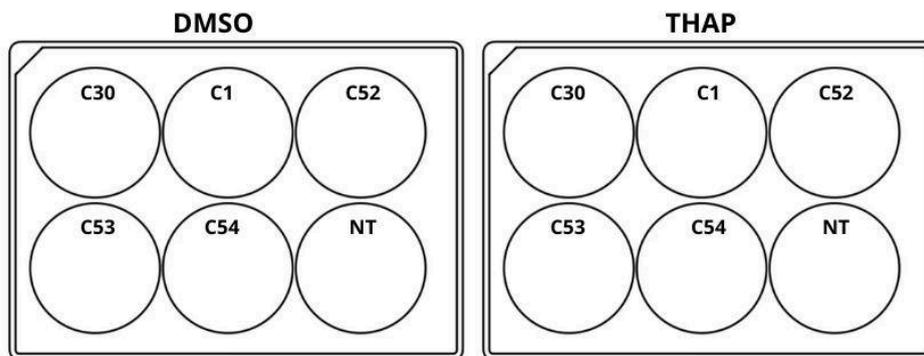


Figura 4.3. Esquema de las placas de células. Se indican los vectores utilizados en la transformación de células H1299. NT: No transformado, DMSO: Dimetilsulfóxido, THAP: Tapsigargina. Cada vector fue incorporado en células en condición sin estrés (DMSO) y con estrés (THAP).

4.3.3. Extracción y cuantificación de proteínas.

Se realizó la extracción de proteínas del cultivo transfectado en las condiciones descritas en la sección anterior. Para eso, se retiró el medio de cultivo, se lavaron los pocillos con 1 mL de PBS y se agregó 120 μL de buffer de lisis (ver anexo 8.4). Sucesivamente se rasparon los pocillos con el suplemento plástico adecuado y se recuperó el extracto celular en tubos eppendorf. El procedimiento se realizó en frío.

Los extractos celulares se centrifugaron a 13000 x g durante 15 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas por el método de ácido bicinónico (BCA),

utilizando el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific™ 23225). En el método de BCA las proteínas forman complejo con iones cúprico (Cu^{2+}) en medio alcalino formando una coloración azul claro (reacción de Biuret) y el Cu^{2+} es reducido a ion cuproso (Cu^{1+}). En un segundo paso, el quelato formado reacciona con el ácido bicinconínico para formar un complejo soluble en agua de coloración púrpura que exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm y que es proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra [55]. Las muestras se diluyeron 1:5 en buffer tris-HCl (20mM, pH 6,8) para asegurar cuantificación en rango lineal de la técnica y se midieron por triplicado. Se realizó una curva de calibración usando muestras estándar de albúmina sérica bovina (BSA) por triplicado en 8 concentraciones diferentes: 0, 0,125, 0,250, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5, y 2,0 mg/mL. El blanco realizado correspondió a 1 parte de buffer de lisis y 4 partes de buffer tris-HCl. El procedimiento de ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos usando 200 uL de la mezcla de trabajo (soluciones A y B del kit mezcladas en proporción 1:50) por cada pocillo y 10 uL de la muestra correspondiente. Se determinó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro Infinite® 200 PRO, TECAN. Los extractos de proteínas se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

4.3.4. Western Blot.

4.3.4.1. SDS-PAGE.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10 y 12%. El gel concentrador (stacking), en todos los casos, se realizó al 4%. La corrida se realizó a 40V en el gel stacking y a continuación a 120V durante 2 horas aproximadamente, hasta que el azul de bromofenol del buffer de carga llegue a la parte inferior del gel.

Para la preparación de las muestras se utilizó buffer de lisis y buffer de carga en volúmenes indicados en la tabla 5.3 (resultados), de forma de obtener todas las muestras a la misma concentración para la siembra. Las muestras fueron tratadas a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos en termoblock.

La siembra se realizó en cantidades de 10 y 30 μg de proteínas de acuerdo al ensayo realizado, ver resultados tabla 5.3. El marcador de tamaño molecular utilizado fue PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific™) (anexo 8.5).

4.3.4.2. Transferencia.

Al finalizar el SDS-PAGE, se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa en buffer transferencia 1X (ver anexo 8.5), a 400 mA durante 1,5 horas en frío usando el dispositivo Mini Trans-Blot® Cell BioRad. Al finalizar, se tiñó la membrana con rojo Ponceau para evaluar la eficacia de la electrotransferencia y obtener un control de carga. Sucesivamente, se bloqueó la membrana con solución de bloqueo (BSA 3% en buffer TBST, ver anexo 8.5) durante 40 minutos en agitación a temperatura ambiente, lo que permite bloquear sitios de unión no específicos de anticuerpos. Transcurrido este tiempo, se incubó con anticuerpos primarios con agitación durante la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con TBST durante 5 minutos cada uno y se incubó con anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) (Tabla 4.1), todo con agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron nuevamente 4 lavados con TBST con agitación a temperatura ambiente de 5 minutos cada uno.

El revelado se realizó utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific™). Se cubrió completamente la membrana con la mezcla de reactivos y se incubó durante 1 minuto. La lectura se realizó en el equipo GBOX Chemi System (SynGene) a diferentes tiempos de exposición.

TABLA 4.1 Lista de anticuerpos y diluciones preparadas.

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
Nombre	Dilución	Especie huésped/clonal	Compañía
anti-p53 (CM-1)	1:2500	Conejo/policlonal	Borek Vojtesek
anti-p21 (12D1)	1:1000	Conejo/monoclonal	Cell signaling technology
anti-β actina (AC-15)	1:5000	Ratón/monoclonal	Sigma
anti-HA tag	1:2500	Conejo/policlonal	Sigma
anti-BiP	1:2500	Conejo/policlonal	Abcam
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Nombre	Dilución	Especie huésped/clonal	
anti-mouse IgG-HRP (sc525416)	1:10000	Cabra/policlonal	Sigma
anti-rabbit IgG-HRP (0545)	1:10000	Cabra/policlonal	Sigma

4.3.4.3. Stripping.

Se incubó la membrana con buffer de stripping (ver anexo 8.5) durante 45 minutos a 50 °C con leve agitación. Sucesivamente, se realizó un lavado con agua desionizada de tipo I, 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBST y se bloqueó nuevamente la membrana, todo con

agitación a temperatura ambiente, quedando de esta forma lista para posterior incubación con anticuerpos según lo requerido.

4.4. Predicción de G-quadruplex *in silico*.

Se utilizaron dos herramientas de predicción de G4 de código abierto disponibles en la web:

i) QGRS Mapper ([http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/.](http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/)) [56], **ii)** G4RNA screener ([http://scottgroup.med.usherbrooke.ca/G4RNA_screener/.](http://scottgroup.med.usherbrooke.ca/G4RNA_screener/)) [57].

i) El algoritmo utilizado en el servidor web QGRS Mapper se basa en un enfoque de búsqueda de expresiones regulares, incorporando un sistema de puntuación. Los supuestos G4 se identifican mediante el siguiente motivo: $GxNy1GxNy2GxNy3Gx$. El motivo consta de cuatro conjuntos de guaninas de igual longitud separados por secuencias de nucleótidos arbitrarios, en donde x es igual al número de Gs en cada conjunto, que a su vez se corresponde con el número de tétradas que componen el cuádruplex G. Las $y1$, $y2$ e $y3$ corresponden a la longitud de los bucles que conectan las tétradas de guanina.

La secuencia debe contener al menos dos tétradas y sólo se consideran como potenciales G4 hasta una longitud máxima de 30 bases. El sistema de puntuación evalúa la probabilidad de que una secuencia determinada forme un G4 estable, siendo las secuencias con puntuaciones más altas las mejores candidatas para formar dicha estructura. Las características consideradas para asignar una puntuación son: bucles más cortos son más comunes que los bucles más largos, los G4 tienden a tener bucles aproximadamente del mismo tamaño y por último, cuanto mayor sea el número de tétradas de guanina, más estable será el quadruplex. La puntuación G más alta posible es 105 [52,56].

ii) La herramienta G4RNA screener no se basa en motivos predefinidos para la búsqueda de G4. Integra tres sistemas de puntuación: cGcC, G4H y G4NN.

G4NN se basa en un algoritmo de aprendizaje automático, consiste en una red neuronal artificial simple que se entrenó con secuencias formadoras de G4 probadas, disponible en una base de datos. El algoritmo fue diseñado para clasificar las secuencias entre 1 y 0, en donde un valor mayor a 0,5 se considera como potencial G4 [57].

El algoritmo **cGcC** aborda el problema de la competencia entre las estructuras basadas en G4 y apareamiento Watson-Crick. Se fundamenta en la consideración de que la presencia de múltiples citocinas consecutivas en proximidades de un potencial G-quadruplex inhibe el plegamiento G4. Se ha demostrado que las citocinas próximas se aparean con guaninas de

un potencial G4 para adoptar estructuras de apareamiento Watson-Crick y no G4. La puntuación se informa en índice cG/cC, siendo potencial G4 un valor mayor a 2,05 [57,58].

El método **G4H** tiene en cuenta la riqueza y asimetría de guaninas de una secuencia dada. La puntuación asigna valores entre -4 y 4, y es 0 para secuencias aleatorias que probablemente formen duplex estables. Un valor mayor a 1 se considera como potencial G4. Valores negativos corresponden a una asimetría con mayor contenido en citocinas.

Los algoritmos que integran el servidor web G4RNA screener han sido comparados con diferentes herramientas y verificados en un conjunto de G4 reportados experimentalmente [52,57,58].

4.5. Análisis *in vitro* de secuencias potenciales formadoras de G4.

A partir de un conjunto de secuencias correspondientes a 5'UTR de genes regulados por p53 a nivel postranscripcional según estudios realizados por el laboratorio mediante abordajes “omicos”, seleccionamos dos genes particulares para evaluar la formación de G4 *in vitro* por varios motivos de interés. En primer lugar, contamos con el antecedente de que el conjunto de secuencias de partida compartía un motivo rico en Gs con potencial para formar G4, a los cuales evaluamos *in silico* mediante las herramientas mencionadas en la sección anterior. Por último y no menos importante, consideramos el interés biológico de las proteínas codificadas en esos ARNm. En consecuencia, a partir de los resultados e información precedente seleccionamos un fragmento de cada una de las 5'UTRs de los genes *TGFB1* y *FXR2* (Tabla 4.2). Por otro lado ya ha sido reportado que la 5'UTR de *TGFB1* forma G4 *in vitro*, de acuerdo a resultados de dicroísmo circular, por lo que utilizamos ese oligo como control positivo para poner a prueba el modelo generado.

4.5.1. Preparación de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos de ARN estudiados se sintetizaron en MacroGen (Tabla 4.2). Se reconstituyeron en agua desionizada de tipo I obteniendo una concentración de 100 μ M y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

Para inducir la formación de la estructura G-quadruplex, los oligonucleótidos de ARN se resuspendieron en buffer de plegado a una concentración de 5 μ M. Sucesivamente se incubó la solución durante 20 minutos a 100 °C y se dejó enfriar durante la noche a temperatura ambiente [51,54,59]. Para la condición del oligonucleótido de ARN con estructura completamente desplegada, se prepararon los ARN a una concentración de 5 μ M en 100 mM de NaOH y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente [51].

TABLA 4.2 Oligonucleótidos sintetizados. Las secuencias corresponden a un fragmento de las 5'UTR de los ARNm de TGFB1 y FXR2.

NOMBRE	Secuencia (5'-3')	Cantidad
oligo-TGFB1	GGGAGGAGGGGGA	30 nmol
oligo-FXR2	CGGGGGCGGCGGC	30 nmol

- **Buffer de plegado:**
40mM KCl
10mM fosfato de potasio, pH 7.
- **Buffer fosfato de potasio, pH 7 100mM:**
K₂HPO₄ 1M ___ 615 µL
KH₂PO₄ 1M ___ 385 µL
H₂O de tipo I _____ 9 mL
- **KCl 1M:**
KCl _____ 3,73 g
H₂O de tipo I c.s.p 50 mL
- **NaOH 5M:**
NaOH ___ 2 g
H₂O de tipo I c.s.p 10 mL

4.5.2. Electroforesis de ARN.

Se realizaron distintos ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% nativo y desnaturalizante, se tiñeron con SYBER gold (SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain, Invitrogen™) o con N-metilmesoporfirina IX (NMM) para detectar ARN total o G-quadruplex, respectivamente.

NMM es una porfirina no simétrica soluble en agua que se une selectivamente a estructuras G-quadruplex. El complejo formado es excitado a 399 nm y emite fluorescencia a 610-614

nm. NMM es un ligando dependiente de estructura G-quadruplex y no de secuencia, y presenta diferente grado de afinidad por G4, siendo alta, media y poca o nula para G4 paralelas, híbridas y antiparalelas, respectivamente [60].

El marcador de tamaño molecular utilizado fue microRNA marker (New England Biolabs, #N2102S), que contiene un conjunto de tres oligonucleótidos sintéticos de ARN monocatenario de 17, 21 y 25 residuos de largo.

En el ensayo de electroforesis de ARN, se procedió a una ejecución previa del gel a 100 V durante 15 minutos en buffer TBE 1X. Sucesivamente se lavaron los pocillos con pipeta pasteur para eliminar la acrilamida residual. Una vez cargadas las muestras, se ejecutó el gel a 100V durante 90 minutos aproximadamente en frío. La tinción de los geles se realizó en oscuridad, durante 15-30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Para revelado con SYBER gold se realizó una dilución 1:10000 y el NMM se preparó en una concentración de 10 µg/mL, ambos en buffer TBE 1X. Transcurrido este tiempo, las lecturas se realizaron en transiluminador UV para el gel teñido con SYBER gold y en GBOX Chemi System (SynGene) para el gel teñido con NMM.

5. Resultados y discusión.

5.1. Obtención de los plásmidos de interés.

Se obtuvieron los plásmidos C52, C53 y C54 en un alto grado de pureza y concentración, dados por la relación de $Abs_{260nm} / Abs_{280nm}$ y cuantificación a 260 nm respectivamente, obtenida por espectrofotometría en el equipo NanoDrop (Tabla 5.1).

TABLA 5.1. Datos obtenidos por NanoDrop luego de la purificación de ADN plasmídico.

Plásmidos	Concentración(ng/μL)	$Abs_{260nm} / Abs_{280nm}$
C52	2514	1,91
C53	661	1,88
C54	1041	1,88

En el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% se pudo comprobar que las bandas observadas corresponden con el tamaño esperado de los plásmidos purificados (Figura 5.1).

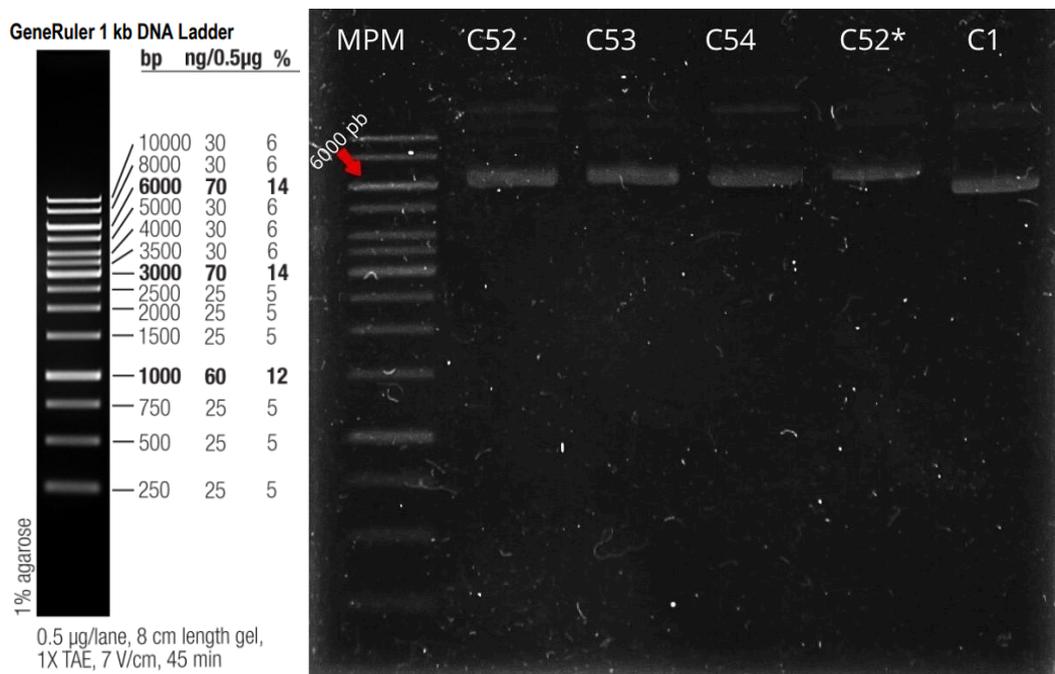


Figura 5.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las maxipreparaciones de ADN plasmídico. Se sembró 150 ng de cada ADN plasmídico purificado de colonias *E. coli*

transformadas con los vectores indicados. C52 corresponde al vector purificado por minipreparación disponible en el laboratorio y C1 es el plásmido que contiene p53 salvaje, ambos utilizados como control. Se sembraron 5 µL del MPM.*

Los plásmidos C52, C53 y C54 tienen un tamaño de 7356, 7347 y 7320 pb, respectivamente. Por su parte, C1 (pcDNA3-P53 wt) contiene 6564 pb y ya estaba en el laboratorio. Se observa una banda mayoritaria en cada muestra que corresponde a los plásmidos en su conformación superenrollada dado que migran más lejos en el gel respecto de las otras bandas presentes. Las distintas conformaciones de un mismo ADN circular tienen la particularidad de migrar distinto. La conformación superenrollada migra una mayor distancia en el gel que la forma lineal debido a su estado compacto. Por el contrario, la forma circular relajada se retrasa en el gel respecto de la lineal.

Se corroboró la identidad del inserto mediante secuenciado en Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y posterior verificación con secuencia de referencia, se adjunta secuencias en anexo 8.1.

5.2. Validación de la expresión y funcionalidad de las proteínas p53 fusionada a APEX2 en células H1299.

5.2.1. Cuantificación de proteínas totales.

En la Tabla 5.2 se muestran los resultados de la cuantificación de proteínas de los extractos de células H1299 transfectadas y en la Tabla 5.3 se indican los volúmenes utilizados para la preparación de las muestras de forma de obtenerlas todas a una concentración de 1,13 µg/µL para la siembra. En la Figura 5.2 se muestra la curva de calibración utilizada. Se obtuvieron cantidades suficientes de proteínas para múltiples ensayos de western blot.

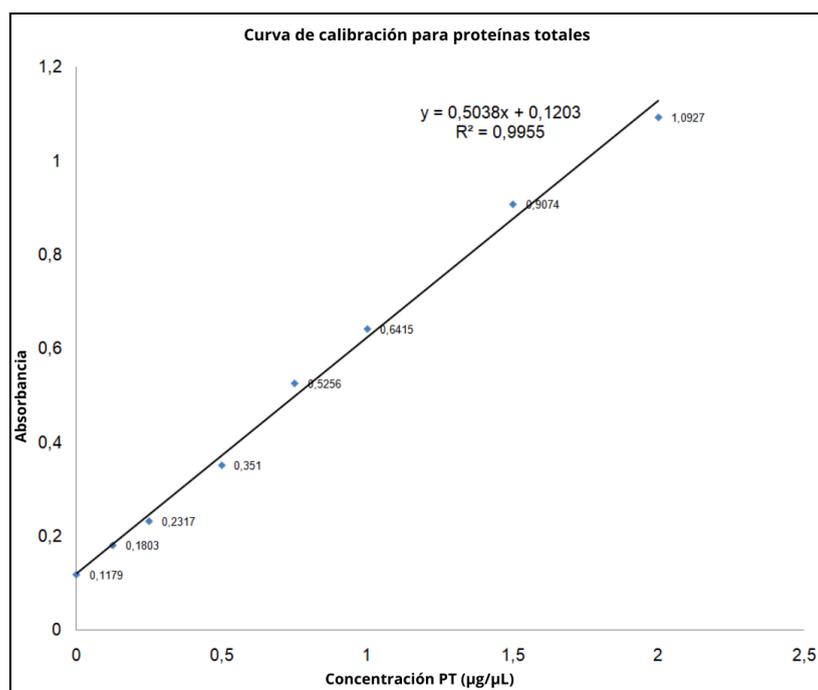


Figura 5.2. Curva de calibración de proteínas. El estándar utilizado fue albúmina sérica bovina (BSA) cuantificado por triplicado en 8 diluciones diferentes.

Tabla 5.2. Cuantificación de proteínas. [Prot]: concentración de proteínas en la muestra, Abs: Absorbancia. NT: Células no transfectadas.

Muestra	dilución	Abs.	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	[Prot] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
C30 DMSO	5	0,326	647,95	0,65	3,24
C1 DMSO	5	0,280	555,58	0,56	2,78
C52 DMSO	5	0,199	394,59	0,39	1,97
C53 DMSO	5	0,217	430,78	0,43	2,15
C54 DMSO	5	0,209	414,97	0,41	2,07
NT DMSO	5	0,310	615,44	0,62	3,08
C30 THAP	5	0,237	469,76	0,47	2,35
C1 THAP	5	0,209	414,87	0,41	2,07
C52 THAP	5	0,169	336,12	0,34	1,68
C53 THAP	5	0,209	415,07	0,42	2,08
C54 THAP	5	0,152	302,01	0,30	1,51
NT THAP	5	0,239	473,64	0,47	2,37

Tabla 5.3. Preparación de las muestras. Se indican las cantidades de muestra, buffer de lisis y buffer de carga 4X para obtener una concentración final de 1,13 µg/µL en todas las muestras. Los volúmenes a cargar para masa de proteínas se muestran a la derecha. [prot]: concentración de proteínas.

Muestra	Vol. Buffer lisis (µL)	Vol. Muestra (µL)	Buffer carga muestra 4X (µL)	[Prot] µg/µL	Vol. de muestra (µL) para X cantidad de µg			
					10 µg	20 µg	30 µg	50 µg
C30 DMSO	26,70	23,30	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
C1 DMSO	22,82	27,18	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
C52 DMSO	11,73	38,27	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
C53 DMSO	14,95	35,05	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
C54 DMSO	13,61	36,39	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
NT DMSO	25,46	24,54	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
C30 THAP	17,86	32,14	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
C1 THAP	13,60	36,40	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
C52 THAP	5,08	44,92	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
C53 THAP	13,62	36,38	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
C54 THAP	0,00	50,00	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15
NT THAP	18,12	31,88	16,66	1,13	8,83	17,66	26,49	44,15

5.2.2. Western Blot.

Mediante western blot se pudo comprobar que el sistema de expresión funcionó correctamente. En los controles utilizados, la condición no transfectado (NT) y la transfección con el plásmido sin inserto (C30), no se observa ninguna banda al revelar con el anticuerpo contra p53, lo cual es esperado dado que no se encuentra p53 en el extracto de proteínas (Figura 5.3). Por su parte, en muestras de células transfectadas con el plásmido con p53 salvaje (C1) se observa una banda del tamaño esperado, próximo a 55 kDa. No se observa banda correspondiente a p47 en condición de estrés, si bien parece haber una disminución de la banda compatible con p53 (Figura 5.3). De todas formas, este mismo plásmido ya ha sido utilizado por otros integrantes del laboratorio y se ha validado el patrón de expresión de las isoformas p53 y p47 de acuerdo a lo reportado en la literatura (reportado en [34] y validado en Trabajo Final de Carrera de la Licenciatura en Ciencias Biológicas en etapa de escritura de Fabrizio Costa).

En las muestras provenientes de extracciones de células transfectadas con los plásmidos C52, C53 y C54 en condiciones normales, se observan bandas predominantes de tamaño próximo a 100 kDa que corresponden a la proteína p53 y p47 fusionadas a APEX2 (Figura 5.3). Por otro lado, en presencia de taspigargina, se identifica una ligera disminución en la

banda p53-APEX, sin embargo, no es claro el aumento de p47-APEX, lo que se indica con flechas negras. El tratamiento con taspigargina promueve la UPR y desencadena un programa celular de respuesta al estrés en el que se incluye el aumento de la expresión de la isoforma p47 [34,61], lo que no detectamos en este experimento para la proteína de fusión p47-APEX2. De todas maneras, la disminución de la expresión de p53-APEX2 indica que efectivamente hay un cambio en las concentraciones relativas de estas isoformas en condiciones de estrés, por lo que los plásmidos serán utilizados en el futuro. Por otra parte, también se observan bandas próximo a los 55 kDa principalmente en condición sin THAP para los plásmidos C52, C53 y C54 que podrían corresponder a p53 dissociado del fragmento de APEX. Asimismo, también se observan bandas de menor peso molecular que podrían deberse a productos de degradación u otras isoformas de menor tamaño que p53.

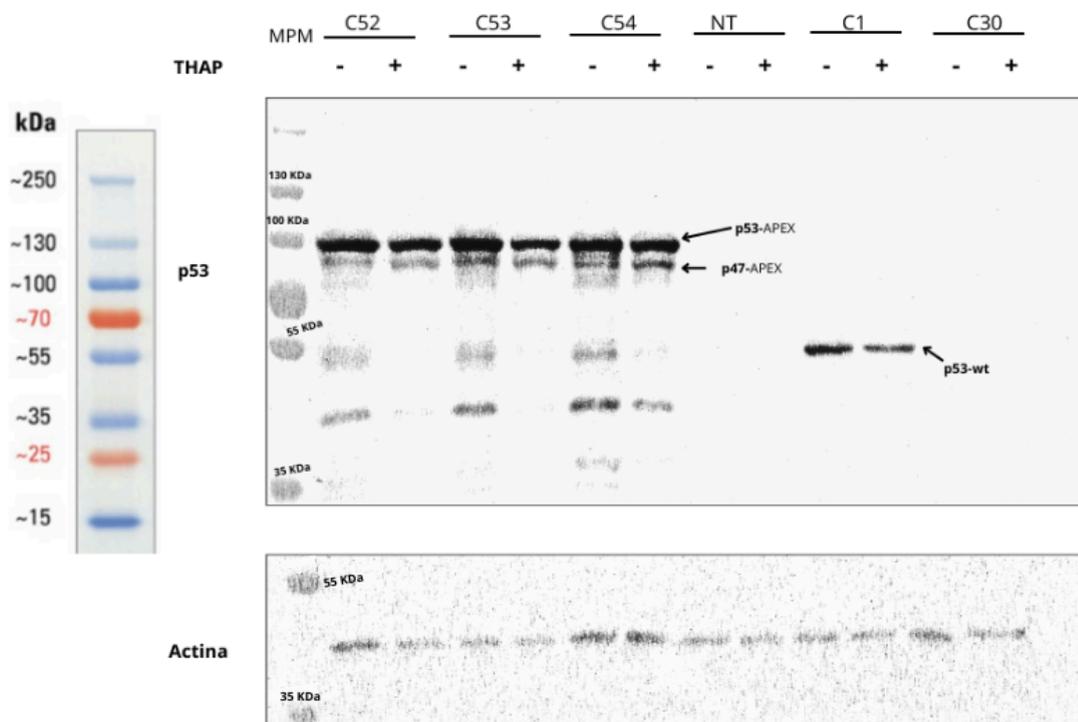


Figura 5.3. Detección por Western blot de isoformas de p53 fusionadas a APEX2. Con flechas negras se indican las dos isoformas producidas a partir del mismo ARNm de p53 fusionada a APEX2 y en el plásmido C1 a p53 wt. A la izquierda se observa el marcador de tamaño molecular utilizado. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-p53 (CM-1) policlonal de conejo y anti-β actina (AC-15) monoclonal de ratón. THAP +/- : tratamiento con o sin taspigargina. Se sembraron 10 µg de proteínas totales.

Para confirmar que las bandas próximas a 100 kDa efectivamente corresponden a la construcción de p53-APEX, se realizó un ensayo de western blot en las mismas condiciones que las presentadas anteriormente pero se utilizó anticuerpos específicos contra la etiqueta derivada de hemaglutinina de virus influenza (tag-HA), presente en los plásmidos C52 y C53

(ver Figura 4.2. sección de materiales y métodos). En consecuencia, se verifica que las bandas próximas a 100 kDa corresponden a las proteínas p53-APEX2 y p47-APEX2 (Figura 5.4). A su vez, nuevamente se observan bandas de menor tamaño, indicadas con estrellas rojas, que podrían ser inespecificidades o productos de degradación.

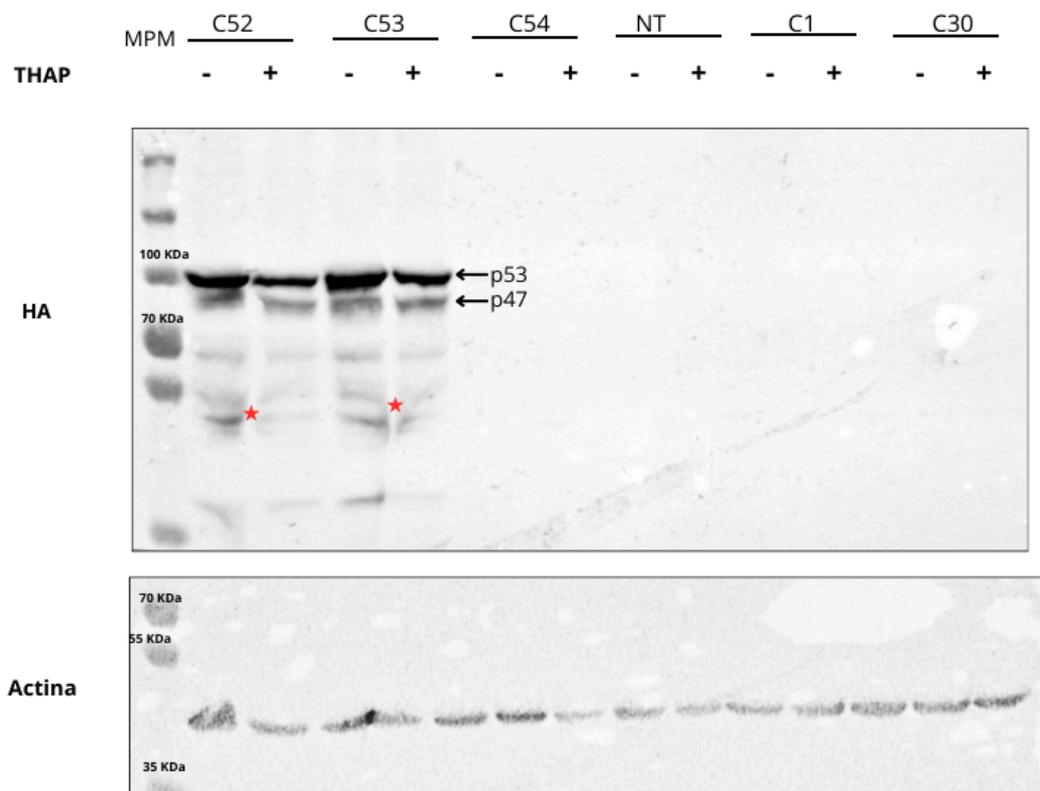


Figura 5.4. Ensayo de western blot para isoformas de p53 fusionadas a APEX2. Con flechas negras se observan las bandas correspondientes a las proteínas p53 y p47 fusionadas a APEX2 y que contienen la etiqueta de hemaglutinina. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-HA tag policlonal de conejo y anti-β actina (AC-15) monoclonal de ratón. THAP +/- : tratamiento con o sin taspigargina. Se sembraron 30 µg de proteínas totales.

A continuación, se realizó un ensayo de western blot con el objetivo de observar p47 en presencia de THAP. Para eso se hizo un corte vertical entre el carril 8 y 9 para revelar el plásmido C1 con mayor tiempo de exposición en el equipo G-Box y evitar posible interferencia de la alta intensidad de las bandas próximas a 100 kDa producidas a partir de los plásmidos C52, C53 y C54. Como referencia de los tamaños moleculares esperados, se incluyeron las proteínas p53 y p47 codificadas por los plásmidos C6 y C7 respectivamente, ya presentes en el laboratorio. En la Figura 5.5 panel A, se identifican las bandas correspondientes a p53-APEX próximo a los 100 kDa al igual que el primer ensayo realizado. A su vez no es claro un aumento de p47 en condición de estrés. En el panel B, en las muestras de células transfectadas con el plásmido C1 en presencia de THAP se observa

una disminución de la banda correspondiente a p53 y una banda tenue de menor tamaño que se corresponde con p47, dado que se encuentra a la misma altura que la proteína codificada por el plásmido de referencia C7, indicado con una flecha negra. A su vez, se verifica que no se corresponde con productos de degradación u otras isoformas de p53, como las indicadas con estrellas rojas. En consecuencia, se puede verificar el efecto del tratamiento con taspigargina en la células H1299 que promueve la expresión diferencial del par p53/47 a partir del plásmido C1.

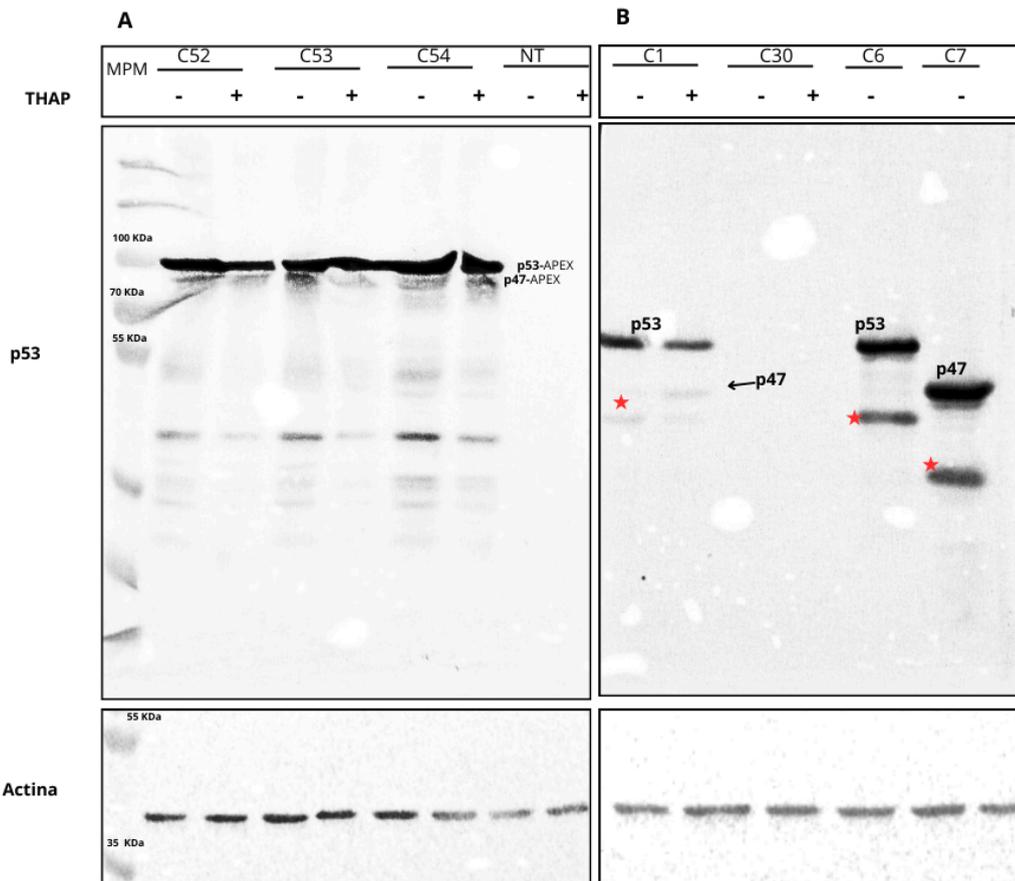


Figura 5.5. Ensayo de western blot para determinar expresión de p47 en condición de estrés. En el panel A se observan las bandas correspondientes a p53 y p47 fusionado a APEX2. Panel B, con flecha negra se indica banda de p47 en presencia de THAP y con estrellas rojas se indican posibles productos de degradación de p53 o isoformas de menor tamaño molecular. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-p53 (CM-1) policlonal de conejo y anti-β actina (AC-15) monoclonal de ratón. THAP +/- : tratamiento con o sin taspigargina. Se sembraron 10 µg de proteínas totales.

Una vez confirmada la expresión exitosa del par p53/p47-APEX, nos propusimos evaluar su actividad determinando el perfil de expresión de uno de los blancos principales de p53 como es p21, en condición de presencia y ausencia de THAP, de acuerdo a lo reportado

previamente en la literatura [34]. En nuestro ensayo pudimos detectar la expresión de p21 a la altura esperada solo en las muestras que fueron transfectadas con ADN conteniendo alguna de las secuencias de p53. A su vez, no se observa expresión de p21 en ausencia de p53, lo que concuerda con reportes previos [34]. Por otro lado, ha sido reportado que tanto p53 como su isoforma p47 tienen la capacidad de inhibir la traducción del ARNm de p21 en UPR, resultando en una disminución de la expresión de la proteína p21 inducida por p53 en condiciones normales [34]. Este patrón reportado lo pudimos corroborar en células transfectadas con el plásmido C1 que expresa las isoformas p53 y p47 no fusionadas a APEX2. Además, pudimos comprobar que la proteína de fusión p53-APEX tiene el mismo efecto en la expresión de p21 que p53 salvaje: aumenta la expresión de p21 en condiciones normales y baja, pero no es nula, cuando hay estrés en RE (Figura 5.6). Por lo tanto, la fusión a APEX2 parece no afectar esta actividad de p53. Para el trabajo futuro de la línea de investigación en principio asumimos que la fusión a APEX2 no afecta mayormente la función del par p53/p47, lo que iremos corroborando a medida que avancemos en el proyecto.

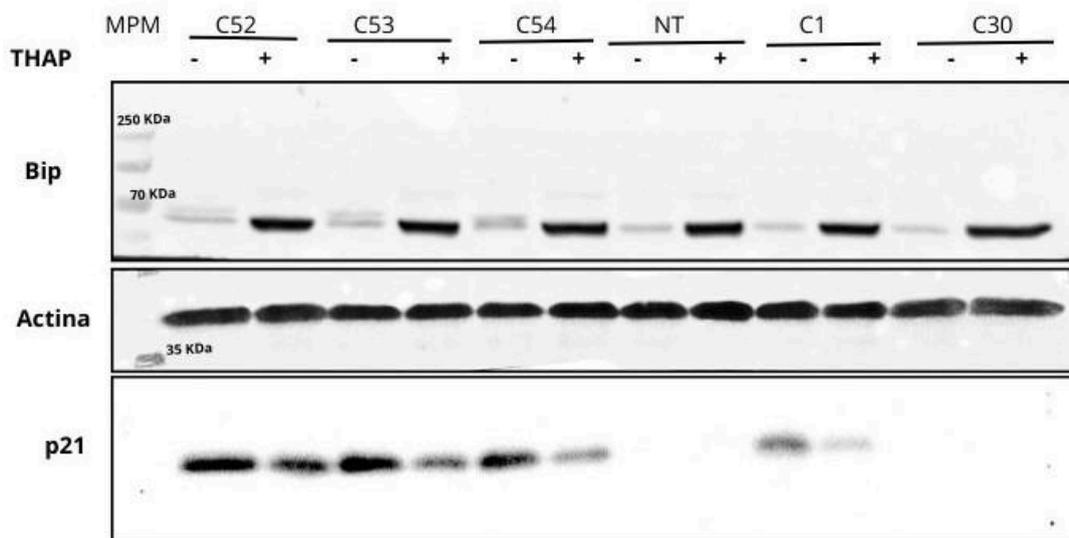


Figura 5.6. Evaluación de la expresión de p21 y BiP en presencia y ausencia de THAP. Se muestra el ensayo de western blot con anticuerpos: anti-BiP (A12) policlonal de conejo, anti-p21 (12D1) monoclonal de conejo y anti-β actina (AC-15) monoclonal de ratón. THAP +/- : tratamiento con o sin taspigargina. Se sembraron 30 µg de proteínas totales.

En paralelo, evaluamos la expresión de la chaperona Bip para analizar la inducción adecuada de la UPR. BiP es un regulador central de la homeostasis del RE que aumenta su expresión en UPR. La proteína de expresión constitutiva actina fue utilizada como control de carga y de forma complementaria, en la Figura 5.7, se presenta la tinción de la membrana con rojo ponceau. En su conjunto, estas evidencias verifican que los procedimientos del

ensayo se realizaron de forma correcta y permiten confiar en la variación de expresión de p53 y de su blanco p21 analizados más arriba.

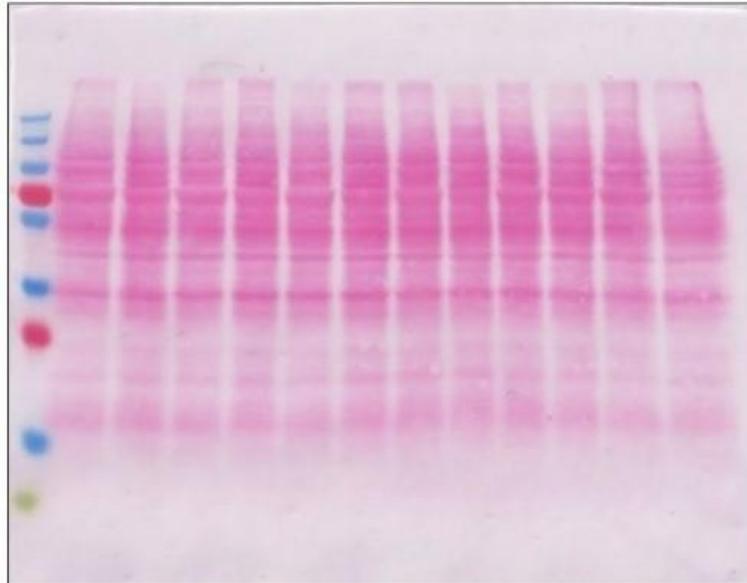


Figura 5.7. Membrana con proteínas totales transferidas teñidas con rojo Ponceau.

5.3. Evaluación de la formación de estructuras G-quadruplex en secuencias ricas en guaninas.

5.3.1. Predicción de G-quadruplex *in silico*.

Se realizó la predicción *in silico* de un conjunto de secuencias correspondientes a 5'UTR de genes que parecen estar regulados por p53 a nivel postranscripcional en UPR, según resultados obtenidos por el laboratorio mediante caracterización del transcriptoma y proteoma en células H1299 en condiciones normales y de estrés en el RE, tanto en presencia como en ausencia de p53/p47 (resultados no publicados, trabajo de Maestría en Biología Celular y Molecular de PEDECIBA de Irene Larghero Valdivia).

El análisis mediante las herramientas bioinformáticas QGRS Mapper y G4RNA screener, arrojó un conjunto de genes con potencial para formar G4 en su extremo 5'UTR. En el algoritmo QGRS Mapper, cualquier puntuación es indicativa de coincidencia de la secuencia con el motivo que caracteriza a los G4 ($GxNy_1GxNy_2GxNy_3Gx$, ver sección 4.4) pero una puntuación mayor a 30 indica alta probabilidad de formar una estructura G4 estable. Por su parte, las puntuaciones mayores a 0,5 , 2,05 y 1 en G4NN, cGcC y G4H, respectivamente, se consideran como potenciales G4. En la tabla 5.4 se muestran las secuencias mejor

puntuadas candidatas a formar G4 *in vitro*. Se aprecia que en la mayoría de los casos, las secuencias analizadas cumplen con las características de potenciales formadoras de G4.

Tabla 5.4. Resultados obtenidos por las herramientas bioinformáticas QGRS Mapper y G4RNA screener. cGcC, G4H y G4NN son tres diferentes algoritmos combinados en la herramienta G4RNA. GQRSM: Mapeo de secuencias ricas en G potenciales G4. Con rectángulos se señalan las secuencias que fueron seleccionadas para analizar in vitro de acuerdo a las observaciones descritas más abajo.

GEN	cGcC	G4H	G4NN	GQRSM
HEXIM1	51,5	1,4	0,8376	41
TGFB1	26	1,4	0,8933	34
IRF2BP2	21	1,85	0,9872	57
DDX42	11,2222	1,2833	0,7496	21
TPMT	9,8333	1,55	0,8956	39
FGF2	9,5	1,2593	0,8511	20
FXR2	8,3636	1,0833	0,7493	21

Para seleccionar las secuencias a ser evaluadas *in vitro* acerca de su capacidad de formar G4 se consideraron diferentes variables. Además del eventual interés biológico de las proteínas codificadas por los ARNm en estudio, se consideró el grado de solapamiento entre el motivo rico en Gs encontrado previamente por el laboratorio en las 5'UTRs de ARNm de interés y la región detectada como posible formadora de G4 por las herramientas informáticas utilizadas en este trabajo. En la Figura 5.8 se muestran fragmentos de las 5'UTR de los genes *FXR2* y *TGFB1*, los que finalmente fueron seleccionados para los ensayos *in vitro*. Con líneas rojas se subraya la región propensa a G4 determinada por G4RNA screener y encuadrado en negro la región obtenida mediante QGRS Mapper. Por su parte, se encuadra en azul el motivo rico en G descrito previamente por el laboratorio mediante herramienta web MEME Suite. Marcado en amarillo se muestra la secuencia que finalmente hemos seleccionado para evaluar la formación de G4 *in vitro*.

Para el oligo *FXR2*, las predicciones resueltas por los dos algoritmos bioinformáticos para G4 coinciden en gran medida. Además, se observa también que las predicciones incluyen al motivo rico en Gs encontrado previamente en el laboratorio. Por tanto, la selección de la región a estudiar *in vitro* parece bastante respaldada. La región incluye al menos una fracción de cada una de las secciones descritas más arriba.

En cambio, para el gen *TGFB1* no encontramos coincidencia ni total ni parcial entre los resultados de las predicciones bioinformáticas para G4. No obstante, sí se demuestra

5.3.2. Análisis *in vitro* de secuencias potenciales formadoras de G4.

A continuación, evaluamos la formación de G4 en fragmentos de las 5'UTR de *TGFB1* y *FXR2* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en diferentes condiciones iónicas ya que los G4 son estabilizados por cationes que pueden intercalarse en una tétrada o entre dos tétradas. Utilizamos SYBER gold para detectar ARN total y N-metilmecoporfirina IX (NMM) para detectar ARN G-quadruplex.

En primera instancia, analizamos el oligonucleótido *TGFB1* en buffer de plegado (10mM de fosfato de potasio y 40mM KCl, ver sección 4.5.1) y en presencia de NaOH que desestabiliza la estructura G4. Los resultados del gel nativo revelado con SYBRGold en la Figura 5.9 A muestran que el oligo *TGFB1* está presente en más de una conformación en condiciones de plegado. Por el contrario, cuando es incubado con NaOH solo aparece una población de moléculas, indicado por la presencia de una única banda. En paralelo, la tinción con NMM revela la presencia de una sola banda en la condición de plegado, sugiriendo que en esa población hay moléculas adoptando estructuras de G4. Sin embargo, en presencia de NaOH esperaríamos no observar G4 (panel A tinción con NMM). No obstante, es bien reconocida la elevada estabilidad de las estructuras G4, que incluso pueden mantenerse en condiciones desnaturalizantes [42,46,54]. Por tanto, los resultados obtenidos comprueban la formación de G-quadruplex en el oligonucleótido *TGFB1* (Figura 5.9), como se ha reportado previamente con técnicas de dicroísmo circular [59].

Para analizar la estabilidad de las estructuras formadas, repetimos el ensayo con el agregado de un tratamiento adicional con NaOH e incubado a 95 °C durante 20 minutos, lo que se indica con estrellas negras en el panel B de la Figura 5.9. Para este tratamiento, no se observa ninguna banda ni en el revelado con SYBER Gold ni con NMM, lo que sugiere que el oligonucleótido de ARN fue degradado. La tinción con SYBR Gold y NMM en los demás carriles del panel B sugieren la presencia de una banda correspondiente a G4 en buffer de plegado, que si bien disminuye en intensidad, igual aparece en presencia de NaOH, de igual forma a como se indicó en el panel A.

marcador de peso molecular ni en el oligonucleótido de ADN, lo cual demuestra selectividad del colorante al G4.

De forma adicional, evaluamos el oligonucleótido *TGFB1* resuspendido en agua ultrapura de tipo I (MiliQ), condición nula o muy baja cantidad de iones, que es desfavorable para la formación de las estructuras G4. En primer lugar, en la tinción con SYBR Gold evidencia la presencia de diferentes estructuras, tanto en presencia de buffer de plegado como en condición de baja carga iónica determinada por la presencia del oligonucleótido en agua ultrapura (Figura 5.10 B). Sin embargo, esperaríamos observar una única banda en la condición con baja carga iónica, que se corresponde con el oligonucleótido desplegado, en la condición desnaturalizante del gel. Algunas de estas bandas observadas podrían ser agregados multiméricos y formación de estructuras de orden superior que persistieron en condición de baja cantidad de iones y desnaturalización impuesta por el gel. Por otro lado, se analizó el oligonucleótido en agua ultrapura y presencia de 100 mM de NaOH, con la finalidad de evaluar el efecto del tratamiento alcalino en presencia de baja cantidad de iones. Como resultado, se observa una única banda en la tinción con SYBER Gold (Figura 5.8 B), lo que evidencia un cambio como resultado del agregado de NaOH. No obstante, debemos confirmar si la banda observada corresponde con el oligonucleótido desplegado o a su forma estructurada en G4 resistente al tratamiento alcalino. Por último, la tinción con NMM verifica la presencia de posible estructura G4 en el tratamiento en buffer de plegado al igual que los resultados anteriores (Figura 5.10 B) y se observa una banda de menor tamaño en las condiciones en presencia de agua ultrapura y 100 mM NaOH. Esto último refleja que la estructura G4 parece ser altamente estable a pesar de formarse en menor medida en las condiciones descritas.

En términos generales, es importante puntualizar que el gel realizado no parece desnaturalizar completamente las muestras y debemos revisar acerca de las soluciones y condiciones del gel óptimas para trabajar con oligos de ARN de pequeño tamaño. Tampoco pudimos verificar si se trata de un G4 intermolecular o intramolecular, en el primer caso, la migración del mismo se retardaría en el gel en comparación con una única molécula en estado lineal dado que lo forman más de una molécula y en el segundo, migraría a mayor velocidad debido a una compactación del oligonucleótido en la estructuración G4. Sin embargo, teniendo en cuenta que el oligonucleótido está formado por 13 residuos, debemos analizar si podemos resolver tales diferencias en el gel de concentración 15% realizado. En cualquier caso, se concluye que *TGFB1* forma G4 y que la condición en presencia de fosfato de potasio y KCl favorece en mayor medida la estabilización de la estructura. A su vez, es probable que la estructura formada se trate de G-quadruplex paralelos, conformación por la que el NMM tiene mayor afinidad. De todas maneras, la confirmación acerca de la formación

de G4, y particularmente el tipo de estructura, se deberá comprobar mediante otra metodología, como por ejemplo dicroísmo circular.

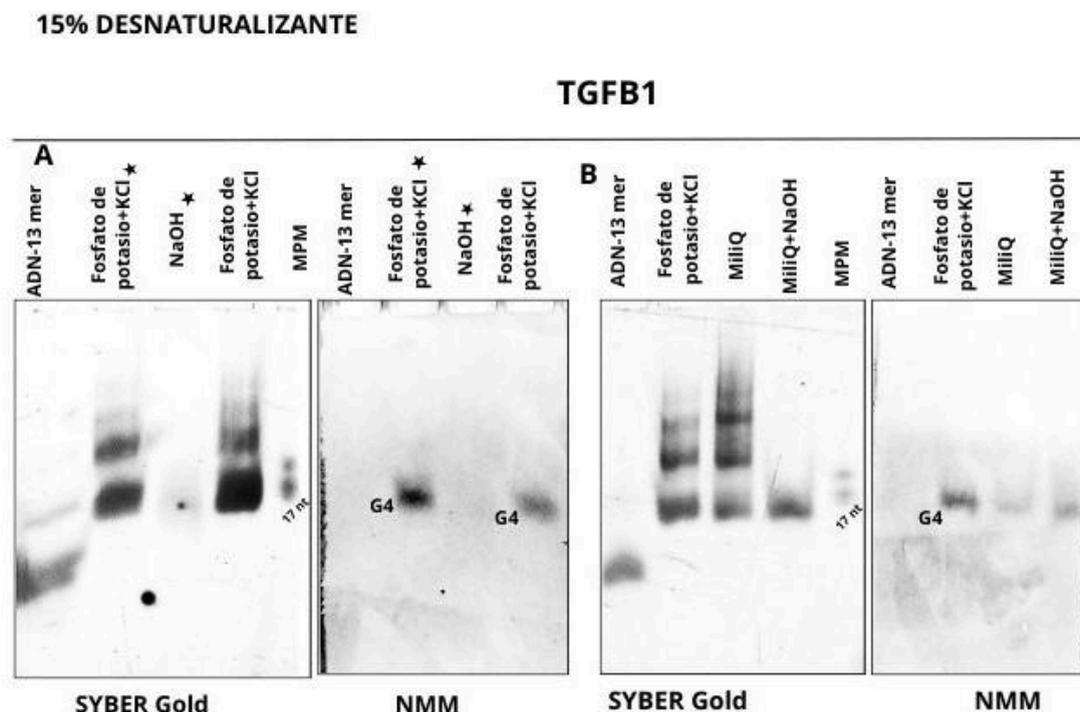


Figura 5.10. Análisis de formación de G4 en TGFB1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 15 % desnaturalizante. En la parte superior se indican las condiciones de tratamiento de las muestras. Fosfato de potasio +KCl: 40mM KCl y 10mM fosfato de potasio, pH 7. NaOH 100mM. Con estrellas negras se indica el tratamiento a 95 °C durante 5 minutos con las sales indicadas. SYBER gold: tinción de ácidos nucleicos, NMM: detección de ARN G4. Se sembraron 0,33 µg de ARN.

A continuación, evaluamos el oligonucleótido *FXR2* mediante electroforesis nativa y desnaturalizante. Los resultados del gel nativo revelado con SYBRGold en la Figura 5.11 muestran que el oligo *FXR2* está presente en más de una conformación en condiciones de plegado y en agua ultrapura tipo I. En contraste, cuando es incubado con NaOH solo aparece una población de moléculas, indicado por la presencia de una única banda. En paralelo, en la tinción con NMM no se observa señal para ninguna de las condiciones de tratamiento impuestas, lo que sugiere que el fragmento seleccionado de la secuencia de la 5'UTR del oligonucleótido *FXR2* no forma G4. No obstante, se deberán realizar más estudios para confirmar estos resultados. Una posibilidad sería realizar el ensayo en diferentes concentraciones iónicas para buscar la condición óptima de plegado de un posible G4 en el oligo *FXR2*. De hecho, el buffer de plegado utilizado en el ensayo es óptimo para el oligo *TGFB1* pero no sabemos si es apropiado para el caso de el fragmento de *FXR2*. Uno de los protocolos analizados informa que si bien una concentración de catión

monovalente de 25 mM suele ser suficiente para la formación completa del G4, en el caso de secuencias nuevas, la concentración mínima de catión para el plegamiento completo debe comprobarse mediante titulación [51].

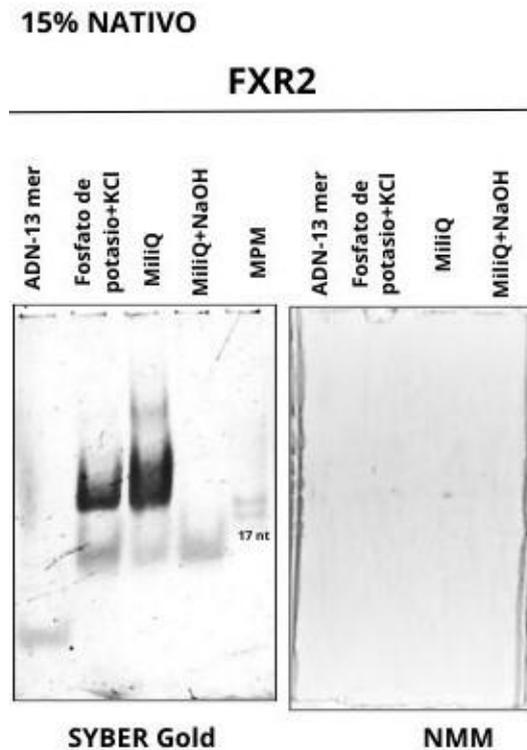


Figura 5.11. Análisis de formación de G4 en FXR2 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 15 % nativo. En la parte superior se indican las condiciones de tratamiento de las muestras. Fosfato de potasio +KCl: 40mM KCl y 10mM fosfato de potasio, pH 7. NaOH 100mM. SYBER gold: tinción de ácidos nucleico, NMM: detección de ARN G4. Se sembraron 0,20 µg de ARN.

Por último, evaluamos el oligo FXR2 en las mismas condiciones como las descritas anteriormente pero en gel desnaturalizante, Figura 5.12. Nuevamente, parece que el oligo FXR2 está presente en más de una estructura en condición de plegado y en agua ultrapura revelado con SYBER Gold. En cambio, en presencia de NaOH solo se identifica una banda. Mediante tinción con NMM se confirma la ausencia de estructuras G4 en las condiciones descritas en el ensayo, al igual que los resultados obtenidos en gel nativo analizado previamente.

15% DESNATURALIZANTE
FXR2

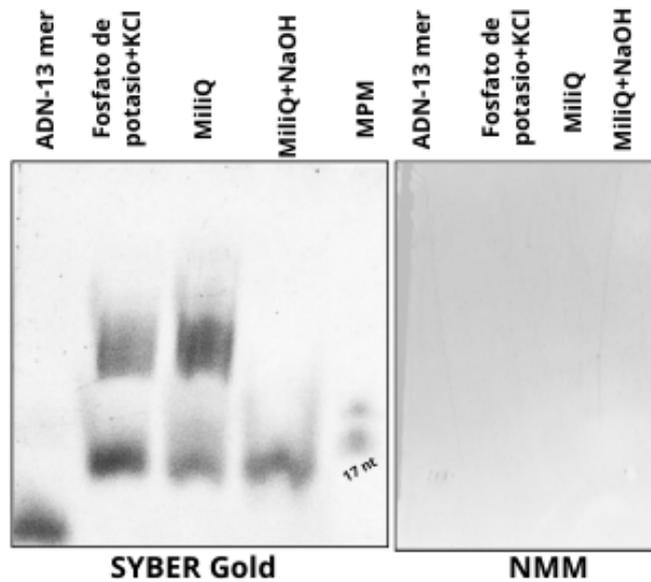


Figura 5.12. Análisis de formación de G4 en FXR2 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 15 % desnaturizante. En la parte superior se indican las condiciones de tratamiento de las muestras. Fosfato de potasio +KCl: 40mM KCl y 10mM fosfato de potasio, pH 7. NaOH 100mM. SYBER gold: tinción de ácidos nucleico, NMM: detección de ARN G4. Se sembraron 0,20 µg de ARN.

6. Conclusiones y perspectivas.

En este trabajo final de carrera, nos propusimos como objetivo general contribuir al desarrollo de herramientas que nos permitirán explorar la actividad de regulación post transcripcional de la familia p53 en UPR. En particular, hemos desarrollado vectores de expresión para usar en un modelo de células humanas que permite identificar ARNm cercanos a p53 y su isoforma p47 durante la UPR y dimos los primeros pasos para la puesta a punto de un sistema *in vitro* para estudiar la formación de G4 en oligonucleótidos de ARN. Por último, ambas aproximaciones serán utilizadas en el futuro para abordar el estudio de potenciales interacciones entre p53 y ARNm G4 en contexto de UPR.

En términos generales, los plásmidos de p53 fusionadas a APEX2 se obtuvieron en cantidad y calidad adecuada y fueron purificados mayoritariamente en su conformación superenrollada. A su vez, se confirmó la identidad del inserto mediante secuenciación Sanger. Por otro lado, mediante western blot se comprobó que el sistema de expresión en las células H1299 funcionó correctamente, las proteínas p53 y p47 fusionada a APEX2 se identifican como una banda del tamaño esperado, próximas a los 100 kDa. No obstante, no detectamos en este experimento un aumento claro de la proteína p47-APEX2 en condición de UPR. De todas maneras, la disminución de la expresión de p53-APEX2 indica que efectivamente hay un cambio en las concentraciones relativas del par p53/47-APEX2, por lo que se concluye que el tratamiento con THAP promueve la expresión diferencial de las proteínas p53 y p47 a partir de los plásmidos generados con respecto de la condición sin estrés, por lo que los plásmidos generados serán utilizados en el futuro.

A continuación, se evaluó la actividad de las proteínas p53 y su isoforma p47 fusionada a APEX frente a uno de sus blancos principales, como es el caso de p21. Se comprobó que la proteína de fusión p53-APEX tiene el mismo efecto que p53 salvaje sobre la expresión de p21, por lo tanto la fusión a APEX2 parece no afectar esta actividad de p53. De forma paralela, trabajos realizados por la Lic. Catalina Barbot confirman los resultados obtenidos ya que se evidencia una actividad adecuada de la proteína de fusión sobre la expresión de p21 y otros blancos claves analizada mediante RT-qPCR.

Se comprobó *in silico* el potencial para formar G4 de un conjunto de secuencias correspondientes a 5'UTR de genes de interés, mediante dos tipos diferentes de herramientas bioinformáticas complementarias. Esto sirvió de base para seleccionar oligos que fueron analizados *in vitro* durante este trabajo pero además será utilizado en el futuro para identificar nuevas regiones de otros ARNm de interés con potencial de formar G4 y estudiar la eventual implicancia de estas estructuras en la regulación traduccional mediada

por p53. Por último, desarrollamos un sistema para estudiar la formación de estructuras G4 *in vitro* en diferentes condiciones iónicas que juegan un rol fundamental en la estabilización de la estructura G4. Confirmamos la presencia de G4 en el oligo de ARN *TGFB1*, como se ha reportado anteriormente, lo que valida el modelo desarrollado. En contraste, en las condiciones del ensayo no identificamos G4 en *FXR2 in vitro*. No obstante, debemos realizar más estudios para confirmar estos resultados. De hecho, si bien una concentración de catión monovalente de 25 mM suele ser suficiente para la formación completa del G-quadruplex, debemos buscar la concentración mínima de catión para el plegamiento completo del oligo *FXR2* [52]. De todas formas, en términos generales desarrollamos un modelo para estudiar estructura de ARN G4, el cual debemos perfeccionar.

Como perspectiva y en el marco del proyecto ANII FCE_1_2023_1_175762 dirigido por el tutor de esta tesina, proponemos identificar los ARNm cercanos a las isoformas p53 y p47 durante la UPR por medio del modelo celular que hemos contribuido a desarrollar, lo que permitirá obtener un conjunto de ARNs que podrían estar regulados por la familia p53 en condición de UPR. Además, pretendemos analizar las conformaciones adoptadas por los ARNm y su dinámica. En particular, evaluaremos si los G4 pueden actuar como plataforma de unión para la proteína p53 y si contribuyen en controlar la expresión de proteínas codificadas en los ARNm involucrados. Por otro lado, es de nuestro interés analizar un conjunto amplio de ARNs mediante el sistema de identificación de G4 *in silico* e *in vitro* generado, así como también estudiar algunas secuencias seleccionadas mediante aproximaciones biofísicas como dicroísmo circular y curvas de disociación medidas en UV.

7. Bibliografía.

- 1 Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017;**170**(6):1062–1078.
- 2 Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature*. 1979;**278**(5701):261–263.
- 3 Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;**8**(1):1–35.
- 4 Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2021;**1876**(1):188556.
- 5 Joerger AC, Fersht AR. The Tumor Suppressor p53: From Structures to Drug Discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;**2**(6):a000919–a000919.
- 6 Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data: Human Mutation. *Hum Mutat*. 2016;**37**(9):865–876.
- 7 Naryzhny SN, Legina OK. [Structural-functional diversity of p53 proteoforms]. *Biomeditsinskaja Khimiia*. 2019;**65**(4):263–276.
- 8 Joerger AC, Fersht AR. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *Annu Rev Biochem*. 2008;**77**(1):557–582.
- 9 Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;**20**(4):199–210.
- 10 Shadfan M, Lopez-Pajares V, Yuan Z-M. MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53. 2012.
- 11 D P, Y Z, J Z. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx. *Oncotarget*. 2012;**3**(3).
- 12 Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R. The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res*. 2013;**27**(4):254–271.
- 13 Klein AM, De Queiroz RM, Venkatesh D, Prives C. The roles and regulation of MDM2 and MDMX: it is not just about p53. *Genes Dev*. 2021;**35**(9–10):575–601.
- 14 Steffens Reinhardt L, Groen K, Newton C, Avery-Kiejda KA. The role of truncated p53 isoforms in the DNA damage response. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2023;**1878**(3):188882.
- 15 Nutthasirikul N, Limpiboon T, Leelayuwat C, Patrakitkomjorn S, Jearanaikoon P. Ratio disruption of the Δ 133p53 and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Oncol*. 2013;**42**(4):1181–1188.
- 16 Ignacio López, Irene Larghero Valdivia, Borivoj Vojtesek, Robin Fähræus, Philip J. Coates. Re-appraising the evidence for the source, regulation and function of p53-family

- isoforms. *Nucleic Acids Research*.
- 17 Fusée LTS, Marín M, Fåhraeus R, López I. Alternative Mechanisms of p53 Action During the Unfolded Protein Response. *Cancers*. 2020;**12**(2):401.
 - 18 Bourdon J-C. p53 Family Isoforms. *Curr Pharm Biotechnol*. 2007;**8**(6):332–336.
 - 19 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;**408**(6810):307–310.
 - 20 Ou H-L, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood*. 2018;**131**(5):488–495.
 - 21 Abuetabh Y, Wu HH, Chai C, Al Yousef H, Persad S, Sergi CM, et al. DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. *Exp Mol Med*. 2022;**54**(10):1658–1669.
 - 22 Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;**18**(4):444–452.
 - 23 Chong WC, Shastri MD, Eri R. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2017;**18**(4):771.
 - 24 Almanza A, Carlesso A, Chinthra C, Creedican S, Doultinos D, Leuzzi B, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *Febs J*. 2019;**286**(2):241–278.
 - 25 Gülow K, Bienert D, Haas IG. BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency. *J Cell Sci*. 2002;**115**(11):2443–2452.
 - 26 Georgakopoulos-Soares I, Parada GE, Hemberg M. Secondary structures in RNA synthesis, splicing and translation. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022;**20**:2871–2884.
 - 27 Lewis CJT, Pan T, Kalsotra A. RNA modifications and structures cooperate to guide RNA–protein interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;**18**(3):202–210.
 - 28 Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Dev Cell*. 2002;**3**(1):99–111.
 - 29 Qi L, Tsai B, Arvan P. New Insights into the Physiological Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Trends Cell Biol*. 2017;**27**(6):430–440.
 - 30 Rivera-Krstulović C, Duran-Aniotz C, Rivera-Krstulović C, Duran-Aniotz C. La respuesta a proteínas mal plegadas como blanco terapéutico en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Médica Chile*. 2020;**148**(2):216–223.
 - 31 Qu L, Huang S, Baltzis D, Rivas-Estilla A-M, Pluquet O, Hatzoglou M, et al. Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3 β . *Genes Dev*. 2004;**18**(3):261–277.

- 32** Baltzis D, Pluquet O, Papadakis AI, Kazemi S, Qu L-K, Koromilas AE. The eIF2 α Kinases PERK and PKR Activate Glycogen Synthase Kinase 3 to Promote the Proteasomal Degradation of p53. *J Biol Chem*. 2007;**282**(43):31675–31687.
- 33** Bourougaa K, Naski N, Boularan C, Mlynarczyk C, Candeias MM, Marullo S, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induces G2 Cell-Cycle Arrest via mRNA Translation of the p53 Isoform p53/47. *Mol Cell*. 2010;**38**(1):78–88.
- 34** Mlynarczyk C, Fåhreaus R. Endoplasmic reticulum stress sensitizes cells to DNA damage-induced apoptosis through p53-dependent suppression of p21CDKN1A. *Nat Commun*. 2014;**5**(1):5067.
- 35** Powell DJ, Hrstka R, Candeias M, Bourougaa K, Vojteseka B, Fåhreaus R. Stress-dependent changes in the properties of p53 complexes by the alternative translation product p53/47. *Cell Cycle*. 2008;**7**(7):950–959.
- 36** Candeias MM, Powell DJ, Roubalova E, Apcher S, Bourougaa K, Vojtesek B, et al. Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. *Oncogene*. 2006;**25**(52):6936–6947.
- 37** Mathai JP, Germain M, Shore GC. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem*. 2005;**280**(25):23829–23836.
- 38** López I, Tournillon A-S, Nylander K, Fåhreaus R. p53-mediated control of gene expression via mRNA translation during Endoplasmic Reticulum stress. *Cell Cycle*. 2015;**14**(21):3373–3378.
- 39** López I, Tournillon A-S, Prado Martins R, Karakostis K, Malbert-Colas L, Nylander K, et al. p53-mediated suppression of BiP triggers BIK-induced apoptosis during prolonged endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2017;**24**(10):1717–1729.
- 40** Tournillon A-S, López I, Malbert-Colas L, Findakly S, Naski N, Olivares-Illana V, et al. p53 binds the mdmx mRNA and controls its translation. *Oncogene*. 2017;**36**(5):723–730.
- 41** Riley KJ-L, Maher LJ. p53–RNA interactions: New clues in an old mystery. *RNA*. 2007;**13**(11):1825–1833.
- 42** Dumas L, Herviou P, Dassi E, Cammas A, Millevoi S. G-Quadruplexes in RNA Biology: Recent Advances and Future Directions. *Trends Biochem Sci*. 2021;**46**(4):270–283.
- 43** Zhang L, Lu Y, Ma X, Xing Y, Sun J, Jia Y. The potential interplay between G-quadruplex and p53: their roles in regulation of ferroptosis in cancer. *Front Mol Biosci*. 2022;**9**:965924.
- 44** Petr M, Helma R, Polášková A, Krejčí A, Dvořáková Z, Kejnovská I, et al. Wild-type p53 binds to MYC promoter G-quadruplex. *Biosci Rep*. 2016;**36**(5):e00397.
- 45** Fay MM, Lyons SM, Ivanov P. RNA G-quadruplexes in biology: principles and molecular mechanisms. *J Mol Biol*. 2017;**429**(14):2127–2147.
- 46** Kwok CK, Merrick CJ. G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological

- Application. *Trends Biotechnol.* 2017;**35**(10):997–1013.
- 47** M M, K C, D G, A T, Z G. Overview of the RNA G-quadruplex structures. *Acta Biochim Pol.* 2016;**63**(4).
- 48** Varshney D, Spiegel J, Zyner K, Tannahill D, Balasubramanian S. The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;**21**(8):459–474.
- 49** Sun Z-Y, Wang X-N, Cheng S-Q, Su X-X, Ou T-M. Developing Novel G-Quadruplex Ligands: From Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid–Protein Interaction. *Molecules.* 2019;**24**(3):396.
- 50** Marcel V, Tran PLT, Sagne C, Martel-Planche G, Vaslin L, Teulade-Fichou M-P, et al. G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis.* 2011;**32**(3):271–278.
- 51** Del Villar-Guerra R, Gray RD, Chaires JB. Characterization of Quadruplex DNA Structure by Circular Dichroism. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2017;**68**:17.8.1-17.8.16.
- 52** Puig Lombardi E, Londoño-Vallejo A. A guide to computational methods for G-quadruplex prediction. *Nucleic Acids Res.* 2020;**48**(1):1–15.
- 53** Adrian M, Heddi B, Phan AT. NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods.* 2012;**57**(1):11–24.
- 54** Schult P, Paeschke K. In-gel staining methods of G4 DNA and RNA structures. *Methods in Enzymology.* 2024. Elsevier. p. 29–43.
- 55** Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;**150**(1):76–85.
- 56** Kikin O, D'Antonio L, Bagga PS. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 2006;**34**(Web Server issue):W676-682.
- 57** Garant J-M, Perreault J-P, Scott MS. Motif independent identification of potential RNA G-quadruplexes by G4RNA screener. *Bioinformatics.* 2017;**33**(22):3532–3537.
- 58** Beaudoin J-D, Jodoin R, Perreault J-P. New scoring system to identify RNA G-quadruplex folding. *Nucleic Acids Res.* 2014;**42**(2):1209–1223.
- 59** Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, Drewe P, Rajasekhar VK, Sanghvi VR, et al. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature.* 2014;**513**(7516):65–70.
- 60** Yett A, Lin LY, Beseiso D, Miao J, Yatsunyk LA. N-methyl mesoporphyrin IX as a highly selective light-up probe for G-quadruplex DNA. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2019;**23**(11n12):1195–1215.
- 61** Lindner P, Christensen SB, Nissen P, Møller JV, Engedal N. Cell death induced by the ER stressor thapsigargin involves death receptor 5, a non-autophagic function of MAP1LC3B, and distinct contributions from unfolded protein response components. *Cell Commun*

Signal. 2020;**18**(1):12.

8. Anexos.

8.1. Secuencias obtenidas de los plásmidos generados.

A continuación se muestra las secuencias obtenidas con cada primer y posteriormente las secuencias completa del gen codificante para la proteína de fusión p53-APEX2 para cada uno de los respectivos plásmidos generados.

C52:

>BHG_R

```
TATAGAATAGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGTTATCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATGATCCGCCGGC
ATCAGCAAACCCAAAGCTCGGAAAGCTTTTGGTGAGCCTCAGCGTAATCAGCAAAGAAGGCATCTTCGTCCGCTGCATA
TTTGTCAACGAGAGGGCGGAATACAGGGTCAGACAAAAGAGCCTTGTGAGAAGGTAGCTGAAGGAGACCTTCCTTCT
CACCCTCAACAACTCCGTGAAGTATGAGTTGTGAAAATAAGAGGATTAGAGGTCCAGGGACCCTCAAATCCAGAAG
GCTCCTTGTGTGCAGCTCCAATAGTGTGACCCCGAGATAGAGCAACGATATCTTGGTCAGTAAGCCCATAGCTTTGC
CAAACACATCTCTCAAATGGTCAGAACCCTTAGTGGGATCGGGCAAGCGACCCTCTGGTGGTGGCTCAGGCTGTCC
TCTCTCCAGGGTGGAATGGAACCTTAGGTCCACCCGTGACCTCAACGGCAACAACGCCAGCCAACCTGGTAGAAATC
GGCGTAGCTCAAAATAGGGAACCTCCGCCTTGAGTGGCTCAAAAGCCTAACAGCGGATGTCAAGACCGTTGTTAGCGC
TGTGAGCCAGTTCGGCAGGGTGTGATGGTCCGAAGGGTCCACCGGTCTTCGTGCCCTGTCAAAGGTTCCAGCA
GAGTGAATGCCAAACGGAGCATTAGAGGAGCGCATCTTCTCAGCGATGAAGCCTCTGAGCTCTTCTTCGCTTC
TCAACGGCGTCTGGTAATCAGCACTCACAGTTGGGTAAGACTTTCTGATCCGCCACCGTCTGAGTCAGGCCCTTCT
GTCTTGAACATGAGTTTTTATGGCGGGAGGTAGACTGACCCTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTGAGCCCTGCT
```

>CMV_F

```
GAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAG
CTTACTGCCATGGAGGAGCCGCGAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATG
GAAACTACTTCTGAAAACAACGTTCTGTCCCTTGGCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCGGACGA
TATTGAACAATGGTTCAGTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAATGCCAGAGGTGCTCCCTCCGTGGCC
CTGCACCAGCAGCTCTACACCGGGCGCCCTGCACCAGCCCTCTGGCCCTGTGATCTTCTGTCCCTCCAG
AAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTCGGTCTGGGCTTCTTGCACTTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAC
TCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAAGTGGCCAAGACCTGCCCTGTGAGCTGTGGGTGATTCCACACCCCG
GCCCGGCACCCCGCTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCG
CACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCTCTCAGCATCTTATCCGAGTGAAGGAAATTTGCGTGT
GGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTCCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTG
TACCACCATCCACTACAACATGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCAT
CACACTGGAAGACTCCAGTGGAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTG
```

>P9_F

```
CGGCGCACAGAGGAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAG
CACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCAGCCAAAGAAGAAACCCTGGATGGAGAATATTTACCCCTCAGATCC
GTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGA
GCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCGCCATAAAAACTCA
TGTTCAAGACAGAAGGGCTGACTCAGACGGTGGCGGATCAGGAAAGTCTTACCAACTGTGAGTGTGATTACCAG
GACGCCGTTGAGAAGGCGAAGAAGAAGCTCAGAGGCTTCATCGCTGAGAAGAGATGCGCTCCTCTAATGCTCCGTT
GGCATTCCACTCTGCTGGAACCTTTGACAAGGGCACGAAGACCGGTGGACCCTTCGGAACCATCAAGCACCCCTGCCG
AACTGGCTCACAGCGCTAACAACGGTCTTGACATCGCTGTTAGGCTTTGGAGCCACTCAAGGCGGAGTCCCTATTT
TGAGCTACGCCGATTTCTACCAGTTGGCTGGCGTGTGGCGTGTGAGGTCACGGGTGGACCTAAGGTTCCATTCCAC
CCTGGAAGAGAGGACAAGCCTGAGCCACCACAGAGGGTCGCTTCCCGATCCCACTAAGGGTCTGACCATTGAG
AGATGTGTTTGGCAAAGCTATGGGCTTACTGACCAAGATATCGTTGCTCTATCTGGGGGTACACTATTGGAGCTGC
ACACAAGGAGCGTCTGGGATTTGAGGGTCCCTGGACCTCTAATCCTCTTATTTTCGACAACCTCATACTTCACGGAGTT
G
```

C52

Promotor CMV	
GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTCCAAGTCTC	
CACCCCATTGACGTC AATGGGAGTTGTTTTGGCACCAAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA	
<u>ACTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT</u>	
CTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCC	
AAGCTTACTGCCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTT	
TCAGACCTATGGAAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATT	
TGATGCTGTCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCCTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGTCCAGAA	
TGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCC	
CCCTCCTGGCCCTGTCTCTGTCCCTTCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTCCGTCTGG	
GCCTTCTGCATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGACTCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTG	
CCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGCACCCCGCTCC	
GGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAG	
CGTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCTCCTCAGCATTTATCCGAGTGAAGGAAATTTGCGTGTG	
GAGTATTTGGATGACAGAAACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGC	
TCTGACTGTACCACCTCCACTACAACATCATGTGAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGG	
CCCATCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTG	
CGTGTTTGTGCTGTCTGCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCC	
TCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGC	
CAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCCTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGT	
TCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGAAGTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAG	
GGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAGGGTCACTACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTCAA	
GACAGAAGGGCCTGACTCAGACGGTGGCGGATCAGGAAAGTCTTACCCAAGTGTGAGTGCATGATTACC	
AGGACGCCGTTGAGAAGGCGAAGAAGAAGCTCAGAGGCTTCATCGCTGAGAAGAGATGCGCTCCTCTA	
ATGCTCCGTTTGGCATTCCACTCTGCTGGAACCTTTGACAAGGGCACGAAGACCGGTGGACCCTTCGGA	
ACCATCAAGCACCTGCCGAAGTGGCTCACAGCGCTAACAAACGGTCTTGACATCGCTGTTAGGCTTTTG	
GAGCCACTCAAGGCGGAGTTCCTATTTTGTAGCTACGCCGATTTCTACCAGTTGGCTGGCGTTGTTGCCG	
TTGAGGTCACGGGTGGACCTAAGGTTCCATTCCACCCTGGAAGAGAGGACAAGCCTGAGCCACCACCA	
GAGGGTCGCTTGGCCGATCCCACTAAGGGTCTGACCATTGAGAGATGTGTTGGCAAAGCTATGGGG	
CTTACTGACCAAGATATCGTTGCTCTATCTGGGGGTCACACTATTGGAGCTGCACACAAGGAGCGTTCTG	
GATTTGAGGGTCCCTGGACCTCTAATCCTCTATTTTCGACAACCTACTTACCGGAGTTGTTGAGTGGT	
GAGAAGGAAGGTCTCCTCAGCTACCTTCTGACAAGGCTCTTTTGTCTGACCCTGTATTCGCCCTCTCG	
TTGACAAATATGCAGCGGACGAAGATGCCTTCTTTGCTGATTACGCTGAGGCTCACAAAAGCTTTCCGA	
GCTTGGGTTTGCTGATGCCGGCGGATCATACCCATAAGATGTTCCAGATTACGCTTGATAACTCGAGCAT	
GCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA	
CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGC	
CACTCCCCTGCTTCTTAATAAAAATGAGGAAATGCATCGATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC	
TGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA	
TGCGGTGGGCTCTATGG	(Señal poliadenilación BGH)

p53

link

APEX2

link

tag-HA

C53:

>BGH_R

TATAGAATAGGGCCCTCTAGATGCATGCTTCGAGTTATCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGGCATCAGCAA
ACCCAAGCTCGGAAAGCTTTTGGTGAGCCTCAGCGTAATCAGCAAAGAAGGCATCTTCGTCCGCTGCATATTTGTCAA
CGAGAGGGCGGAATACAGGGTCAGACAAAAGAGCCTTGTGAGAAGTAGCTGAAGGAGACCTTCCTTCTCACCCTC
AACAACTCCGTGAAGTATGAGTTGTGAAAAATAAGAGGATTAGAGGTCCAGGGACCCTCAAATCCAGAACGCTCCTTG
TGTGCAGCTCCAATAGTGTGACCCCAAGATAGAGCAACGATATCTTGGTCAGTAAGCCCAATAGCTTTGCCAAACACA
TCTCTCAAATGGTCAGAACCCTTAGTGGGATCGGGCAAGCGACCCTCTGGTGGTGGCTCAGGCTTGTCTCTCTTCCA
GGGTGGAATGGAACCTTAGGTCCACCCGTGACCTCAACGGCAACAACGCCAGCCAACCTGGTAGAAATCGGCGTAGCT
CAAAATAGGGAACCTCCGCCTTGGTGGCTCCAAAAGCCTAACAGCGATGTCAAGACCCTTGTAGCGCTGTGAGCCA
GTTCCGGCAGGGTGTCTGATGTTCCGAAGGGTCCACCGTCTTCGTGCCCTGTCAAAGGTTCCAGCAGAGTGAAT
GCCAAACGGAGCATTAGAGGAGCGCATCTCTTCTCAGCGATGAAGCCTCTGAGCTTCTTCTCGCCTTCTCAACGGCG
TCCTGGTAATCAGCACTCACAGTTGGGTAAGACTTTCTGATCCGCCACCCTGAGTCAAGCCCTTCTGTCTTGAAC
ATGAGTTTTTATGGCGGGAGGTAGACTGACCCTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTGAGCCCTGCTCCCCCTGG
CTCCTTCCAGCCTGGGCATCCTTGAATCCAAGG

>CMV_F

CTAGAGAACCCTACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTACTGCCATGGAG
GAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAAACTACTTCTGAA
AACAACTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTG
ACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAAATGCCAGAGGGCTGCTCCCCCGTGGCCCTGCACCAGCAGCTG
CTACACCGGGCCCTGCACCAGCCCCCTCTGGCCCTGTCACTTCTGTCCCTTCCAGAAAACCTACCAGGGC
AGTACGGTTCCGCTCTGGGCTTCTTGCACTTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAATCCCTGCCCTCAAC
AAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGTTGATTCCACACCCCGCCCGGCACCCGCGT
CCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGC
TCAGATAGCGATGGTCTGGCCCTCCTCAGCATCTATCCGAGTGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGAC
AGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTAC
AACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACTGGAAGACTCC
AGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTGCCTGTCTGGGAGAGACCGGCCACAGAGGA
AGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAG

>p9_F

TCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACAACACCAGC
TCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCCTGGATGGAGAATATTTACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGA
GATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGAACCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCT
CACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCC GCCATAAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCT
GACTCAGACGGTGGCGGATCAGGAAAGTCTTACCCAAGTGTGAGTGTGATTACCAGGACGCCGTTGAGAAGGCGAA
GAAGAAGCTCAGAGGCTTCATCGCTGAGAAGAGATGCGCTCCTTAATGCTCCGTTTGGCATTCCACTCTGCTGGAAC
CTTTGACAAGGGCACGAAGACCGGTGGACCCTTCCGAACCATCAAGCACCCCTGCCGAACCTGGCTCACAGCGCTAACA
ACGGTCTTGACATCGCTGTAGGCTTTTGGAGCCACTCAAGGCGGAGTTCCTATTTTGGAGCTACGCCGATTTCTACC
AGTTGGCTGGCGTTGTTGCCGTTGAGGTCACGGGTGACCTAAGGTTCCATTCCACCCTGGAAGAGAGGACAAGCCT
GAGCCACCACCAGAGGTCGCTTGCCCGATCCCACTAAGGTTCTGACCATTTGAGAGATGTGTTTGGCAAAGCTAT
GGGGCTTACTGACCAAGATATCGTTGCTCTATCTGGGGTACACTATTGGAGCTGCACACAAGGAGCGTTCTGGATT
TGAGGGTCCCTGGACCTTAATCCTCTATTTTCGACAACCTACTTTCACGGAGTGTGAGTGGTGAAGGAAGG
TCTCCTCAGCTACCTTCTGACAAGGCTCTTTTGTCTGA

C53

Promotor CMV

```
GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCA
AGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAA
AATGTCGTAACAACCTCCGCCCAATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCT
ATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATAC
GACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTACTGCCATGGAGGAGCCGCGAGTCAGATCCTAGCGTCGAG
CCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCT
TGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCCTGAAGACC
CAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCTGCACCAGCAGCTCCT
ACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCTGGCCCTGTCTATCTTCTGTCCCTTCCAGAAAACCTAC
CAGGGCAGCTACGGTTCCGTCTGGGCTTCTTGCACTTCTGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCAGTACT
CCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACTGCCCTGTGCAGCTGTGGTTGATTCCA
CACCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTT
GTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCTCCTCAGCATCTTATC
CGAGTGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGT
CCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACTACATGTGTAACAGTTCCT
GCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTAG
TGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTGCTGTCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAG
AATCTCGCAAGAAAGGGGAGCCTACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAA
CAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCCCTCAGATCCG
TGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCTTGAAGTCAAGGATGCCAGGCTG
GGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACTGAAGTCCAAAAGGGTCAGTCTACCTCC
CGCCATAAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACGGTGGCGGATCAGGAAAGTCTTAC
CCAAGTGTGAGTGCTGATTACCAGGACGCCGTTGAGAAGGCGAAGAAGAAGCTCAGAGGCTTCATCGC
TGAGAAGAGATGCGCTCCTCTAATGCTCCGTTTGGCATTCCACTCTGCTGGAACCTTTGACAAGGGCAC
GAAGACCGGTGGACCCTTCGGAACCATCAAGCACCTGCCGAAGTGGCTCACAGCGCTAACACGGTC
TTGACATCGCTGTTAGGCTTTTGGAGCCACTCAAGGCGGAGTTCCTATTTTGGAGTACGCCGATTCTA
CCAGTTGGCTGGCGTTGTTGCCGTTGAGGTCACGGGTGGACCTAAGGTTCCATTCCACCCTGGAAGAGA
GGACAAGCCTGAGCCACCACCAGAGGGTCGCTTCCCCGATCCACTAAGGGTCTGACCATTGAGAG
ATGTGTTTGGCAAAGCTATGGGGCTTACTGACCAAGATATCGTTGCTCTATCTGGGGTACACTATTGG
AGCTGCACACAAGGAGCGTTCTGGATTGAGGGTCCCTGGACCTAATCCTCTTATTTTCGACAACCTCA
TACTTACGGAGTTGTTGAGTGGTGAGAAGGAAGGTCTCCTTACGCTACCTTCTGACAAGGCTCTTTTGT
CTGACCCTGTATTCGCCCTCTCGTTGACAAAATATGCAGCGGACGAAGATGCCTTCTTTGCTGATTACGC
TGAGGCTACCAAAAAGCTTTCCGAGCTTGGGTTTGTGATGCC TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT
TGATAACTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCA
GCCTCGACTGTGCCTTCTAG TTGCCAGCCATCTGTTG
```

p53

link

APEX

tag-HA

```
TTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTTAATAAAATGA
GAAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGCTATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGCAGGACAGCAA
GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
```

(Señal poliadenilación BGH)

C54:

>BGH_R

GCCCTCTAGATGCATGCTCGAGTTATCAGGCATCAGCAAACCCAAGCTCGGAAAGCTTTTGGTGAGCCTCAGCGTAAT
CAGCAAAGAAGGCATCTTCGTCGCTGCATATTTGTCAACGAGAGGGCGGAATACAGGGTCAGACAAAAGAGCCTTG
TCAGAAGGTAGCTGAAGGAGACCTTCCTTCTCACCCTCAACAACCTCCGTGAAGTATGAGTTGTCGAAAATAAGAGGA
TTAGAGGTCCAGGGACCCTCAAATCCAGAACGCTCCTTGTGTGCAGCTCCAATAGTGTGACCCCAAGATAGAGCAAC
GATATCTTGGTCAGTAAGCCCCATAGCTTTGCCAAACACATCTCTCAAATGGTCAGAACCCTTAGTGGGATCGGGCAA
GCGACCCTCTGGTGGTGGCTCAGGCTTGCCTCTCTCCAGGGTGAATGGAACCTTAGGTCCACCCGTGACCTCAA
CGGCAACACGCCAGCCAACCTGGTAGAAATCGGCGTAGCTCAAATAGGGAACCTCCGCCTTGAGTGGCTCCAAAAGC
CTAACAGCGATGTCAAGACCGTTGTTAGCGCTGTGAGCCAGTTCGGCAGGGTGCCTGATGGTTCCGAAGGGTCCACC
GGTCTTCGTGCCCTGTCAAAGGTTCCAGCAGAGTGAATGCCAAACGGAGCATTAGAGGAGCGCATCTCTTCTCAG
CGATGAAGCCTCTGAGCTTCTTCTCGCCTTCTCAACGGCGTCTGGTAATCAGCACTCACAGTTGGGTAAGACTTTT
CTGATCCGCCACCGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTGAACATGAGTTTTTATGGCGGGAGGTAGACTGACCTTTT
TGGACTTCAGGTGGCTGGAGTGAAGCCTGCTCCCCCTGGCTCCTTCCAGCCTGGGCATCCTGAGTTCCAAGGCC
TCATTGAGCTCTCGAA

>CMV_F

ACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTACTGCCATGGAGGAGCCGCGAGTC
AGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCTGAAAACAACGTTCT
GTCCCCCTTGCCGTCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCC
AGGTCCAGATGAAGCTCCAGAAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCG
GCCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCGTGCATCTTCTGTCCCTTCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTT
CCGTCTGGGCTTCTTGCACTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGACGTACTCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTG
CCAACCTGGCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCACACCCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATG
GCCATCTACAACGACTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGA
TGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTT
TCGACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACTACATGTG
TAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCT
ACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTGCTGTCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTC
CGCAAGAAAGGGGAGCCTCACACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAA

>p9_F

AATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCAAACAACACCA
GCTCCTCTCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTC
GAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGAAGTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGG
GCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAGGGTCACTACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGG
CCTGACTCAGACGGTGGCGGATCAGGAAAGTCTTACCAACTGTGAGTGTGATTACCAGGACGCCGTTGAGAAGGC
GAAGAAGAAGCTCAGAGGCTTCATCGCTGAGAAGAGATGCGCTCCTTAATGCTCCGTTTGGCATTCCACTCTGCTGG
AACCTTTGACAAGGGCACGAAGACCGGTGGACCCTTCGGAACCATCAAGCACCCCTGCCAACTGGCTCACAGCGCTA
ACAACGGTCTTGACATCGCTGTTAGGCTTTGGAGCCACTCAAGGCGGAGTTCCCTATTTTGGAGCTACGCCGATTTCT
ACCAGTTGGCTGGCGTTGTTGCCGTTGAGGTACGGGTGGACCTAAGGTTCCATTCCACCCTGGAAGAGAGGACAAG
CCTGAGCCACCACAGAGGGTCCGTTGCCCGATCCACTAAGGTTCTGACCATTTGAGAGATGTGTTTGGCAAAGC
TATGGGGCTTACTGACCAAGATATCGTTGCTCTATCTGGGGTCACTATTGGAGCTGCACACAAGGAGCGTTCTGG
ATTTGAGGGTCCCTGGACCTAATCCTTATTTTCGACAACCTACACTTACGGAGTTGTTGAGTGGTGAAGGAA
GGTCTCCTTCACTACCTTCTGACAAGGCTCTTTTGTCTGACCCTGTA

C54

Promotor CMV

GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTC
CACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT
CTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCC
AAGCTTACTGCCATGGAGGAGCCGAGTCAGATCCTAGCGTGGAGCCCTCTGAGTCAGGAAACATT
TCAGACCTATGGAACTACTTCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATT
TGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCAGTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAA
TGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCC
CCCTCCTGGCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGG
GCTTCTTGCACTTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAATCTCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTG
CCAATGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGTTGATTCCACACCCCCGCCGGCACCCGCGTCC
GCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAG
CGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGAAGGAAATTTGCGTGTG
GAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGC
TCTGACTGTACCACCATCCACTACAACATACATGTGTAACAGTTCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGG
CCCATCCTCACCATCATCACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTG
CGTGTGTGCTGTCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCC
TCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCCTCCAGC
CAAAGAAGAAACCCTGGATGGAGAATATTTACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGT
TCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGAAGTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAG
GGCTACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCACTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTTCAA
GACAGAAGGGCCTGACTCAGACGGTGGCGGATCAAGAAAGTCTTACCCAAGTGTGAGTGTGATTACC
AGGACGCCGTTGAGAAGGCGAAGAAGAAGCTCAGAGGCTTCATCGCTGAGAAGAGATGCGCTCCTCTA
ATGCTCCGTTTGGCATTCCACTCTGCTGGAACCTTTGACAAGGGCACGAAGACCGGTGGACCCTTCGA
ACCATCAAGCACCTGCCGAAGTGGCTCACAGCGCTAACAACGGTCTTGACATCGCTGTTAGGCTTTG
GAGCCACTCAAGGCGGAGTTCCTATTTGAGCTACGCCGATTTCTACCAGTTGGCTGGCGTTGTTGCC
TTGAGGTCACGGGTGGACCTAAGGTTCCATTCCACCCTGGAAGAGAGGACAAGCCTGAGCCACCACCA
GAGGGTGCCTTGGCCGATCCCACTAAGGGTTCTGACCATTGAGAGATGTGTTGGCAAAGCTATGGGG
CTTACTGACCAAGATATCGTTGCTCTATCTGGGGGTCACACTATTGGAGCTGCACACAAGGAGCGTTCTG
GATTTGAGGGTCCCTGGACCTCTAATCCTCTATTTTCGACAACCTCATACTTCACGGAGTTGTTGAGTGGT
GAGAAGGAAGTCTCCTCAGCTACCTTCTGACAAGGCTCTTTGTCTGACCCTGTATTCCGCCCTCTCG
TTGACAAATATGCAGCGGACGAAGATGCCTTCTTTGCTGATTACGCTGAGGCTACCAAAAAGCTTTCCGA
GCTTGGGTTTGGTGTGCTGATAACTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAA
TGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGC
CACTCCCACTGTCTTCTTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC
TGGGGGTTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA
TCCGGTGGGCTCTATGG (Señal poliadenilación BGH)

p53

link

APEX

8.2. Soluciones gel de agarosa.

- *TAE 50X:*

Tris base 2M

Ácido acético glacial 1M

EDTA 0,05M, pH 8

Se guarda el stock 50X y se diluye en agua miliRO para llevar a 1X al momento de usarse.

- *Buffer de carga 6x para ADN:*

Tris-HCl 10 mM (pH 7,6)

0,03 % azul de bromofenol

0,03 % xileno cianol FF

60 % glicerol

EDTA 60 mM.

8.3. Medio de cultivo:

- *Luria-Bertani (LB):*

10 g de triptona

5 g de extracto de levadura

10 g NaCl

Agua destilada c.s.p 1 L

Sólido: 15 g de agar

Esterilizar por autoclave

8.4. Solución extracción de proteínas.

- *Buffer de lisis:*

20mM HEPES KOH pH 7,5

50mM β -glicerofosfato (inhibidor de proteasas)

1mM EDTA pH 8

1mM EGTA pH 8

0,5 mM Na_3VO_4 (inhibidor de ATPasas, entre otras enzimas)

100mM KCl

10% glicerol

1% tritón 100x

8.5. Soluciones y marcador de peso molecular utilizado Western Blot.

- *Buffer de corrida 10X de proteínas:*

30,3 g de TRIS-base
144 g glicina
10 g SDS
H₂O miliQ c.s.p 1 L

- *Gel Stacking (4%): (para 5 mL)*

H₂O miliRO3 mL
Acrilamida (30%, 29:1).....0,67 mL
Tris-HCl 0,5M pH 6,8.....1,25 mL
SDS 10%.....50 uL
APS 10%.....50 uL
TMED.....5 µL

- *Gel separador (10%): (para 15 mL)*

H₂O miliRO6,15 mL
Acrilamida (30%, 29:1).....4,95 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8.....3,75 mL
SDS 10%.....0,15 mL
APS 10%.....0,15 mL
TMED.....7,5 µL

- *Buffer de carga (4X) para proteínas.*

250 mM Tris-HCl pH 6,8
12% SDS
40% glicerol
20% β-mercaptoetanol
0,02% azul de bromofenol

- *Buffer de transferencia 1X:*

100 ml buffer de corrida 10X
200 ml ETOH 95%
H₂O miliQ c.s.p 1 L

- *Buffer TBST:*
50 mM Tris-HCl pH 7,5
NaCl 150 mM
0,1% Tween 20
- *Buffer de Striping*
60mM Tris-HCl pH 6,8
2% SDS
0,1 M β-mercaptoetanol
- *Solución de bloqueo (3% BSA en TBST):*
3 g BSA
100 mL TBST

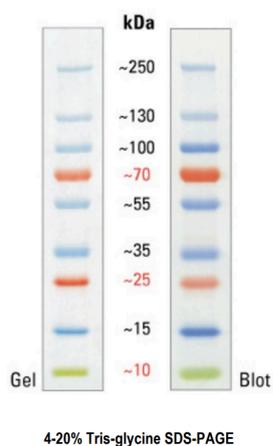


Figura 8.2. Marcador de peso molecular utilizado en western blot.

8.6. Soluciones utilizadas en electroforesis de ARN.

- *PAGE 15%: para un minigel de 1 mm de espesor, se utilizaron las siguientes cantidades.*

TBE 10X.....0,9mL
 Acrilamida (30%, 29:1).....4,5 mL
 MiliQ..... 3,6 mL
 APS 10%..... 90 µL

TMED..... 9 μ L

- *Buffer de carga nativo 5X:*

60mM KCl

10mM de Tris, pH 7,5

50 % glicerol

0,025% xilencianol FF

0,025% azul de bromofenol

- *TBE 10X:*

1M Tris base

1M Ácido bórico

0,02 M EDTA

- *PAGE 15% desnaturizante: (cantidades para un minigel)*

TBE 10X.....0,45mL

Acilamida (30%, 29:1).....4,5 mL

Urea (c.f. 7M).....3,82 g

MiliQ c.s.p 9 mL

APS 10%..... 90 μ L

TMED..... 9 μ L

- *Buffer de carga desnaturizante 2X*

8 M Urea

20% Glicerol

0.025% xilencianol FF

0.025% azul de bromofenol