

Trabajo Final de Carrera, Licenciatura en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
2024

Validación de un modelo celular para el estudio de la actividad de p53 y análisis de la expresión de *SRP54* durante la respuesta a proteínas desplegadas

Bach. Fabrizio Costa

Tutor: Dr. Ignacio López

Sección de Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Índice

Agradecimientos.....	4
Resumen.....	5
1.Introducción.....	6
1.1 La proteína supresora de tumores p53.....	6
1.2 Respuesta a proteínas desplegadas.....	11
1.3 SRP54.....	15
2.Objetivos.....	18
2.1 Objetivo general.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3.Materiales y Métodos.....	19
3.1 Preparación de las construcciones de ADN.....	19
3.1.1 Propagación de plásmidos.....	19
3.1.2 Purificación de plásmidos.....	19
3.1.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	19
3.1.4 Secuenciación de las regiones de interés de los plásmidos.....	19
3.2 Modelo celular.....	20
3.2.1 Cultivo celular.....	21
3.2.2 Transfección.....	22
3.2.3 Inducción del estrés en el Retículo Endoplásmico.....	22
3.2.4 Almacenamiento de las muestras.....	22
3.3 Validación del modelo.....	23
3.3.1 Extracción de proteínas.....	23
3.3.2 Cuantificación de proteínas.....	23
3.3.3 Electroforesis SDS-PAGE.....	24
3.3.4 Western Blot.....	24
3.3.5 Análisis por densitometría.....	25
3.4 Análisis de expresión relativa.....	25
3.4.1 Extracción de ARN.....	25
3.4.2 Retrotranscripción y qPCR.....	26
3.4.2.1 Eficiencia de Cebadores.....	26
3.4.2.1 Expresión relativa de SRP54 y HSPA5.....	27

4. Resultados y discusión.....	29
4.1 Preparación del modelo celular.....	29
4.1.1 Extracción de plásmidos.....	29
4.1.1.1 Secuenciación.....	30
4.1.2 Cultivo celular.....	30
4.2 Validación del modelo.....	32
4.2.1 Cuantificación de proteínas.....	32
4.2.2 Western Blot.....	32
4.3 RT-qPCR.....	36
4.3.1 Eficiencia de cebadores.....	36
4.3.2 Análisis de expresión de HSPA5	37
4.3.3 Análisis de expresión de SRP54.....	39
5. Conclusión y perspectivas.....	41
6. Bibliografía.....	42
7. Anexo.....	49
7.1. Protocolos y Buffers.....	49
7.2. Anexo a resultados.....	51

Agradecimientos

Agradezco a mi tutor, Nacho, por su ininterrumpida dedicación y paciencia a lo largo de toda la pasantía.

A la sección bioquímica por darme el espacio para desarrollar este trabajo, especialmente al laboratorio 305.

Al equipo de investigación de Andrea, Tania y Mariana, por prestar asistencia cuando se necesito.

A mis compañeros de equipo, Irene, Catalina y Fabio, por acompañarme y ayudarme en este proceso.

Resumen

Una de las proteínas humanas más estudiadas desde todo punto de vista es p53, un factor de transcripción que media respuestas vinculadas a la reparación del ADN y el control del ciclo celular, y que también interviene en un elevado número de procesos celulares muy diversos. El gran interés que recae sobre esta proteína está asociado a su fuerte vínculo con el cáncer; el gen que codifica para p53 está mutado, en promedio, en más del 50% de todos los tipos de cáncer. A pesar de toda la información acumulada sobre p53, aún no se conocen en su totalidad las vías regulatorias en las que participa ni en los mecanismos moleculares implicados. De hecho, si bien ha sido mayormente caracterizado como un factor de transcripción, existe evidencia que sugiere que p53 es también capaz de actuar a otros niveles en las vías de la expresión génica, lo que se asocia con diferentes contextos celulares. En nuestro laboratorio, estudiamos la actividad de p53 durante la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). Esta respuesta se activa cuando existe estrés en el retículo endoplásmico, lo que surge de la acumulación de proteínas mal plegadas o agregadas en su lumen, y tiene como objetivo disminuir la carga proteica en el retículo. Para eso, la UPR coordina la reducción de la expresión de proteínas de forma general y el aumento de la expresión de chaperonas.

En el presente trabajo se planteó en primer lugar poner a punto un modelo celular en el cual poder estudiar efectos en la regulación de la expresión génica mediados por p53 durante la UPR. Se utilizaron células de cáncer de pulmón humanas que no son capaces de expresar p53, a las que se les introdujo un plásmido con la secuencia codificante de p53. En paralelo, las células fueron tratadas con el fármaco Tapsigargina, inductor de la UPR. La detección de cambios de expresión de marcadores de estrés en el retículo y de p53 por RT-qPCR y western blotting, de acuerdo a lo reportado en la literatura, permitió verificar el éxito de los tratamientos empleados. Como prueba de concepto, y para comprobar resultados de transcriptómica previamente realizados por el equipo de trabajo que sugerían la existencia de regulación de *SRP54* por p53, se analizó la expresión relativa de *SRP54* a nivel de ARN usando RT-qPCR. Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de *SRP54* no se ve afectada ni por la UPR, ni por la presencia de p53, ni por la combinación de ambas variables, contradiciendo los datos preliminares. De todas maneras, se logró poner a punto el uso del modelo celular usado por el grupo de trabajo para abordar diferentes aspectos de la biología de p53 y de la UPR.

1.Introducción

1.1. La proteína supresora de tumores p53

La proteína p53 ha sido reconocida como el “guardián del genoma” dado sus capacidades anti-tumorales en su estado salvaje (“wild-type” ,wt) o no mutado (Wang et al., 2023). Es codificada por el gen *TP53* que se encuentra en el cromosoma 17p13.1. Fue descubierta en 1979 por su asociación con proteínas virales del virus oncogénico de simio SV40 (Lane & Crawford, 1979). Posteriormente fue caracterizado como un factor de transcripción que interacciona de forma secuencia específica con el ADN (Laptenko & Prives, 2006), siendo funcional en su estado tetramérico (Jeffrey et al., 1995). En condiciones normales, p53 canónica no se encuentra funcionalmente activa, lo que se logra principalmente a través del regulador negativo MDM2. Esta proteína se asocia a p53 y, por un lado enmascara uno de sus dominios de transactivación de la transcripción (ver más abajo), y por otro, ubiquitina a p53 lo que promueve su degradación en el proteosoma (Haupt et al., 1997). La activación de p53 ocurre en diferentes condiciones de estrés celular, entre los que se encuentran daño en el ADN, activación de oncogenes, privación nutricional e hipoxia, entre varios otros (Efeyan & Serrano, 2007; Vousden & Lane, 2007), siendo la respuesta al daño en el ADN la mejor caracterizada. Una vez reconocida esta situación de estrés, p53 contribuye a la detención del ciclo celular y promueve la reparación del ADN. De repararse exitosamente, se retoma el ciclo celular; de no ser así, se inducen los procesos de senescencia o apoptosis en la célula. De esta forma se evita la proliferación de células que contengan mutaciones que potencialmente puedan contribuir con la transformación celular y el eventual desarrollo de tumores (el-Deiry et al., 1994; Lanigan et al., 2011; Pitolli et al., 2019).

Si bien se reconoce la gran relevancia de su función como factor de transcripción y su fuerte asociación al control del ciclo celular, apoptosis y senescencia, p53 es también capaz de actuar en vías de regulación “no-canónicas” en donde se incluyen la autofagia, homeostasis metabólica, ferroptosis y diferenciación celular (Kasthuber & Lowe, 2017; Wang et al., 2023). Sin embargo, aún no se conoce con exactitud de qué forma p53 es capaz de intervenir en todas estas vías e incluso cómo es capaz de inducir efectos opuestos en tipos celulares diferentes. Un ejemplo de respuestas celulares contradictorias está dado por la atenuación de la glucólisis mediante la reducción del consumo de glucosa o represión de enzimas glucolíticas por p53 en células de cáncer de pulmón y mama. En cambio, en células musculares p53 induce la expresión de enzimas

glucolíticas, teniendo un efecto totalmente opuesto (Kim et al., 2013; Kruijswijk et al., 2015). Por tanto, además del tipo de estrés, el resultado de la activación de p53 está altamente ligado al contexto celular.

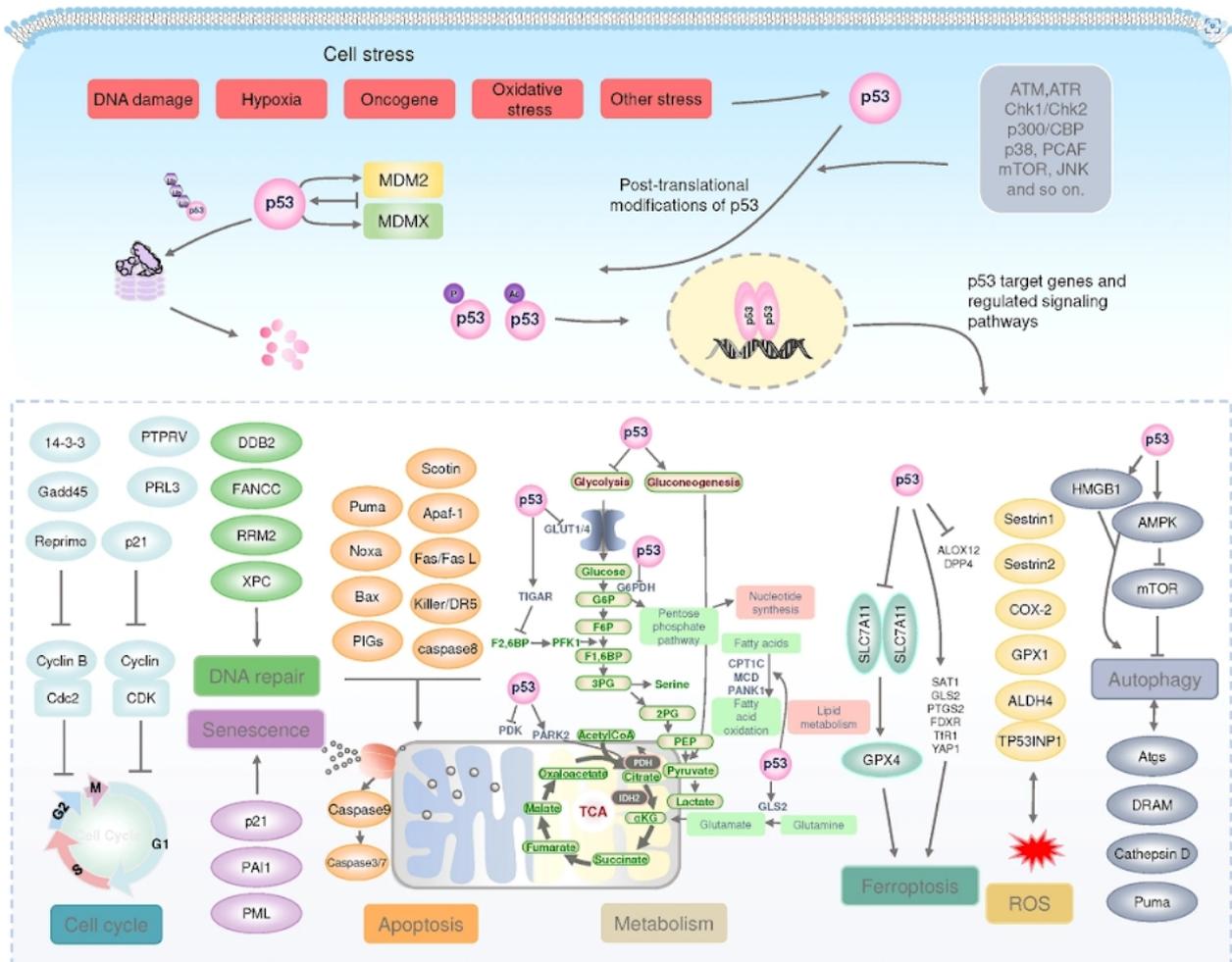


Figura 1. Resumen de funciones de p53 canónica. La activación de p53 luego de detectar estrés celular le permite escapar de la regulación negativa mediada por MDM2 (y su homólogo MDMX). Una vez activada, p53 es capaz de formar tetrámeros y actuar como factor de transcripción para una gran diversidad de genes blanco. En la imagen se muestran algunas de las vías más estudiadas que son activadas por p53. Tomado de Wang et al., 2023.

En algunos casos se ha considerado a p53 como un oncogén debido a que su estado mutado se encuentra fuertemente vinculado al desarrollo de cáncer (Figura2); esto ocurre tanto por mutaciones de pérdida de función, como por mutaciones de ganancia de función que promueven la proliferación anormal de células (Bouaoun et al., 2016; Olivier et al., 2010). De hecho, existe una condición patológica asociada a mutaciones congénitas en

TP53 llamada síndrome de Li-Fraumeni (Ilic et al., 2014), que se caracteriza por la presencia de tumores previo a los 45 años de edad, tanto en el paciente como en sus parientes de primer y segundo grado (Li et al., 1988). Si bien se reconoce que las mutaciones de la línea germinal en el gen *TP53* son las principales responsables de dicho síndrome, también se han reportado mutaciones en otros genes, como es *CHEK2* (Bachinski et al., 2005). Asimismo, ratones knock-out que no tienen p53 en su línea germinal desarrollan tumores en un 100% de los casos en 10 meses (Donehower, 1996). En su conjunto, estas observaciones demuestran que el correcto funcionamiento de p53 es esencial para mantener a las células en su estado normal y así evitar el desarrollo de tumores.

Muchos oncogenes se encuentran asociados a tipos específicos de cáncer, agrupados por tejido o célula de origen. Sin embargo, *TP53* es el gen cuyo estado mutado se ha encontrado en la mayor diversidad de cánceres (Figura 2, Bailey et al., 2018), esto remarca la importancia de p53 en el correcto funcionamiento celular, su ubicuidad de expresión y su importancia en el estudio de cáncer.

La proteína canónica p53 está compuesta por 393 residuos aminoacídicos que se pliegan en una estructura multidominios que contiene algunas regiones intrínsecamente desordenadas (Figura 3). En varios de esos dominios existen residuos blanco de una alta cantidad de modificaciones postraduccionales como fosforilación, metilación y acetilación, entre varias otras. Estas características le brindan versatilidad y flexibilidad a la vía de p53, lo que explica parcialmente la diversidad de factores con los que interactúa y de blancos que regula (Uversky, 2016). Además, otra fuente de diversidad funcional está dada por la existencia de isoformas. Se ha reportado que el gen *TP53* tiene la información para guiar la producción de hasta 12 isoformas, aunque la existencia y función de algunas de ellas no están completamente confirmadas (Figura 3) (López et al., 2024)

Dentro de las isoformas con más evidencia sobre su expresión y función se encuentra p47. La expresión de esta variante se ha observado aumentada en diferentes situaciones de estrés, como es en el estrés en el retículo endoplasmático, y parece promover cascadas de señalización diferentes de p53 canónica pero dependientes del tipo de estrés (Bourougaa et al., 2010). Esta isoforma es un producto alternativo del ARNm de p53, que se traduce a partir de un segundo sitio de iniciación de forma independiente del cap y posiblemente a través de un IRES (Candeias et al., 2006; Datta et al., 1999). p47 no contiene los primeros 40 aminoácidos de p53 canónica que conforman el dominio de transactivación I y en donde se encuentran secuencias reguladoras como el sitio de unión

de blancos y respuestas celulares reguladas (Bourougaa et al., 2010; Powell et al., 2008). Además, se ha observado que p47 es capaz de regular negativamente algunas de las actividades de p53 vinculadas a su rol como factor de transcripción y a las respuestas represoras de crecimiento. También controla su ubiquitinación y localización subcelular (Courtois et al., 2002; Ghosh et al., 2004). Por ejemplo, se ha reportado que frente al daño en el ADN, la activación de p53 canónica detiene el ciclo celular en G1. Por otro lado, el aumento de expresión de p47 durante el estrés en el retículo endoplásmico promueve la detención del ciclo celular en G2. La detención del ciclo en esta etapa es de particular relevancia durante la respuesta a proteínas desplegadas.

Chr.17

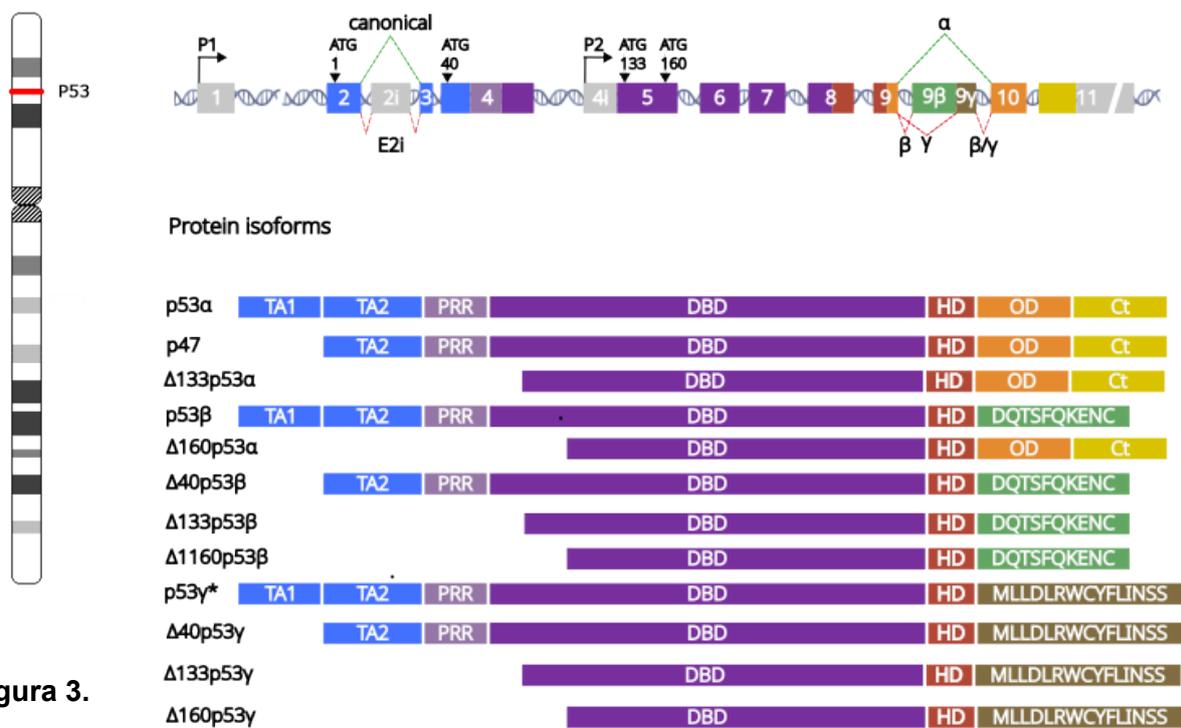


Figura 3.

Estructura genética e isoformas de p53. A la izquierda se muestra el cromosoma 17 con la ubicación del locus de *TP53*. Arriba a la derecha se muestra la arquitectura genética del locus *TP53*. Debajo se muestran las diferentes isoformas que han sido reportadas hasta el momento con los diferentes dominios presentes en ellas. Tomado de López et al., 2024.

1.2. Respuesta a proteínas desplegadas

El estrés en el retículo endoplasmático (ER) se ha descrito principalmente como consecuencia a la acumulación de proteínas mal plegadas o de alteraciones en la homeostasis del calcio (Schröder & Kaufman, 2005) y desencadena la “respuesta a proteínas mal plegadas” o UPR (del inglés “Unfolded protein response”). El retículo endoplasmático es el reservorio de calcio más grande de la célula y se encarga de asistir el plegamiento de proteínas con destino de membrana y secreción, por lo que en el lumen hay proteínas como foldasas y chaperonas. La fluctuación de Ca^{2+} en el RE afecta el plegado de proteínas, tanto por su participación en interacciones electrostáticas en determinadas proteínas, como por la inhibición de foldasas y chaperonas (Schröder & Kaufman, 2005)

Si bien la UPR se activa en condiciones fisiológicas en células con alta producción de proteínas, las alteraciones en esta respuesta se han visto vinculadas a patologías neurodegenerativas, metabólicas, cáncer, diabetes e inflamaciones crónicas, entre otras (Hetz et al., 2020; Rutishauser & Spiess, 2002).

En tumores sólidos, el microambiente expone a las células con alta tasa de proliferación a condiciones de hipoxia y déficit nutricional. Bajo estas condiciones, se genera estrés en el retículo endoplasmático y en consecuencia se activa la UPR. Los efectos de la UPR en tumores son contradictorios y se ha observado su vínculo tanto en la proliferación agresiva de células tumorales como en la muerte de las mismas. También, se ha visto que la UPR tiene un papel en el incremento o disminución de la sensibilidad de ciertas células tumorales a algunos fármacos (Mlynarczyk & Fåhræus, 2014).

Como se muestra en la figura 4, las cascadas de señalización inducidas en la UPR tienen como objetivo inicial restablecer la proteostasis a nivel del RE a través de la disminución de la expresión de proteínas destinadas al RE y aumento de la expresión de proteínas vinculadas al plegamiento, maduración, secreción y/o degradación de las proteínas en el RE (Ron & Walter, 2007; Schröder & Kaufman, 2005). Por lo contrario, y en última instancia cuando el estrés es agudo, la UPR es capaz de desencadenar procesos de apoptosis y autofagia (Pihán et al., 2017).

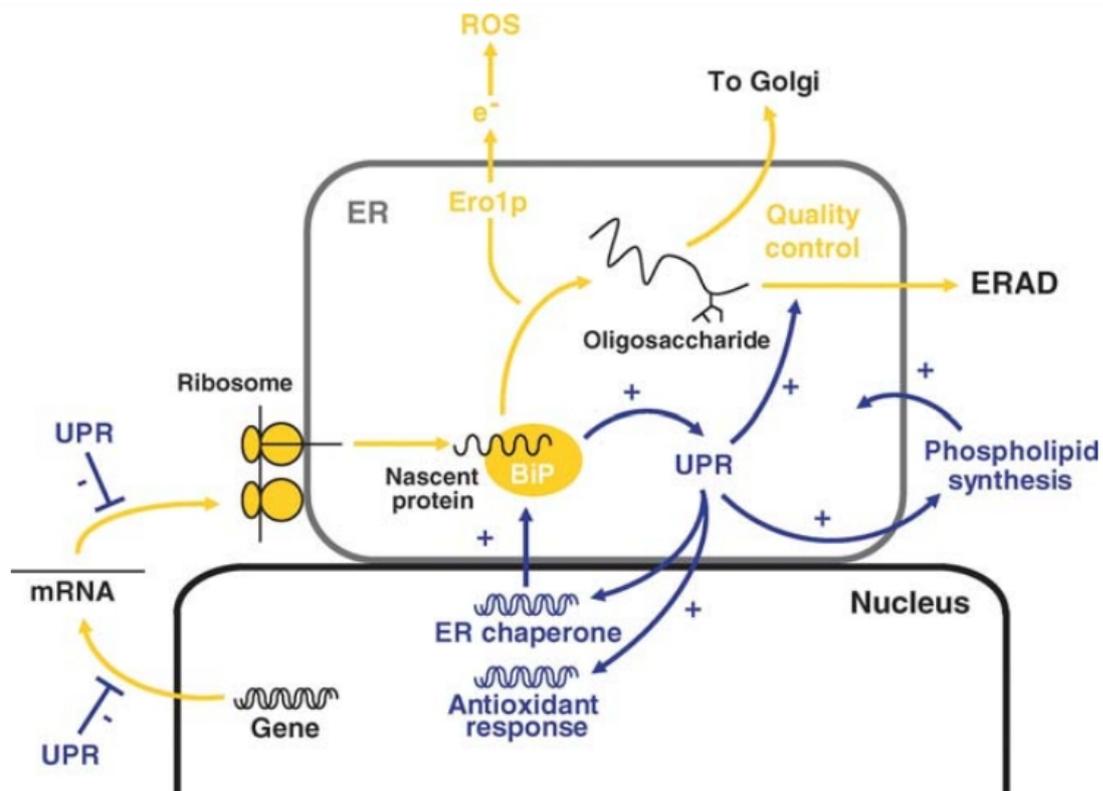


Figura 4. Respuesta a proteínas desplegadas. UPR Esquema de los efectos de la UPR (en azul) sobre el flujo normal de producción de proteínas en el RE (en amarillo). Tomado de Schröder & Kaufman, 2005.

En eucariotas superiores, existen tres principales cascadas de señalización encargadas de la iniciación de la UPR que dependen de los sensores transmembranales del retículo endoplásmico: PERK, IRE1 α y ATF6 α (Figura 5). Los dominios proteicos que se encuentran en el lumen del RE de PERK e IRE1 α en su estado inactivo están unidos a la chaperona BiP. En condiciones de estrés, BiP se disocia de los dominios luminales y se promueve la oligomerización de PERK e IRE1 α . La oligomerización de estas proteínas resulta en su transfosforilación y la subsecuente activación de las cascadas de señalización correspondientes (Bertolotti et al., 2000). El dominio citosólico de perk fosforila el factor de iniciación eucariótico 2 alfa (eIF2 α) impidiendo la traducción dependiente del cap. La supresión de la traducción dependiente del cap se acompaña de la promoción de la traducción a través de mecanismos de inicio de la traducción alternativos, como ocurre con los ARNm de ATF, BiP y el propio p47 (Bourougaa et al., 2010; Candeias et al., 2006; Fernandez et al., 2002).

La activación de IRE1 α promueve su actividad ARNasa que tiene dos funciones

principales. Por un lado, degrada los ARNm de proteínas de la vía secretora que se encuentran asociados a la cara citoplasmática del RE a través de los ribosomas que los están traduciendo. Por otro, participa en un mecanismo de splicing no canónico del ARNm de XBP1, favoreciendo la expresión del factor de transcripción XBP1s (Sidrauski & Walter, 1997; Yoshida et al., 2001).

En condiciones de estrés, ATF6 se trasloca al aparato de Golgi donde se cliva, liberando una porción citosólica que migra al núcleo y actúa como factor de transcripción. Los genes blanco que activan ATF6 y XBP1s están vinculados en el plegado, maduración, secreción y degradación de proteínas (Carrara et al., 2013).

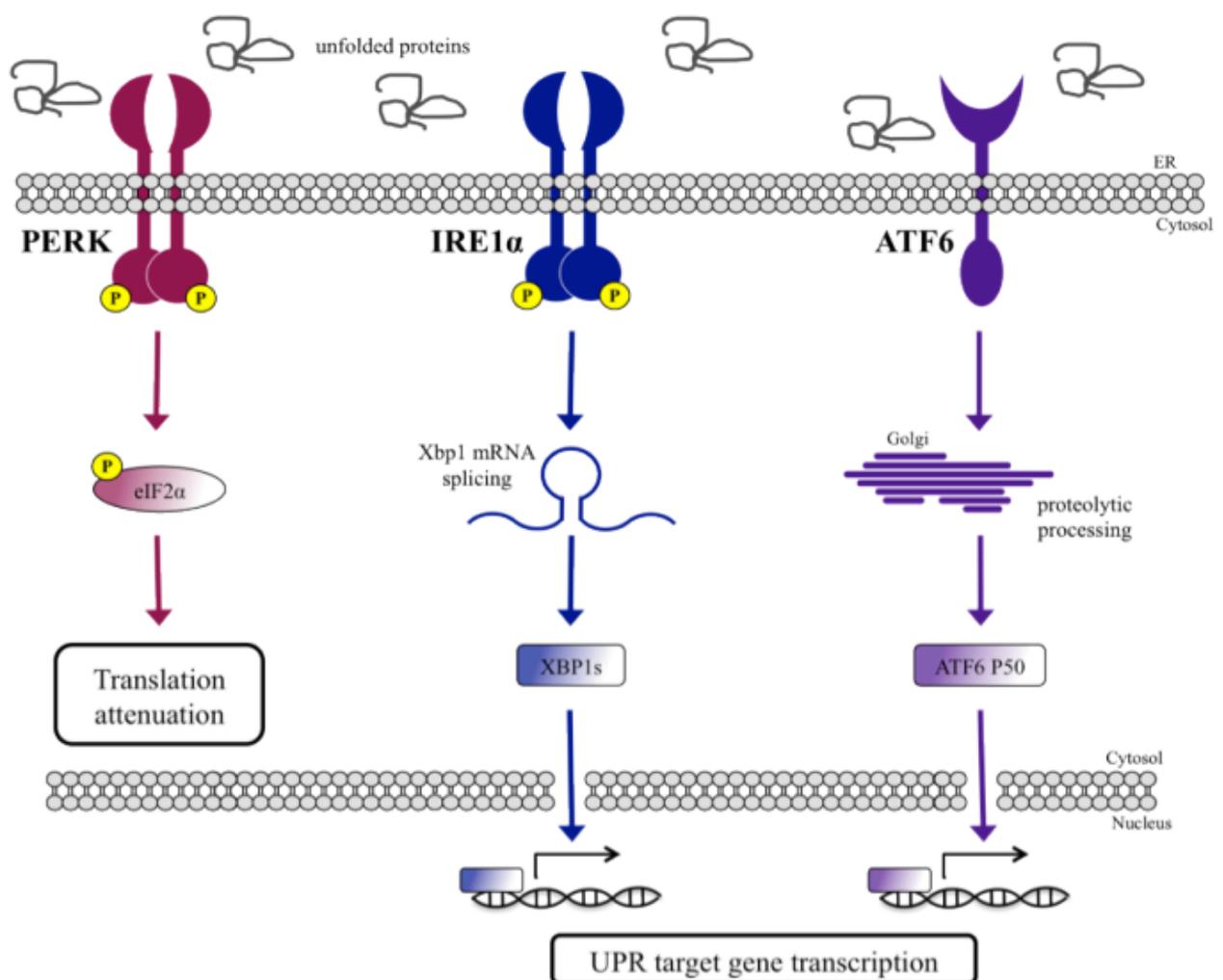


Figura 5. Sensores de la UPR en eucariotas superiores. Resumen de la activación de la UPR a través de sus 3 sensores; PERK, IRE1α y ATF6, con la subsecuente cascada de señalización activada por cada uno de ellos (extraído de Carrara et al., 2013).

De particular importancia para este trabajo son las chaperonas BiP (HSPA5) y calreticulina, que han sido utilizadas como marcadores de estrés en los experimentos (ver resultados). Calreticulina es una chaperona/lectina que se encuentra en el lumen del RE asociada a calnexina, asiste en el plegamiento de casi todas las glucoproteínas y participa en la regulación de la UPR mediante la represión de ATF6 α (Tung et al., 2024; Williams, 2006). Por otro lado, BiP es una de las chaperonas más abundantes en el RE, participando también en el sensado del estrés principalmente a través de sus complejos homoméricos y asociación con IRE1 α (Kopp et al., 2019). Esperamos que en condiciones de estrés ambas chaperonas aumenten su expresión tanto para aliviar la carga proteica del RE como para participar en la regulación de la UPR (Bakunts et al., 2017; Llewellyn et al., 1995)

El presente trabajo final de carrera se realizó en el marco del proyecto “Identificación de vías de señalización reguladas por p53 de forma post-transcripcional en la respuesta a proteínas desplegadas (UPR)”, proyecto financiado por el Fondo Clemente Estable-ANII (FCE_3_2020_1_161877) a cargo del Dr. Ignacio López. El objetivo de este proyecto es definir los cambios mayores en el perfil de proteínas que ocurren durante la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés) mediados por p53 y por su isoforma p47, prestando principal atención a aquellos cuya regulación ocurra a nivel post-transcripcional.

La actividad de p53 ha sido estudiada por su participación en la regulación de la transcripción, sin embargo, estudios recientes, algunos del equipo de trabajo, han revelado la posibilidad de que p53 participe en la regulación a nivel post-transcripcional, suprimiendo, por ejemplo, la traducción de p21 y MDM2 durante el estrés del retículo endoplasmático (López et al., 2015; Mlynarczyk & Fåhræus, 2014).

La activación de la UPR provoca que la célula focalice su energía en la regulación de todas las etapas de la expresión proteica, siendo la traducción la mayormente regulada. Acorde a los objetivos del proyecto general, este contexto de estrés es beneficioso para estudiar posibles regulaciones sobre la traducción mediadas por p53 o sus isoformas. Por esto, el laboratorio propuso investigar esta condición mediante estrategias ómicas asociadas a la presencia/ausencia de p53. Estas estrategias fueron realizadas en el modelo establecido en Uruguay durante este trabajo final de carrera (ver sección 3.2). En los análisis por microarreglos realizados en el proyecto marco se detectó un 20% de disminución de la expresión de ARNm *SRP54* que depende de p53 y ocurre únicamente

en contexto de UPR (datos no publicados), lo que motivó el desarrollo de una estrategia experimental para validarlo, lo que se puso a punto durante este trabajo.

1.3. SRP54

SRP54 es el componente central de la partícula de reconocimiento de señal (SRP de "signal recognition particle"), un complejo ribonucleoproteico que se encuentra tanto en eucariotas como en procariontes. SRP54 es esencial para que SRP funcione correctamente, lo que es apoyado por su presencia universalmente conservada en eubacterias (como Ffh), arqueas y eucariotas (Figura 6). Incluso en algunos organismos, este componente por sí solo es suficiente para ejercer la función de translocación (Grudnik et al., 2009; Nilsson, 1999). En eucariotas, SRP media el transporte de proteínas secretoras y de membrana hacia el retículo endoplasmático mediante el reconocimiento de una secuencia señal hidrofóbica en el N-terminal de las proteínas en el momento que emergen del ribosoma (Luirink, 2004). SRP54 es una GTPasa que interactúa con el ARN del complejo y media los cambios conformacionales necesarios para la translocación, esto lo hace en sus dos dominios, en su C-terminal está el dominio M y en el N-terminal el dominio NG. El dominio M contiene los sitios de unión del ARN del complejo SRP y el sitio de reconocimiento de la secuencia señal. En el dominio NG se encuentra el sitio que cataliza la reacción GTPasa y el sitio de unión al receptor de SRP asociado a la translocación y localizado en la membrana del RE (Ver figura 6). SRP54 es el último componente en unirse al complejo completando el ensamblado de pre-SRP a SRP (Grosshans et al., 2001; Politz et al., 2000). El rol central de SRP54 radica en su capacidad para reconocer a la secuencia señal en el péptido emergente y mediar la interacción con el receptor de SRP en el retículo endoplasmático, permitiendo su translocación (Grosshans et al., 2001; Luirink, 2004). Mutaciones en heterocigosis para SRP54 que desestabilizan la proteína se han visto vinculadas a la neutropenia congénita grave (SCN, por sus siglas en inglés) con síntomas que se superponen con el síndrome de Shwachman-Diamond (SDS, por sus siglas en inglés) (Weichenrieder, 2021). SCN engloba un conjunto de enfermedades vinculadas a la inmunodeficiencia y se caracteriza por un bajo recuento de neutrófilos. Por otro lado, SDS se vincula con una deficiencia exocrina pancreática y defectos en el desarrollo neurológico, incluyendo anomalías

esqueléticas. Los síntomas causados por pérdida de función de SRP54 ocurren en células y tejidos donde la secreción de proteínas es una función central y donde la demanda no es satisfecha por el alelo funcional (por ejemplo, células pancreáticas y neutrófilos). (Juaire et al., 2021).

Según lo ya mencionado, la reducción en la expresión de SRP54 podría causar una disminución global en la expresión de proteínas que son traslocadas al RE. Acorde a los objetivos del proyecto general, si SRP54 reduce su expresión por causa de p53 en la UPR, esto podría indicar que proteínas del RE que bajen su expresión únicamente cuando se activa la UPR y p53 se encuentra presente, lo hagan indirectamente a través de la reducción de SRP54. Estas consecuencias ayudarían a reducir el problema de acumulación proteica en el RE, disminuyendo la situación de estrés, e indicaría evidencia sobre el rol de p53 en la regulación de la UPR. Hasta el momento se desconoce la existencia de un vínculo regulatorio entre SRP54 y p53, por lo que estudiar su patrón de expresión en este contexto resulta novedoso y relevante.

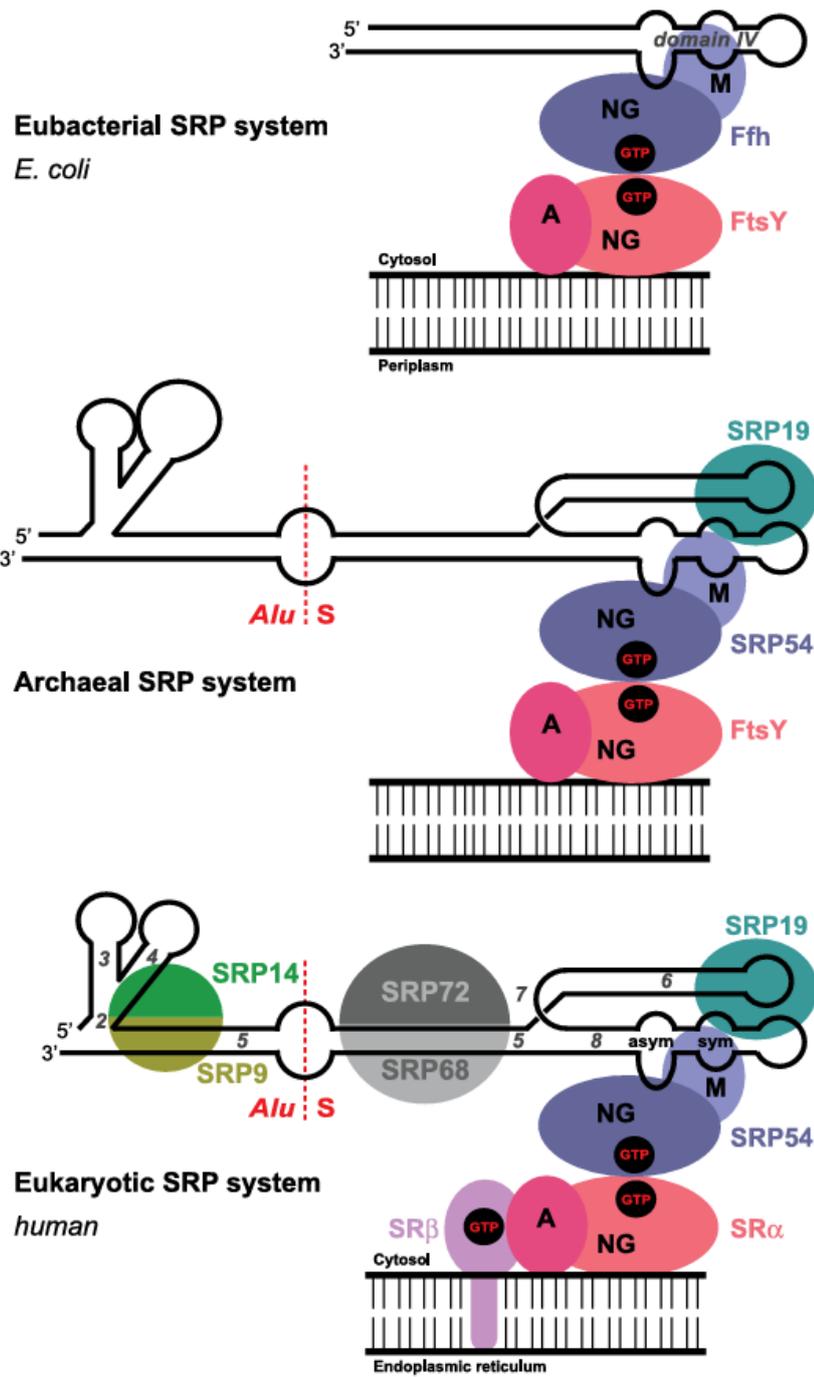


Figura 6. SRP en diferentes dominios de la vida. Esquema del complejo SRP con todos sus componentes para eubacterias, arqueas y eucariotas. SRP54 o Ffh se observa en violeta, destacando su dominio M (violeta claro) y NG (violeta oscuro). Imagen extraída de Luirink, 2004.

2.1 Objetivo General

En este trabajo final de carrera, nos propusimos establecer y validar un modelo celular en el que se introduzca p53 de forma exógena y se induzca la UPR. Además, como prueba de concepto, utilizamos el modelo para estudiar la expresión del ARNm de SRP54 en respuesta a p53 durante la UPR, de forma de comparar con datos previos que sugieren una relación funcional entre ambos.

2.2 Objetivos específicos

- Producir un cultivo de células H1299 en cantidad suficiente para someterlas a los tratamientos necesarios.
- Propagar los plásmidos p-p53 y p-EV para los ensayos de transfección.
- Validar el modelo mediante la reproducción del perfil de expresión de p53 y de algunos marcadores de estrés del retículo endoplasmático.
- Evaluar la eficiencia de amplificación de los cebadores específicos para *SRP54* y controles celulares internos (normalizadores) a utilizar en reacciones de PCR cuantitativa.
- Analizar la variación de la expresión del ARNm de *SRP54* en respuesta a la actividad de p53 durante la UPR.

3. Materiales y métodos

3.1 Preparación de las construcciones de ADN

3.1.1 Propagación de plásmidos

Los vectores pcDNA3 (V79020, Invitrogen) con la secuencia codificante de p53 salvaje o “wild-type” (wt, p-p53) o sin inserto (“empty vector”/EV o p-ev) (Figura 7) fueron cedidos por Robin Fåhraeus y se propagaron en *Escherichia coli* DH5 α quimiocompetentes. Utilizando protocolos estándares de transformación bacteriana por “heatshock” (ver Anexo), alícuotas independientes de bacterias fueron transformadas con 100 ng de cada plásmido. Se aislaron los transformantes en placas de LB-Ampicilina (Ver Anexo), con los que se realizaron los cultivos correspondientes para incrementar la masa bacteriana según indicaciones del kit de purificación de plásmidos (ver sección 3.1.2).

3.1.2 Purificación de plásmidos

Bacterias transformadas con los plásmidos de interés fueron cultivadas hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) dentro del rango 2,7-3,0. La purificación de ADN en grandes cantidades y de calidad apta para transfección de células eucariotas se realizó utilizando el kit “GeneJET Endo-Free Plasmid Maxiprep” (K0861, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones de fábrica. Este kit asegura la eliminación de endotoxinas bacterianas que podrían generar estrés no deseado en el cultivo de células eucariotas.

Los plásmidos obtenidos se cuantificaron mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop, Thermo Scientific).

3.1.3 Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una corrida electroforética de los plásmidos purificados para verificar su integridad y calidad en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE 1X (ver anexo). El ADN se migró durante 45 min a 100V y se detectó utilizando el agente intercalante “GoodView” (SBSgenetech, HGV-2). Como guía se usó el marcador de tamaño molecular “GeneRuler 1Kb DNA Ladder” (Thermo Scientific).

3.1.4 Secuenciación de las regiones de interés de los plásmidos

Los plásmidos se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Se

secuenció la región del plásmido flanqueada por el promotor temprano CMV y la señal de poliadenilación bGH para verificar la presencia (p-p53) o ausencia (p-ev) de la región codificante de *TP53*. Se utilizaron los cebadores CMV forward y bGH reverse (ver anexo y Figura 7). Luego de analizar la calidad de los resultados de secuenciación, la fidelidad de la secuencia se analizó por BLAST (Ver Anexo) comparando la secuencia obtenida con la secuencia de *TP53* proveniente de la base de datos NCBI y que previamente fue utilizada por el grupo de estudio.

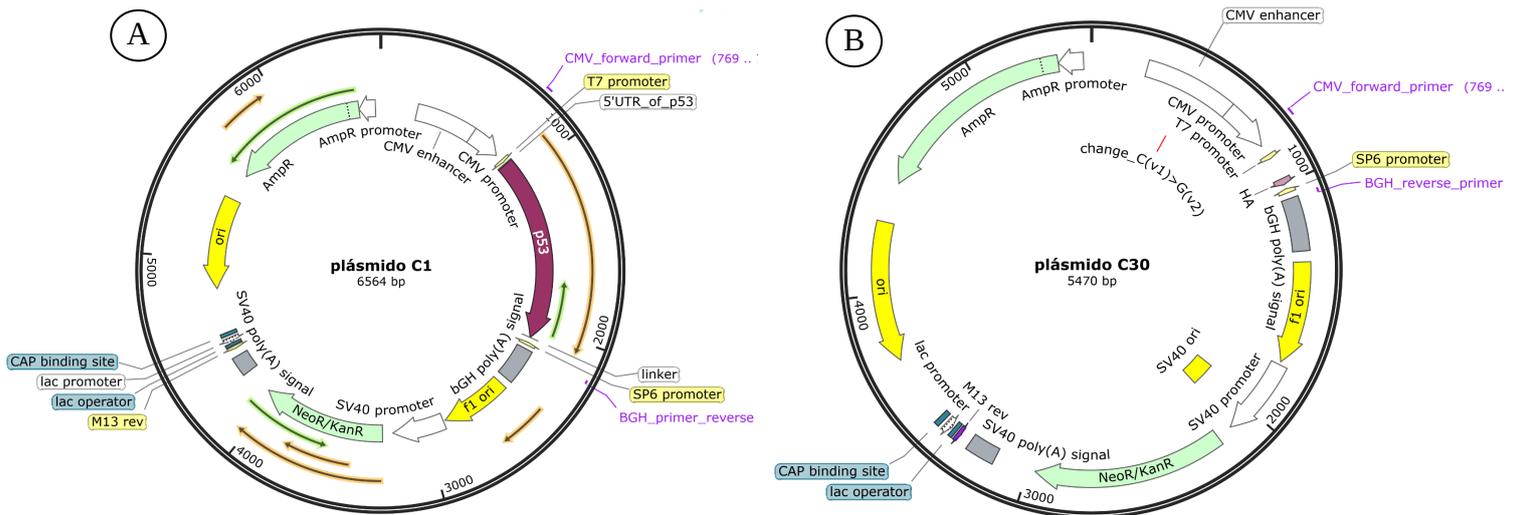


Figura 7. Mapa de plásmidos pcDNA3 con la secuencia codificante de p53 (A) y sin inserto o “empty vector” (B)

3.2. Modelo celular

En el transcurso de la pasantía se trabajó con la línea celular H1299 obtenida de ATCC (Nº de catálogo ATCC: CRL-5803), establecida a partir de una muestra de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Non-small cell lung cancer) de un paciente hombre caucásico de 43 años. Estas células poseen una delección parcial del gen *TP53* en homocigosis, por lo que no expresan ninguna de las isoformas de p53 (*NCI-H1299 - CRL-5803 | ATCC*, s. f.).

El modelo celular fue preparado para estudiar las siguientes dos variables: (1) Presencia de p53; (2) Estrés en el retículo endoplasmático que induce la UPR. Tomando en cuenta los controles necesarios, en el siguiente diagrama se muestra la distribución de tratamientos del cultivo:

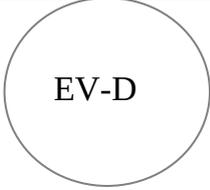
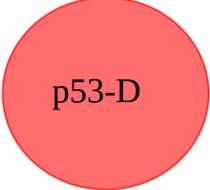
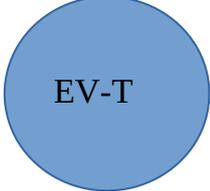
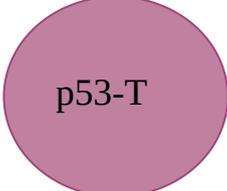
EV	p53	
 EV-D	 p53-D	DMSO
 EV-T	 p53-T	THAP

Figura 8. Grupo de muestras resultantes de la combinación de presencia/ausencia de p53 con condiciones de estrés/no estrés. EV refiere a “empty vector” o vector vacío/sin inserto; T (tapsigargina) a la molécula inductora de UPR; D (dimetilsulfóxido) al vehículo de administración de la molécula; y p53 al vector conteniendo el gen codificante para p53.

3.2.1. Cultivo celular

Los cultivos de células H1299 fueron manipulados exclusivamente dentro de una cabina de bioseguridad de clase I, a excepción de las extracciones de ácidos nucleicos y proteínas al final del experimento (ver secciones 3.3.1 y 3.4.1). Se siguieron buenas prácticas de cultivo celular para prevenir la contaminación del cultivo y de los reactivos.

Las células H1299 fueron cultivadas a partir de un stock conteniendo 2×10^6 células a -140°C . Se utilizó el medio RPMI 1640 conteniendo Glutamax (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y penicilina-estreptomina (10.000U/mL, GIBCO). En primera instancia, se cultivaron las células en soportes T-25 y los pasajes posteriores se realizaron entre soportes T-75. Las incubaciones se realizaron en estufa a 37°C con atmósfera de 5% de CO_2 y tuvieron una duración de entre 24-72 h dependiendo de la carga celular sembrada y la confluencia deseada. En cada pasaje, las células fueron despegadas del sustrato con 0,25% Tripsina-EDTA (Gibco), luego de lavados con DPBS 1X (Gibco). La inactivación de la tripsina se efectuó diluyendo en un factor de 1:5 con medio completo RPMI 1640 ya que el suero fetal bovino inhibe la actividad de la enzima. Para realizar los experimentos, las células fueron contadas y sembradas en placas de 6 pocillos. Para el conteo se despegaron las células de los soportes como fue descrito

anteriormente y se dispusieron en un volumen adecuado. De esta suspensión, 10 μL sin diluir fueron colocados en la cámara de Neubauer (Boeco, BOE01). Se contabilizaron únicamente los 4 cuadrantes de los vértices de la cámara y se calculó la concentración de células por mL utilizando la siguiente fórmula: células contadas $\times 4 \times 10^4$. En base a este valor, se prepararon suspensiones celulares a una concentración de $8,75 \times 10^4$ células/mL y se tomaron 2 mL para inocular cada pozo de placas de 6 pocillos, de forma de tener $1,75 \times 10^5$ células en cada uno de ellos. Este número de células H1299 permite obtener una confluencia de 40-60% luego de 16-24hs de inoculación, lo que es condición necesaria para continuar con el paso de transfección (ver sección 3.2.2).

3.2.2 Transfección

Las células fueron transfectadas con el fin de reintroducir la secuencia codificante completa y funcional de *TP53*. Se trata de una transfección transitoria durante 48 horas ya que no hay integración de los plásmidos en el material génico de las células en cultivo. El cultivo se transfectó utilizando el reactivo "GeneJuice Transfection Reagent" (70967, Novagen) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se utilizaron 500 ng de cada plásmido en cada pocillo.

3.2.3 Inducción del estrés en el Retículo Endoplasmático

Para inducir estrés en el Retículo Endoplasmático (RE) y la subsecuente activación de la UPR, se empleó el compuesto tapsigargina (en inglés, Thapsigargin o THAP). Este fármaco altera la homeostasis de Ca^{2+} en el RE al inhibir la "bomba de calcio del RE" (SERCA, por sus siglas en inglés) (Jaskulska et al., 2020). La tapsigargina fue preparada en el vehículo dimetilsulfóxido (DMSO).

La tapsigargina fue agregada al cultivo de forma de tener una concentración final dentro del pocillo de 50 nM. A los pocillos control, se les adicionó 0,1% de DMSO. La molécula o vehículo se administra por goteo disperso para evitar exponer transitoriamente a las células a concentraciones de THAP o DMSO mayores a las deseadas. El tratamiento se realizó 24h post-transfección y tuvo una duración de 16-24hs.

3.2.4 Almacenamiento de las muestras.

Luego del tiempo de incubación, se colectaron las células para extraer proteínas y ARN totales. Para eso, se removió el medio de los pocillos, evitando tocar la monocapa de células, y se lavó con DPBS. Se trabajó en frío y minimizando el tiempo que las células se

encuentran sin medio para evitar la degradación de los ácidos nucleicos y las proteínas. Las placas que se utilizaron para extraer ARN fueron suministradas con 300 μ L del reactivo TRIzol (Invitrogen) por pozo y las utilizadas para extracción de proteínas se le suministran entre 120-130 μ L de Western Blot Lysis Buffer (WB-LB, ver anexo) por pozo. A las muestras que se utilizarían para extracción de ARN se les agregó 100 μ L de TRIzol (Invitrogen) y los pellets que se utilizarían para extracción de proteínas se almacenaron sin buffer. Las placas y pellets fueron almacenados a -80°C hasta la realización de las extracciones.

3.3 Validación del modelo

3.3.1 Extracción de proteínas

Todos los pasos de la extracción fueron realizados en hielo y reduciendo las instancias de congelado/descongelado para minimizar la degradación de proteínas.

Se descongelaron las placas a las que se le suministró WB-LB, junto a los pellets del medio de la misma placa. Se utilizó un rastrillo de cultivo para desprender todo el contenido de los pocillos y se trasvasó la mezcla resultante al tubo Eppendorf que contenía el pellet correspondiente a cada muestra.

Las muestras de extracto celular total fueron sometidas a ciclos de vórtex de 5-10 segundos cada 10 minutos por 1 hora. Luego se centrifugaron por 15 minutos a 13000 $\times g$ a 4°C y se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf nuevos. Se generaron alícuotas de 8 μ L del extracto proteico resultante para utilizar en el momento de la cuantificación y evitar descongelar la muestra excesivamente. Se almacena todo a -20°C .

3.3.2 Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las proteínas se utilizó el método del Ácido Bicinonínico (BCA) utilizando el kit "BCA Protein Assay Kit" (Pierce). Se utilizaron diluciones de BSA proporcionadas en el kit para generar una curva estándar entre 0,125 y 2 mg/mL. Tanto los estándares de BSA como las muestras (dilución 1:4) se diluyeron en Tris-HCl (pH 6,8; 20mM). Se sembraron 10 μ L de la muestra diluida por pocillo en una placa de 96 pozos. Como blancos se utilizaron Tris-HCl (pH 6,8; 20 mM), para los estándares de BSA, y WB-LB diluido en un factor de 4 en Tris-HCl (pH 6,8; 20 mM), para las muestras. Se siguieron los pasos indicados por el proveedor y se midió la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 560 nm en un espectrofotómetro de placas. Los valores de absorbancia obtenidos se

normalizaron utilizando los blancos correspondientes. Los valores de absorbancia normalizados de los estándares de BSA fueron graficados en función de la concentración de cada dilución, generando una curva estándar. Se utilizó la ecuación de la recta a la que se ajustó la curva estándar para calcular la concentración de cada muestra, tomando en cuenta el factor de dilución.

3.3.3. Electroforesis SDS-PAGE

En base a las concentraciones calculadas, se tomó la muestra con menor concentración de proteínas como referencia para establecer una concentración de trabajo y se diluyeron el resto de las muestras para llegar a dicha concentración. A las muestras diluidas se les adicionó 4X Laemmli buffer (buffer de carga, ver anexo) conteniendo β -mercaptoetanol en cantidad suficiente para diluir el buffer de carga a su concentración de uso. Estas muestras fueron incubadas a 95°C por 10 minutos para completar el proceso de desnaturalización proteica.

Se prepararon geles separadores de poliacrilamida al 10% y geles concentradores ("stacking") al 4%. De cada muestra se utilizaron 15-20 μ g de proteína. Se aplicó un campo eléctrico inicial de 90V por 5 minutos para generar el efecto de apilamiento y luego se aumentó a 120V-150V, lo que fue mantenido constante para separar las proteínas.

3.3.4. Western Blot

Luego de la corrida electroforética se prosiguió inmediatamente a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific). La transferencia se realizó a 400 mAmperios constantes por 2h, manteniendo el sistema en hielo para evitar el sobrecalentamiento y que se arruinen los geles/membranas.

Al finalizar la transferencia, se realizó una tinción de la membrana con el colorante Ponceau-red para corroborar el éxito de la transferencia.

Considerando que se quiere verificar el éxito de la transfección y el tratamiento con THAP, se revelaron las siguientes 3 proteínas: p53 (proteína de interés, se observa el éxito de la transfección y se estudia su patrón de expresión para validar el modelo), calreticulina (chaperona en el RE, con expresión inducida durante la UPR; Schardt et al., 2010) y actina (constante en todos los tratamientos, control de carga). Para eso se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

p53: Suero CM1 de conejo proporcionado por el Dr. Robin Fåhraeus (INSERN U1131

Université Paris Cité, Francia).

Calreticulina: Policlonal generado en conejo (SPA-602, Assay designs).

Actina: Monoclonal generado en ratón (A1978, Sigma).

La detección de las proteínas se realizó mediante revelado indirecto con anticuerpos secundarios que reconocen la cadena pesada del anticuerpo primario ligados a peroxidasa de rábano, HRP (“Horse raddish peroxidase”). El ensayo se reveló con el kit “Pierce ECL Western Blotting Substrate”(Thermo Scientific) y con el equipo de registro G-Box (Syngene).

Entre cada ronda de revelado se realizaron “strippings” (Buffer de “stripping”, ver anexo) desprendiendo los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la ronda anterior, evitando así interferencias en la señal químioluminiscente de las proteínas reveladas posteriormente.

3.3.5 Análisis por densitometría

Las imágenes de las membranas de los Western Blot fueron procesadas utilizando el software ImageJ. Se seleccionaron individualmente todas las bandas y se analizó la imagen con la herramientas “ROI Manager”, de la tabla de datos obtenida se utilizó la columna “signal” la cual contiene los datos de intensidad corregidos en base al fondo. Los datos de intensidad de las bandas de interés fueron normalizadas con las de β -actina de cada carril. Posteriormente se estandarizaron utilizando la muestra EV-D de la réplica biológica correspondiente como normalizador, para los datos de p53 y p47 se utilizó la muestra p53-D como normalizador debido a la ausencia de bandas en los tratamientos p53-. Se realizaron análisis estadísticos ANOVA (Kruskal-Wallis) y t-test para apoyar los datos cualitativos del Western Blot.

3.4 Análisis de la expresión relativa

3.4.1 Extracción de ARN

Se descongelaron las placas y pellets conteniendo TRIzol sobre hielo. El contenido de las placas fue recuperado utilizando un rastrillo de cultivo y trasvasado a los correspondientes tubos con pellets. Se realizó una extracción de ácidos nucleicos estándar utilizando el reactivo en base a tiocianato guanidina/fenol, TRIzol (invitrogen). El bajo pH de este reactivo permite la separación del ARN de ADN y proteína. El ARN obtenido en la fase acuosa fue tratado con ADNasa utilizando el kit “Rnase-Free DNase Set” (QIAGEN) para

eliminar posible ADN contaminante. El paso final de la purificación del ARN se realizó utilizando el kit “Rneasy MinElute Cleanup Kit” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue analizado mediante espectrofotometría utilizando un Nanodrop donde se midió la absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm para evaluar su concentración y pureza (ver anexo).

3.4.2 Retrotranscripción y qPCR

El ARN puro fue sometido a una retrotranscripción utilizando la retrotranscriptasa “SuperScript III” (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Para la reacción se utilizó 1 µg de ARN total y cebadores aleatorios o “random primers” (Thermo Scientific). El ADN copia (ADNc) obtenido se empleó como molde para reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el reactivo SensiFAST. Se realizaron qPCR para calcular la eficiencia de cebadores y para análisis de expresión de los genes de interés. En ambos casos se utilizó el mismo programa de ciclado, correspondiendo a 2 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, seguido de 40 ciclos de 5 segundos de desnaturalización a 95°C y 30 segundos de elongación a 60°C. A continuación se especifica cada tipo de qPCR realizado.

3.4.2.1 Eficiencia de cebadores

En nuestra investigación no resulta relevante obtener valores absolutos respecto a la expresión de los componentes a analizar, nuestros resultados apuntan a la existencia o no de cambios en el perfil de expresión celular. Para evidenciar dichos cambios se realizó una cuantificación relativa que nos permitiera ver el aumento, disminución o invariabilidad de la expresión de genes candidatos, en nuestro caso *SRP54*, en base a un gen de referencia o “housekeeping” cuya expresión se mantuviera inalterada por los tratamientos empleados. Se utilizó el método de Livak (expresión matemática del método: $2^{-\Delta\Delta Ct}$; Schmittgen & Livak, 2008), el cual asume que las eficiencias de los cebadores utilizados para amplificar el gen de interés y el gen de referencia son cercanos a 100% e iguales o muy similares. En conjunto con *SRP54*, se analizó la expresión relativa de *HSP5A* (otra chaperona del RE que está muy involucrada en la UPR) como doble control del tratamiento con taspigargina.

Para poder utilizar el método de Livak se debió seleccionar un gen de referencia que cumpliera con los requisitos establecidos para ser utilizado como normalizador en los análisis de expresión relativa.

Para calcular la eficiencia de los cebadores que se muestran en la Tabla 1 se realizó una qPCR utilizando como molde diluciones seriadas de una mezcla de ADNc de todos los tratamientos obtenidos a partir del ARN extraído previamente en un factor de 1:3 (1:10, 1:30, 1:90, 1:270 y 1:810). Cada dilución se amplificó por duplicado y en paralelo fueron realizados los controles: “ARN-” (Todos los componentes excepto el ARN previo a la retrotranscripción) y “RT-” (Mezcla de ARN de los 4 tratamientos+ buffers necesarios, pero sin la retrotranscriptasa). La eficiencia de los cebadores se calculó utilizando la ecuación:

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{pend}} - 1}$$

Tabla 1. Se muestran los cebadores utilizados para amplificar el gen de interés, el gen utilizado como control de estrés y los 3 candidatos a ser utilizados como controles internos. Se muestran las secuencias de los cebadores forward y reverse de cada gen.

Gen	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tipo
SRP54	Forward	AACTTCTTGGTATGGGCGACA	Gen de interés
	Reverse	GTCTCGCAACGTAAACTGACC	
LMF2	Forward	GGCACTGTGCACTACTTTGG	Gen housekeeping
	Reverse	CTGGTGAAGGTGAAAGTGG	
HMBS	Forward	ACAAGAGACCATGCAGGCTAC	Gen housekeeping
	Reverse	CGTGGAATGTTACGAGCAGTG	
GADPH	Forward	CTGGGCTACACTGAGCACC	Gen housekeeping
	Reverse	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	
HSPA5	Forward	GAAAGAAGGTTACCCATGCAGT	Control de estrés
	Reverse	CAGGCCATAAGCAATAGCAGC	

La pendiente se obtiene graficando el promedio de los valores de Ct en función del logaritmo en base 10 de las diluciones empleadas.

Para comparar las eficiencias de los diferentes pares de cebadores se calcularon las diferencias entre los Ct promedio de cada juego de cebadores para cada una de las diluciones y se graficaron en función del logaritmo en base 10 de las diluciones. La pendiente de las gráficas se utilizó para evaluar la compatibilidad de los cebadores. Se consideran compatibles si el valor absoluto de dicha pendiente es menor a 0,1. De superarse dichos valores se invalida compatibilidad (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 2001)

3.4.2.2 Expresión relativa de *SRP54* y *HSPA5*

Se amplificó por qPCR una región del mensajero de los genes de interés (*SRP54* y *HSPA5*) y del gen de referencia que cumple con los requisitos planteado en la sección

3.4.2.1. Las muestras se analizaron por triplicados técnicos y se generaron curvas de “melting” de todos los amplicones, esto permite visualizar la diversidad de amplicones y asegurar que exista un único producto de amplificación.

Para el análisis de los resultados se utilizaron los valores de ciclo umbral de amplificación (Ct) de los triplicados técnicos de cada muestra promediados. Posteriormente, se normalizan los promedios de Ct del gen de interés con los del gen de referencia para obtener el primer Δ Ct de la fórmula de Livak, esto se realiza para todas las condiciones experimentales (ejemplo: p53-D_{SRP54} – p53-D_{HK}). Estos valores normalizados son posteriormente comparados con el Δ Ct de la muestra control, en nuestro caso el tratamiento EV-D (Ejemplo: Δ Ct.p53-D – Δ Ct.EV-D), lo que se corresponde con el factor $\Delta\Delta$ Ct en la expresión matemática. Los valores de expresión relativa para *SRP54* en todas las situaciones experimentales fueron sometidas al test estadístico ANOVA (Kruskal-Wellis) y t-test.

4. Resultados y discusión

4.1 Preparación del modelo celular

4.1.1 Extracción de plásmidos

Previo a la realización de los análisis se debió preparar el modelo presentado en la sección 3.1. En primer lugar se obtuvieron los plásmidos (p-p53 y p-EV) a ser utilizados en la transfección de las células H1299 como se muestra en la sección 3.2. Para verificar la calidad de los plásmidos extraídos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) como se muestra en la Figura 9. En los carriles correspondientes a las muestras se pueden observar 2 bandas claras, una con mayor intensidad y menor tamaño molecular aparente que corresponde a los plásmidos en una conformación superenrollada, forma en que se encuentran fisiológicamente dentro de las bacterias; y una banda tenue y delgada con un tamaño molecular aparente mayor, lo cual podría corresponder al plásmido lineal en consecuencia a la agresividad de los tratamientos de extracción. Se puede observar una sombra por encima de estas bandas que podría corresponder a conformaciones circulares del plásmido que migran con mayor dificultad que las ya mencionadas. Estas observaciones se corresponden con una migración estándar de un plásmido, sugiriendo la presencia de un solo plásmido en nuestra purificación y que el mismo se encuentra en buenas condiciones y cantidad, según la alta representación de la conformación superenrollada.

Debido a que el plásmido no fue linealizado, no podemos utilizar el marcador de peso molecular para definir el tamaño de estos plásmidos. Sin embargo, se esperaba que la migración de la banda correspondiente a la conformación superenrollada se alejase en gran medida del tamaño real del plásmido. El plásmido p53 tiene un tamaño de ≈ 6500 pb y el plásmido EV es de ≈ 5500 pb, en el gel se observa un tamaño aparente de ≈ 6000 para p-p53 y ≈ 5000 para p-EV, lo que sugiere un retraso en la migración del plásmido. Según ensayos técnicos realizados en el laboratorio, se observó que esta discrepancia entre el tamaño del plásmido y el marcador de peso molecular se debe a que el agente intercalante (GoodView) fue adicionado previo a la solidificación del gel y por ende de la corrida de las muestras, interfiriendo en la migración de los plásmidos purificados. Esta información es tenida en cuenta por el grupo de investigación en los experimentos que se realizan actualmente. A pesar de esto, sí se puede observar que la diferencia de tamaño de ambos plásmidos es ≈ 1000 pb, correspondiéndose con el tamaño de la secuencia codificante de p53 (≈ 1100 pb), lo que aporta más evidencia acerca de la identidad de los

plásmidos de interés. La verificación final de los plásmidos se realizó mediante la secuenciación de la región flanqueada por el promotor CMV y la señal de poliadenilación bGH, que para el caso de p-p53, corresponde a la secuencia codificante de p53.

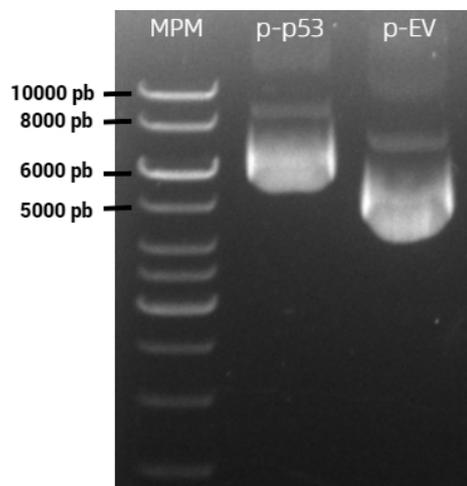


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa. Productos de la extracción de los plásmidos p-p53 y p-EV, junto al marcador de masa molecular (MPM) GeneRuler 1kb DNA Ladder. Se sembró 5 μ L de muestra en 1 μ L de buffer de carga 6X.

4.1.1.1 Secuenciación

Los resultados de la secuenciación en Macrogen fueron analizados por blast comparando la región secuenciada con la secuencia codificante de *TP53*. Se verificó la inserción de la secuencia de interés en el plásmido p-p53 y la ausencia en el plásmido p-EV. Estos resultados fueron analizados por otros integrantes del equipo, las secuencias obtenidas se muestran en el anexo.

4.1.2 Cultivo celular

Se realizaron 3 réplicas biológicas del modelo presentado en la sección 3.1 (R1, R2 y R3). Las placas de 6 pocillos que fueron utilizadas para producir las muestras fueron observadas en un microscopio óptico invertido para comprobar que no hubiesen irregularidades en el cultivo. En la figura 10 se muestran las células en cultivo de una réplica biológica con los 4 tratamientos EV-D, EV-T, p53-D y p53-T, comparándolas con las imágenes del cultivo en microscopía de contraste de fases proporcionadas por ATCC, el proveedor de las células. A nivel general se puede observar que todas presentan la morfología de una célula epitelial, observándose un cuerpo celular de forma irregular como consecuencia de las adhesiones célula-matriz. También es posible observar

granulosidades en el citoplasma, que se pueden observar claramente en la imagen proporcionada por ATCC. Estas observaciones sugieren que nos encontrábamos trabajando con la misma línea celular presentada en la imagen de ATCC (H1299) y que dicho cultivo no está contaminado con seres vivos detectables por microscopía óptica u otro tipo celular no deseado. Se pueden observar células redondeadas por no encontrarse adheridas a la matriz, lo que podría explicarse por: 1) se encuentran en proceso de división celular; 2) se encuentran en proceso de apoptosis; 3) en casos donde la confluencia celular es cercana a 100%, podría deberse a que no han podido adherirse a la matriz por falta de espacio.

Otra observación importante es que en los casos donde no se empleó el fármaco, EV-D y p53-D, se observa una mayor confluencia celular y menor proporción de células en suspensión con respecto a las muestras tratadas (-T). De todas maneras, en el caso p53-D se observa un aumento de células en suspensión respecto a EV-D. Los casos EV-T y p53-T muestran la menor confluencia celular y mayor proporción de células en suspensión, siendo p53-T en las que se observan estas características con más claridad. Estas observaciones macroscópicas tienen sentido en cuanto a que el estrés en el retículo endoplasmático dificulta el crecimiento de las células y potencialmente puede activar el proceso de apoptosis. Por otro lado, p53 se encuentra vinculado con la regulación del ciclo celular, reconocimiento de estrés y apoptosis, por lo que su presencia puede contribuir al aumento de los casos en donde se induce la apoptosis.

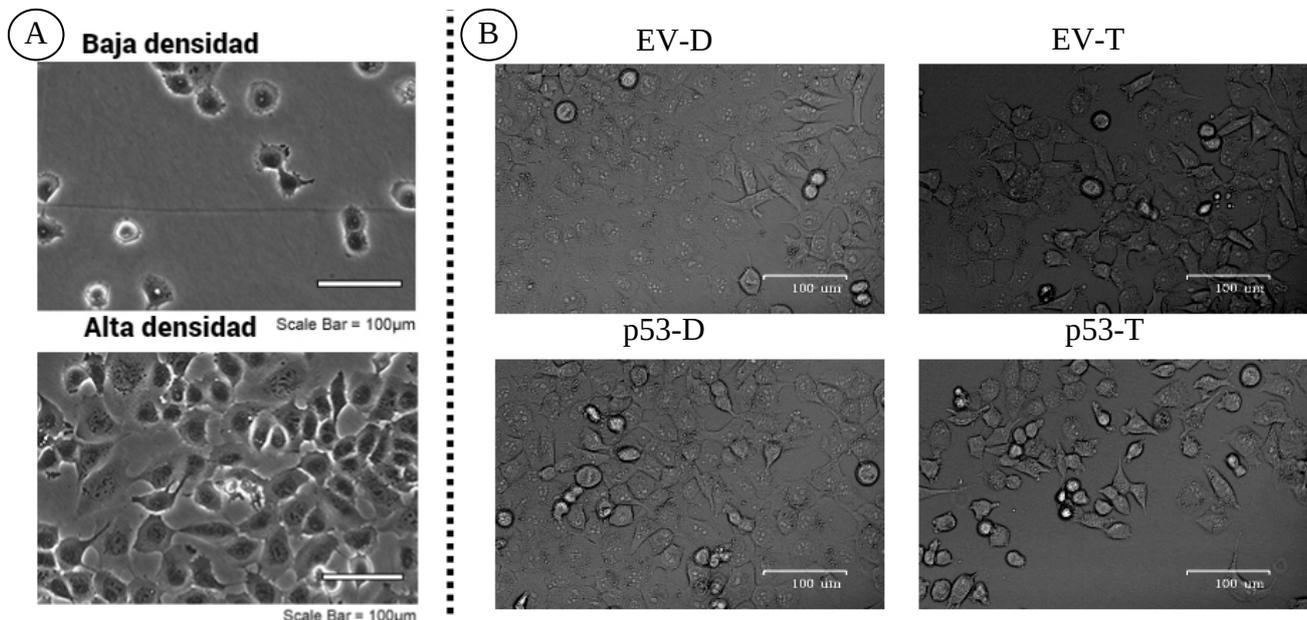


Figura 10. Vista al microscopio invertido de las células H1299. (A) Vista al microscopio de contraste de fases las células H1299 proporcionadas en la página ATCC (Nº de catálogo

CRL-5803) con baja y alta densidad celular. (B) Células H1299 observadas al microscopio óptico invertido en el laboratorio, para los 4 tratamientos celulares: EV-D, EV-T, p53-D y p53-T de una réplica biológica.

4.2 Validación del modelo

4.2.1 Cuantificación de proteínas

Para poner a punto los análisis por Western Blot se debió cuantificar el extracto proteico para determinar la concentración de proteínas totales en cada muestra y utilizar el mismo valor de cantidad de proteínas totales en cada experimento. Con las muestras de BSA proporcionadas por el kit se generó una curva estándar que se muestra en el anexo. El coeficiente de determinación (R^2) fue superior a 0,98 por lo que se considera que la línea de tendencia se ajusta a los datos obtenidos. La concentración de proteínas de las muestras se calculó en base a la ecuación de la línea de tendencia obtenida. Las concentraciones calculadas para cada muestra se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración de proteínas totales estimadas con el método de BCA. Se muestra la concentración de cada muestra (EV-D, EV-T, p53-D y p53-T) para las tres réplicas biológicas analizadas, R1, R2 y R3. En rojo se marcan las muestras con menor concentración de proteínas totales de cada réplica.

	R1	R2	R3
EV-D	1,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1,45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2,52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
EV-T	0,71 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1,56 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
p53-D	1,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1,53 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1,93 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
p53-T	0,85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,96 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1,79 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

En base a estos resultados, las muestras un mismo experimento se diluyeron para que tuvieran la misma concentración de proteínas totales, de forma de poder compararlas dentro de una réplica biológica. Para esto se tomó en cuenta la muestra con menor concentración de proteína de cada réplica, de forma que las muestras quedaron con concentraciones de 0,70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (R1), 0,80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (R2) y 1,50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (R3).

4.2.2 Western Blot

En la sección anterior se puede observar a nivel general diferencias en las características macroscópicas del cultivo celular entre los tratamientos. Con el fin de corroborar que estas diferencias surjan del éxito de los tratamientos a los que se sometió el cultivo, se

propuso analizar la expresión proteica de blancos específicos. Por tanto, se analizó p53 para verificar el éxito de la transfección con el plásmido que contiene la secuencia codificante de p53 y evaluar la correcta expresión de la proteína en estudio; Calreticulina, chaperona que cuya expresión aumenta en condiciones de UPR, para verificar el éxito del tratamiento con tapsigargina; y β -actina, proteína housekeeping de expresión constante y por tanto utilizado como control de carga. Para ello, se realizó una corrida electroforética SDS-PAGE para cada réplica biológica, usando 18 μ g de proteínas totales por muestra para R1 y 15 μ g para R2 y R3. Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, sobre la que se realizaron las detecciones con anticuerpos. Para asegurar que la transferencia fue exitosa, se tiñó la membrana con rojo Ponceau, un colorante cargado negativamente que se une de forma reversible a los aminoácidos positivos y regiones no polares de la proteína. Los resultados de esta tinción se muestran en la Figura 11. Como se observa, los carriles que corresponden a las muestras se encuentran totalmente cubiertos de coloración, con algunas bandas en diferentes grados de intensidad distribuidos a lo largo de todo el carril, indicando que todo el contenido del gel se transfirió exitosamente a la membrana. También se puede notar que las proteínas que migraron en el gel tienen una gran variedad de tamaños y concentraciones, lo que es esperable de un extracto proteico total.

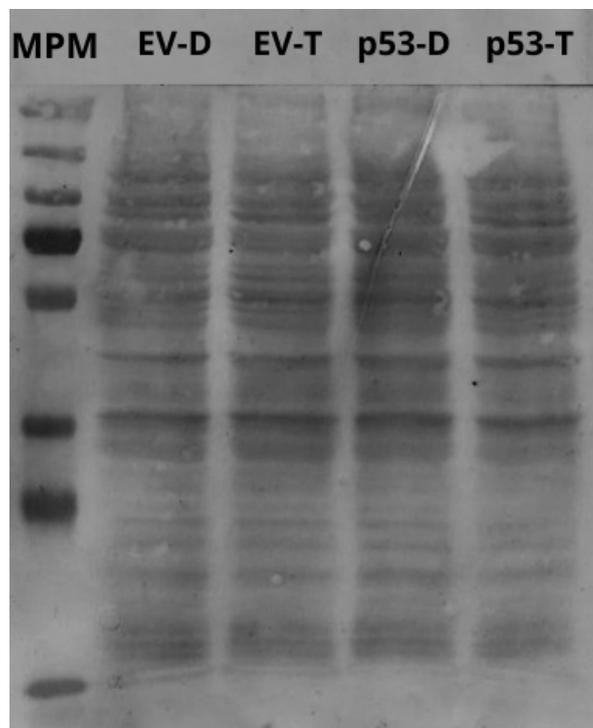


Figura 11. Tinción con rojo Ponceau. Membranas de nitrocelulosa teñidas inmediatamente luego de la transferencia, para la réplica R1, representativa de las demás.

En cuanto a la expresión de los blancos analizados, es importante notar que las bandas resultantes del revelado de β -actina muestran un tamaño molecular aparente de ~ 40 kDa, lo cual se corresponde a su tamaño esperado (Figura 12). Asimismo, la intensidad y tamaño de las bandas es relativamente uniforme para los diferentes tratamientos dentro de cada réplica biológica. Esto indica que se sembró aproximadamente la misma cantidad de proteína para cada muestra, por lo que diferencias en la intensidad o tamaño de banda que se observen entre tratamientos para los otros blancos analizados se deben a cambios en su expresión y no a errores en el sembrado o cuantificación de las muestras que resulte en una detección diferencial.

Las bandas correspondientes al revelado con el anticuerpo anti Calreticulina se observan relativamente uniformes en todos los tratamientos, ya que existe una expresión basal de dicho marcador. En la densitometría se puede observar una tendencia a que aumente la expresión de Calreticulina cuando el cultivo celular es tratado con taspigargina, sin embargo no es estadísticamente significativo. Esto no se corresponde con lo esperado, con la inducción de la UPR se debería ver un aumento notorio en la expresión de Calreticulina, lo que no es apreciable.

En la detección de p53 se puede observar una clara diferencia entre las muestras que fueron transfectadas con p-EV (p53⁻) y p-p53 (p53⁺). La línea celular H1299 no es capaz de expresar p53, por lo que la única fuente de dicha proteína es el plásmido p-p53; la ausencia total de bandas en los carriles de p53⁻ indica que no hubo contaminación de las muestras en ninguna de las técnicas previamente empleadas. Además, constituye otra observación acerca de la identidad de las células con las que trabajamos. En las muestras p53⁺ se puede observar una banda de alta intensidad muy cercana a 55 kDa que se corresponde con p53 de tamaño completo o canónica; esto nos asegura que la transfección fue exitosa y que las células son capaces de expresar correctamente al plásmido p-p53. Además de la banda principal, se pueden observar bandas más pequeñas y menos intensas en las muestras p53⁺. Si bien parte podría atribuirse a productos intermedios de la degradación de p53, la banda inmediatamente por debajo de p53 mostró diferencias de expresión de acuerdo a si se indujo o no estrés en el RE. Esta banda se corresponde con p47, una isoforma de p53 que se expresa en condiciones de estrés en el RE, como fue descrito en la bibliografía (Bourougaa et al., 2010; Mlynarczyk & Fåhraeus, 2014). Los resultados de análisis por densitometría fueron similares a lo que se pudo observar cualitativamente, habiendo diferencias estadísticamente significativas

($p < 0,008$) para la comparación de p47 entre los tratamientos p53-D y p53-T (Ver Figura 12). En conjunto, estos resultados muestran que el modelo de estudio responde de acuerdo a antecedentes previos.

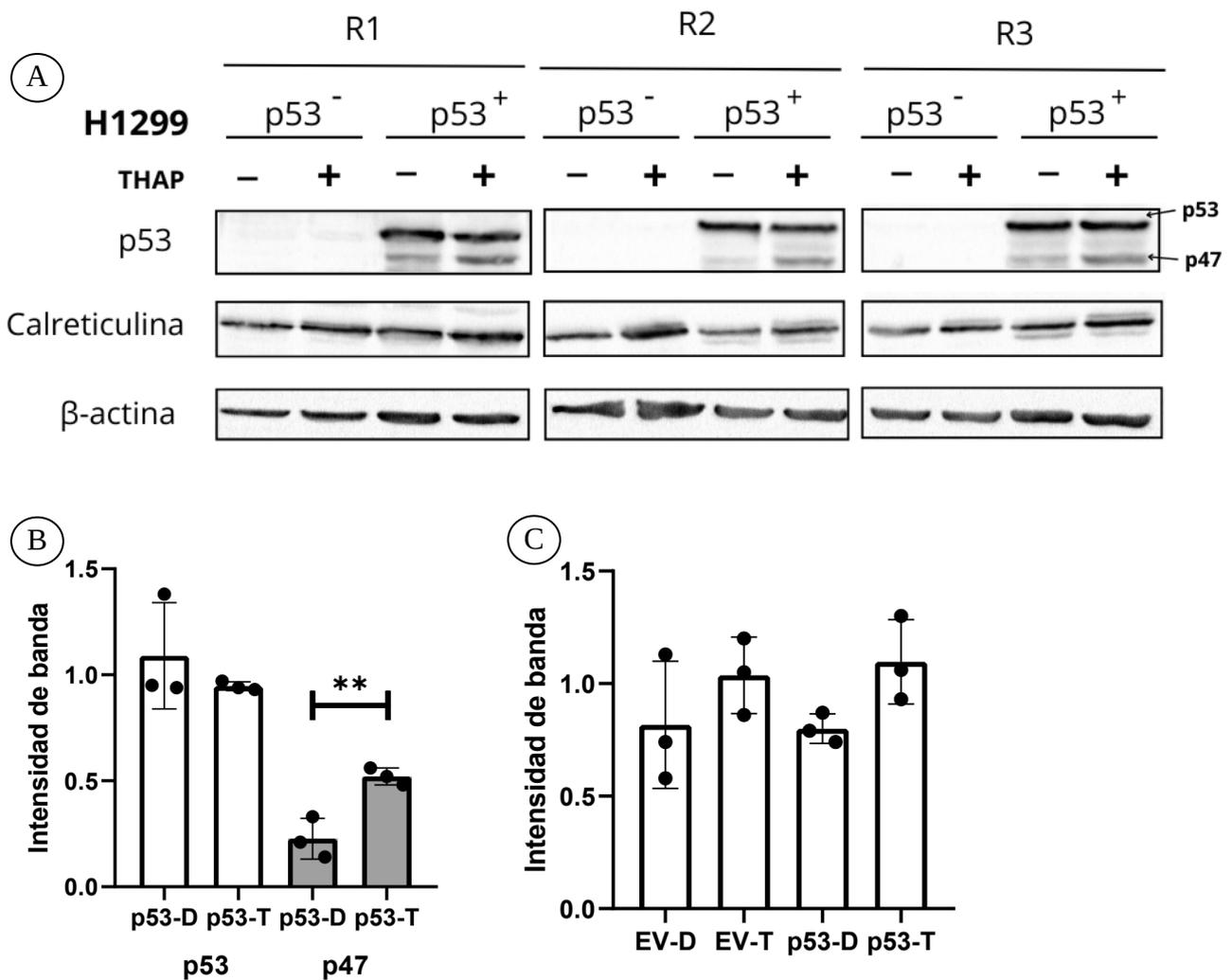


Figura 12. Expresión de marcadores específicos. (A) Western Blot. Se observa el revelado de p53, Calreticulina y β -actina para los 3 experimentos (R1, R2 y R3). Las flechas indican dos isoformas de p53 (p53FL y p47). Densitometría para las bandas del Western Blot, normalizado con β -actina. A) comparación de las bandas de p53 y p47, t-test $p < 0,008$ (**). B) Intensidad de banda para calreticulina.

4.3 RT-qPCR

4.3.1 Eficiencia de cebadores.

Para cumplir con los requisitos del método de Livak mencionado en la sección 3.4.2.2, se calcularon las eficiencias de los cebadores que se muestran en la Tabla 1 utilizando la mezcla de todos los tratamientos de la réplica biológica R1. Se graficó el Ct obtenidos para cada uno de los genes en función del logaritmo en base 10 de las diluciones seriadas de R1 y se obtuvo una línea de tendencia para todos los pares de cebadores utilizados (Figura 13), las cuales se ajustan a los datos con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,99 para todas las rectas. Esto muestra que las replicas técnicas fueron manipuladas correctamente y que las rectas obtenidas a partir de estos datos son confiables.

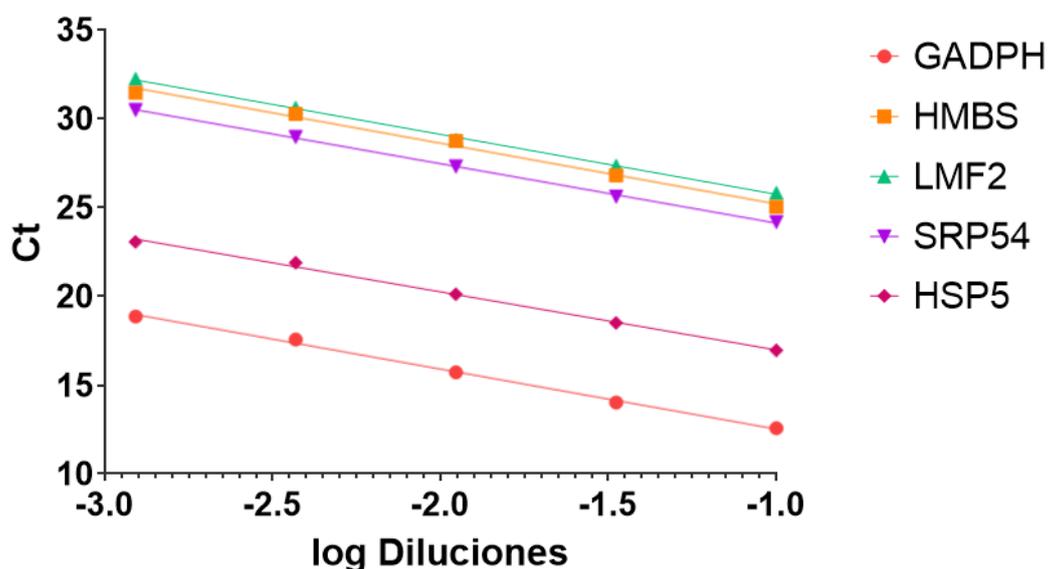


Figura 13. Eficiencia de cebadores. Gráfico de los Ct en función de las diluciones seriadas de R1. Se muestra la línea de tendencia asociada a cada set de datos.

Las eficiencias obtenidas se compararon entre sí para seleccionar el gen constitutivo que se adapte a las premisas y asunciones del método previamente mencionado.

El resumen de la comparación se muestra en la Tabla 3. Si bien las eficiencias de los 3 genes constitutivos podrían ser consideradas “iguales” a la del par de cebadores de *SRP54*, no es así para el cebador de *HSPA5*. La diferencia entre las pendientes de los gráficos de eficiencia de *HMBS* y *HSPA5* supera el valor de $|0,1|$, lo que significa que las eficiencias de dichos cebadores no pueden ser consideradas como “iguales” con el fin de

emplear el método de Livak (sección 3.4.2.1). De usarse dichos cebadores para calcular la expresión relativa se obtendrían valores que sub/sobreestimarían los valores reales. Tanto *GAPDH* como *LMF2* también serían candidatos para calcular la expresión relativa de ambos genes de interés, pero por razones prácticas, se seleccionó a *LMF2* para continuar con los análisis.

Tabla 3. Comparación entre las pendientes de las gráficas de eficiencias de los pares de cebadores de los 3 genes constitutivos (*GAPDH*, *HMBS* y *LMF2*) con la de los genes de interés (*SRP54* y *HSPA5*). En verde se muestran los valores en donde se acepta la igualdad de las eficiencias de los cebadores, en rojo se muestra el valor que fue rechazado.

Genes	GAPDH	HMBS	LMF2
<i>SRP54</i>	0,03	0,07	0,03
<i>HSPA5</i>	0,10	0,14	0,10

4.3.2 Análisis de expresión de *HSPA5*

Las diferencias observadas con Calreticulina en el Western Blot entre tratamientos con THAP y DMSO no fueron suficientes para verificar la correcta inducción del estrés en el RE, por esta razón se midió mediante RT-qPCR la expresión relativa de *HSPA5*, otra chaperona del RE que está fuertemente vinculada a la UPR. Los resultados de la qPCR se observan en la Figura 14.

Las curvas de melting son un control de las reacciones de qPCR, se realizan mediante el calentamiento gradual del amplicón generado. Dado que el SYBR Green usado como fluoróforo en las reacciones tiene una fluorescencia máxima cuando está unido a moléculas de ADN doble hebra, y baja cuando las moléculas de ADN se desnaturalizan, la pérdida de fluorescencia de SYBR Green se relaciona con la disociación de las hebras complementarias de los amplicones. Debido a que la disociación de las hebras depende de su composición nucleotídica y longitud, la temperatura a la que se disocian la mitad de las moléculas de un amplicón dado, conocida como temperatura de melting o T_m , varía para las diferentes moléculas de ADN doble cadena. Esto se evidencia por un corrimiento del pico de la curva melting en el eje de la temperatura. Los resultados de la curva de melting indican la especificidad de los cebadores utilizados para la reacción de qPCR. En caso de encontrarse múltiples picos, estaríamos viendo amplificación de “off-target” (en español: “fuera del blanco”) o inespecificidades, por lo que los cebadores estarían amplificando secuencias que no corresponden al fragmento deseado. Esto afectaría los

resultados de expresión relativa, dada la incapacidad de la qPCR de distinguir ambos amplicones en las curvas de amplificación. El gráfico que se muestra en la Figura 14A para *HSPA5* presenta un único pico cercano a 83°C, lo que significa que los amplicones generados son moléculas con idéntica composición nucleotídica y longitud, confirmando la ausencia de efectos “off-target” y validando los resultados de expresión relativa mostrados a continuación.

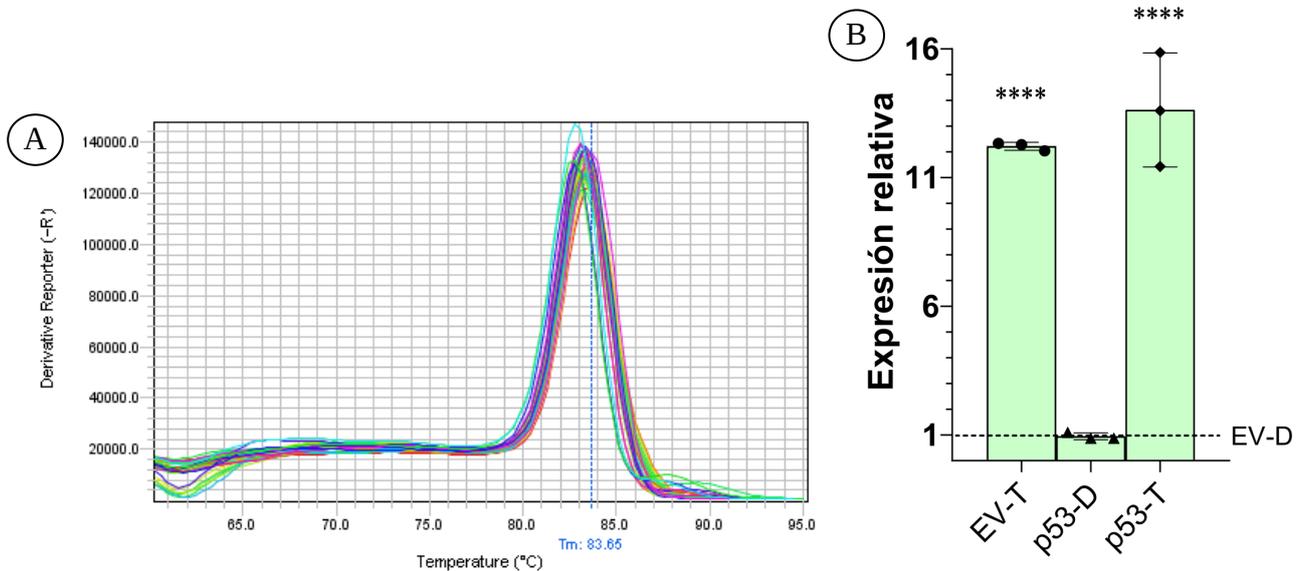


Figura 14. qPCR para *HSPA5*. A) Se muestran las curvas de “melting” para el amplicón de *HSPA5* de una réplica biológica. B) Se muestra la expresión relativa de *HSPA5* para los casos EV-T, p53-D y p53-T normalizados con el control EV-D (línea punteada). Diferencias significativas **** indican p-valor < 0,0001 con respecto a la muestra control en t-test.

Para la situación experimental p53-D se puede observar una expresión relativa casi idéntica a la observada para EV-D (situación control). Esto significa que la presencia de p53 en las células del cultivo no modificó la expresión de *HSPA5* en relación a un marcador de expresión constitutiva, lo que sugiere que la expresión de *HSPA5* no se ve afectada por la presencia de p53 a este nivel en las células en condiciones normales. Por el contrario, las células que fueron tratadas con taspigargina muestran un comportamiento diferente. Para las muestras EV-T y p53-T se observa un claro incremento de entre 12 a 16 veces en la expresión de *HSPA5* en relación a la muestra control. Esta diferencia es respaldada por los análisis estadísticos, ANOVA (Kruskal-Wallis) los cuales mostraron un p-valor de 0,007(**) y los t-test que mostraron un p-valor < 0,0001 para las comparaciones de EV-T y p53-T respecto a EV-D. No parece haber diferencia de expresión entre las

muestras EV-T y p53-T, apoyado por el t-test (p-valor = 0,33), lo que sugiere que la expresión de *HSPA5* durante el estrés también es independiente de la presencia de p53.

4.3.3 Análisis de expresión de *SRP54*

Como prueba de concepto para el grupo de trabajo, se utilizó el gen *SRP54*, el cual se encuentra fuertemente involucrado en procesos de transporte de proteínas hacia el interior del RE. Se realizaron RT-qPCR para las réplicas biológicas R1, R2 y R3 con sus correspondientes tratamientos, EV-D, EV-T, p53-D y p53-T. Los resultados del análisis de expresión relativa se muestran en la Figura 15.

En primer lugar, se puede observar que en las curvas de melting, Figura 15A, el amplicón correspondiente al blanco *SRP54* muestra un único pico a 80°C, homogéneo para todas las réplicas biológicas y tratamientos. La ausencia de múltiples picos significa que todas las moléculas de ADN producidas tienen la misma composición y longitud, indicando que se produjo un único tipo de molécula de ADN. Este resultado valida el uso de este par de cebadores para evaluar la expresión de *SRP54* utilizando SYBRGreen.

Se calcularon los valores de expresión relativa de *SRP54* para las muestras EV-D, EV-T, p53-D y p53-T, utilizando el gen de expresión constitutiva *LMF2* como normalizador. Se utilizaron test estadísticos ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wellis) y se comparó muestra a muestra utilizando t-test.

A nivel cualitativo se puede observar una tendencia a que la expresión de ARNm de *SRP54* disminuya en la condición p53-D, esto es levemente apoyado ya que existe una diferencia estadísticamente significativa a nivel global (Kruskal-Wallis: p-valor = 0,013) y entre las muestras EV-T (muestra con mayor media) y p53-D (t-Test: p-valor= 0,037). Esta disminución no es significativa cuando se compara EV-D/p53-D, por lo que puede que no sea una disminución biológicamente relevante. De todas formas, esta diferencia no se corresponde con nuestra hipótesis, estos resultados indican que la expresión de *SRP54* no se vería afectada por la presencia de p53 y la inducción de la UPR.

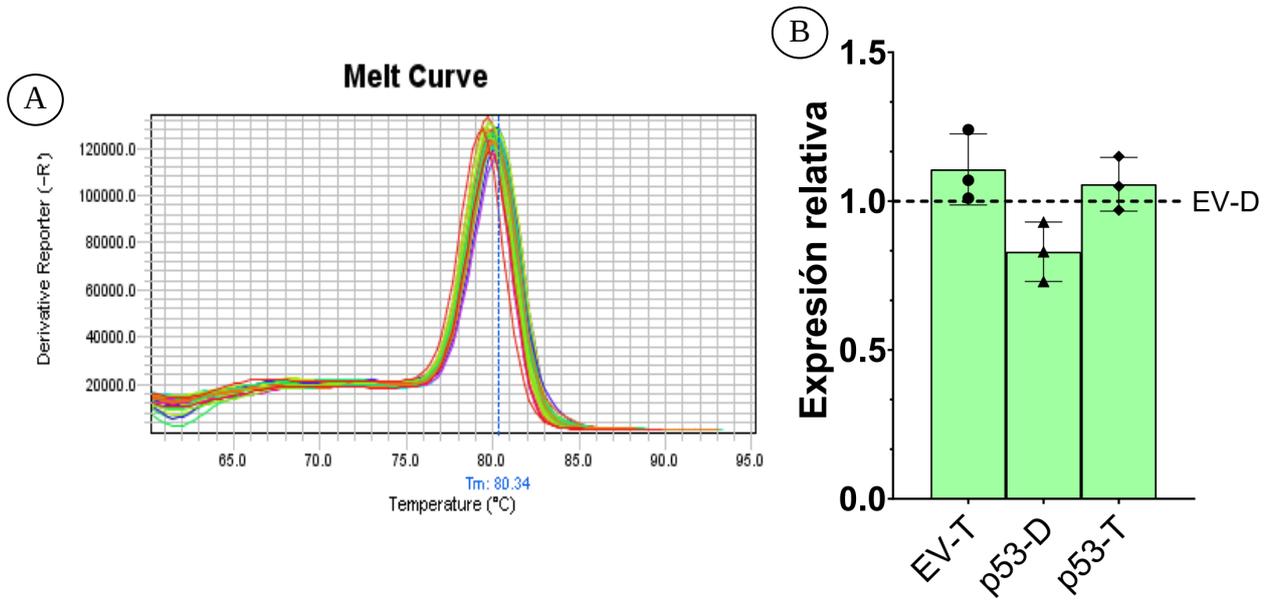


Figura 15. Análisis de expresión de *SRP54*. A) Curva de “melting” para las reacciones de RT-qPCR de las 3 réplicas biológicas B) Expresión relativa de *SRP54* para las muestras EV-T, p53-D y p53-T normalizadas con el control EV-D.

5. Conclusiones y perspectivas

Según los objetivos planteados, el trabajo se dividió en dos secciones. En primer lugar, y por coincidir con el inicio del proyecto de investigación, fue necesario validar el modelo a utilizar en el proyecto global en el que se enmarca mi trabajo. En primer lugar, logramos obtener los plásmidos a utilizar con calidad y en cantidad adecuada. La reproducibilidad del cultivo celular de H1299 es un punto central en nuestro trabajo. Siguiendo las buenas prácticas, se regeneró el cultivo y se verificaron algunas características morfológicas por microscopía óptica. Se observó la similaridad en morfología general entre nuestro cultivo celular y el de las imágenes proporcionadas por el proveedor, ATCC. Asimismo, los Western Blot revelaron que este cultivo es incapaz de expresar a p53 de forma endógena, asegurándonos de que estamos trabajando con nuestro cultivo de interés.

Posteriormente, se logró verificar el éxito de nuestros tratamientos de transfección e inducción de estrés en el RE mediante Western blot y RT-qPCR, como lo indican la presencia de p53 en muestras transfectadas con el p-p53 y el aumento de expresión de ARNm de HSPA5, así como la isoforma corta de p53 llamada p47 (Bourougaa et al., 2010; Lee et al., 2007; Llewellyn et al., 1995). Trabajos posteriores del equipo de trabajo verificaron el aumento de expresión de proteína de HSPA5. Estas características parecen suficientes para concluir que en nuestro laboratorio el modelo responde de acuerdo a lo reportado en la literatura, exceptuando a Calreticulina, y puede ser usado para analizar la expresión de ARNm de diferentes genes con el fin de observar diferencias en presencia/ausencia de p53 y la UPR.

La discrepancia entre lo observado con Calreticulina respecto a lo que se esperaba podría deberse a problemas técnicos ya que se tuvo mucha dificultad para su revelado en ensayos posteriores, esto sugiere que hay problemas con la retención de esta proteína en las membranas de Western Blot o bien que el anticuerpo utilizado para su revelado no se encuentra en estado óptimo.

La segunda parte de este trabajo se basa en poner a prueba el modelo previamente validado, y estudiar como prueba de concepto si la expresión de *SRP54* cambia.

Resultados previos de micro-arreglos del equipo de trabajo sugerían una reducción en la expresión de ARNm de *SRP54* en consecuencia de la presencia de p53 y la UPR.

Adicionalmente, siendo que *SRP54* se encuentra fuertemente vinculado con procesos de transporte en el RE, es un candidato prometedor para estudiar la biología de la célula, lo que en principio es fácilmente abordable por qPCR, una técnica más sensible que los

micro-arreglos. Los resultados que obtuvimos no estuvieron acorde a lo que se obtuvo en los micro-arreglos, ya que no observamos una influencia de p53 en la expresión de *SRP54* y estadísticamente tampoco se veía influenciada por el estrés en el RE. Los resultados de la qPCR son confiables en la medida que se tenga seguridad de que el diseño de cebadores haya sido correcto. Por razones probabilísticas se verifica que el amplicón generado en la qPCR fue único y homogéneo para todas las muestras, pero no se verifica que se trate de un fragmento del ARNm de *SRP54*. Para tener absoluta certeza de que los análisis de expresión relativa se correlacionan con nuestros resultados obtenidos, se debería secuenciar el amplicón producido y compararlo con la región del ARNm para la cual los cebadores fueron diseñados.

Si bien los resultados no fueron acordes a lo esperado, se pudo comprobar la funcionalidad del modelo, esto indica que el modelo sería útil para el análisis de la expresión de genes candidatos y la potencial variación que ocurriría en la misma en consecuencia de la presencia de p53 y la UPR. Asimismo, los resultados señalan la importancia de corroborar resultados utilizando diferentes aproximaciones, principalmente si las diferencias son relativamente pequeñas, como era el caso de la expresión de *SRP54*.

En el proyecto global se propone analizar no solo la variación en la expresión de genes en consecuencia a las variables de interés, sino también en el desacople entre la expresión de ARNm y la expresión de proteínas. Dado los resultados de los Western Blot, el modelo presentado sería útil para analizar la expresión proteica y cumplir con los objetivos del proyecto global.

6. Bibliografía

ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. (2001). *Relative quantification of gene expression qPCR Applied bulletin*.

Bachinski, L. L., Olufemi, S.-E., Zhou, X., Wu, C.-C., Yip, L., Shete, S., Lozano, G., Amos, C. I., Strong, L. C., & Krahe, R. (2005). Genetic mapping of a third Li-Fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23. *Cancer Research*, 65(2), 427-431.

- Bailey, M. H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M. C., Kim, J., Reardon, B., Ng, P. K.-S., Jeong, K. J., Cao, S., Wang, Z., Gao, J., Gao, Q., Wang, F., Liu, E. M., Mularoni, L., ... Mariamidze, A. (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*, *173*(2), 371-385.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.060>
- Bakunts, A., Orsi, A., Vitale, M., Cattaneo, A., Lari, F., Tadè, L., Sitia, R., Raimondi, A., Bachi, A., & Van Anken, E. (2017). Ratiometric sensing of BiP-client versus BiP levels by the unfolded protein response determines its signaling amplitude. *eLife*, *6*, e27518. <https://doi.org/10.7554/eLife.27518>
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, *2*(6), 326-332. <https://doi.org/10.1038/35014014>
- Bouaoun, L., Sonkin, D., Ardin, M., Hollstein, M., Byrnes, G., Zavadil, J., & Olivier, M. (2016). TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data: Human Mutation. *Human Mutation*, *37*(9), 865-876. <https://doi.org/10.1002/humu.23035>
- Bourougaa, K., Naski, N., Boularan, C., Mlynarczyk, C., Candeias, M. M., Marullo, S., & Fåhræus, R. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress Induces G2 Cell-Cycle Arrest via mRNA Translation of the p53 Isoform p53/47. *Molecular Cell*, *38*(1), 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.041>
- Candeias, M. M., Powell, D. J., Roubalova, E., Apcher, S., Bourougaa, K., Vojtesek, B., Bruzzoni-Giovanelli, H., & Fåhræus, R. (2006). Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. *Oncogene*, *25*(52), 6936-6947. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209996>
- Carrara, M., Prischi, F., & Ali, M. (2013). UPR Signal Activation by Luminal Sensor Domains. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(3), 6454-6466. <https://doi.org/10.3390/ijms14036454>
- Courtois, S., Verhaegh, G., North, S., Luciani, M.-G., Lassus, P., Hibner, U., Oren, M., & Hainaut, P. (2002). ΔN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain,

counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene*, 21(44), 6722-6728.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205874>

Datta, B., Datta, R., Mukherjee, S., & Zhang, Z. (1999). Increased Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 α at the G2/M Boundary in Human Osteosarcoma Cells Correlates with Deglycosylation of p67 and a Decreased Rate of Protein Synthesis. *Experimental Cell Research*, 250(1), 223-230. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4508>

Donehower, L. A. (1996). The p53-deficient mouse: A model for basic and applied cancer studies. *Seminars in Cancer Biology*, 7(5), 269-278. <https://doi.org/10.1006/scbi.1996.0035>

Efeyan, A., & Serrano, M. (2007). p53: Guardian of the Genome and Policeman of the Oncogenes. *Cell Cycle*, 6(9), 1006-1010. <https://doi.org/10.4161/cc.6.9.4211>

el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., & Wang, Y. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research*, 54(5), 1169-1174.

Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M. D., & Hatzoglou, M. (2002). Regulation of Internal Ribosomal Entry Site-mediated Translation by Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 α . *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 19198-19205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201052200>

Ghosh, A., Stewart, D., & Matlashewski, G. (2004). Regulation of Human p53 Activity and Cell Localization by Alternative Splicing. *Molecular and Cellular Biology*, 24(18), 7987-7997. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.7987-7997.2004>

Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E., & Simos, G. (2001). Biogenesis of the Signal Recognition Particle (Srp) Involves Import of Srp Proteins into the Nucleolus, Assembly with the Srp-Rna, and Xpo1p-Mediated Export. *The Journal of Cell Biology*, 153(4), 745-762. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.4.745>

Grudnik, P., Bange, G., & Sinning, I. (2009). Protein targeting by the signal recognition particle. *Bchm*, 390(8), 775-782. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.102>

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), 296-299. <https://doi.org/10.1038/387296a0>

Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the

- unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(8), 421-438.
<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Ilic, M., Aleksandar, K., Markov, B., Mijatov, I., Mijatov, S., & Vuckovic, N. (2014). Li-fraumeni syndrome: A case report. *Vojnosanitetski Pregled*, 71(12), 1159-1162.
<https://doi.org/10.2298/VSP1412159I>
- Jaskulska, A., Janecka, A. E., & Gach-Janczak, K. (2020). Thapsigargin—From Traditional Medicine to Anticancer Drug. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 4.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010004>
- Jeffrey, P. D., Gorina, S., & Pavletich, N. P. (1995). Crystal Structure of the Tetramerization Domain of the p53 Tumor Suppressor at 1.7 Angstroms. *Science*, 267(5203), 1498-1502.
<https://doi.org/10.1126/science.7878469>
- Juaire, K. D., Lapouge, K., Becker, M. M. M., Kotova, I., Michelhans, M., Carapito, R., Wild, K., Bahram, S., & Sinning, I. (2021). Structural and Functional Impact of SRP54 Mutations Causing Severe Congenital Neutropenia. *Structure*, 29(1), 15-28.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2020.09.008>
- Kasthuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062-1078.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Kim, H.-R., Roe, J.-S., Lee, J.-E., Cho, E.-J., & Youn, H.-D. (2013). P53 regulates glucose metabolism by miR-34a. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(2), 225-231. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.043>
- Kopp, M. C., Larburu, N., Durairaj, V., Adams, C. J., & Ali, M. M. U. (2019). UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(11), 1053-1062. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0324-9>
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(7), 393-405. <https://doi.org/10.1038/nrm4007>
- Lane, D. P., & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature*, 278(5701), 261-263. <https://doi.org/10.1038/278261a0>
- Lanigan, F., Geraghty, J. G., & Bracken, A. P. (2011). Transcriptional regulation of cellular

- senescence. *Oncogene*, 30(26), 2901-2911. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.34>
- Laptenko, O., & Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: One protein, many possibilities. *Cell Death & Differentiation*, 13(6), 951-961. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401916>
- Lee, D., Singaravelu, G., Park, B.-J., & Ahnn, J. (2007). Differential Requirement of Unfolded Protein Response Pathway for Calreticulin Expression in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 372(2), 331-340. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.06.071>
- Li, F. P., Fraumeni, J. F., Mulvihill, J. J., Blattner, W. A., Dreyfus, M. G., Tucker, M. A., & Miller, R. W. (1988). A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Research*, 48(18), 5358-5362.
- Llewellyn, D. H., Sheikh, F. N., Kendall, J. M., & Campbell, A. K. (1995). Upregulation of calreticulin expression in HeLa cells by calcium-stress. *Biochemical Society Transactions*, 23(2), 330S-330S. <https://doi.org/10.1042/bst023330s>
- López, I., Tournillon, A.-S., Nylander, K., & Fåhræus, R. (2015). P53-mediated control of gene expression via mRNA translation during Endoplasmic Reticulum stress. *Cell Cycle*, 14(21), 3373-3378. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1090066>
- López, I., Valdivia, I. L., Vojtesek, B., Fåhræus, R., & Coates, P. J. (2024). Re-appraising the evidence for the source, regulation and function of p53-family isoforms. *Nucleic Acids Research*, gkae855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae855>
- Luirink, J. (2004). SRP-mediated protein targeting: Structure and function revisited. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.03.013>
- Mlynarczyk, C., & Fåhræus, R. (2014). Endoplasmic reticulum stress sensitizes cells to DNA damage-induced apoptosis through p53-dependent suppression of p21CDKN1A. *Nature Communications*, 5(1), 5067. <https://doi.org/10.1038/ncomms6067>
- Nilsson, R. (1999). Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54. *The EMBO Journal*, 18(3), 733-742. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.733>
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 Mutations in Human Cancers: Origins,

- Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a001008-a001008. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>
- Pihán, P., Carreras-Sureda, A., & Hetz, C. (2017). BCL-2 family: Integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death & Differentiation*, 24(9), 1478-1487. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.82>
- Pitolli, C., Wang, Y., Mancini, M., Shi, Y., Melino, G., & Amelio, I. (2019). Do Mutations Turn p53 into an Oncogene? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6241. <https://doi.org/10.3390/ijms20246241>
- Politz, J. C., Yarovoi, S., Kilroy, S. M., Gowda, K., Zwieb, C., & Pederson, T. (2000). Signal recognition particle components in the nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1), 55-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.55>
- Powell, D. J., Hrstka, R., Candeias, M., Bourougaa, K., Vojteseka, B., & Fåhraeus, R. (2008). Stress-dependent changes in the properties of p53 complexes by the alternative translation product p53/47. *Cell Cycle*, 7(7), 950-959. <https://doi.org/10.4161/cc.7.7.5626>
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519-529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
- Rutishauser, J., & Spiess, M. (2002). Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Medical Weekly*, 132(17-18), 211-222. <https://doi.org/10.4414/smw.2002.09861>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005a). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1-2), 29-63. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056>
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005b). THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 739-789. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005c). THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 739-789.

<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>

- Sidrauski, C., & Walter, P. (1997). The Transmembrane Kinase Ire1p Is a Site-Specific Endonuclease That Initiates mRNA Splicing in the Unfolded Protein Response. *Cell*, *90*(6), 1031-1039. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80369-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80369-4)
- Tung, J., Huang, L., George, G., Harding, H. P., Ron, D., & Ordonez, A. (2024). A genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies calreticulin as a selective repressor of ATF6 α . *eLife*, *13*, RP96979. <https://doi.org/10.7554/eLife.96979>
- Uversky, V. N. (2016). p53 Proteoforms and Intrinsic Disorder: An Illustration of the Protein Structure-Function Continuum Concept. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(11), 1874. <https://doi.org/10.3390/ijms17111874>
- Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). P53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(4), 275-283. <https://doi.org/10.1038/nrm2147>
- Wang, H., Guo, M., Wei, H., & Chen, Y. (2023). Targeting p53 pathways: Mechanisms, structures and advances in therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01347-1>
- Weichenrieder, O. (2021). Cellular Traffic Jam and Disease Due to Mutations in SRP54. *Structure*, *29*(1), 3-5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.12.010>
- Williams, D. B. (2006). Beyond lectins: The calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, *119*(4), 615-623. <https://doi.org/10.1242/jcs.02856>
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell*, *107*(7), 881-891. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0)

7. Anexo

7.1 Protocolos y Buffers

Transformación bacteriana por choque térmico (Heat Shock)

- Células competentes DH5 α 200 μ L descongeladas en hielo 15 minutos
- Agregar 10 μ L del plásmido de interés a las células competentes
- 30 minutos de incubación en hielo
- Choque térmico de 42°C por 90 segundos
- Colocar células en caldo LB a temperatura ambiente
- Agitar 30 minutos a 37°C
- Plaquear en LB-agar + ampicilina

LB Agar (+Ampicilina)

10 g Triptona

5 g Extracto de levadura

10 g NaCl

1 L agua destilada mili-Rho

15 g Agar

1 mL de Ampicilina previo a colocar el medio en las placas de petri (Concentración final:
100 μ g/ml)

Buffer de corrida TAE 10X

48,5 g Tris base

11,4 mL ácido acético

20 mL EDTA 0,5 M (pH 8,0)

Buffer de carga 6X (gel de agarosa)

1,5 mL Glicerol

0,0125 g azul de bromofenol

0,0125 g Xileno cianol FF

Western Blot Lysis Buffer (WB-LB) (100mL)

20 mM HEPES-KOH pH 7,5

1mM EDTA pH8,0

0,5 mM Na₃VO₄
100 mM KCl
10% Glicerol
1% Trituna X-100
+inhibidores de proteasa

SDS Loading buffer (4X) (buffer de carga)

200 mM Tris-HCl pH 6,8
8% SDS
40% glicerol
20% β-mercaptoetanol
0,2% bromofenol

Buffer de Corrida 10X (SDS)

144 g Glicina
10g SDS
30,2g Tris base
Llevar a 1L con agua destilada mili-Rho

Buffer de transferencia (1L)

Tris Base 3 g
Glicina 14.42 g
H₂O mRo c.s.p. 200mL
EtOH 200 mL
SDS 10% 3,7mL

Stripping Buffer (10mL)

60 mM Tris-HCl pH 6,8
2% SDS
0,1 M β-mercaptoetanol
Agua destilada Mili-Q

TBS-T (Buffer de lavado)

1 M Tris-HCl pH 7,5 10mL

5 M NaCl 15 mL

Tween 20% 1mL

7.2. Anexo a resultados

Tabla 4. Concentración y pureza del ARN extraído luego de todos los tratamientos de limpiado y concentración.

Muestra	Absorbancia 260	260/280	Concentración (ng/ μ L)	Réplica biológica
EV-D	14,92	2,06	596,8	R1
EV-T	13,98	1,99	559,1	
p53-D	16,04	2,03	641,6	
p53-T	13,19	2,08	527,6	
EV-D	9,52	2,09	380,4	R2
EV-T	14,17	2,08	566,8	
p53-D	15,31	2,08	612,6	
p53-T	13,45	2,07	538,1	
EV-D	11,24	2,09	449,6	R3
EV-T	13,75	2,09	550,2	
p53-D	14,69	2,08	588,0	
p53-T	12,35	2,09	493,9	

Tabla 5: secuencia de cebadores CMV y bGH

Primer	Secuencia	
CMV	CGCAAATGGGCGGTAGGCCGTG	Forward
bGH	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Reverse

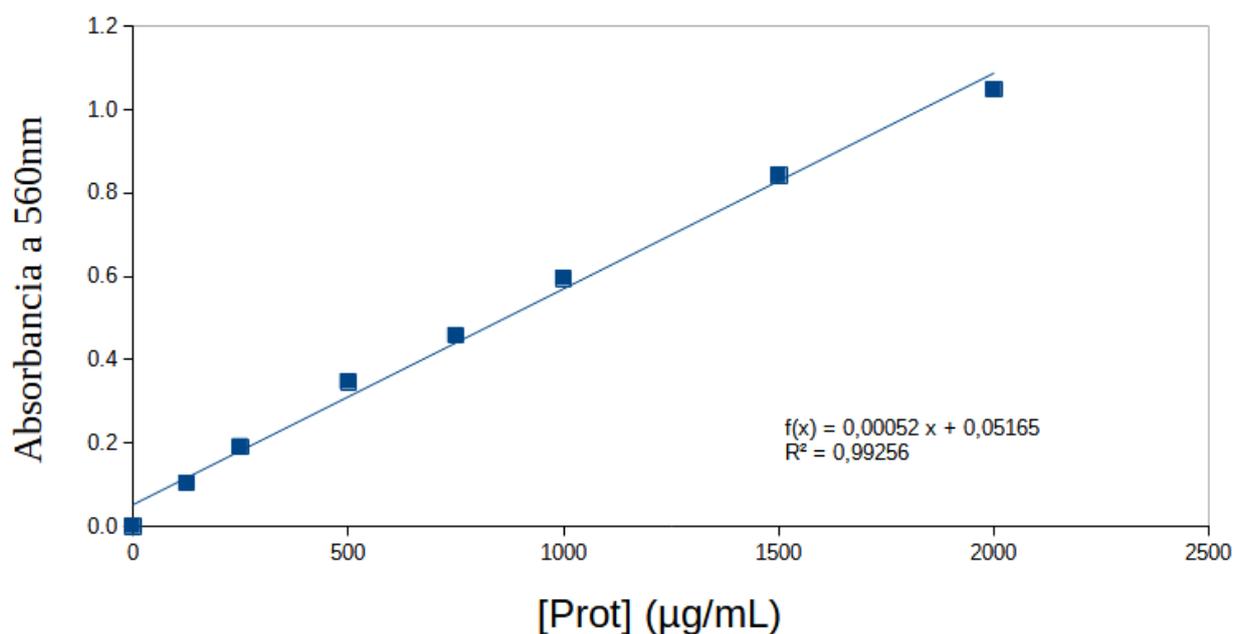


Figura 16. Curva estándar de la cuantificación de proteínas. Se graficó la absorbancia a 560 nm (λ) en función de la concentración de proteínas totales de los estándares de BSA ($\mu\text{g/mL}$). Se ajustaron los datos a una línea de tendencia, para la que se muestra la ecuación asociada y el coeficiente de determinación (R^2).

Tabla 6. Se muestran los pares de cebadores analizados y las eficiencias calculadas para cada uno de ellos.

Genes	Eficiencia	Pendiente	Categoría
GAPDH	97,8	-3,376	Constitutivo
HMBS	96,2	-3,416	
LMF2	97,9	-3,374	
SRP54	99,1	-3,343	Genes de interés
HSPA5	95,3	-3,439	

Comparación de secuencia madre-secuenciado.

Plásmido C1. En verde se muestra la secuencia codificante de TP53 y en celeste la complementaria. Los cebadores CMV y BGH se muestran en violeta.

CMV_forward_primer
cgcaaatgggcggttaggcgtg

5' cgcaaatgggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaaccactgcttactggcttatcg
3' gcgttaccgcgccatccgcacatgccaccctccagatatattcgtctcagagaccgattgatctcttgggtgacgaatgaccgaatagc

aaattaatagcactcactatagggagaccaagcttACTGCCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAG
ttaatatgctgagtgatataccctctgggttcgaaTGACGGTACCTCCTCGGCCTCAGTCTAGGATCGCAGCTCGGGGGAGACTCAGTC

GAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCC
CTTTGTA AAAAGTCTGGATACCTTTGATGAAGGACTTTTGTGCAAGACAGGGGGAACGGCAGGGTTTCGTTACCTACTAAACTACGACAGG

CCGGACGATATTGAACAATGGTTCCTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCCCTGCA
GGCCTGCTATAACTTGTACCAAGTACTTCTGGGTCCAGGTCTACTTCGAGGGTCTTACGGTCTCCGACGAGGGGGGCACCGGGGACGT

CCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCTGTCTATCTTCTGTCCCTTCCAGAAAACCTACCAGGGCAGC
GGTCGTGAGGATGTGGCCGCCGGGACGTGGTTCGGGGAGGACCGGGGACAGTAGAAGACAGGGAAGGGTCTTTTGGATGGTCCCGTCG

TACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAA
ATGCCAAAGGCAGACCCGAAGAACGTAAGACCTGTCCGTTCCAGACACTGAACGTGCATGAGGGGACGGGAGTTGTTCTACAAAACGGTT

CTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCA
GACCGTTCTGGACGGGACAGCTGCACACCAACTAAGGTGTGGGGGCGGGCCGTGGGCGCAGGCGCGGTACCGGTAGATGTTCTGTCAGT

CAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCTCCTCAGCATCTTATCCGA
GTCGTGACTGCCTCCAACACTCCGCGACGGGGTGGTACTCGCGACGAGTCTATCGCTACCAGACCGGGGAGGAGTCGTAGAATAGGCT

GTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGC
CACCTTCCTTTAAACGCACACCTCATAAACCTACTGTCTTTGTGAAAAGCTGTATCACACCACACGGGATACTCGGCGGACTCCAACCG

TCTGACTGTACCACCATCCACTACAACCTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACA
AGACTGACATGGTGGTAGGTGATGTTGATGTACACATTGTCAAGGACGTACCCGCCGTACTTGGCCTCCGGGTAGGAGTGGTAGTAGTGT

CTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCTCTGGGAGAGACC66CGCACAGAGGAA
GACCTTCTGAGGTCACCATTAGATGACCCTGCCTTGTGAAACTCCACGCACAAACACGGACAGGACCCTCTCTGGCCGCGTGTCTCCTT

GAGAATCTCCGCAAGAAAGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCC
CTCTTAGAGGCGTTCTTTCCCTCGGAGTGGTCTCGACGGGGTCCCTCGTGATTCGCTCGTGACGGGTGTTGTGGTTCGAGGAGAGGG

CAGCCAAAGAAGAAACCCTGGATGGAGAATATTTACCCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAG
GTCGGTTTCTTCTTTGGTGACCTACCTCTTATAAAGTGGGAAGTCTAGGCACCCGCACTCGGAAGCTCTACAAGGCTCTCGACTTACTC

GCCTTGGAACCTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAAGTCT
CGGAACCTTGAGTTCCTACGGGTCGACCTTCTCGGTCCCCCTCGTCCGAGTGAGGTGGTGGACTTCAGGTTTTTCCAGTCAGA

ACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCTGACTCAGACTGATAGTAActcgagcatgcatctagagggccctattct
TGGAGGGCGGTATTTTTTGTAGTACAAGTCTGTCTTCCCGACTGAGTCTGACTATCATTgagctcgtacgtagatctcccgggataaga

atagtgtcacctaaatgctagagctcgtgatcagcctcgactgtgccttcta 3'
tatcacagtggatttacgatctcgagcagactagtcggagctgacacggaagat 5' 1403

ggagctgacacggaagat
BGH_primer_reverse

Plásmido C30. En violeta se muestran los cebadores CMV y BGH. No se encuentra la secuencia codificante de TP53

