



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



**ANÁLISIS DE LOS MOTIVOS QUE CONTROLAN LA
ESTABILIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
INDIFERENCIADO 1 (Utf1) POR MUTAGÉNESIS
DIRIGIDA.**

Mónica Novo Pérez

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutor académico: **Dra. María del Carmen Portillo Guisado**

Departamento de Bioquímica y biotecnología

Doctorado en biología y microbiología molecular

carmen.portillo@urv.cat

En cooperación con: **Centro Nacional de Investigaciones oncológicas
(CNIO)**

Supervisores: **Dra. Carolina Villarroya Beltri**

Grupo de División celular y Cáncer

cvillarroya@cniio.es

Dr. Marcos Malumbres

Grupo de División celular y Cáncer

mmm@cniio.es

Junio 2021

Yo, Mónica Novo Pérez, con DNI 53478942-D, soy concedora de la guía de prevención del plagio de la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio del 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, 7 de Junio de 2021

Firma

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mónica', with a large, sweeping horizontal stroke underneath it.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. DATOS DEL CENTRO.....	1
2. RESUMEN/ <i>ABSTRACT</i> Y <i>KEYWORDS</i>	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
3.1. EL CICLO CELULAR.....	4
3.1.1. PRINCIPALES REGULADORES DEL CICLO CELULAR	4
3.1.1.1. QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA	4
3.1.1.2. FOSFATASAS.....	5
3.2. Utf1: Undifferentiated transcription factor 1	6
3.2.1. ANTECEDENTES DE FUNCIÓN Y VÍAS DE DEGRADACIÓN.....	6
3.2.2. ESTRUCTURA Y POTENCIALES RESIDUOS IMPORTANTES EN SU DEGRADACIÓN	8
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	11
5.1.1 Mutagénesis dirigida	11
5.1.2. Transformación	12
5.1.3. Miniprep.....	12
5.2.3. Midiprep.....	13
5.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	13
5.2.1. Cultivo de células Hela.....	13
5.2.2. Transfección.....	14
5.3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	15
5.3.1. BCA	15
5.3.2. Western-Blot.....	16
6. RESULTADOS.....	18
6.1. Análisis del papel de SPOP y SIAH en la degradación de Utf1 mediante el uso de inhibidores químicos	18
6.2. Generación de mutantes de Utf1.....	19
6.3. Análisis de la estabilidad de los mutantes de Utf1.....	23
7. DISCUSIÓN.....	26
8. CONCLUSIÓN.....	28
9. AUTOEVALUACIÓN.....	29
10. BIBLIOGRAFÍA.....	30

11. ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
• Anexo 1: Mapa del vector pMX	32
• Anexo 2: Resultados de la secuenciación.....	32
• Anexo 3: Ejemplo de BCA	34

1. DATOS DEL CENTRO

El Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) es una institución pública centrada en la investigación del cáncer fundado en 1998. Además, colabora con numerosos hospitales y compañías farmacéuticas para conseguir financiación, sin embargo, la mayoría de esta se obtiene de manera competitiva destacando también las ventas y los acuerdos con empresas privadas.

Su sede se encuentra en el campus del Instituto de Salud Carlos III en Madrid.

Desde 2019 cuenta con 34 patentes activas y una plantilla de alrededor de 547 empleados. También posee 136 proyectos activos y una elevada actividad internacional. La ciencia en este centro se organiza en programas de investigación básica, innovación y orientada a pacientes.

La investigación básica abarca dos grandes programas, el de Oncología Molecular y el de Biología Estructural, cada uno de ellos compuestos por diversos grupos de investigación.

En concreto, el Programa de Oncología Molecular es el programa más grande del CNIO y cuenta con 11 Grupos de Investigación y 4 de Investigación Junior. A este programa pertenece el grupo de División Celular y Cáncer, dirigido por el doctor Marcos Malumbres, dedicado a comprender los mecanismos que regulan la división celular y la proliferación en células de mamíferos para conseguir optimizar las estrategias terapéuticas contra las células cancerosas.

2. RESUMEN/ABSTRACT Y KEYWORDS

RESUMEN:

El correcto desarrollo y funcionamiento del organismo depende del equilibrio entre dos procesos fundamentales de la célula: la división celular y la diferenciación. Para que estos procesos estén bien coordinados deben existir nexos moleculares entre ellos. Se ha observado que quinasas y fosfatasas de ciclo celular regulan la fosforilación del factor de diferenciación Utf1, afectando a su estabilidad. Con el objetivo de estudiar los residuos de Utf1 importantes para el control de su estabilidad, así como sus vías de degradación, se han generado distintos mutantes de Utf1 por mutagénesis dirigida. Los resultados de este trabajo indican que la degradación de Utf1 está mediada por su ubiquitinación, y que en ella participan las E3-ubiquitina ligasas SPOP y SIAH. Además, la fosforilación de las serinas 48 y 54 de Utf1 aumenta su estabilidad.

ABSTRACT:

The correct development and functioning of the organism depends on the balance between two fundamental processes of the cell: cell division and differentiation. For these processes to be well coordinated, there must be molecular links between them. It has been observed that cell cycle kinases and phosphatases regulate the phosphorylation of the differentiation factor Utf1, affecting its stability. In order to study the Utf1 residues important for the control of its stability, as well as its degradation pathways, different Utf1 mutants have been generated by targeted mutagenesis. The results of this work indicate that Utf1 degradation is mediated by its ubiquitination, and that the E3-ubiquitin ligases SPOP and SIAH are involved. In addition, phosphorylation of serines 48 and 54 of Utf1 increases its stability.

Keywords: Utf1, SPOP, SIAH, estabilidad, degradación y regulación epigenética.

3. INTRODUCCIÓN:

3.1. EL CICLO CELULAR

El ciclo celular en mamíferos está constituido por cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M. En gap 1 (G1), la célula crece y empieza la transcripción de genes implicados en el control de dicho ciclo. La fase S, en la cual se produce la duplicación del material genético y se comienza la formación del huso mitótico. En gap 2 (G2), la célula continúa creciendo y se produce la preparación para la división, así como la revisión de la correcta replicación del ADN. Finalmente, en la fase de mitosis (M), compuesta por la mitosis y la citocinesis, la célula se divide en dos células hijas.

También, existe la fase G0 (fuera del ciclo celular), en la cual la célula permanece en un estado quiescente.

Debido a su gran importancia, el ciclo celular debe estar estrictamente regulado para asegurar la correcta división del material genético, debido a que un fallo en dicha regulación podría desembocar en una proliferación descontrolada pudiéndose acumular mutaciones, el agotamiento de progenitores o incluso el desarrollo de cáncer (Malumbres y Barbacid, 2009). Dicha regulación consta de varios *checkpoints* entre las fases del ciclo, de esta forma, si las condiciones no son óptimas para la progresión se produce la parada del ciclo impidiendo el paso a la siguiente fase (L. Hartwell y Weinert, 1989).

3.1.1. PRINCIPALES REGULADORES DEL CICLO CELULAR

3.1.1.1. QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA

Entre los reguladores del ciclo celular, y por tanto de la proliferación, destacan las **quinasas dependientes de ciclina** (Cdks). Estas son esenciales para asegurar la correcta progresión del ciclo en células eucariotas mediante la fosforilación de sustratos siguiendo un patrón muy concreto tanto espacial como temporal (Wurzenberger y Gerlich, 2011). Esta capacidad de fosforilar los sustratos de forma tan específica está determinada por su unión a distintos tipos de ciclinas, cuya expresión se encuentra muy regulada a lo largo del ciclo.

Las subunidades catalíticas de las Cdks pertenecen a la familia de quinasas heterodiméricas de serina/treonina y se encuentran muy conservadas en la evolución (Malumbres y Barbacid, 2005). Entre ellas destaca Cdk1, que desempeña un papel clave en la progresión del ciclo celular, especialmente en la mitosis. Entre otros sustratos, Cdk1 fosforila e inactiva APC/C-Cdc20, el cual se encarga de la degradación de proteínas implicadas en el proceso de mitosis, incluyendo su ciclina reguladora: la ciclina B. Esta degradación es necesaria para la inactivación de Cdk1 y por tanto para la salida de mitosis (Pines, 2011).

3.1.1.2. FOSFATASAS

Diversos estudios realizados en eucariotas muestran que la salida de la mitosis solo es posible si se cumplen dos requisitos: la inactivación de las Cdks y la defosforilación de sus sustratos. (Wurzenberger y Gerlich, 2011). Dicha defosforilación es realizada por las **fosfatasas**, que actúan catalizando la eliminación de grupos fosfato de los sustratos de las Cdks.

Se ha comprobado que en la especie *Saccharomyces cerevisiae* es la fosfatasa Cdc14, de especificidad dual, la principal responsable de dicha defosforilación y, por tanto, es esencial para la salida de la mitosis. Sin embargo, en mamíferos este papel ha sido asumido por la fosfatasa PP2A-B55 (Wurzenberger y Gerlich, 2011). No obstante, Cdc14 se encuentra altamente conservada y presenta ortólogos en el resto de eucariotas. En mamíferos, existen dos isoformas con distinta localización subcelular Cdc14a y Cdc14b (Mocciaro y Schiebel, 2010).

A pesar de que la familia Cdc14 se encuentra conservada en mamíferos, su papel en ellos no está claro. Aunque existen resultados contradictorios al respecto, en parte a la posible redundancia entre isoformas, parece que Cdc14a y Cdc14b no son esenciales para la salida de mitosis en mamíferos (Wurzenberger y Gerlich, 2011).

Con la finalidad de averiguar el papel fisiológico que desempeña la fosfatasa Cdc14 en mamíferos, en el laboratorio de acogida (Laboratorio de “División Celular y Cáncer”, del CNIO) se desarrollaron ratones *knockout* dobles para ambas isoformas (Cdc14a y Cdc14b). Los resultados obtenidos de estos ratones mostraron que estos presentaban dificultades en la diferenciación tanto neuronal como adipocítica. Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos de diferenciación *in vitro* a partir de células madre embrionarias (ESCs) doble *knockout* para Cdc14a y b (Cdc14abKO). Dichos análisis mostraron que estas ESCs Cdc14abKO eran incapaces de diferenciarse a neuronas o adipocitos, exponiendo la posibilidad de que Cdc14 esté implicada en mamíferos en la salida de la pluripotencia hacia la fase G0 y su posterior diferenciación (resultados no publicados).

3.2. Utf1: Undifferentiated transcription factor 1

3.2.1. ANTECEDENTES DE FUNCIÓN Y VÍAS DE DEGRADACIÓN

Para investigar los mecanismos moleculares a través de los cuales las fosfatasa Cdc14 podrían estar controlando la diferenciación de ESCs, se llevaron a cabo en el laboratorio de acogida análisis por espectrometría de masas de proteínas totales y fosfoproteínas en ESCs wt y Cdc14abKO a tiempo 0 y a día 3 del proceso de diferenciación. Este estudio permitió identificar las proteínas que se encontraban hiperfosforiladas y que, por tanto, son dianas potenciales de la fosfatasa Cdc14a o b. Entre estas potenciales dianas de Cdc14 se encontraron múltiples proteínas involucradas en la regulación epigenética de la cromatina, tales como: Utf1, Tet1, Tet2, Dnmt3L, etc (datos no publicados).

De entre estas, se prestó especial atención a la diana Utf1, ya que el número de residuos fosforilados era muy elevado, y muchos de ellos se encontraban contiguos a un residuo de prolina, siendo este motivo donde (pS/T-P) normalmente fosforilan las Cdks y otras quinasas relacionadas con la proliferación como ERK2.

Se conoce que Utf1, se localiza en el núcleo y se expresa en células embrionarias pluripotentes. Su expresión, que está regulada por Oct4/Sox2, disminuye tras la diferenciación y no está presente en células completamente diferenciadas (Jia et al., 2012). Debido a su restringida expresión, se le otorgó el nombre de “Factor de transcripción de células indiferenciadas1” (Raina et al., 2021).

Utf1 es crucial para que se realice una adecuada diferenciación de células pluripotentes y de las germinales primordiales, puesto que las células *knockdown* para Utf1 pueden autorrenovarse pero presentan una diferenciación defectuosa (Van den Boom et al., 2007; Kooistra et al., 2010).

Además, Utf1 está fuertemente unido a la cromatina y participa en la regulación transcripcional de múltiples genes (Jia et al., 2012). La mayor parte de los genes que regula Utf1 se caracterizan por tener promotores bivalentes, que son aquellos que tienen simultáneamente modificaciones epigenéticas activadoras (H3K4me3) y represoras (H3K27me3) (Nishimoto et al., 2013). Los genes con promotores bivalentes reclutan a la RNA-polimerasa II, pero esta permanece pausada, de forma no se transcriben pero están listos para empezar a expresarse rápidamente una vez que se inicie el estímulo de diferenciación apropiado (Kooistra et al., 2010). Utf1 está implicado en mantener este estado bivalente de la cromatina y, por tanto, resulta esencial para mantener la pluripotencia de las células madres y su posterior diferenciación (Bao et al., 2017).

En el laboratorio de acogida se ha observado que Utf1 puede ser directamente fosforilado por Cdk1 y ERK2 (datos no publicados). Además, existen evidencias de que esta fosforilación de Utf1 podría estar relacionado con su estabilidad, ya que tanto inhibidores de Cdk1 (roscovitina) como de la vía de ERK2 (trametinib) inducían la degradación de Utf1. Además, la sobreexpresión de Cdc14B, que defosforila a Utf1, disminuye la estabilidad de la misma. Por último, en las ESCs Cdc14abKO la expresión de Utf1 no disminuye al inducir la diferenciación (datos no publicados).

Actualmente, el mecanismo por el cual se degrada Utf1 no está definido, sin embargo, en uno de los experimentos del laboratorio de División Celular y Cáncer (CNIO) se observó un rescate parcial de Utf1 al someter a las células a un tratamiento con inhibidor del proteosoma (MG132) apuntando a esta vía de degradación como potencial responsable. No obstante, los resultados no son suficientes para efectuar una conclusión definitiva, debido a la parcialidad del rescate (resultados no publicados).

El sistema ubiquitino-proteosómico está implicado en numerosas funciones celulares y es la principal vía en el catabolismo proteico. En esta vía, las proteínas destinadas a la degradación por diferentes motivos, como un mal plegamiento, son marcadas con ubiquitina. La vía consta de las siguientes fases: en la primera la proteína se conjuga covalentemente a los residuos de ubiquitina, y la segunda, en la cual se efectúa la degradación de la proteína ubiquitinada por el complejo proteosoma. Estas dos fases se encuentran estrictamente reguladas (Wang y Le, 2019).

La ubiquitinación es un proceso postraduccional que resulta en la adición de moléculas de ubiquitina en una proteína. La ubiquitina es una proteína pequeña que se encuentra muy conservada y que termina con un motivo de diglicina (Van Wijk., 2019). La glicina C-terminal de la ubiquitina se une al grupo amino de la lisina perteneciente a la proteína mediante un enlace isopeptídico. Dicha reacción está mediada por enzimas ubiquitinantes: E1, E2 y E3. E1, enzima activadora de ubiquitina, mediante ATP genera un enlace tioéster entre E1 y la ubiquitina (Cuneo y Mittag, 2019). A continuación, E2 transfiere esta ubiquitina a la proteína diana con ayuda de E3. A su vez, E3 es el que reconoce de forma específica el sustrato y se une a él. Posteriormente, el proteosoma reconoce esta señal de ubiquitina, se une al sustrato que ha sido ubiquitinado, le elimina la ubiquitina y lo degrada en pequeños polipéptidos (Hanna et al., 2019).

Las ubiquitinas ligasas se dividen principalmente en: E3 ligasa con dominio HECT y E3 ligasa con dominio RING. Cullin-3 (CUL3) es una proteína de tipo Cul/E3 de tipo RING (Lydeard et al., 2013).

3.2.2. ESTRUCTURA Y POTENCIALES RESIDUOS IMPORTANTES EN SU DEGRADACIÓN

Utf1 es una proteína que consta de 339 aminoácidos, rica en prolina, la mayoría de sus aminoácidos son básicos y posee un elevado punto isoeléctrico. Posee un potencial dominio de unión al DNA (*leucine zipper*), pero los algoritmos predicen que la mayor parte de su estructura es desordenada (Figura 1A). La comparación entre la Utf1 humana y murina dio un porcentaje de similitud del 63% (Raina et al., 2021). Presenta numerosos motivos interesantes para poder llevar a cabo un análisis de estabilidad. Entre ellos, destaca la presencia de dos potenciales sitios de unión a SPOP y un sitio potencial de unión de SIAH (Figura 1A y B).

La proteína POZ de tipo moteado (SPOP) es un receptor de reconocimiento de sustrato del complejo Cullin-E3-ubiquitina ligasa, la cual está implicada en la ubiquitinación y degradación por la vía proteasomal de múltiples proteínas, incluyendo el factor de pluripotencia Nanog (Zhang et al., 2019; Marzahn et al., 2016). Varios estudios, han mostrado que SPOP desempeña un importante papel en la reparación del daño del ADN y su replicación (Maekawa y Higashiyama, 2020). Además, es esencial para que se exprese de forma adecuada el ARNm de ATR, BRCA2, ChK1, Rad51, que se son genes relacionados con la reparación del ADN (Hjorth-Jensen et al., 2018).

Por otro lado, la región de unión de SIAH resulta interesante debido a que SIAH es una E3 ubiquitina ligasa de dominio RING, y está implicada en la ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma de diferentes proteínas diana incluyendo POU2AF1, MYB y PLM (Scortegagna et al., 2014). Participa en procesos como la apoptosis, la supresión de tumores y la señalización RAS (Nadeau et al., 2007)

Además de estos motivos potencialmente importantes para controlar la estabilidad de la proteína, se prestó interés en sus 5 lisinas, por ser sitios potenciales de ubiquitinación, una de las cuales se encuentra dentro del motivo de unión a SIAH (Figura 1B). Por último, se prestó especial atención a los dos residuos de serina que flanquean el motivo de unión a SIAH, porque se detectaron defosforilados en experimentos de sobreexpresión de Cdc14, están conservados en humanos y se fosforilan *in vitro* por Cdk1 y ERK2.

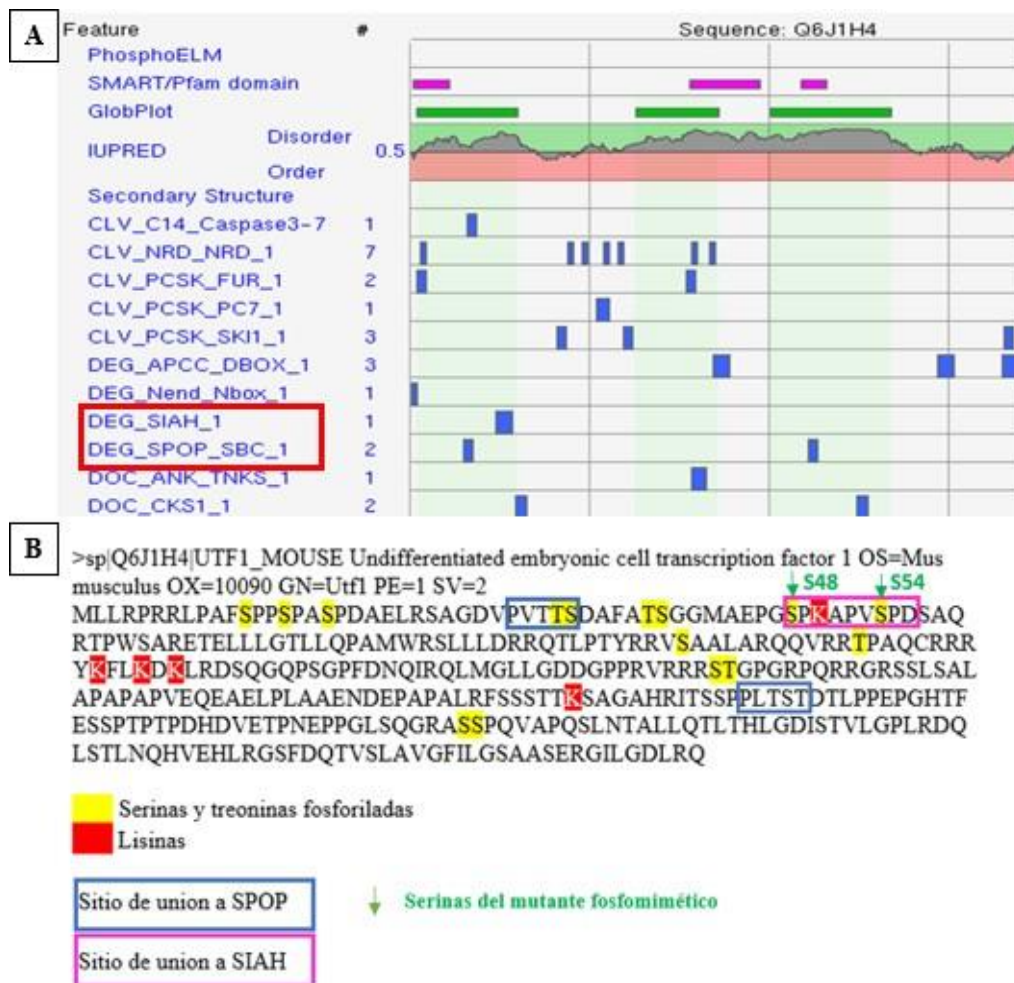


Figura 1. A. Análisis de estructura secundaria y de la presencia de motivos relevantes en la proteína Utf1 (ELM). B. Secuencia de aminoácidos de Utf1 con lisinas, serinas/treoninas fosforiladas y sitios de unión a SIAH y SPOP (Uniprot).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En un principio el proyecto de fin de grado estaba programado para que empezase en febrero y terminase en junio en el grupo de División Celular y Cáncer en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Sin embargo, debido al retraso presentado en la firma del convenio, el convenio marco fue creado desde cero, me incorporé a mediados de marzo por lo que algunos de los mutantes ya habían sido generados, pero pude participar en la transfección en las células y el posterior análisis de la degradación de dichos mutantes.

La hipótesis del proyecto es:

La introducción de mutaciones en regiones que sean importantes para la estabilidad de Utf1 afectará a su degradación inducida por los inhibidores de quinasa roscovitina y trametinib.

Por tanto, permitirá identificar que residuos controlan su degradación y qué proteínas de unión están implicadas en este proceso.

El objetivo principal del estudio es identificar qué residuos o regiones de la proteína del factor de transcripción indiferenciado 1 son importantes para regular su estabilidad. Para ello, se procederá a realizar los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de la degradación de Utf1 wt inducida por roscovitina (rosco) y trametinib (tram) en presencia de inhibidores de SPOP y de SIAH, con el fin de analizar si se rescata la degradación de Utf1 y, por tanto, averiguar si estas proteínas son necesarias para su desestabilización.
- Generación por mutagénesis dirigida de mutantes de Utf1 en los sitios de unión de SPOP, SIAH y SPOP+SIAH. También se hará un mutante fosfomimético (S→D) de las serinas S48 y S54.
- Transfección de los mutantes generados en células Hela para estudiar si se rescata la degradación de Utf1 inducida por los inhibidores de quinasas roscovitina y trametinib. También se transfectarán otros dos mutantes previamente generados: Utf13KR y Utf15KR, que tienen mutadas 3 y 5 lisinas respectivamente, con el fin de estudiar si esta degradación es dependiente de la ubiquitinación de Utf1.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

5.1.1 Mutagénesis dirigida

La generación de mutantes SPOP, SIAH, SPOP+SIAH y MIMIC, se llevó a cabo por mutagénesis dirigida utilizando el kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). Este procedimiento consiste en amplificar por PCR el plásmido que contiene el gen que se quiere mutar utilizando un par de *primers* complementarios que poseen la mutación en el sitio de interés. Posteriormente se degrada específicamente el DNA parental (sin la mutación) con la enzima *Dpn I*, de modo que solo queda el DNA recién sintetizado y con la mutación de interés.

Para el diseño de los *primers* se siguieron las instrucciones del kit, según las cuales:

- Los *primers* deben medir entre 25-45 bases.
- La mutación/es tiene que estar en el centro del *primer*, flanqueada por 10-15 nucleótidos a cada lado.
- La T_m tiene que ser superior a 78 °C calculada según la fórmula: $T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - (675/N)$, donde N no incluye las bases que serán insertadas o delecionadas.
- Los *primers* deben de tener un mínimo de un contenido de GC de un 40% y terminar en una o más bases de C o G.

Tanto la eliminación de los sitios de unión a SIAH y SPOP o el mutante MIMIC requerían de dos reacciones de mutagénesis secuenciales, ya que era necesario introducir varias mutaciones, por lo que se necesitaron 4 *primers* para cada uno (Tabla 1). Una vez conseguido mutar el primer sitio de cada mutante, se mutaba el segundo sitio sobre el *primer* producto de la mutación.

Para la reacción de PCR la concentración del plásmido debe ser de entre 5-50 ng/μl por lo que se prepararon diluciones, al igual que de los *primers* (Sigma-Aldrich) cuya concentración debía ser 125 ng/μl. Cada tubo de PCR debe contener: 38,5 μl de H₂O Braun, 5 μL de Buffer 10 x, 1 μL de dNTP mix, 2 μl de DNA (plásmido con Urf1 o control, 5-50 ng) y 1,25 μl de cada par de *primers* (125 ng). Justo antes de incluir los microtubos en el termociclador, se añade 1 μl de polimerasa *Pfu Utra* que permanece preservada en glicerol como el resto de enzimas a -20°C hasta el momento de su uso. El programa usado en el termociclador consiste en los siguientes pasos: 1 ciclo 95°C 30 segundos; 95°C 30 segundos, 55°C 1 min y 68°C 6 min durante 18 ciclos; y un ciclo 4°C tiempo infinito.

Una vez terminada la PCR, se añade 1µl de la enzima Dpn I, que realizará la digestión del DNA parental y se deja en el termociclador 1 hora a 37°C. Posteriormente, se debe seguir con la transformación.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -3')	µg	Tm	GC%	Len
utf_SIAMUT1 FW	GAACCCGGCTCGCACCAAGGCTCCCGTG	251,8	86,2	71,4	28
utf_SIAMUT1 RV	CACGGGAGCCTTGGTGCGAGCCGGGTTTC	235,3	86,2	71,4	28
utf_SIAMUT2 FW	CCAAGGCTCCCGTGCCCCGGACTCG	186,4	84,7	76	25
utf_SIAMUT2 RV	CGAGTCCGGGGCACGGGAGCCTTGG	175,2	84,7	76	25
utfmutspop1 FW	GGATGTCCCGGTGAACTACGCTGATGCCTTCGC	120,5	84,1	60,6	33
utfmutspop1 RV	GCGAAGGCATCAGCGTAGTTACCCGGGACATCC	152,9	84,1	60,6	33
utfmutspop2 FW	GCTCTCCTCCTTCGAGCAGCCGACACTCTGC	168,8	83	63,6	33
utfmutspop2 RV	GCAGAGTGTCCGGTGTCTCGAAGAGGAGGACAGC	168,6	83	63,6	33
UTF_MIMIC1 FW	GGCTGAACCCGGCGACCCCAAGGCTCCCGTG	165,1	89,8	74,1	31
UTF_MIMIC1 RV	CACGGGAGCCTTGGGGTTCGCCGGGTTTCAGCC	142,3	89,8	74,1	31
UTF_MIMIC2 FW	CAAGGCTCCCGTGGACCCGGACTCGGC	131,6	85,4	74	27
UTF_MIMIC2 RV	GCCGAGTCCGGGTCACCGGGAGCCTTG	140,2	85,4	74	27

Tabla 1: Par de primers diseñados para cada mutante. *QuickChange Primer Desing Program* (Agilent)

5.1.2. Transformación

Tanto los plásmidos del kit de mutagénesis dirigida como el empleado como muestra (Anexo 1) contenían un gen de resistencia a ampicilina. Se trabaja con mechero Bunsen encendido para crear condiciones de esterilidad y con puntas estériles. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se añaden 30 µl de bacterias competentes Stellar (Clontech, previamente descongeladas en hielo) y 2 µl del DNA amplificado anteriormente en el termociclador. La mezcla de ambos se deja en hielo durante 30 minutos y tras este tiempo, se sumerge 45 segundos a 42°C, creando el choque térmico que permite la permeabilización de la membrana bacteriana. Se vuelve a incubar 5 minutos en hielo y se añade 500 µl del medio de las bacterias Stellar en cada eppendorf. Se incuba nuevamente a 37°C en agitación en el termobloque. Una vez transcurridos 15 minutos, se siembra en una placa de Agar + Ampicilina (Condalab) y se deja incubando *overnight* a 37°C. Al día siguiente se comprueba la presencia de que haya colonias resistentes en la placa y, en caso afirmativo se resiembran para llevar a cabo una amplificación del DNA plasmídico mediante la técnica de miniprep.

5.1.3. Miniprep

Al menos 4 colonias de cada reacción de mutagénesis se siembran en tubos con 5 ml de LB con 5µl de ampicilina (1000 ng/µl). Cada colonia se siembra en un único tubo evitando picar posibles colonias satélites. Los tubos se dejan incubando *overnight* a 37°C en agitación.

Al día siguiente se lleva cabo la purificación del DNA plasmídico mediante el QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez terminado el proceso, se cuantifica el DNA con un *Nanodrop* y se preparan tubos con un volumen final de 9µl a una concentración de 200 ng/µl. Por último, se añade un primer específico para su secuenciación (Tabla 2) y se lleva a la Unidad de Genómica del CNIO. Los resultados de la secuenciación nos informan de cuáles de los clones seleccionados contienen la mutación deseada. A continuación, se selecciona uno de los clones que contenga la mutación deseada y se vuelve a llevar a cabo otra reacción de mutagénesis sobre él o, si ya se trata de la versión final, se transforma en bacterias competentes para su amplificación.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -3')
Utf1seq1	CTCCGCCGTCGCCAGCTAC

Tabla 2: *Primer* específico para la secuenciación de los mutantes propuestos (Agilent).

5.2.3. Midiprep

Con el fin de amplificar el plásmido que contiene el gen con las mutaciones deseadas, las bacterias transformadas con el plásmido se siembran en un cultivo con 200ml de LB en presencia de ampicilina y se incuban a 37° *overnight* en agitación. Posteriormente, se purifica el DNA plasmídico mediante la técnica de midiprep utilizando el kit Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel). Esta técnica nos permite obtener la cantidad necesaria de plásmido para su posterior transfección en células HeLa.

5.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

5.2.1. Cultivo de células Hela.

Las células elegidas para el proyecto fueron las HeLa debido a su buena eficiencia en la transfección y su fácil mantenimiento en el laboratorio. No obstante, Utf1 solo se expresa en células madre embrionarias humanas y murinas, por lo que es necesario transfectar las células HeLa con Utf1 para que puedan expresar la proteína exógenamente.

El mantenimiento de las células HeLa se lleva a cabo en DMEM High Glucose (Sigma) suplementado con FBS al 10% (Sigma-Aldrich), Penicilina/Streptomycin (Gibco) y Glutamina (PAN-Biotech). Las células HeLa se cultivan a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Para realizar los pases, las células se lavan con PBS (Sigma) y se despegan de la placa con tripsina (Sigma, x1), que posteriormente es inactivada en medio completo.

5.2.2. Transfección

Las transfecciones se realizaron en células HeLa mediante el método de lipofección. Un día antes de la transfección, se efectúa un pase de las células en placas de seis pocillos para obtener la confluencia adecuada y optimizar el proceso. La preparación consiste en elaborar para cada pocillo: un primer tubo eppendorf que contenga 100 μ l de medio Opti-MEM (previamente calentado a 37°C), 1,5 μ g del plásmido que se desea introducir (pMX-Utf1wt, pMX-Utf1mutSPOP, pMX-Utf1mutSIAH, pMX-Utf1mutSPOP+SIAH, pMX-Utf1mutMIMIC) y 0,75 μ g del pEGFP-C1, que servirá como control de expresión (Clontech). El segundo tubo de eppendorf debe contener en 100 μ l de medio opti-MEM (37°C) y 3 μ l de lipofectamina x2000 (Invitrogen). La lipofectamina está compuesta por subunidades lipídicas pueden unirse al DNA y fusionarse con la membrana plasmática de las células.

Seguidamente se mezcla el contenido de los dos tubos y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente para que la lipofectamina pueda incorporar el DNA. Tras este paso, se añade opti-MEM al tubo de forma que el volumen final de la mezcla sea de 1ml por cada pocillo. Se aspira el medio de cada pocillo de las células cultivadas y se añade el de la mezcla de transfección. Las células se vuelven a incubar a 37°C durante 6 horas. Finalmente, el medio de transfección se retira y se añaden 2 ml de medio de mantenimiento de células HeLa por cada pocillo y se incuba *overnight*.

5.2.3. Tratamiento con inhibidores

Algunas células se sometieron a un tratamiento con inhibidores de quinasa, pasadas las 6 horas de la transfección (Figura 2). Los inhibidores escogidos fueron roscovitina (50 μ M) y trametinib (1 μ M). Una vez pasadas las seis horas, se añade dos mililitros de medio por pocillo con la concentración de inhibidor necesaria y se deja incubar durante toda la noche.

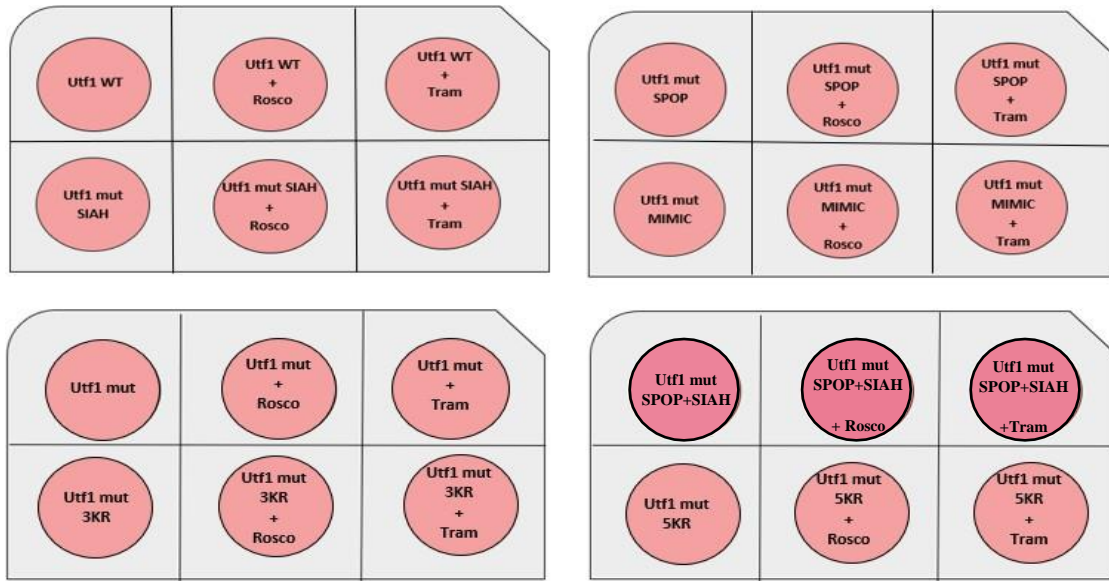


Figura 2: Esquema general de placas P6 en la transfección de células HeLa

5.3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

5.3.1. BCA

Las células transfectadas se analizaron mediante Western-Blot. Para ello, previamente es necesario realizar el método BCA con el fin de cuantificar la cantidad de proteína y cargar la misma cantidad de cada condición en el gel de poliacrilamida. Esta técnica presenta como base la reacción colorimétrica producida al contactar ácido bicinonónico (BCA) con las proteínas de la muestra.

Para ello, pasada la incubación *overnight* se aspiró el medio y se realizó un lavado con PBS que fue aspirado también. Para levantar las células y recogerlas se añadió 1ml de PBS-EDTA (x1, Sigma) en cada pocillo de las placas P6 y se incubó a 37°C durante unos minutos. El EDTA es un quelante de calcio, del cual dependen las proteínas de anclaje de las células, por lo que provoca que las células se levanten de la placa. Posteriormente, se recoge cada pocillo en un eppendorf de 2 ml para centrifugarse a 300xg durante 5 min y se aspira el sobrenadante.

A continuación, se lleva a cabo la lisis de las células; a partir de este momento es necesario trabajar en hielo para evitar la actuación de las proteasas. El pellet se resuspende en el buffer de lisis High Salt RIPA (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, 500 mM NaCl, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%), para poder obtener las proteínas que se encuentran unidas a la cromatina; a este tampón se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa justo en el momento antes de la lisis. Se dejó 10 minutos en

hielo y seguidamente, se centrifugó 10 min a 16.000xg a 4 °C. Terminada la centrifugación, se quita el pellet ya que las proteínas se encuentran en el sobrenadante y se realiza una dilución 1:2 (puede variar) en las muestras puesto que se estiman que están más concentradas que la curva patrón que se realizará.

Paralelamente, se prepara una dilución seriada 1:2 de albúmina de suero bovino (BSA) con una concentración inicial de 2mg/ml en agua Braun. Tanto la serie de BSA como las diluciones de las muestras se depositan en una placa de BCA de fondo plano (5ul por pocillo) y se les añaden 200µl del kit BCA Protein Assay (Thermo Fisher), que consta de un reactivo A y un B que deben añadirse en proporción 50:1 respectivamente. Una vez añadido, los pocillos presentan una coloración verde debido al reactivo. Se incuba la placa 15 minutos a 37°C, en los cuales el color vira hacia el morado en los pocillos donde hay más cantidad de proteína y se mide la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro mediante el programa Gen5. Una vez obtenidos los valores de absorbancia se lleva a cabo la recta patrón (Anexo 3), que relaciona la concentración de proteína BSA con la absorbancia. La ecuación de la recta patrón permite extrapolar los valores de absorbancia de las muestras de interés y estimar su concentración de proteína.

Por último, se calcula el volumen de muestra que hay que cargar para que haya una concentración de proteína de 1 µg/µl en un volumen final de 30 µl, y el resto se completa con H₂O Braun.

5.3.2. Western-Blot

Se prepara un eppendorf con la cantidad de muestra y H₂O Braun resultantes de los cálculos tras realizar el BCA. También deben añadirse 6 µl del buffer de carga x6 (350 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% glicerol, 10% SDS, 0.6 M DTT, 0.1% azul de bromofenol) y se hierven a 95 °C 5min. Este paso es indispensable ya que permite la desnaturalización de las proteínas y que estas migren en función de su peso molecular, ya que el SDS se une proporcionando carga negativa a la proteína, pero manteniendo una relación carga/masa constante. Posteriormente, se cargan 10 µl del marcador peso molecular (Genetics BlueStar, prestained protein marker) y los 36 µl del volumen preparado en los pocillos correspondientes del gel de poliacrilamida (Bio-Rad), que se coloca en la cubeta cubierta con buffer de electroforesis 1x; al conectarlo a una fuente de alimentación el campo eléctrico de 110V, se permite la movilidad electroforética de las proteínas que se dirigen hacia el polo positivo. Dado que el gel no es una superficie adecuada para realizar el marcaje de proteínas, es crucial llevar a cabo la transferencia semi-seca de proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad).

Dicha transferencia sigue el mismo principio que la electroforesis, las proteínas cargadas negativamente son sometidas a un campo eléctrico en el transfer (Bio-Rad) y migran hacia el polo positivo. Por ello, la membrana de nitrocelulosa se intercala entre el gel y el electrodo positivo.

Una vez las proteínas han sido transferidas, la membrana debe de ser bloqueada para evitar uniones inespecíficas. El bloqueo se realiza con 5% de BSA en TBS-T (TBS con 0.1% Tween-20) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Después, se incuba la membrana *overnight* a 4 °C y en agitación con el anticuerpo primario específico diluido 1:1000 en TBS-T: anti-Utf1 (*rabbit*, Abcam), anti-actina (*mouse*, Sigma) y anti-GFP (*mouse*, Roche).

Al día siguiente, se realiza un lavado de 10 minutos de la membrana con TBS-T, en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se incuba la membrana 1 hora con el anticuerpo secundario diluido 1:5000 en TBS-T. Estos anticuerpos están conjugados con peroxidasa y son: goat anti-mouse (Dako) para los anticuerpos primarios de actina y GFP; y goat anti-rabbit (Dako) para el anticuerpo primario de Utf1. De esta forma, los anticuerpos secundarios se unen a los primarios de forma específica. Tras la incubación se realiza un lavado rápido y tres lavados de 5 minutos con TBS-T y se revelan usando un kit de quimioluminiscencia (Western Lightning Plus-ECL; Perkin Elmer). El ECL es un sustrato que reacciona con la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, de forma que produce una señal lumínica que captura el sistema de imagen molecular, y la imagen es proporcionada gracias al programa Imagenlab.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis del papel de SPOP y SIAH en la degradación de Utf1 mediante el uso de inhibidores químicos

Para llevar a cabo una primera aproximación del papel de SPOP y SIAH en la estabilidad de Utf1 mientras se generaban los mutantes, se analizó si la inhibición química de SPOP (SPOP-IN-6b, MedChem) y la inhibición de SIAH (Menadione, Sigma) revertía la degradación de Utf1. Como las células HeLa no expresan Utf1 de forma endógena, fueron transfectadas con Utf1 wt. En base a datos previos del laboratorio, para inducir su degradación se trataron las células con inhibidores de quinasas: trametinib (inhibidor de la ruta de ERK2) y roscovitina (inhibidor inespecífico de varias Cdk's entre ellas: Cdk1, Cdk2 y Cdk5). Las células HeLa fueron co-transfectadas con GFP como control de transcripción, que permite identificar si los inhibidores de quinasas están actuando específicamente sobre la proteína de interés Utf1 y no inhiben la transcripción o traducción general. También, se toma como control endógeno de carga la β -actina, para comprobar que todos los pocillos tengan la misma cantidad de proteína total y que las diferencias en la cantidad de Utf1 no se deben a diferencias en la carga.

Como se puede observar, el inhibidor de SPOP no rescató la degradación de Utf1 inducida por trametinib o roscovitina (Figura 3). Sin embargo, como no teníamos forma de comprobar que la inhibición de SPOP ha funcionado correctamente, no podemos concluir definitivamente que SPOP no esté implicado en la degradación de Utf1. Además, la sola presencia del inhibidor afecta a la expresión de tanto Utf1 como de GFP, lo que sugiere que el inhibidor es inespecífico y tiene otros efectos secundarios que afectan a otras funciones de la célula. Respecto al inhibidor de SIAH, resultó tóxico y resultó en la muerte del cultivo celular, probablemente también debido a su inespecificidad.

Por tanto, los experimentos con los inhibidores químicos no permitieron extraer ninguna observación concluyente, así que se pasó al análisis de la estabilidad de Utf1 por mutagénesis de sus potenciales sitios de unión a SPOP y/o SIAH.

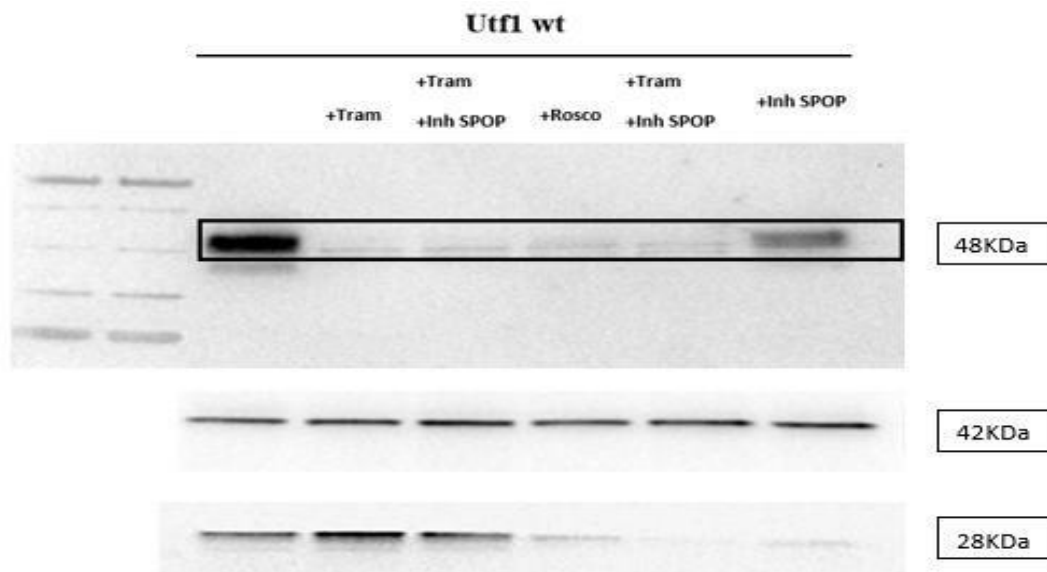


Figura 3: Análisis de la estabilidad de la proteína Utfl sometida al tratamiento con inhibidores de quinasa e inhibidores de SPOP y SIAH. Células Hela co-transfectadas con Utfl wt y GFP, y analizadas por western blot.

6.2. Generación de mutantes de Utfl

La generación de mutantes se efectuó por mutagénesis dirigida. Primeramente, se estudiaron las secuencias que se deseaban mutar dentro de Utfl. A continuación, se diseñaron los dos pares de *primers* necesarios para cada mutante para realizar dicha mutagénesis (Tabla 1).

Para eliminar los dos sitios de unión a SPOP se utilizaron dos pares de *primers* (un par para cada sitio) en dos mutagénesis consecutivas. Cada par de *primers* introducía una delección que cambiaba la pauta de lectura y, por tanto, la secuencia de aminoácidos en los motivos de interés, y una inserción, que permitía recuperar la pauta de lectura tras el sitio de unión a SPOP. Los mutantes obtenidos fueron secuenciados y el resultado comparado con la secuencia wt mediante la herramienta *Blast*. Tal como se observa en el alineamiento, se obtuvieron las mutaciones esperadas en los dos sitios de unión a SPOP mostrando el alineamiento de nucleótidos (Figura 4A).

Además, las secuencias de nucleótidos fueron traducidas con la herramienta *ExPASy Translate* a una secuencia de aminoácidos (Figura 4B) que permitió ver los cambios y que la pauta de lectura era correctamente recuperada tras las mutaciones. Como se puede apreciar, en el primer sitio de unión a SPOP se ha cambiado la secuencia PVTTS por la secuencia PVNYA, perdiéndose una serina/treonina fosforilada; y en el segundo sitio se cambia la secuencia PLTST por la secuencia PLRAA, perdiéndose una serina y dos treoninas.

A

```

Query 1      CGTCGCCAGCTAGCCCCGACGCTGAGCTGCGGTCGGCCGGGATGTCCCAGTGAACCTACG 60
Sbjct 59      CGTCGCCAGCTAGCCCCGACGCTGAGCTGCGGTCGGCCGGGATGTCCCAGTGA-CTACG 117
Query 61      -CTGATGCCTTCGCTACTTCGGGCGGGATGGCTGAACCCGGCTCGCCCAAGGCTCCCGTG 119
Sbjct 118      TCTGATGCCTTCGCTACTTCGGGCGGGATGGCTGAACCCGGCTCGCCCAAGGCTCCCGTG 177
Query 120     TCCCCGGACTCGGCGCAGCGCACGCCCTGGAGTGCCTCGAGAGACGGAGCTACTTCTGGGC 179
Sbjct 178     TCCCCGGACTCGGCGCAGCGCACGCCCTGGAGTGCCTCGAGAGACGGAGCTACTTCTGGGC 237
Query 180     ACGCTGCTGCAGCCGGCCATGTGGCGCTCACTACTGCTGGACCGCAGGCAGACTCTGCCT 239
Sbjct 238     ACGCTGCTGCAGCCGGCCATGTGGCGCTCACTACTGCTGGACCGCAGGCAGACTCTGCCT 297
Query 240     ACTTACCGCCGCGTGTCCGCGCACTGGCCCGTCAGCAAGTTCGGCGCACGCCCGCTCAG 299
Sbjct 298     ACTTACCGCCGCGTGTCCGCGCACTGGCCCGTCAGCAAGTTCGGCGCACGCCCGCTCAG 357
Query 300     TGCCGCGCTCGCTACAAGTTCTCAAGGACAAACTCCGAGACTCCAGGCCAGCCGCTCC 359
Sbjct 358     TGCCGCGCTCGCTACAAGTTCTCAAGGACAAACTCCGAGACTCCAGGCCAGCCGCTCC 417
Query 360     GGACCCTTCGATAACCAGATCCGCCAATCATGGGGCTATTGGGGGACGATGGGGCGCCG 419
Sbjct 418     GGACCCTTCGATAACCAGATCCGCCAATCATGGGGCTATTGGGGGACGATGGGGCGCCG 477
Query 420     AGGGTTCGCCCGCCGCTCTACTGGCCCTGGACGTCCTCCAGCGCCGCGCCGCTCGTCCCTC 479
Sbjct 478     AGGGTTCGCCCGCCGCTCTACTGGCCCTGGACGTCCTCCAGCGCCGCGCCGCTCGTCCCTC 537
Query 480     TCCGCGTTAGCACCCGCACCTGCACCGGTGGAGCAAGAGGCCGAGCTGCCGCTGGCTGCG 539
Sbjct 538     TCCGCGTTAGCACCCGCACCTGCACCGGTGGAGCAAGAGGCCGAGCTGCCGCTGGCTGCG 597
Query 540     GAAATGACGAACCTGCCCTGCGCTCAGATTCAGTTCTTCCACGACGAAGTCTGCAGGT 599
Sbjct 598     GAAATGACGAACCTGCCCTGCGCTCAGATTCAGTTCTTCCACGACGAAGTCTGCAGGT 657
Query 600     GCCCACCGCATTACCAGCTCTCCTCCTTT-CGAGCAGCCGACACTCTGCCTCCTGAGCC 658
Sbjct 658     GCCCACCGCATTACCAGCTCTCCTCCTTTACGAGCA-CGACACTCTGCCTCCTGAGCC 716
Query 659     GGGCCATACCTTCGAATCCTCCCGACGCCAACCCCGACACGACGTTGGAGACCCCGAA 718
Sbjct 717     GGGCCATACCTTCGAATCCTCCCGACGCCAACCCCGACACGACGTTGGAGACCCCGAA 776

```

B

```

MLLRPRRLPAFSPSPASPDAELRSAGDV FVTTS DAFATSGGMAEPGSPKAPVSPDSAQ
RTPWSARETELLLGTLLQPAMWRSLLDDRQTLPTYRRVSAALARQQVRRIPAQCRRR|
YKFLKDKLRDSQGQPSGPFQDNQIRQLMGLLDGPPRVRRRSTIGPGRPQRRGRSSLSAL
APAPAPVEQEAELPLAAENDEPAPALRFSSSTTKSAGAHRITSSP PLTST DTLPEPGHTF
ESSPTPTPDHDVETPNEPPLSQGRASSPQVAPQSLNTALLQTLTHLGDISTVLGPLRDQ
LSTLNQHVEHLRGSFDQTVSLAVGFILGSAASERGI LGDLRQ

```

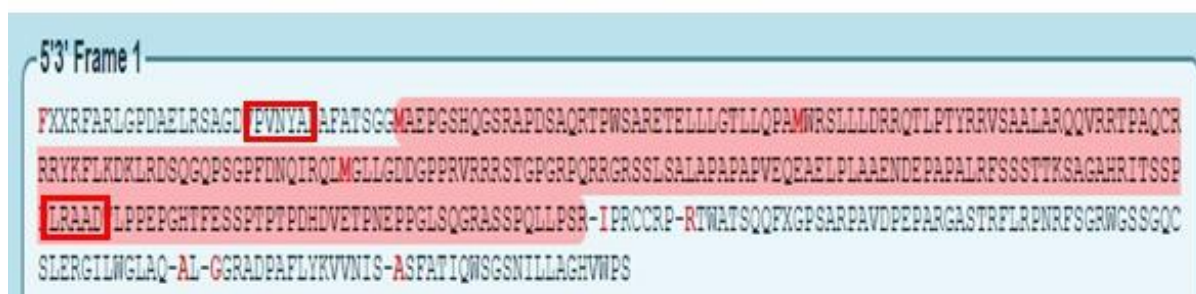


Figura 4. A. Comparación de las secuencias de nucleótidos de Utf1wt y Utf1mutSPOP. En verde están recuadradas las mutaciones deseadas. B. Comparación de secuencias traducidas de Utf1 wt y Utf1mutSPOP (*Expassy*). En rojo están recuadrados los sitios de unión a SPOP y el resultado de su mutación.

Para eliminar el sitio de unión a SIAH se siguió la misma estrategia de introducir una delección y posteriormente recuperar la pauta de lectura con una inserción. Para ello hicieron falta dos pares de *primers* y dos mutagénesis consecutivas, ya que, aunque se trataba de un sitio único, las dos mutaciones necesarias estaban demasiado separadas entre sí para utilizar un *primer* único. Como se observa en el alineamiento de secuencias de nucleótidos (Figura 5A) y en la secuencia de

aminoácidos (Figura 5B), se obtuvieron clones con las mutaciones esperadas. En este mutante se ha cambiado la secuencia de unión a SIAH SPKAPVSPD por la secuencia SHQGSRAPD, con la consiguiente pérdida de una serina fosforilada y de una lisina potencialmente modificable por ubiquitina.

A	Query	2	CGCATTTTCT - CGGCGTCG - CAGCTAGCCCCGACGCTGAGCTGCGGTTCGGCCGGGGATGT	59
	Sbjct	45	CGCTTTTCTCCGCCGTCGCCAGCTAGCCCCGACGCTGAGCTGCGGTTCGGCCGGGGATGT	104
	Query	60	CCCGGTGACTACGTCTGATGCC TTCGCTACTTCGGGCGGGATGGCTGAACCCGGCTCGCA	119
	Sbjct	105	CCCGGTGACTACGTCTGATGCC TTCGCTACTTCGGGCGGGATGGCTGAACCCGGCTCGC-	163
	Query	120	CCAAGGCTCCCGTGT - CCCC GGACTCGGCGCAGCGCACGCCCTGGAGTGCTCGAGAGACGG	178
	Sbjct	164	CCAAGGCTCCCGTGT - CCCC GGACTCGGCGCAGCGCACGCCCTGGAGTGCTCGAGAGACGG	223
	Query	179	AGCTACTTCTGGGCACGCTGCTGCAGCCGGCCATGTGGCGCTCACTACTGCTGGACCGCA	238
	Sbjct	224	AGCTACTTCTGGGCACGCTGCTGCAGCCGGCCATGTGGCGCTCACTACTGCTGGACCGCA	283
	Query	239	GGCAGACTCTGCCTACTTACC GCCCGCTGTCCGCCGCACTGGCCCGTCAGCAAGTTCGGC	298
	Sbjct	284	GGCAGACTCTGCCTACTTACC GCCCGCTGTCCGCCGCACTGGCCCGTCAGCAAGTTCGGC	343
	Query	299	GCACGCCCGCTCAGTGCCGCCGTCGCTACAAGTTCCTCAAGGACAAACTCCGAGACTCCC	358
	Sbjct	344	GCACGCCCGCTCAGTGCCGCCGTCGCTACAAGTTCCTCAAGGACAAACTCCGAGACTCCC	403
	Query	359	AGGGCCAGCCGTCCGGACCCTTCGATAACCAGATCCGCCAACTCATGGGGTATTGGGGG	418
	Sbjct	404	AGGGCCAGCCGTCCGGACCCTTCGATAACCAGATCCGCCAACTCATGGGGTATTGGGGG	463
	Query	419	ACGATGGGCGCCGAGGGTTCGCCGCCGCTCTACTGGCCCTGGACGTCCCAGCGCCGCG	478
	Sbjct	464	ACGATGGGCGCCGAGGGTTCGCCGCCGCTCTACTGGCCCTGGACGTCCCAGCGCCGCG	523
	Query	479	GCCGCTCGTCCCTCTCCGCGTTAGCACCCGCACCTGCACCGGTGGAGCAAGAGGCCGAGC	538
	B	Sbjct	524	GCCGCTCGTCCCTCTCCGCGTTAGCACCCGCACCTGCACCGGTGGAGCAAGAGGCCGAGC

MLLRPRRLPAFSPSPASPDAELRSAGDVPVTTSDAFATSGGMAEPC**SPKAPVSPD**SAQ
RTPWSARETELLGTLQAMWRSLLDRRQTLPTYRRVSAALARQQVRRTPAQCRRR
YKFLKDKLRDSQGQPSGPFNDQIRQLMGLLGDDGPPRVRRRSTGPRPQRRGRSSLSAL
APAPAPVEQAEPLAAENDEPAPALRFSSSTTKSAGAHRITSSPPLTSTDTLPPEPGHTF
ESSPTPTPDHDVETPNEPPGLSQGRASSPQVAPQSLNTALLQTLTHLGDISTVLGPLRDQ
LSTLNQHVEHLRGSFDQTVSLAVGFILGSAASERGILGDLRQ

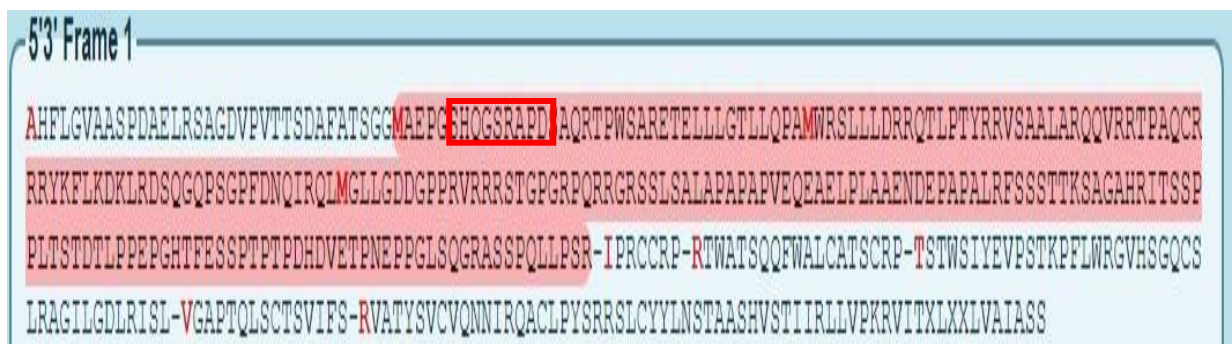


Figura 5. A. Comparación de las secuencias de nucleótidos de Utf1 wt y Utf1mutSIAH. En verde están recuadradas las mutaciones deseadas. B. Comparación de secuencias traducidas de Utf1 wt y Utf1mutSIAH (*Expasy*). En rojo está recuadrado el sitio de unión a SIAH y el resultado de su mutación.

Además, se elaboró un mutante con los dos sitios de unión a SPOP y el sitio de unión a SIAH mutados mediante la mutagénesis dirigida del sitio de SIAH sobre el mutante Utf1mutSPOP. Como resultado, además de eliminar los sitios de unión a SPOP y SIAH, se han perdido de un total de 4 treoninas y 2 serinas potencialmente fosforilables y una lisina potencialmente ubiquitinable (Figura 6B).

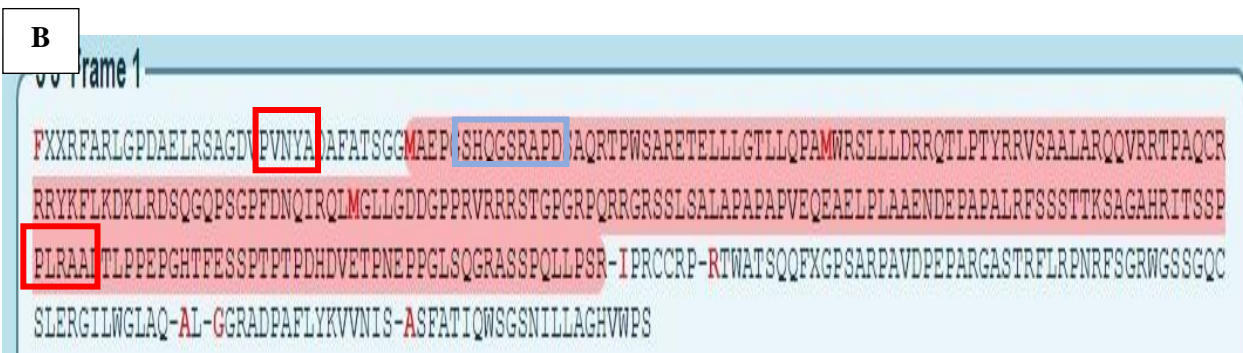
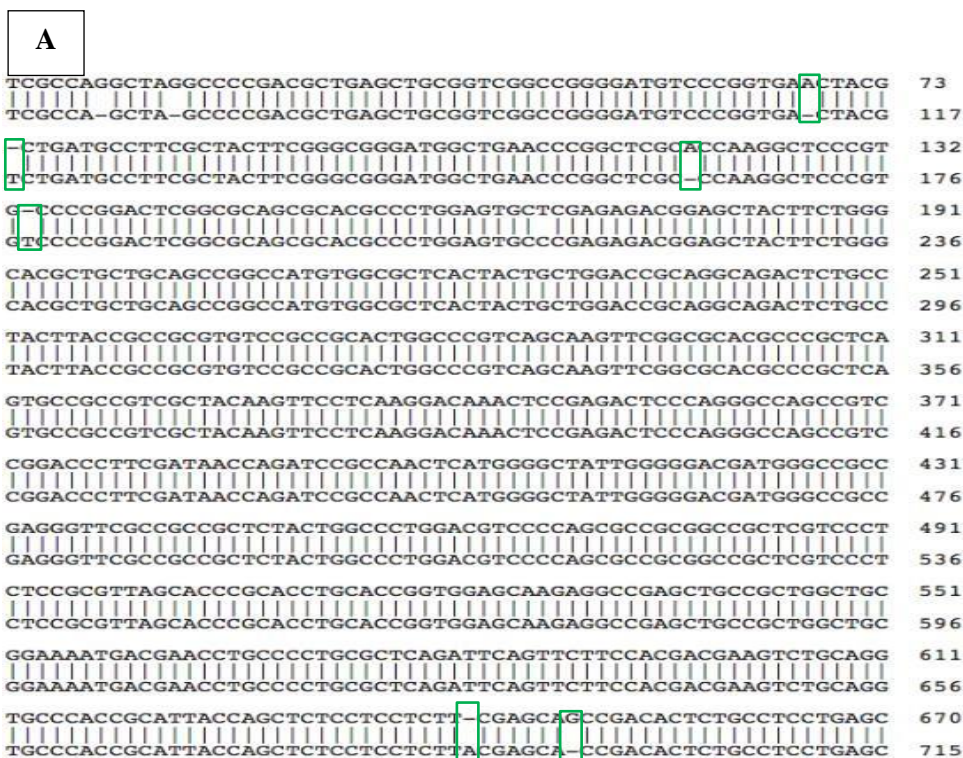


Figura 6. A. Comparación de las secuencias de nucleótidos de Utf1wt y Utf1mutSPOP+SIAH. En verde recuadradas las mutaciones deseadas B. Secuencia traducida de Utf1mutSPOP+SIAH (Expassy). En rojo están recuadrados los resultados de la mutación de los sitios de unión a SPOP y en azul de SIAH.

Por último, se generó un mutante fosfomimético de las serinas 48 y 54, sustituyéndolas por ácidos aspárticos. Al ser aminoácidos cargados negativamente mimetizan la fosforilación de serinas, que permanecerán de esta forma “pseudofosforilada” incluso en presencia de inhibidores de quinasas. Para ello se utilizaron dos pares de *primers* y dos mutagénesis consecutivas que introdujeron 3 y

2 sustituciones de nucleótidos respectivamente (Figura 7A). Como resultado de sustituyeron las serinas 48 y 54 por aspárticos (Figura 7B)

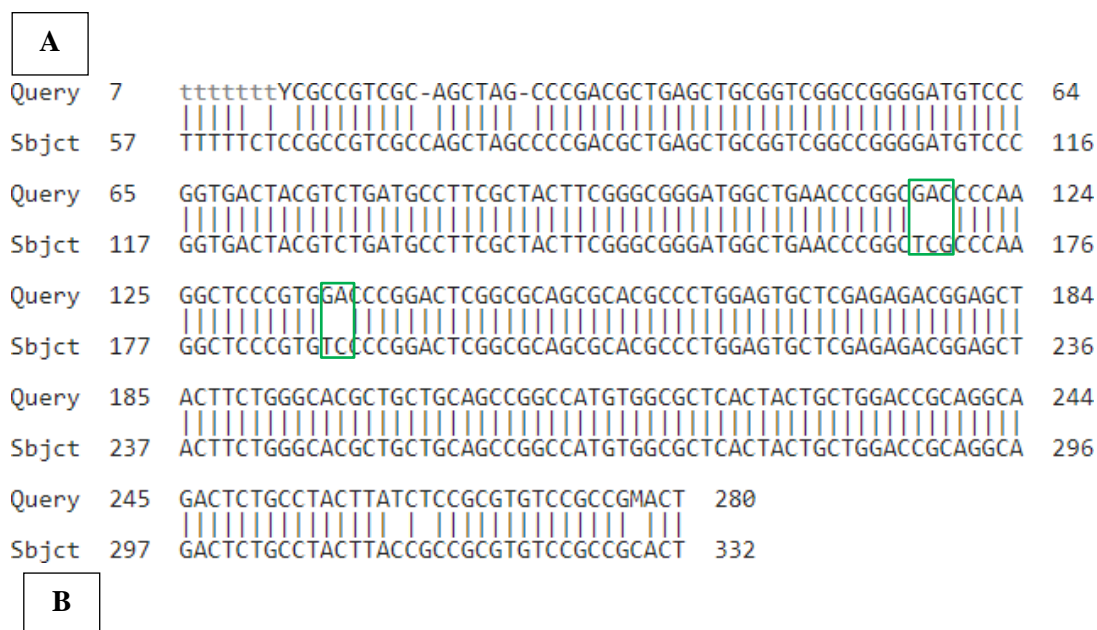


Figura 7A: Comparación de secuencias de Utf1 wt y Utf1mutMIMIC (NCBI). Se presentan las mutaciones deseadas recuadradas en verde B. Secuencia traducida de Utf1mutMIMIC (*Expasy*). En rojo recuadrados los resultados de la mutación.

6.3 Análisis de la estabilidad de los mutantes de Utf1

Para analizar la estabilidad de los mutantes generados respecto a Utf1 wt se transfectaron en células HeLa. Para inducir su degradación se trataron las células con los inhibidores de quinasas trametinib (inhibidor de la ruta de ERK2) y roscovitina (inhibidor inespecífico de varias Cdk5) entre ellas: Cdk1, Cdk2 y Cdk5).

Igual que antes, las células HeLa fueron co-transfectadas con GFP como control de transcripción, y se usa β -actina como control de carga (Figura 8).

Para estudiar si la ubiquitinación tiene un papel importante en la degradación de Utf1, se transfectaron los mutantes previamente generados.

Utf13KR y Utf15KR, en los que se han eliminado 3 y 5 lisinas de la proteína respectivamente. Como se puede observar, tanto el mutante Utf13KR y como el Utf15KR rescatan parcialmente la degradación inducida por trametinib (Figura 8), lo que sugiere que esta degradación está mediada

por ubiquitinación. El rescate es además mayor en el caso del mutante 5KR. El rescate en las muestras tratadas con roscovitina es mucho menos evidente, pero también se observa que en estas condiciones ha habido una disminución importante en la cantidad de GFP. Esto parece indicar que roscovitina ha afectado a la transcripción y/o traducción general de la célula, probablemente como consecuencia de la parada en mitad del ciclo celular al inhibir Cdk1; por tanto, el descenso en los niveles de Utf1 que se ve corresponde en gran medida a la disminución de su síntesis y no solo a su degradación, por lo que su rescate al bloquear su ubiquitinación es mínimo. Para evitar este problema, en los experimentos posteriores con los demás mutantes se utilizaron concentraciones menores de roscovitina (30uM).

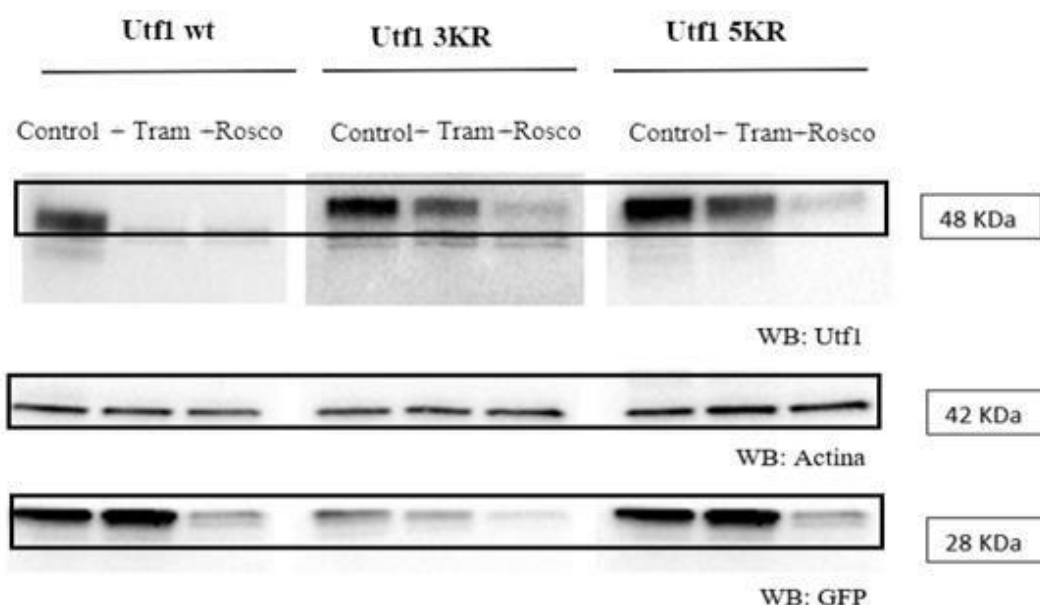


Figura 8. Análisis de la estabilidad de Utf1 wt y los mutantes Utf1 3KR y 5KR en presencia de los inhibidores roscovitina y trametinib. Las células HeLa fueron co-transfectadas con Utf1 y GFP y tratadas con los inhibidores para inducir su degradación. Los niveles de Utf1, GFP y actina fueron analizados por western blot.

Para analizar el papel de las E3 ubiquitina ligasas SPOP y SIAH en la degradación de Utf1 se transfectaron Utf1 wt y los mutantes Utf1mutSPOP, Utf1mutSIAH y Utf1mutSPOP+SIAH en las células HeLa. Como se puede observar, todos los mutantes rescatan parcialmente la degradación de Utf1 inducida por roscovitina (Figura 9). El rescate es mayor en Utf1mutSIAH con respecto a Utf1mutSPOP. Además se puede observar que los niveles de proteína en el caso de los mutantes de SIAH son mayores en condiciones control (Figura 9), lo que sugiere que son más estables y se degradan menos en condiciones normales. Por otro lado, en ninguno de los casos se observa rescate en la degradación inducida por trametinib (Figura 9).

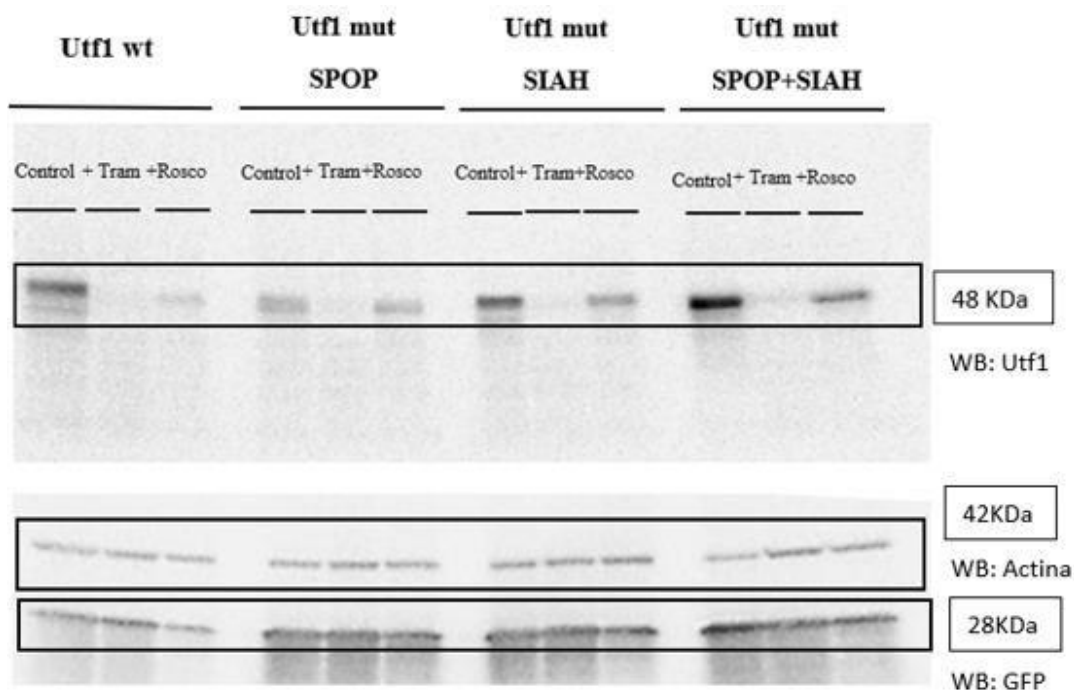


Figura 9: Análisis de estabilidad de Utf1 wt y los mutantes Utf1SPOP, Utf1SIAH Y Utf1SPOP+SIAH. Co- transfección con GFP y sometidos a inhibidores de quinasa. Análisis por western blot de Utf1, GFP y actina.

Por último, se repitió de nuevo el experimento con los mismos mutantes, incluyendo además el mutante Utf1mutMIMIC (Figura 10). Estos análisis confirmaron los resultados previamente obtenidos con los mutantes de SIAH. Además se puede observar que el mutante Utf1MIMIC también parece más estable en condiciones normales, aunque el rescate de la degradación inducida por inhibidores no queda claro.



Figura 10: Análisis de la estabilidad de Utf1 y de todos los mutantes generados expuestos al tratamiento con inhibidores de quinasa y control de carga de actina.

7. DISCUSIÓN

Utf1 es de gran interés debido a que es una potencial diana de Cdc14 y desarrolla un importante papel tanto en la diferenciación como en la proliferación de las ESCs, aunque su mecanismo de acción no está bien definido (Jia y cols, 2012).

Actualmente, no está definida la vía de degradación de Utf1. Los resultados de anteriores experimentos del laboratorio de acogida, en los que se trataba a las células transfectadas con inhibidores de bafilomicina (inhibidor de la autofagia) y MG132 (inhibidor de la degradación por vía del proteosoma) señalaban a que la principal vía de degradación sería vía proteosoma (resultados no publicados). Sin embargo, se trataba de un rescate parcial y no era posible concluir la vía de degradación con los resultados presentados.

Los resultados de los experimentos presentados en este trabajo con los mutantes Utf1mut3KR y Utf1mut5KR apoyan la idea de que la degradación de Utf1 es dependiente de ubiquitinación, debido a que la eliminación de las lisinas rescata la degradación de la proteína de interés. No obstante, con los datos que tenemos hasta ahora no se puede descartar que esto pueda ser debido también a otros *ubiquitin-like modifiers* como SUMO o Nedd8.

A pesar de que el análisis del papel que ejercía en la degradación SPOP y SIAH no fue concluyente mediante la utilización de inhibidores químicos, debido a su inespecificidad, sí se obtuvieron resultados representativos en el análisis de sus mutantes. En dichos resultados, se observa un rescate de la degradación de Utf1 de los mutantes SPOP y SIAH cuando son sometidos al inhibidor roscovitina; además, el rescate es mayor cuando se elimina simultáneamente los sitios de SPOP y SIAH, indicando que ambas proteínas participan en la degradación de Utf1. En el caso de Utf1mutSPOP, el rescate que se observa es menor que con Utf1mutSIAH; esto podría deberse a que esta proteína desempeña un papel más secundario en la degradación de Utf1, pero también podría haber influido de forma negativa en el rescate la eliminación de varias serinas/treoninas fosforiladas al quitar los sitios de unión a SPOP, ya que datos previos del laboratorio (datos no publicados) sugieren que la fosforilación de Utf1 aumenta su estabilidad. Por el contrario, en el caso de Utf1mutSIAH la pérdida de una lisina potencialmente ubiquitinable al eliminar el sitio de unión ha podido influir en que la contribución de SIAH en el rescate sea mayor.

Por otra parte, se muestra que el mutante fosfomimético generado presenta mayor estabilidad respecto a Utf1 wt, pareciendo indicar que cuando la proteína está fosforilada en las serinas 48 y 54, que flanquean el motivo de unión a SIAH, la proteína es más estable. Este resultado apoya la idea previa del laboratorio de acogida de que la fosforilación está directamente relacionada con la estabilidad de Utf1 ya que se observó que la sobreexpresión de Cdc14b, que produce la

defosforilación de Utf1, conducía a una disminución de la estabilidad de la proteína de interés (resultados no publicados).

Por otro lado, en este experimento se puede observar que los carriles correspondientes a la muestra de Utf1mutSPOP+SIAH están por debajo del resto. Este hecho puede deberse a que, al perderse algunas serinas y treoninas, la proteína podría presentar un menor nivel de fosforilación y, por tanto, un menor peso molecular; aunque también podría ser debido a otras posibles modificaciones post-traduccionales. Además, el rescate se observa en las muestras que han sido tratadas con el inhibidor roscovitina pero no con trametinib, lo que puede sugerir que la degradación inducida por la inhibición de ERK2 vaya por otra vía distinta a la de SPOP o SIAH, o que la inhibición presente efectos indirectos adicionales que no son posibles rescatar solo con los mutantes.

Aunque los resultados expuestos han sido favorables a la hipótesis y ayudan a descifrar la regulación de la estabilidad y de la degradación de Utf1, es necesario llevar a cabo más estudios para poder obtener datos concluyentes y definitivos.

En proyectos futuros, sería interesante estudiar cómo afecta indirectamente ERK2 a la degradación de Utf1.

8. CONCLUSIÓN

En conclusión, el estudio de estabilidad de Utf1 mediante mutagénesis dirigida muestra que los mutantes en los que se han eliminado el sitio de unión a SPOP o SIAH son más estables que Utf1 wt, en especial los mutantes SIAH y SPOP+SIAH. Además, la eliminación de ambos sitios simultáneamente tiene un efecto aditivo en el rescate, indicando que tanto SPOP como SIAH están implicados en la degradación de Utf1.

Por otro lado, la eliminación de las lisinas aumenta la estabilidad de Utf1, sugiriendo que su degradación está mediada por ubiquitinación.

Por último, se ha observado que el mutante fosfomimético de las serinas 48 y 54 es más estable, sugiriendo que la fosforilación de estas serinas protege a Utf1 de su degradación.

9. AUTOEVALUACIÓN

Mi estancia en el grupo de investigación “División Celular y Cáncer” del CNIO ha sido enriquecedora gracias a que he podido observar cómo funciona un grupo de investigación en su día a día. También, participar en los seminarios y lab meetings me ha permitido conocer el resto de proyectos que están efectuando otros miembros del grupo, así como los de otros grupos del Programa de Oncología Molecular.

Además, con el desarrollo de este proyecto, he podido ampliar mis conocimientos y experiencia en técnicas de biología molecular como la mutagénesis dirigida en la cual solo tenía conocimientos teóricos básicos. Asimismo, la ayuda de mi tutora Carolina ha sido crucial tanto para interpretar los datos previos como los resultados obtenidos como la planificación del proyecto. A su vez, mi tutora académica María del Carmen me ha ayudado en la estructuración del trabajo.

En resumen, me he parecido una gran experiencia este primer contacto con el sector de la investigación y poder aprender de grandes científicos que me han ayudado y han compartido su conocimiento en las técnicas empleadas con paciencia y claridad.

10. BIBLIOGRAFÍA

Bao, Q., Morshedi, A., Wang, F., Bhargy, S., Pervushin, K., Yu, W., & Dröge, P. (2017). Utl1 contributes to intergenerational epigenetic inheritance of pluripotency. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-14426-5

Cuneo, M., & Mittag, T. (2019). The ubiquitin ligase adaptor SPOP in cancer. *The FEBS Journal*, 286(20), 3946-3958. doi: 10.1111/febs.15056

Hanna, J., Guerra-Moreno, A., Ang, J., & Micoogullari, Y. (2019). Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease. *The American Journal Of Pathology*, 189(1), 94-103. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.09.004

Hartwell, L., & Weinert, T. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246(4930), 629-634. doi: 10.1126/science.2683079

Hjorth-Jensen, K., Maya-Mendoza, A., Dalgaard, N., Sigurðsson, J., Bartek, J., & Iglesias-Gato, D. et al. (2018). SPOP promotes transcriptional expression of DNA repair and replication factors to prevent replication stress and genomic instability. *Nucleic Acids Research*, 46(18), 9891-9891. doi: 10.1093/nar/gky788

Jia, J., Zheng, X., Hu, G., Cui, K., Zhang, J., & Zhang, A. et al. (2012). Regulation of Pluripotency and Self- Renewal of ESCs through Epigenetic- Threshold Modulation and mRNA Pruning. *Cell*, 151(3), 576-589. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.023

Kooistra, S., van den Boom, V., Thummer, R., Johannes, F., Wardenaar, R., & Tesson, B. et al. (2010). Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1 Regulates ESC Chromatin Organization and Gene Expression. *STEM CELLS*, 28(10), 1703-1714. doi: 10.1002/stem.497

Lydeard, J., Schulman, B., & Harper, J. (2013). Building and remodelling Cullin–RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO Reports*, 14(12), 1050-1061. doi: 10.1038/embor.2013.173

Maekawa, M., & Higashiyama, S. (2020). The Roles of SPOP in DNA Damage Response and DNA Replication. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(19), 7293. doi: 10.3390/ijms21197293

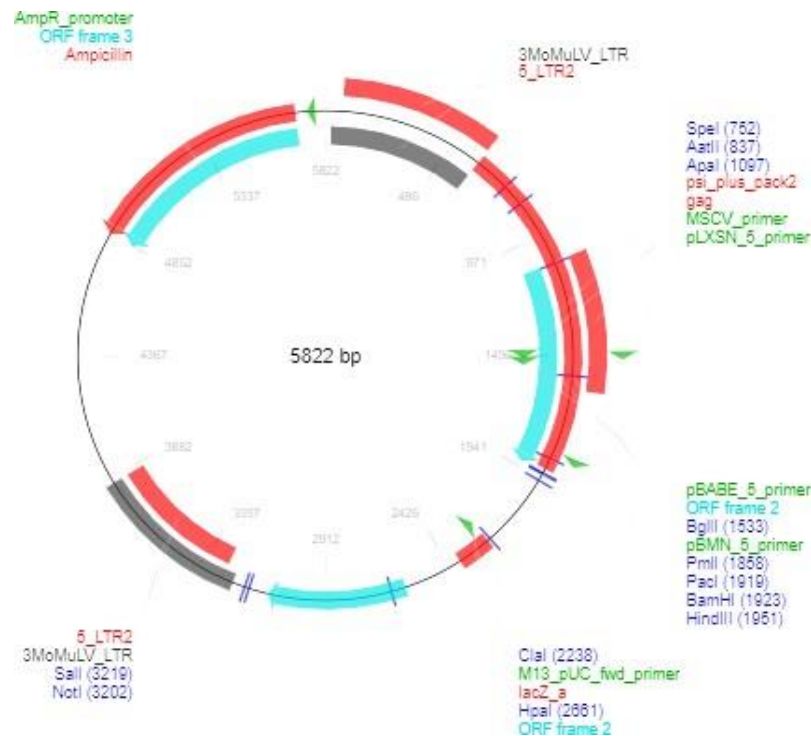
Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153-166. doi: 10.1038/nrc2602

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends In Biochemical Sciences*, 30(11), 630-641. doi: 10.1016/j.tibs.2005.09.005

- Marzahn, M., Marada, S., Lee, J., Nourse, A., Kenrick, S., & Zhao, H. et al. (2016). Higher-order oligomerization promotes localization of SPOP to liquid nuclear speckles. *The EMBO Journal*, 35(12), 1254-1275. doi: 10.15252/embj.201593169
- Mocciaro, A., & Schiebel, E. (2010). Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions. *Journal Of Cell Science*, 123(17), 2867-2876. doi: 10.1242/jcs.074815
- Nadeau, R., Toher, J., Yang, X., Kovalenko, D., & Friesel, R. (2007). Regulation of Sprouty2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 100(1), 151-160. doi: 10.1002/jcb.21040
- Nishimoto, M., Katano, M., Yamagishi, T., Hishida, T., Kamon, M., & Suzuki, A. et al. (2013). In Vivo Function and Evolution of the Eutherian-Specific Pluripotency Marker UTF1. *Plos ONE*, 8(7), e68119. doi: 10.1371/journal.pone.0068119
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(7), 427-438. doi: 10.1038/nrm3132
- Raina, K., Dey, C., Thool, M., Sudhagar, S., & Thummer, R. (2021). An Insight into the Role of UTF1 in Development, Stem Cells, and Cancer. *Stem Cell Reviews and Reports*. doi: 10.1007/s12015-021-10127-9
- Scortegagna, M., Kim, H., Li, J., Yao, H., Brill, L. y Han, J. et al. (2014). Fine tuning of the UPR por Ubiquitin Ligases Siah1 / 2. *Plos Genetics* , 10 (5), e1004348. doi: 10.1371 / journal.pgen.1004348
- Van den Boom, V., Kooistra, S., Boesjes, M., Geverts, B., Houtsmuller, A., & Monzen, K. et al. (2007). UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ES cell differentiation. *Journal Of Cell Biology*, 178(6), 913-924. doi: 10.1083/jcb.200702058
- Van Wijk, S., Fulda, S., Dikic, I., & Heilemann, M. (2019). Visualizing ubiquitination in mammalian cells. *EMBO Reports*, 20(2). doi: 10.15252/embr.201846520
- Wang, Y., & Le, W. (2019). Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System. *Autophagy: Biology And Diseases*, 527-550. doi: 10.1007/978-981-15-0602-4_25
- Wurzenberger, C., & Gerlich, D. (2011). Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8), 469-482. doi: 10.1038/nrm3149
- Zhang, J., Chen, M., Zhu, Y., Dai, X., Dang, F., & Ren, J. et al. (2019). SPOP Promotes Nanog Destruction to Suppress Stem Cell Traits and Prostate Cancer Progression. *Developmental Cell*, 48(3), 329-344.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.11.035

11. ANEXOS

- Anexo 1: Mapa del vector pMX:



Anexo 1: Mapa del vector pMX (Addgene).

- Anexo 2: Resultados de la secuenciación:

A>280421a_CVB85_SPECIFIC_A12_096.ab1= **MUTANTE SPOP COMPLETO**
 CGTCGCCAGCTAGCCCCGACGCTGAGCTGCGGTCGGCCGGGGATGTCCCGG
 TGA ACTACGCTGATGCCTTCGCTACTTCGGGCGGGATGGCTGAACCCGGCTC
 GCCAAGGCTCCCGTGTCCCCGGACTCGGCGCAGCGCACGCCCTGGAGTGC
 TCGAGAGACGGAGCTACTTCTGGGCACGCTGCTGCAGCCGGCCATGTGGCG
 CTC ACTACTGCTGGACCGCAGGCAGACTCTGCCTACTTACCGCCGCGTGTCC
 GCCGCACTGGCCCGTCAGCAAGTTCGGCGCACGCCCGCTCAGTGCCGCCGT
 CGCTACAAGTTCCTCAAGGACAACTCCGAGACTCCCAGGGCCAGCCGTCC
 GGACCCTTCGATAACCAGATCCGCCAACTCATGGGGCTATTGGGGGACGAT
 GGGCCGCCGAGGGTTCGCCGCCGCTCTACTGGCCCTGGACGTCCCCAGCGC
 CGCGGCCGCTCGTCCCTCTCCGCGTTAGCACCCGCACCTGCACCGGTGGAGC
 AAGAGGCCGAGCTGCCGCTGGCTGCGGAAAATGACGAACCTGCCCTGCGC
 TCAGATTCAGTTCTTCCACGACGAAGTCTGCAGGTGCCACCGCATTACCAG
 CTCTCCTCCTTTCGAGCAGCCGACACTCTGCCTCCTGAGCCGGGCCATAACC
 TTCGAATCCTCCCCGACGCCAACCCCCGACCACGACGTGGAGACCCCGAAT
 GAGCCTCCTGGCCTTTCAGGGCCGTGCTTCTTCCCCGCAGGTTGCTCCCC
 AGTCGTTGAATACCGCGTTGCTGCAGACCTTGACGCACTTGGGCGACATCTC
 AACAGTTCTGGGCCCTCTGCGCGACCAGCTGTCGACCCTGAACCAGCACGT

GGAGCATCTACGAGGTTCTTCGACCAAACCGTTTCTTCTGGGCGGTGGGGT
TCATTCTTGGGCAGTGCAGCCTCCGAGCGGGGCATCTTGGGACTTGCGCAAT
AAAGCTTTTGTAGGGTGGGCGCCGCCGACCAGCCTTTCTTGTACAAGTGGTG
AT

B>100521a_CVB102_SPECIFIC_D09_073.ab1= MUTANTE SIAH COMPLETO
GCGCATTTTCTCGGCGTCGCAGCTAGCCCCGACGCTGAGCTGCGGTTCGGCCG
GGGATGTCCCGGTGACTACGTCTGATGCCTTCGCTACTTCGGGCGGGATGGC
TGAACCCGGCTCGCACCAAGGCTCCCGTGCCCCGGACTCGGCGCAGCGCAC
GCCCTGGAGTGCTCGAGAGACGGAGCTACTTCTGGGCACGCTGCTGCAGCC
GGCCATGTGGCGCTCACTACTGCTGGACCGCAGGCAGACTCTGCCTACTTAC
CGCCGCGTGTCCGCCGCACTGGCCCGTCAGCAAGTTCGGCGCACGCCCGCT
CAGTGCCGCCGTGCTACAAGTTCCTCAAGGACAAACTCCGAGACTCCCAG
GGCCAGCCGTCCGGACCCTTCGATAACCAGATCCGCCAACTCATGGGGCTA
TTGGGGGACGATGGGCGCCGAGGGTTCGCCGCCGCTCTACTGGCCCTGGA
CGTCCCCAGCGCCGCGGCCGCTCGTCCCTCTCCGCGTTAGCACCCGCACCTG
CACCGGTGGAGCAAGAGGCCGAGCTGCCGCTGGCTGCGGAAAATGACGAA
CCTGCCCTGCGCTCAGATTCAGTTCCTTCCACGACGAAGTCTGCAGGTGCC
ACCGCATTACCAGCTCTCCTCCTTACGAGACCGACACTCTGCCTCCTGA
GCCGGGCCATACTTCGAATCCTCCCCGACGCCAACCCCCGACCACGACGT
GGAGACCCCGAATGAGCCTCCTGGCCTTTCCAGGGCCGTGCTTCTTCCCCG
CAGTTGCTCCCCAGTCGTTGAATACCGCGTTGCTGCAGACCTTGACGCACTT
GGGCGACATCTCAACAGTTCCTGGGCCCTCTGCGCGACCAGCTGTGACCCCTG
AACCAGCACGTGGAGCATCTACGAGGTTCCCTTCGACCAAACCGTTTCTCTGG
CGTGGGGTTCATTCTGGGCAGTGCAGCCTCCGAGCGGGCATCCTTGGGGAC
TTGCGCATAAGCTTGTAGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAGTG
TGATATTCAGCTGACGCGTCGCTACATACAGTGTCTGTGTTCAAATAATAT
ACGGCAGGCATGTCTGCCGTATTCGCGTAGATCATTATGTTACTATTTAAAC
TCAACGGCCGCCAGCCATGTGTCGACGATAATAAGATTATTAGTTCCGAAG
AGAGTGATCACTKAGTTGCASCTRCTAGTAGCCATTGCCAGCAGTG

**C>060521a_CVB98_SPECIFIC_F11_085.ab1= MUTANTE SPOP-SIAH
COMPLETO**
TTTTYYCSGCGGTTCCGCCAGGCTAGGCCCCGACGCTGAGCTGCGGTTCGGCCG
GGGATGTCCCGGTGAACTACGCTGATGCCTTCGCTACTTCGGGCGGGATGG
CTGAACCCGGCTCGCACCAAGGCTCCCGTGCCCCGGACTCGGCGCAGCGCA
CGCCCTGGAGTGCTCGAGAGACGGAGCTACTTCTGGGCACGCTGCTGCAGC
CGGCCATGTGGCGCTCACTACTGCTGGACCGCAGGCAGACTCTGCCTACTTA
CCGCCGCGTGTCCGCCGCACTGGCCCGTCAGCAAGTTCGGCGCACGCCCGC
TCAGTGCCGCCGTGCTACAAGTTCCTCAAGGACAAACTCCGAGACTCCCA
GGGCCAGCCGTCCGGACCCTTCGATAACCAGATCCGCCAACTCATGGGGCT
ATTGGGGGACGATGGGCGCCGAGGGTTCGCCGCCGCTCTACTGGCCCTGG
ACGTCCCCAGCGCCGCGGCCGCTCGTCCCTCTCCGCGTTAGCACCCGCACCT
GCACCGGTGGAGCAAGAGGCCGAGCTGCCGCTGGCTGCGGAAAATGACGA
ACCTGCCCTGCGCTCAGATTCAGTTCCTTCCACGACGAAGTCTGCAGGTGCC
CACCGCATTACCAGCTCTCCTCCTTTCGAGCAGCCGACACTCTGCCTCCTG
AGCCGGGCCATACTTCGAATCCTCCCCGACGCCAACCCCCGACCACGACG
TGAGACCCCGAATGAGCCTCCTGGCCTTTCCAGGGCCGTGCTTCTTCCCC
GCAGTTGCTCCCCAGTCGTTGAATACCGCGTTGCTGCAGACCTTGACGCACT

TGGGCGACATCTCAACAGTTCCMGGGGCCCTCTGCGCGACCAGCTGTGCGAC
 CCTGAACCAGCACGTGGAGCATCTACGAGGTTCCCTTCGACCAAACCGTTTCT
 CTGGGCGGTGGGGGTCATCTGGGCAGTGCAGCCTCGAGCGGGGCATCCTTT
 GGGGACTTGCGCAATAAGCTTTGTAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTT
 GTACAAAGTGGTGAATATCAGCTGAGCGTCGTTTCGCTACCATACAGTGGTCT
 GGTTCAAATATATTACTGGCAGGCCATGTCTGGCCCTCGAG

D>200521a_CVB112_SPECIFIC_D12_090.ab1= **MUTANTE MIMIC COMPLETO**
 GYCCSTTTTTTTTTYCGCCGTCGCAGCTAGCCCGACGCTGAGCTGCGGTCCGGC
 CGGGGATGTCCCGGTGACTACGTCTGATGCCTTCGCTACTTCGGGCGGGATG
 GCTGAACCCGGCGACCCCAAGGCTCCCGTGGACCCGGACTCGGGCGCAGCGC
 ACGCCCTGGAGTGCTCGAGAGACGGAGCTACTTCTGGGCACGCTGCTGCAG
 CCGGCCATGTGGCGCTCACTACTGCTGGACCCGAGGCAGACTCTGCCTACTT
 ATCTCCGCGTGTCCGCCGMACTT

Anexos 2A, B, C Y D: Resultado de la secuenciación de la Unidad de Genómica del CNIO.

- **Anexo 3: Ejemplo de BCA**

La placa se lee en el espectrofotómetro y se comprueba que la absorbancia de las muestras diluidas presentan valores comprendidos entre la absorbancia máxima y mínima de los pocillos con la dilución seriada de BSA.

Con los resultados de absorbancia y la concentración conocida obtenemos la ecuación de la recta patrón.

Concentración BSA (mg/μl)	Absorbancia (nm)
2000	0,603
1000	0,308
500	0,198
250	0,143
125	0,103
62,5	0,088
31,25	0,081
15,625	0,077
7,8125	0,076

Tabla 3: Datos obtenidos del espectrofotómetro.



$y = 0,0003x + 0,0708$ $R^2 = 0,9969$

Despejando la “x” de la ecuación obtenemos los valores de la concentración de la muestra diluida en mg/μl, deshaciendo la dilución y cambiando a las unidades adecuadas se calcula los μl necesarios para un volumen final de 30 μl sin contar con el Lb x6.

N° muestra	Absorbancia (nm)	Concentración(mg/μl)	Deshaciendo dilución x3	μg/μl	Muestra (μl)	H2O (μl)	Lb (μl)
1	0,335	880,6666667	2642	2,642	11,35503407	18,6449659	6
2	0,305	780,6666667	2342	2,342	12,80956447	17,1904355	6
3	0,459	1294	3882	3,882	7,72797527	22,2720247	6
4	0,412	1137,333333	3412	3,412	8,792497069	21,2075029	6
5	0,316	817,3333333	2452	2,452	12,23491028	17,7650897	6
6	0,537	1554	4662	4,662	6,435006435	23,5649936	6
7	0,297	754	2262	2,262	13,26259947	16,7374005	6
8	0,315	814	2442	2,442	12,28501229	17,7149877	6
9	0,453	1274	3822	3,822	7,849293564	22,1507064	6
10	0,28	697,3333333	2092	2,092	14,34034417	15,6596558	6
11	0,22	497,3333333	1492	1,492	20,10723861	9,89276139	6
12	0,342	904	2712	2,712	11,0619469	18,9380531	6
13	0,375	1014	3042	3,042	9,861932939	20,1380671	6
14	0,286	717,3333333	2152	2,152	13,94052045	16,0594796	6
15	0,479	1360,666667	4082	4,082	7,34933856	22,6506614	6

Tabla 4: Datos para realizar el western blot.