



**TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN  
BIOTECNOLOGÍA**

# Utilidad de un anticuerpo “custom” para la detección específica de una nueva isoforma de 70 kDa de la enzima RNasa L

Alumno: Diego Estrada Macip

Tutor: Elisa Oltra García

Curso académico: 2020-2021





## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1: Ruta de activación de la enzima.....	2
Figura 2: Estructura de la enzima.....	6
Figura 3: Dominios de la enzima.....	7
Figura 4: Hipótesis de la enzima RNasa L de 70 kDa.....	15
Figura 5: Vector pCDNA 3.1.....	23
Figura 6: Células HEK-293T/83 kDa (24h) .....	35
Figura 7: Células HEK-293T/83 kDa (48h) .....	35
Figura 8: Células HEK-293T/70 kDa (24h) .....	36
Figura 9: Células HEK-293T/70 kDa (24h) .....	36
Figura 10: Análisis western blot de células (1) .....	39
Figura 11: Análisis western blot de células (2) .....	41
Figura 12: Análisis western blot de células (3) .....	43
Figura 13: Alineamiento BLASTP.....	43
Figura 14: BLASTP de secuencias humanas.....	44
Figura 15: Análisis western blot de PBMCs.....	45
Figura 16: Análisis western blot mixtos (1) .....	47
Figura 17: Tinción de la Figura 16.....	48
Figura 18: Análisis de western blot (2) .....	49
Figura 19: Tinción de la Figura 18.....	50
Figura 20: Análisis de western blot (3) .....	51
Figura 21: Análisis de western blot (4) .....	52

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Homología de la RNasa entre especies.....	8
Tabla 2: Cantidades del stacking gel.....	26
Tabla 3: Cantidades de resolving gel.....	27
Tabla 4: Anticuerpos primarios.....	29
Tabla 5: Anticuerpos secundarios.....	30
Tabla 6: Resultados del Nanodrop.....	32

## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

**2-5A** 2-5 oligoadenilato

**ARD** Dominio de repetición de anquirina N-terminal

**avSGs** Gránulos de estrés antivirales

**CARDs** Dominios amino-terminales de activación y reclutamiento de caspasas

**CTD** Dominio carboxi-terminal (CTD)

**EAT** Ehrlich ascites tumor

**EMCV** Virus de la encéfalo miocarditis

**G3BP1** Ras-Gap SH3 domain binding protein

**GCN2** General control nonderepressible 2

**HIV-1** Virus de la inmunodeficiencia humana

**HPC1** Cáncer Hereditario de Próstata

**HPC1** Gen hereditario del cáncer de próstata

**HRI** Heme-regulated inhibitor

**HVC** Virus de la hepatitis C

**IAV** Virus de la Influenza A

**IFN** Interferón

**IFNAR** Receptores de la superficie celular

**ISGs** Genes estimuladores de interferones antivirales

**LGP2** DExH-box helicasa 58

**MDA5** Proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma

**NDV** Virus de la enfermedad de Newcastle

**OAS** Oligoadenilato sintetasa

**PBMCs** Células mononucleares de sangre periférica

**PERK** PKR-like ER kinase

**PK** Dominio homólogo de la proteína quinasa

**PKR** Proteína kinasa

**PRRS** Receptores de reconocimiento de patógenos

**RLRs** Receptores similares a RIG-I citosólicos

**RNASE** Domino ribonucleasa C-terminal

**SFC** Síndrome de Fátiga Crónica

**SGs** Gránulos de estrés

**SINV** Virus Sindbis

**TMEV** Virus Theiler de encefalomiелitis murina

**UPR** Unfolded protein response

**VV** Virus Vaccinia

## RESUMEN

La enzima RNasa L es una endoribonucleasa en estado latente que está presente en una gran variedad de tipos celulares de mamíferos, y cuya función principal es su actividad antiviral como respuesta a la presencia de interferones (IFN) al detectar la presencia de un patógeno. En el genoma humano está codificada por el gen *RNASEL* y su activación desencadena la degradación de todo tipo de ARN tanto celular como viral. La enzima presenta un tamaño aproximado de 83 kDa pero evidencias recientes obtenidas por el grupo de la Dra. Elisa Oltra indican la posibilidad de que exista una nueva isoforma de 70 kDa en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes de encefalomiелitis miálgica/síndrome de fatiga crónica (EM/SFC).

Para confirmar esta hipótesis se llevó a cabo la producción de distintos constructos de expresión conteniendo ambas isoformas, a utilizar en transfecciones de células humanas HEK-293T para su producción *in vitro*, y de esta forma, conocer el funcionamiento de un anticuerpo “custom” (POLY 33) obtenido en conejos con un péptido sintético de 17 aminoácidos exclusivo de la nueva isoforma de 70 kDa mediante ensayos western blot.

Esta investigación pretende confirmar el funcionamiento de este anticuerpo específico “custom” en relación con otros comerciales no específicos de isoforma, así como confirmar la existencia de esta nueva isoforma en muestras de pacientes. La importancia reside en que la nueva isoforma podría constituir un biomarcador de la EM/SFC y el anticuerpo “custom” proporcionar una herramienta de ensayo.

**Palabras clave:** RNasa L | interferones | isoformas | 70 kDa | PBMCs | western blot  
| síndrome de fatiga crónica

## **ABSTRACT**

The RNase L enzyme is a latent endoribonuclease that is present in a wide variety of mammalian cell types, and whose main function is its antiviral activity in response to the presence of interferons (IFN) when there is presence of a pathogen. In the human genome it is encoded by the RNASEL gene and its activation triggers the degradation of all types of RNA, both cellular and viral. The enzyme is approximately 83 kDa in size but recent evidence obtained by Dr. Elisa Oltra's group indicates the possibility of the existence of a new 70 kDa isoform in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS).

To confirm this hypothesis, different expression constructs containing both isoforms were produced to be used in transfection of human HEK-293T cells for in vitro production, and in this way, get to know the performance of a "custom" antibody (POLY 33) obtained in rabbits with a synthetic peptide composed of 17 amino acids exclusive of the new 70 kDa isoform by western blot assays.

This research aims to confirm the performance of this "custom" specific antibody relative to other commercial non-isoform specific antibodies, as well as to confirm the existence of this new isoform in patient samples. The importance lies in the fact that the new isoform could constitute a biomarker for MS/CFS and the custom antibody could provide an assay tool.

**Key words:** RNase L | interferons | isoforms | 70 kDa | PBMCs | western blot | chronic fatigue syndrome



# ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	VÍA OAS/RNASE L.....	1
1.2	PAPEL DE LA RNASE L.....	2
1.3	RECEPTORES.....	3
1.4	GRÁNULOS DE ESTRÉS .....	4
1.5	ESTRUCTURA DE LA RNASE L.....	5
1.6	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA RNASE L.....	9
1.6.1	Actividad antiviral.....	9
1.6.2	Mecanismo de acción .....	10
1.6.3	Inhibición de la actividad de la RNase L por virus .....	11
1.7	PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA ENZIMA RNASE L.....	13
1.7.1	Cáncer de próstata .....	13
1.7.2	Síndrome de Fatiga Crónica (SFC) y fibromialgia .....	14
1.8	HIPÓTESIS DE LA APARICIÓN DE LA FORMA DE 70 kDa.....	14
2	OBJETIVOS .....	16
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1	MATERIALES.....	18
3.1.1	Líneas celulares.....	18
3.1.2	Medios de cultivo .....	18
3.1.3	Agentes de transfección.....	19
3.1.4	Extractos para el análisis por western blot .....	19
3.1.5	Marcadores.....	19
3.2	PRODUCCIÓN Y AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE LA ENZIMA RNase L.....	19
3.2.1	Transformación bacteriana .....	19
3.2.2	MAXI PREP .....	20
3.2.3	Cuantificación y calidad del plásmido observado .....	21

3.3	CULTIVOS CELULARES.....	22
3.3.1	Mantenimiento de células .....	22
3.3.2	Pase de células .....	22
3.4	TRANSFECCIÓN .....	23
3.4.1	Lipofectamine 3000.....	24
3.4.2	X-tremeGENE HP .....	24
3.5	PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNA TOTAL.....	25
3.5.1	Protocolo de extracción con M-PER.....	25
3.6	PROTOCOLO DE WESTERN BLOT.....	26
3.6.1	FABRICACIÓN DE GELES 10% DE POLIACRILAMIDA .....	26
3.6.2	Análisis de Western Blot .....	27
3.7	TINCIÓN CON ROJO PONCEAU.....	31
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
4.1	PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO RECOMBINANTE DE EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE RNASE L.....	31
4.2	PRODUCCIÓN DE LAS ISOFORMAS DE RNASE L DE 83 KDA Y 70 KDA EN CÉLULAS HEK-293T .....	33
4.3	ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LAS ISOFORMAS DE RNASE L 83 y 70 kDa	37
4.3.1	WESTERN BLOT DE CÉLULAS.....	38
4.3.2	WESTERN BLOT DE PBMCs.....	44
4.3.3	WESTERN BLOTS DE CÉLULAS Y PBMCs.....	46
5	CONCLUSIONES.....	53
6	BIBLIOGRAFÍA.....	55



# 1 INTRODUCCIÓN

La enzima RNasa L o endoribonucleasa L es una proteína encargada de degradar el ARN viral y celular cuando se lleva a cabo su activación tras producirse infección vírica (Manivannan et al., 2020). Se halla en prácticamente todos los tipos de células de mamífero, y su activación esta mediada por la unión del oligonucleótido 2-5A (Silverman et al., 2007).

## 1.1 VÍA OAS/RNASE L

En primer lugar, esta enzima es el efector del sistema 2-5A (2-5 oligoadenilato), siendo este una ruta metabólica involucrada principalmente en el mecanismo molecular de los interferones (IFNs). Este sistema es el encargado de llevar a cabo un proceso apoptótico como respuesta a determinadas infecciones víricas y distintos estímulos externos (Silverman et al., 2007). Como ya se ha demostrado con el tiempo, el organismo huésped es capaz de causar la apoptosis de determinadas células mediante este sistema, con la finalidad de defenderse del virus, al igual que la apoptosis puede originarse por diferentes métodos como la homeostasis de los tejidos, morfogénesis embrionaria, o tratamientos de quimioterapia o radioterapia (Castelli et al., 1997). En células humanas el 2-5A está sintetizado por 3 isoenzimas: OAS1 (del inglés oligoadenylate synthetase), OAS2 y OAS3 (Donovan et al., 2015); aunque existe un cuarto gen OAS, solo los mencionados anteriormente codifican proteínas catalíticas (Li et al., 2016).

La vía OAS/RNasa L y su unión a ARN de doble cadena (ARNdc) tanto celular como vírico bloquea las infecciones de determinados virus y por ello es un mecanismo crucial utilizado por las células para defenderse de los patógenos (Karasik et al., 2021). Estos virus inducen la producción de interferones de tipo I que desencadenan la señal inicial inductora de los genes OAS al ser las proteínas OAS receptores de reconocimiento de patógenos o Pattern Recognition Receptors en inglés (PRRs). Por lo tanto, al inducirse la activación de la enzima, pasa de ser un monómero inactivo a una endoribonucleasa dimérica activa de ARNdc (Drappier et al., 2015).

Existen 2 vías antivirales principales inducidas por IFN, siendo la primera de ellas el ya mencionado sistema 2-5A activado por ARNdc, y otra vía mediada por la proteína kinasa (PKR) dependiente de ARNdc. Como ya establecido anteriormente, la activación de la endonucleasa depende de su unión al oligonucleótido 2-5A, formado por una serie de 5'-olidodenedilatos trifosforilados con enlaces 2'-5' fosfodiéster en contraste con las uniones 3'-5' observadas en ARN y ADN (Bisbal C et al., 2007). Los IFN inducen la transcripción de genes, como los OAS mencionados anteriormente, encargados de sintetizar 2-5A cuyos productos proteicos son activados por ARNdc provocando que esta molécula de pequeño tamaño lleve a cabo la inhibición de la traducción a partir de ATP (Donovan et al., 2017) (Figura 1). La unión y activación de la enzima RNasa L es la única función que se ha obtenido hasta ahora del 2-5A (Bisbal C et al., 2007).

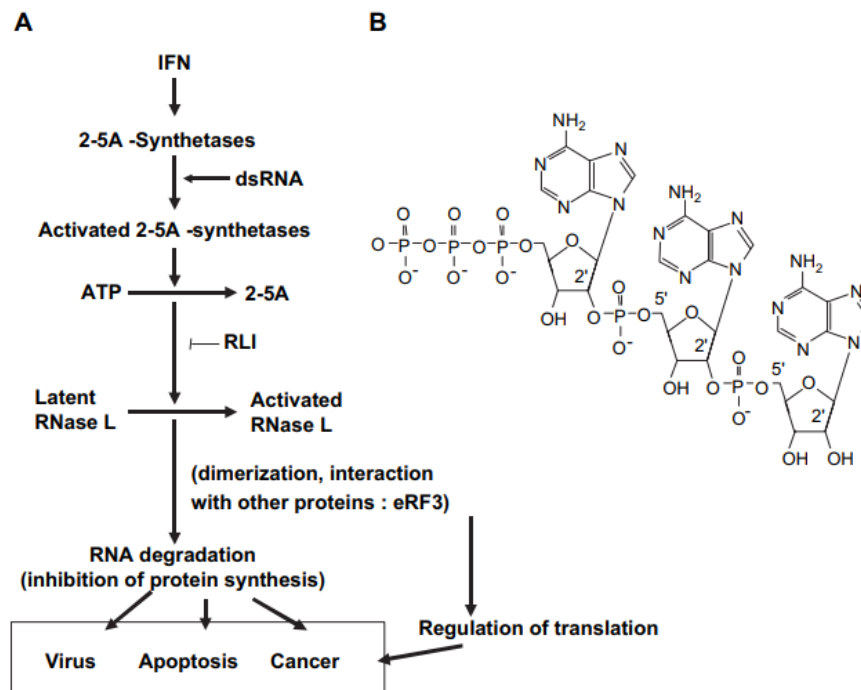


Figura 1: Ruta de activación de la 2-5 A/RNasa L (Fuente: Silverman et al., 2007)

## 1.2 PAPEL DE LA RNASA L

En segundo lugar, la enzima RNasa L ejerce un papel fundamental en el metabolismo celular y en la inmunidad innata de muchas maneras diferentes (Silverman et al., 2007). Por ejemplo, existen pequeños productos de escisión de ARN producidos por la enzima cuando ocurre algún tipo de infección viral que pueden constituir una señal de los

receptores similares al ácido retinoico inducible-I con el fin de amplificar la señal del gen IFN- $\beta$  (Chakrabarti et al., 2011).

Por lo tanto, en este caso, la enzima podrá tener diferentes papeles, entre ellos, la protección del sistema nervioso central de la desmielinización inducida por cualquier virus (Chakrabarti et al., 2011), como posteriormente se demostró en un estudio en el cual un virus de hepatitis desmielinizante resulto ser letal 12 días post infección en la mayoría de los ratones que presentaban la ausencia de la enzima RNasa L (Ireland et al., 2009).

La presencia de otro rol de gran importancia de esta enzima en la inmunidad innata se observa por su función en la inducción de citoquinas y vías endosomales responsables de suprimir infecciones virales. Este descubrimiento de las funciones de la RNasa L le atribuye poder ser utilizada como diana para el desarrollo de fármacos antimicrobianos (Chakrabarti et al., 2011).

Del mismo modo, estudios posteriores han sugerido que la endonucleasa RNasa L está relacionada con el cáncer, específicamente con una función supresora de determinados tumores producidos por el cáncer de próstata, cómo se ha podido observar al realizar diversos estudios de la genética hereditaria de este tipo de cáncer. Estos estudios genéticos, realizados en laboratorios de Finlandia (Rokman et al., 2002), Estados Unidos (Casey et al., 2002) e Israel (Rennert et al., 2002), demostraron que existía una predisposición a padecer cáncer de próstata en el caso de presentar mutaciones de la enzima RNasa L (Silverman et al., 2003). Un papel en la supresión tumoral se estableció gracias al mapeo del gen de la RNasa L al gen hereditario del cáncer de próstata (HPC1), que llevó a la propuesta del virus xenotrópico relacionado con la leucemia murina como agente causante de la enfermedad (Silverman et al., 2011), trabajo que posteriormente sería retractado.

### **1.3 RECEPTORES**

En tercer lugar, la invasión viral y el proceso de replicación asociado se detecta en células del huésped mediante la existencia de receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), que provocan la señalización de determinadas respuestas antivirales, incluyendo la producción de determinadas citoquinas y a su vez promoviendo

la aparición de la respuesta inmune adaptativa. Las citoquinas clave en este proceso son los interferones de tipo I (IFN I) (Akira et al., 2006) aunque los interferones de tipo III (IFN III) también presentan gran importancia tras la exposición de la célula ante los patógenos (Chitrakar et al., 2018). Los interferones producidos por las células infectadas por virus actúan uniéndose a los receptores de la superficie celular IFNAR (IFN- $\alpha/\beta$  receptor) para inducir la expresión de los genes estimuladores de interferones antivirales (ISGs), como por ejemplo la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (OAS). Otros PRRs como los receptores similares a RIG-I citosólicos y MDA5 (RLRs, del inglés RIG-I like receptors) detectan el ARN viral citoplasmático y discriminan el ARN viral del propio mediante el reconocimiento de estructuras de doble hebra y grupos 5'-trifosfato, que no existen en el ARN endógeno (Malathi et al., 2020).

Los receptores RIG-I son sensores de gran importancia en la detección de la infección viral, ya que median no solo la inducción transcripcional de los interferones de tipo I, si no también otros genes relacionados con la respuesta antiviral del huésped. Los RLRs están localizados en el citosol. Esta familia de proteínas está constituida por 3 grupos diferentes: RIG-I, proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5), y LGP2, también conocida como DExH-box helicasa 58 o DHX58. Todos los RLRs tienen un dominio central helicasa y un dominio conocido como dominio carboxi-terminal (CTD). La detección de ARNs inmunoestimuladores se lleva a cabo gracias a estos dos dominios ya que funcionan de manera conjunta. Tanto MDA5 como RIG-I poseen dos dominios amino-terminales de activación y reclutamiento de caspasas (CARDs) que median en la transducción de señales corriente abajo. LGP2 destaca por su falta de CARDs y se considera que es la encargada de regular RIG-I y MDA5. Después de su experimentación en células de ratones se concluyó que RIG-I y MDA5 son claves en la defensa antiviral y la inducción de los interferones de tipo I y las infecciones llevadas a cabo por la mayoría de las familias principales de virus son reconocidas por los RLRs (Rehwinkel et al., 2020).

## **1.4 GRANULOS DE ESTRÉS**

En cuarto lugar, los gránulos de estrés (SGs) son complejos ARN-proteína no membranosos que se forman en el citoplasma como respuesta ante situaciones de estrés, como por ejemplo la señal producida al ocurrir una infección viral. Interacciones complejas de ARN-proteína en los SGs establecen una fase de separación líquido-líquido del resto del citoplasma, lo que facilita el reclutamiento de determinadas proteínas en un compartimento dinámico (Eiermann et al., 2020).

Dependiendo de la señal de estrés producida y su origen, las proteínas kinasas como PKR, GCN2 (general control nonderepressible 2), HRI (heme-regulated inhibitor), o PERK (PKR-like ER kinase), fosforilan un factor de iniciación de la traducción, eIF2 $\alpha$ , con el objetivo de inhibir ésta, lo que lleva a la síntesis de los gránulos de estrés. Los SGs producidos y la composición de las proteínas reclutadas dependen del tipo de estímulo y el tipo celular, pero G3BP1 (Ras-GAP SH3 domain binding protein) se requiere en cualquier contexto para producirse la nucleación. Estudios recientes han establecido que la exclusión selectiva de algunos transcritos por parte los SGs necesitan superar el estrés. Gránulos de estrés antivirales (avSGs) son formados durante la infección viral y se ha considerado que tienen un papel fundamental en la señalización antiviral ya que llevan a cabo el reclutamiento de determinadas proteínas como PKR, OAS o RNasa L. La formación de los avSGs es necesaria para la señalización y producción de los IFN en enfermedades como el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la Influenza A (IAV) e infecciones del virus Sindbis (SINV). Como ya mencionado anteriormente, determinadas proteínas como OAS o RNasa L se unen en avSGs durante la infección viral (Manivannan et al., 2020).

## **1.5 ESTRUCTURA DE LA RNASA L**

La endonucleasa RNasa L comenzó describiéndose como una estructura de 185 kDa tras realizar experimentos de filtración por gel en 1979 (Slattery et al., 1979). Sin embargo, al ser un tamaño inusual para una endonucleasa, se continuó con su investigación para posteriormente describirse como una enzima de aproximadamente 78-80 kDa en geles de condiciones desnaturizantes (Silverman et al., 2007). Esta enzima, en su configuración dimérica es esencial para desplegar su función catalítica y antiviral (Huang et al., 2014).

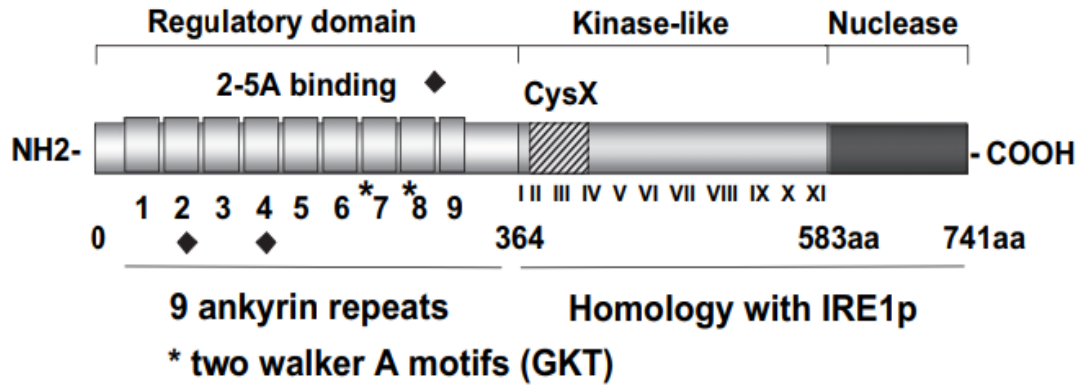


Figura 2: Estructura de la enzima RNasa L (Fuente: Silverman et al., 2007)

Ambas formas coexisten en las células, dependiendo su ratio del tipo de célula y los procedimientos experimentales empleados para detectarla. Del mismo modo, ambas formas se unen a 2-5A y tienen una actividad nucleasa dependiente de este activador. Tanto en el bazo como en el hígado de los ratones y en las células EAT (Ehrlich ascites tumor) se ha observado otra pequeña proteína de un tamaño de 40-46 kDa que también se une a 2-5A y escinde Poly(U). Este peso molecular más bajo que el de la estructura observada inicialmente puede deberse a una escisión proteolítica de la enzima RNasa L (Bisbal et al., 2007).

El monómero de la RNasa humana posee un peso molecular de 83,539 kDa y está compuesta de 741 aminoácidos como se ha podido demostrar al realizar su clonación (Figura 2). Se expresa abundantemente en diferentes células de mamíferos. Recientemente, en leucocitos periféricos de la sangre se ha mostrado la expresión de una variante de RNasa empalmada que presenta la ausencia del tercer exón. La enzima contiene 3 dominios principales: un dominio de repetición de anquirina N-terminal (ARD), que se considera como el dominio regulador de la RNasa L, un dominio homólogo de la proteína quinasa (PK), y un dominio ribonucleasa C-terminal (RNASE) (Chakrabarti et al., 2011).

Los dominios PK y RNASE presentan homología con Ire1, siendo tanto quinasa y endoribonucleasa que actúan en la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, del inglés unfolded protein response) de levaduras a humanos. Entre el dominio ARD y el dominio PK, podemos encontrar un enlace de aproximadamente 30 aminoácidos (Figura 3). Dentro del dominio RNASE está presente un dominio PUG o PUB cuya función es eliminar los glucanos de las glucoproteínas que se encuentran mal plegadas. Aunque

las proteínas Ire1 presentan dominios tanto PK como RNASE, la enzima RNasa L es la única proteína que tiene presente los 3 dominios diferentes (Chakrabarti et al., 2011).

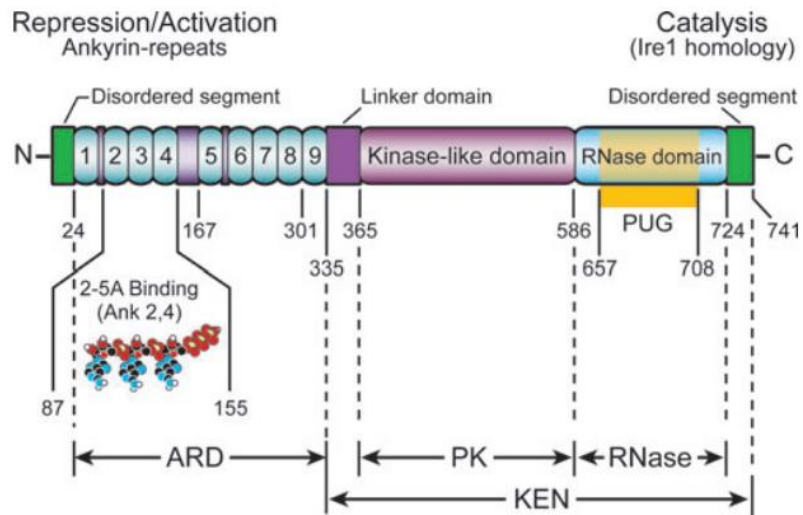


Figura 3: Estructura de la RNasa L con sus respectivos dominios (Fuente: Chakrabarti et al., 2011)

Las secuencias de RNasa L se conocen tanto en una gran porción de especies de mamíferos, como en una de especies avícolas (gallina, *Gallus gallus*) lo que permite hacer una serie de comparaciones presentes en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tabla 1: Homología de la RNasa L entre las diferentes especies de mamíferos y aves (Fuente: Chakrabarti et al., 2011)

Species	Identity in domains of RNase L from different species compared with human RNase L (%)		
	Full length (aa 1-741) <sup>a</sup>	ARD (aa 1-335) <sup>a</sup>	KEN (aa 336-741)
<i>Homo sapiens</i>	100	100	100
<i>Pan troglodytes</i>	97	95	98
<i>Pongo abelii</i>	95	94	96
<i>Macaca mulatta</i>	92	91	93
<i>Equus caballus</i>	77	78	77
<i>Canis lupus familiaris</i>	71	72	70
<i>Bos taurus</i>	71	73	70
<i>Sus scrofa</i>	70	69	71
<i>Loxodonta africana</i>	67	68	66
<i>Cavia porcellus</i>	65	64	66
<i>Mus musculus</i>	64	63	65
<i>Rattus norvegicus</i>	62	64	62
<i>Gallus gallus</i>	39	47	32

El dominio ARD está más conservado que el dominio KEN. Como se observa en la tabla 1 la RNasa de *Gallus* presenta una homología de 47% y 32% de los dominios ARD y KEN en comparación con la RNasa L de *Homo sapiens* (Chakrabarti et al., 2011).

El dominio N-terminal está compuesto de ocho motivos completos de anquirina y uno parcial que resulta ser un segmento desorganizado en la estructura cristalina del N-terminal de la RNasa L humana (Tanaka et al., 2004). Las funciones principales de los motivos de anquirina es mediar las interacciones de las proteínas, en el caso de la enzima RNasa L, con el oligonucleótido 2-5A que provocará su activación. R1, R7, R8, R9 son esenciales para la unión de 2-5A, interaccionando de manera directa con R2-R4, y siendo R7-R9 necesarios para la integridad estructural pero no para la unión de 2-5A (Bisbal et al., 2007.). Al producirse la unión con 2-5A ocurre un cambio conformacional en el dominio de anquirina, y esto provoca que se muestre la ribonucleasa C-terminal provocando la homodimerización de la RNasa L y por lo tanto la activación de la actividad nucleasa de la enzima. Se requiere un ratio molar de 1:1 entre 2-5A y RNasa L para que ocurra la dimerización y activación de la endonucleasa (Dong et al. 1995)

La mitad C-terminal de la enzima es homóloga a la IRE1p quinasa/endoribonucleasa del retículo endoplásmico, que funciona en la respuesta de las proteínas no plegadas en *Sacharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Homo sapiens*. Las proteínas IRE1p y RNasa L muestran muchas similitudes, entre las cuales destacan la homología

tanto en sus dominios nucleasa como los dominios kinasa y similares. Sin embargo, aunque la actividad quinasa de IRE1p si se conoce, la enzima RNasa L no presenta ninguna actividad quinasa aparentemente. Sin embargo, la enzima presenta una reducción en su actividad cuando existe una mutación en la lisina 392 del dominio proteína quinasa II debido a la dificultad de la RNasa L a dimerizar tras ocurrir esta mutación. Se necesitan diversos aminoácidos en el dominio C-terminal para que ocurra la catálisis, siendo estos, R667 y H672. Otros diferentes como Tyr712 y Phe716 son importantes para la unión del ARN. Las primeras dianas de ARN identificadas fueron ARNm viral y ARNr, aunque más recientemente se han identificado otros ARNms regulados por la enzima, y, por lo tanto, puede ser una indicación de que tanto la enzima como la vía 2-5A pueden tener un rol biológico en la fisiología de la célula (Bisbal et al., 2007).

## **1.6 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA RNASA L**

### **1.6.1 Actividad antiviral**

La respuesta de los IFN tipo I es la primera barrera que posee el huésped para defenderse de las infecciones virales y ocurre momentos antes de producirse la respuesta inmune adaptativa. También, la actividad de estos IFN es crucial para evitar la propagación del virus antes de que se haya desarrollado por completo la respuesta inmune. La replicación viral se bloquea o inhibe gracias a la regulación de la transcripción de un número determinado de genes a través de diferentes mecanismos regulados por los IFN de tipo I, siendo uno de estos mecanismos, la aparición de la vía 2-5 A/RNasa L, que presentará un rol muy importante en la actividad antiviral de los IFN. Los virus producen estructuras ARN de doble hebra al ocurrir la infección viral que activaran las sintetasas 2-5 A (Bisbal et al., 2007). La presencia de 2-5 A se ha demostrado en células que han estado expuestas a virus como el virus de la encéfalo miocarditis (EMCV) (Williams et al., 1979), virus vaccinia (Rice et al., 1984) o reovirus (Nilsen et al., 1982).

La demostración de la actividad antiviral de la enzima RNasa L se llevó a cabo mediante la clonación de la 2-5 A sintetasa y la RNasa L. La resistencia al virus de la encéfalo miocarditis (EMCV) y mengovirus se observa gracias a la expresión de la 2-5 A sintetasa de 40 kDa, mientras que la inhibición de la replicación del EMCV ocurre por la sobreexpresión de la proteína 2-5 A sintetasa de 69 kDa en células humanas. De forma similar, la actividad antiviral de los IFNs contra los EMCV se inhibió por la expresión de

una mutante dominante negativa de la enzima o su tratamiento con un antagonista de 2-5 A (Bisbal et al., 2007).

### 1.6.2 Mecanismo de acción

Un modelo de activación de la enzima RNasa L puede llevar a la degradación preferencial del ARN viral vs celular. El ARNm viral que posee estructura de doble hélice puede activar la sintetasa 2-5 A, lo que lleva a la producción de 2-5 A y la posterior activación de la enzima, para la liquidación de virus o apoptosis (Karasik et al., 2020). A los intermediarios replicativos de los virus de ARN se les puede unir la 2-5 A sintetasa y por lo tanto ser activada. Además, se han aislado complejos entre el ARNdc del EMCV y la 2-5 A sintetasa que producen 2-5 A a partir de ATP de las células infectadas por virus (Bisbal et al., 2007).

De forma concreta, la RNasa L lleva a cabo la restricción de la propagación viral, con una serie de mecanismos diferentes que incluyen:

- (i) *Degradación del genoma viral:* es el caso del virus EMCV y otros virus de ssRNA (Drapper et al., 2015).
- (ii) *Degradación del mRNA viral:* afecta tanto a virus de ADN como de ARN. La activación de OAS y la posterior producción de 2-5 A ocurre en sitios donde existe producción de ARNdc lo que puede dotar de especificidad al ARNm viral (Drappier et al., 2015).
- (iii) *Degradación de ARNm y ARNr celular:* el daño producido al ARNr debería limitar la traducción, incluyendo la del ARNm. La propagación del virus se ve reducida por apoptosis celular, producida por la degradación sostenida del ARN celular, incluido el mitocondrial (Drappier et al., 2015).
- (iv) *Amplificación de la señal de IFN:* se puede producir la activación de helicasas citoplasmáticas debido a la liberación de pequeños fragmentos de ARN al citoplasma por parte de la RNasa L. Estas helicasas activan las síntesis de los TFN de tipo I, creando una respuesta positiva en la defensa antiviral (Drappier et al., 2015).

### 1.6.3 Inhibición de la actividad de la RNasa L por virus

Los virus han desarrollado diferentes estrategias para escapar y contrarrestar los efectos antivirales. Existen diversas proteínas tales como la NS1 del virus Influenza A que actúa corriente arriba de la vía OAS/RNasa L, mientras que otras proteínas como la proteína L del virus de Theiler actúa corriente abajo (Drappier et Al., 2015). En algunas células infectadas por virus, de hecho, a pesar de existir estructuras de ARNdc viral capaces de activar la sintetasa 2-5 A y las concentraciones elevadas de 2-5 A, no se puede observar ninguna actividad de la RNasa L (Silverman et Al., 2007).

Algunos virus pueden contrarrestar la actividad antiviral de la OAS/RNasa L, actuando algunos en puntos iniciales de la vía enmascarando el ARNdc, o actuando en las enzimas OAS. Por otra parte, también pueden actuar más tardíamente en la ruta mediante la degradación de 2-5 A o la inhibición de la enzima RNasa L (Gusho et al., 2020).

#### *Producción de 2-5 A inactivos o inhibidores*

En infecciones por el virus del herpes simple tipo 1 y 2, se sintetizan análogos de 2-5 A junto con 2-5 A auténticos. Esto provoca que los análogos sean activadores débiles de la RNasa L y así poder inhibir la activación de la RNasa L por parte de los 2-5 A auténticos (Drappier et al., 2015).

#### *Secuestro de ARNdc por parte de las proteínas virales*

Los virus que llevan a cabo el secuestro del ARNdc previenen la activación de OAS. Virus como el Influenza A NS1, virus vaccinia (VV) E3L y la proteína  $\sigma 3$  de la cápside exterior del reo virus son algunos ejemplos de proteínas que llevan a cabo esta acción. Esta última proteína no solo se emplea en la formación de la estructura de la cápside, sino que también contrarresta respuestas antivirales. La proteína Tat del virus del VIH se une a la estructura *tar* de ARNdc en el mRNA del VIH, y de este modo evitar la activación de OAS. (Drappier et Al., 2015)

### *Expresión de las enzimas decapadas de mRNA viral*

En células infectadas por virus de ADN, puede ocurrir una transcripción convergente de hebras opuestas de ADN que lleven a la formación de ARNdc. En el caso de virus vaccinia, se prevé que hasta el 15% del ARN poliA sintetizado al final de la de la replicación forme dúplex. El virus vaccinia posee las enzimas D9 y D10, que tienen la función y capacidad de degradar estructuras metiladas de ARNm haciéndolas susceptibles a la exonucleasa Xrn1. (Burgess et al., 2015, Liu et al., 2015)

### *Degradación de 2-5 A por una fosfodiesterasa viral*

Se ha descubierto que la expresión fosfodiesterasas 2-5A inhibe la activación de la enzima RNasa L. Estas fosfodiesterasas degradan 2-5A en ATP y AMP. Esta actividad de las fosfodiesterasas se mostró por primera vez en la proteína ns2 del virus de la hepatitis de ratón, es decir, un coronavirus (Zhao et al., 2012).

### *Expresión incrementada de RLI/ABCE*

La infección producida por EMCV induce la expresión de RLI/ABCE que está correlacionada con la inhibición de la RNasa L, ya que su sobreexpresión suprime la acción de los interferones ante EMCV, y posiblemente también ante HIV-1 al realizar observaciones similares (Bisbal et al., 1995, Martinand et al., 1999).

### *Inhibición de RNasa L por la interacción directa con la enzima*

Se ha demostrado que la existencia de la proteína L\*, codificada por el virus Theiler de encefalomiелitis murina (TMEV en inglés) se une de manera directa con la enzima y por lo tanto inhibe la función de la RNasa L mediante la interacción proteína-proteína (Sorgeloos et al., 2013).

### *Inhibición competitiva de la actividad ribonucleasa*

Los poliovirus contienen una estructura en forma de arpón en su ARN genómico que antagoniza la RNasa L. Esta horquilla en la región de codificación de la proteína 3C actúa como un sustrato resistente a la ruptura de la RNasa L (Drappier et al., 2015).

### *Escape de la escisión de la RNasa L mediante la adaptación del genoma viral*

El virus de la hepatitis C (HVC) genotipo 1 ha evolucionado hasta reducir el número de sitios de escisión reconocidos por la enzima RNasa L, es por ello por lo que es más resistente a los IFN que HVC2 y HCV3 y por lo que los pacientes infectados con el genotipo 1 son más difíciles de curar (Han et al., 2002).

## **1.7 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA ENZIMA RNASA L**

Como ya se ha mencionado previamente, la enzima RNasa L presenta un papel fundamental en la defensa celular contra virus patógenos. Sin embargo, se ha demostrado que la enzima juega otros roles diferentes a las funciones antivirales, como la diferenciación celular, senescencia, desarrollo de diabetes, desmielinización de los axones o almacenamiento de lípidos, así como la regulación de las funciones de la barrera (Dayal et al., 2017). En base a esta última, se ha demostrado que la enzima, en su forma inactiva, interactúa con la proteína de unión a la actina, Filamina A para modular el citoesqueleto de actina e inhibir la entrada del virus. La ausencia tanto de la enzima como de la Filamina A propició la entrada del virus en las células (Malathi et al., 2014).

### **1.7.1 Cáncer de próstata**

La asociación genética del Cáncer Hereditario de Próstata (HPC1) a la RNasa L amplía la función de la enzima a la supresión tumoral del cáncer hereditario de próstata y otros tipos de cánceres (Dayal et al., 2017, Karasik et al., 2020). Se han detectado cuatro mutaciones en HPC1/RNasa L en casos hereditarios de cáncer de próstata siendo estos: M1I (sustitución del codón de inicio), E265X (codón de parada en 265), 47 $\Delta$ AAAG (delección que causa un desplazamiento de cuadro y un codón de parada) y R462Q (mutación errónea en 462) (Dayal et al., 2017). A su vez se ha determinado que existe una variante denominada Arg462Gln que tiene una actividad enzimática hasta tres veces menor en relación con la wild type y está asociada al riesgo de padecer esta enfermedad (Casey et al., 2002). La dificultad para dimerizar a una forma catalítica por parte de la RNasa L (R642Q) explicó su deficiencia por causar apoptosis de las células cancerígenas en respuesta a la 2-5A demostrando un posible rol en el cáncer de próstata (Xiang et al., 2003) y se observó en el 43% de los casos hereditarios del cáncer. Sin embargo, existen otros estudios en los que no se observa una relación clara entre

la RNasa L R462Q y el cáncer de próstata indicando que la enfermedad puede estar relacionada con otros genes y factores (Dayal et al., 2017).

### **1.7.2 Síndrome de Fatiga Crónica (SFC) y fibromialgia**

En primer lugar, el síndrome de fatiga crónica es un desorden caracterizado por una fatiga incapacitante que dura al menos 6 meses, y va acompañada de otro tipo de síntomas (Afari et Al., 2003), es decir, la fatiga tiene que ser lo suficientemente severa para perder de forma parcial o completa la función física o social y síntomas como la perturbación del sueño, deterioro de la concentración, dolor muscular, dolor multiarticular, dolores de cabeza, dolor de garganta, exacerbación post-exercional de la fatiga y ganglios linfáticos sensibles (Cleare et al., 2003). Del mismo modo, la fibromialgia se encuentra asociada y es comórbida al SFC, por lo tanto, los pacientes afectados con la enfermedad muestran síntomas que se superponen con los de SFC (Oltra et al., 2020).

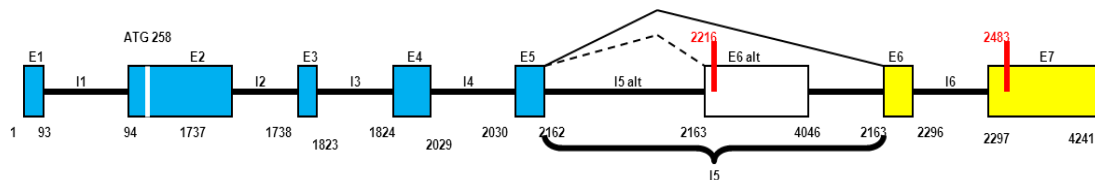
Existen varios informes que establecen la regulación al alza de determinados componentes de la vía 2-5 A/RNase L en extractos de células mononucleares de sangre periférica pertenecientes a pacientes con el Síndrome de Fatiga Crónica. De la misma forma, se ha indicado la presencia de la proteína de unión 2-5 A conteniendo el peso molecular de 37 kDa, lo que podría determinar y ser un marcador bioquímico potencial del Síndrome de Fatiga Crónica. El polipéptido de 37 kDa pudiera ser un producto de degradación de la enzima RNasa L. Este producto de degradación presente en los extractos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con SFC, posiblemente por una mayor presencia de elastasa en sangre, provocando la acumulación del polipéptido de 37 kDa (Silverman et al., 2007). Aspecto que no ha llegado a confirmarse en otras cohortes de pacientes.

## **1.8 HIPÓTESIS DE LA APARICION DE LA FORMA DE 70 kDa**

Posteriormente el grupo de la Dra. Oltra detectó, mediante análisis de western blot de muestras de PBMCs de pacientes afectados por el síndrome de fatiga crónica y por fibromialgia, establecía la posibilidad de una forma no descrita de la enzima RNasa L

con un peso molecular aproximado de 70 kDa, que parecía estar sobreexpresada en pacientes (datos no publicados).

Una de las posibilidades que explicaría la aparición de la nueva isoforma de 70 kDa podría ser producto de splicing alternativo de un sitio críptico del gen la RNasa L. Esta nueva hipotética isoforma compartiría los exones 1-5, un sitio de empalme críptico, en el intrón más largo (Intrón 5), produciendo una forma acortada de la RNasa L de sólo 652 aminoácidos, en vez de 741. Este nuevo Exón 6 altera el marco de lectura truncando la secuencia C-terminal (que carece de 106 aminoácidos en el extremo C-terminal).



*Figura 4: Estructura del gen de la RNasa L humana: propuesta de corte y empalme alternativo. Cajas azules indican los 5 primeros exones, caja blanca indica sitio de empalme críptico, cajas amarillas indican exones 6 y 7 (Fuente: Elisa Oltra)*

Es por ello por lo que se ha establecido la posibilidad de que los síntomas observados en pacientes con síndrome de fatiga crónica estén relacionados con la enzima RNasa L de 70 kDa y sus características funcionales diferentes a la enzima nativa de 83 kDa.

## 2 OBJETIVOS

A lo largo de los años, se ha conocido que la enzima RNasa L, activada cuando se produce infección vírica (Mannivanan et Al.,2020) tiene un peso molecular de 83 kDa. Sin embargo, en investigaciones anteriores realizadas por la Dra. Elisa Oltra se ha descubierto otra aparente forma de 70 kDa (datos no publicados). Previo inicio de este proyecto se confirmó la presencia del posible transcrito descrito (Figura 6, datos no publicados) y se utilizó un péptido sintético correspondiente a los 17 aminoácidos exclusivos del C-terminal en la isoforma hipotética de 70 kDa para inmunizar conejos, generando así un anticuerpo “custom” para su detección de forma específica (Abgent Technologies).

Con ello, los objetivos de esta investigación fueron los siguientes:

Objetivo general:

El objetivo general de este TFG fue ensayar la utilidad de un anticuerpo “custom” para detectar la isoforma de RNase L de 70 kDa, como posible herramienta para estudios de esta nueva isoforma.

Objetivos específicos:

1. Producir preparaciones stock de constructos de expresión de las isoformas de RNase L en estudio libres de endotoxinas bacterianas.
2. Transfectar células humanas en cultivo con constructos de expresión de la nueva isoforma de RNase L 70 kDa y de la “wild type” de 83 kDa para su sobreexpresión y análisis por western blot.
3. Confirmar la utilidad y funcionamiento del anticuerpo “custom”, denominado POLY 33, para la detección específica de la nueva isoforma de 70 kDa en comparación a otros anticuerpos comerciales para la detección de ambas isoformas.

4. Evidenciar la existencia de la forma de 70 kDa, además de la ya descrita de 83 kDa, en células mononucleares de sangre periférica y su posible relación con el síndrome de fatiga crónica y/o fibromialgia.

## **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

A continuación, se describen los materiales y métodos que se utilizaron para alcanzar los objetivos descritos ordenados según cronología de ejecución del proyecto.

### **3.1 MATERIALES**

#### **3.1.1 Líneas celulares**

En primer lugar, cabe destacar que en esta investigación se utilizó el tipo celular HEK 293T (ATCC CRL-11268), a pesar de haber realizado la transfección de manera no satisfactoria con otros tipos celulares como: células MEF (ATCC CRL-2907), MEF (KO) (ATCC CRL-2911) y SH (ATCC HTB-11).

Las HEK 293T consisten en células embrionarias de riñón humano y debido a que son unas células muy apropiadas para realizar la transfección al transfectarse fácilmente, han sido ampliamente utilizadas para todo tipo de investigaciones relacionadas con la biología celular. Con el fin de realizar la transfección se utilizaron tres clones de pCDNA 3.1 conteniendo RNasa L wild type de 83 kDa y RNasa L mutante de 70 kDa cada uno realizando la transfección en una placa de 6 pocillos.

#### **3.1.2 Medios de cultivo**

En segundo lugar, para llevar a cabo el cultivo de las células, como medio base se utilizó medio DMEM (Thermo Fisher Scientific, cat #11965118) Este medio de cultivo está compuesto de glucosa y piruvato sódico y no contiene proteínas, lípidos u otros factores de crecimiento.

Al realizar el cultivo de células HEK 293T y antes de depositarlas en la placa de 6 pocillos las células estuvieron cultivadas en frascos de 25 ml y por lo tanto para levantar las células de los frascos se utilizó tripsina 1X (Thermo Fisher Scientific, cat #R001100), RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, cat #11875101) y PBS (Thermo Fisher Scientific, cat #10010023).

### **3.1.3 Agentes de transfección**

Para realizar la transfección se utilizaron varios tipos de protocolos y agentes de transfección entre los que se incluye el X-tremeGene HP (Sigma Aldrich, cat #6366236001, Genejuice (Sigma Aldrich, cat #70967), y Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific, cat #L3000001), aunque posteriormente solo se empleó el protocolo de Lipofectamina 3000, ya que tras realizar una prueba con GFP, la mayor cantidad de fluorescencia y por lo tanto el mayor éxito de transfección se observó con ese agente.

### **3.1.4 Extractos para el análisis por western blot**

Se contaba ya con una colección de muestras control y muestras de pacientes extraídas de PBMCs congeladas en solución de carga y almacenadas a -20°C.

### **3.1.5 Marcadores**

Los marcadores utilizados en todos los casos fueron: Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, #26620, 10 a 250 kDa), Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, #26616, 10 a 180 kDa) y Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, con número de #26623, 10 a 260 kDa).

## **3.2 PRODUCCIÓN Y AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE LA ENZÍMA RNasa L**

### **3.2.1 Transformación bacteriana**

Al realizar la transformación bacteriana se realizó el protocolo por Heat Shock. Para realizar la transformación se tomó un vial de bacterias competentes (almacenadas a -80°C). A continuación, se descongelaron lentamente en hielo y se añadió 1-5µl de la reacción de ligación y del plásmido correspondiente, que previamente se había centrifugado a 800 rpm durante 1 minuto y se mezcló suavemente. Posteriormente se depositó en hielo durante al menos 30 minutos para a continuación aplicarle un choque térmico a 42°C en un tiempo entre 60 y 90 segundos. Inmediatamente, se depositó en hielo durante 1-2 minutos. El siguiente paso consistió en añadir medio SOC en una cantidad de 500 a 1000 µl, en nuestro caso, específicamente 750 µl y se puso en agitación con aireación a 250 rpm durante aproximadamente 1 hora. Se centrifugó 3

minutos a 500 rpm, y una vez finalizada la centrifugación, el sobrenadante obtenido se volcó para eliminarlo y con el líquido sobrante se resuspendió y se plateó con bolas de cristal estériles. Las placas utilizadas tuvieron que ser de ampicilina (concentración final de 75µg/ml). La transformación se concluyó con una incubación a 37°C durante toda la noche, y debido a que la transformación se realizó de forma efectiva, se observaron colonias de color blanco en la placa.

Una vez se obtuvieron las colonias en las 3 placas correspondientes, se extrajeron 2 colonias por placa y se depositaron en 6 tubos diferentes, es decir, 2 tubos por cada placa, y en cada tubo una colonia. Los tubos contenían 5 ml de medio LB, suplementado con ampicilina y se incubó a 37°C 10-12h, en agitación a 225rpm. Se continuó el protocolo realizando un cultivo en frascos Erlen Meyer con 50-250 ml/frasco de LB suplementado con ampicilina y se incubó a 37°C 16-18h (overnight), en agitación a 225 rpm para la obtención de suficientes bacterias para realizar una Maxi Prep de cada plásmido.

### **3.2.2 MAXI PREP**

El cultivo de bacterias obtenido overnight se expuso a una centrifugación de 6000 RCF durante 15 minutos a 4°C, obteniéndose un peso de 280.36 gr para el tubo 1, y 261.66 para el tubo 2, por lo tanto, se añadió 20 ml de LB al tubo 2 para que los tubos tuviesen aproximadamente el mismo peso.

El pellet se resuspendió en 10 ml de Buffer P1, asegurándose previamente de que la RNasa A se añadió al Buffer P1. Se continuó añadiendo 10 ml de Buffer P2 y se mezcló invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. El siguiente paso consistió en añadir 10 ml de Buffer P3 y repetir la inversión también de 4 a 6 veces y se puso en hielo durante 20 minutos. Después se centrifugó a mínimo 20,000 RCF durante 30 minutos a 4°C y se trasladó el sobrenadante, el cual contenía el plásmido a otro tubo, obteniéndose un peso de 54,71 gr en el tubo 1 y 53, 97 gr en el tubo 2, y, por consiguiente, se añadió la cantidad necesaria de agua al tubo 2 para que ambos tuviesen un peso estimado de 54,71 gr.

Se volvió a centrifugar a mínimo 20,000 RCF durante 15 minutos a 4°C y se volvió a extraer el sobrenadante conteniendo el plásmido a un nuevo tubo, esta vez obteniéndose un peso de 51,19 gr en el tubo 1 y 52,44 gr en el tubo 2.

A continuación, se equilibró a QIAGEN-tip 500 aplicando 10 ml de Buffer QBT y dejamos que la columna se vaciase por gravedad. Después se aplicó a las columnas el sobrenadante obtenido con anterioridad y se permitió que entrase en la resina mediante “flow por gravedad”. Se lavó el QIAGEN tip 500 con 2 x 30 ml de Buffer QC, con un segundo lavado opcional justo después, y se eluyó el ADN con 15 ml de Buffer QF.

El protocolo continuó al día siguiente llevando a cabo la precipitación del ADN añadiendo 10,5 ml de isopropanol al ADN eluído el día anterior. Se mezcló y se centrifugó a mínimo 15,000 RCF durante 30 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante, obteniéndose un peso de 44,59 gr para el tubo 1 y 44,78 para el tubo 2, y por ello se extrajo la cantidad necesaria de isopropanol para obtener aproximadamente un peso de 44,78 gr en los 2 tubos. Se volvió a realizar una centrifugación opcional obteniéndose para los 2 tubos un peso aproximado de 31 gr.

Posteriormente, se lavó el pellet de ADN con 5 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 15,000 RCF durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante cuidadosamente. Si los tubos fuesen cónicos la centrifugación debería ser a 5000 RCF durante 60 minutos a 4°C. Se secó al aire durante 5-10 minutos y se volvió a disolver el ADN en un volumen apropiado de buffer. Finalmente observamos en el NanoDrop para medir la observancia de nuestras muestras y conocer la cantidad de ADN presente y si existió contaminación en las muestras.

### **3.2.3 Cuantificación y calidad del plásmido observado**

Tras realizar la Maxiprep obtuvimos como resultado 2 tubos diferentes consistiendo en:

1. pCDNA 3.1 conteniendo la RNasa L de 83 kDa wild type
2. pCDNA 3.1 conteniendo la RNasa L de 70 kDa mutante

A continuación, se prosiguió con el NanoDrop. Este instrumento permite medir con gran precisión y reproducibilidad medidas de espectrofotometría con diferentes longitudes de onda que van desde 220 a 750nm. Por lo tanto, se comenzó levantando el pedestal superior. Mediante el uso de una micropipeta, se depositó 1  $\mu$ l de muestra en el pedestal inferior. Justo después, se cerró el pedestal superior y se inició el software correspondiente. Entre muestra y muestra fue necesaria la limpieza de ambos pedestales con papel de laboratorio para evitar cualquier tipo de contaminación. Finalmente, se obtuvo la cantidad de ADN presente en cada muestra y las absorbancias a 260/280 y 260/230.

### **3.3 CULTIVOS CELULARES**

#### **3.3.1 Mantenimiento de células**

Para llevar a cabo la transfección de las células primero se realizó la siembra de células, que en este caso fueron células HEK, MEFs, SH, y MEFs -/-. Las células se encontraban incubándose en frascos y, por lo tanto, se eliminó el sobrenadante, y se añadió 3 ml de tripsina para lavar las paredes de este. Se continuó añadiendo otros 2 ml de tripsina y 5 ml de medio completo o medio DMEM. Finalmente se añadió 200  $\mu$ l por pocillo en una placa de 6 pocillos.

#### **3.3.2 Pase de células**

Para realizar el pase primero se desechó el medio del frasco de células. Después se realizó un lavado con PBS, RPMI-1640 o tripsina 1X. En el caso del PBS se añadió 5 o 10 ml y después 3 ml de tripsina. En el caso de utilizar solamente tripsina primero se añadió 2 ml y después 3 ml para lavar la pared. A continuación, se incubó a 37°C durante 2 minutos en el caso de las células MEF y HEK, y 3 minutos en el caso de las MEF KO. Una vez acabada la incubación se golpeó el frasco de células para observar si las células estaban despegadas de la superficie. El proceso continuó añadiendo 5 ml de medio completo o DMEM dejándolo caer por la pared. Las células se pasaron a un tubo de 15 ml y se centrifugó a 300 RCF durante 5 minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió las células en 3 ml.

### 3.4 TRANSFECCIÓN

Al llevar a cabo la transfección, en un principio, se utilizaron diferentes agentes de transfección tales como la lipofectamina 3000 y el EXTREME GENE HP siendo el protocolo de la lipofectamina el que mayor eficiencia mostró al realizar la transfección, y, por lo tanto, con el que se continuó la investigación.

El vector introducido en el plásmido bacteriano fue pCDNA 3.1 siendo KpnI y XhoI los sitios en los que se introdujo los ORFs. Este ADN plasmídico fue el que posteriormente se introdujo en las células HEK 293T mediante diversas transfecciones.

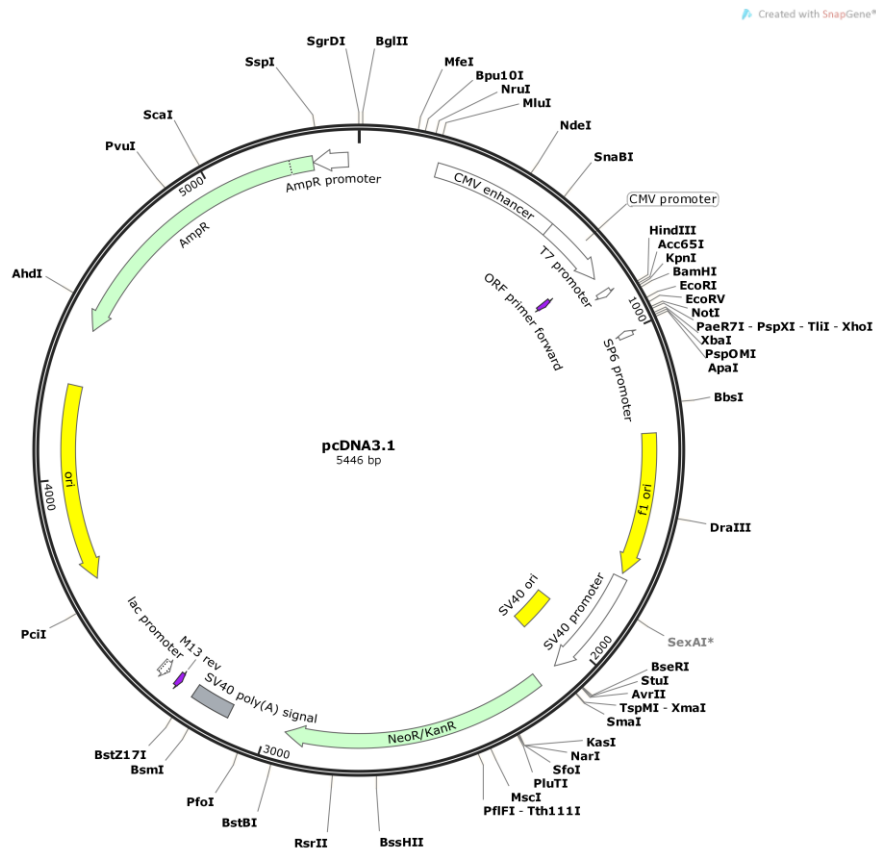


Figura 5: Mapa del vector pCDNA 3.1

### **3.4.1 Lipofectamine 3000**

Para este protocolo se prepararon 4 tubos de 2ml (dos tubos "A" y dos tubos "B"), ya que dos de los tubos fueron destinados a los 3 primeros pocillos que contendrán la pCDNA 3.1 con la RNasa L de 83 kDa, y los otros dos tubos para los 3 siguientes pocillos el pCDNA 3.1 con la RNasa L de 70 Kda.

A los tubos "A" tanto de los pocillos 1 al 3, como el de los pocillos 4 al 6, se les añadió 375 µl de Optimem y 15 µl de Lipofectamina. Una vez añadido, hubo que realizar un vortex de forma suave durante unos segundos. A los tubos "B" se les añadió 375 µl de Optimem, 30 µl de P3000 y 7 µl de GFP para poder ver si la transfección se realizó de forma correcta. Sin embargo, la cantidad de ADN para el tubo "B de los pocillos que contenían la RNasa L de 83 kDa (pocillos 1-3) fue de 12,29 µl, mientras que la de los pocillos que contenían la enzima de 70 kDa (pocillos 4-6) fue de 10,52 µl.

El siguiente paso consistió en añadir el contenido del tubo B al tubo A, obteniendo entonces 2 tubos, los cuales se repartirán equitativamente en sus respectivos tres pocillos. Tras realizar la transfección las placas se incubaron durante unas 48 a 72h y finalmente se observaron bajo el microscopio.

### **3.4.2 X-tremeGENE HP**

Para realizar el protocolo de transfección con el EXTREME GENE HP primero se dejó equilibrar el X-tremeGENE HP, el ADN y el diluent (medio sin suero u Optimem) a 15-25°C y se vortexeó el vial conteniendo el X-tremeGENE HP. Posteriormente se prepararon cuatro tubos conteniendo las siguientes cantidades:

- Tubo 1: 100µl OPTIMEM, 1µg de ADN y 1µl de X-TREME GENE HP
- Tubo 2: 100µl OPTIMEM, 1µg de ADN y 2µl de X-TREME GENE HP
- Tubo 3: 100µl OPTIMEM, 1µg de ADN y 3µl de X-TREME GENE HP
- Tubo 4: 100µl OPTIMEM, 1µg de ADN y 4µl de X-TREME GENE HP

A continuación, se mezcló suavemente y se realizó una incubación durante 30 minutos. Finalmente se depositó en gotas sobre los diferentes pocillos, en este caso, una placa de 12 y se removió cuidadosamente y se puso a incubar durante 18 a 72h. A su vez a

los dos primeros pocillos de cada fila se les añadió 2,4 µl de GFP y a los dos últimos pocillos 4,2 µl de RFP.

Debido a que hubo que realizar varias transfecciones para asegurar la eficacia del proceso, fue necesario realizar varios pases de células con el fin de seguir incubando las células y eliminar el gran porcentaje de células muertas.

### **3.5 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNA TOTAL**

Al llevar a cabo la extracción de las proteínas, solo fue necesario realizarlas de las muestras celulares transfectadas, ya que las muestras de sangre periférica de los pacientes habían sido extraídas varios años antes y estaban almacenadas en el congelador. El protocolo de extracción se realizó con el reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER, y para células HEK 293T que se habían transfectado con anterioridad y células MEF, MEF -/- y SH que estaban incubadas sin transfectar.

#### **3.5.1 Protocolo de extracción con M-PER**

Primero de todo, se desechó el medio de cultivo de las células adheridas. Consecuentemente, se añadió el reactivo M-PER a los pocillos. En el caso de las células HEK 293T transfectadas, al estar depositadas en una placa de 6 pocillos se añadió 250 µl de M-PER, mientras que para el resto de las células que estaban incubadas en frascos se añadió 500 µl.

El siguiente paso consistió en raspar los pocillos y los frascos con un raspador de células durante aproximadamente 5 minutos. Posteriormente se recogió el lisado y se transfirió a tubos de microcentrifuga. Se centrifugó a aproximadamente 14,000 RCF durante 5 minutos hasta obtener un pellet. Finalmente se transfirió el sobrenadante, que es donde se encontrará nuestras muestras de proteína a tubos de 1,5 ml.

### 3.6 PROTOCOLO DE WESTERN BLOT

Una vez extraídas las proteínas y almacenadas en el congelador hasta ser utilizadas se comenzó a preparar el protocolo de western blot. Por lo tanto, primero de todo, se tuvo que preparar los geles de poliacrilamida.

#### 3.6.1 FABRICACIÓN DE GELES 10% DE POLIACRILAMIDA

Para realizar el protocolo de western blot, primero se tuvieron que fabricar los geles de poliacrilamida, tanto el stacking gel, como el resolving gel. Se cogió un cristal grueso de 0,5 mm y otro delgado de 0,25 mm y se unieron con sus respectivas pinzas quedando entre ellos un hueco de unos 0,25mm, representando el grosor del gel, donde se depositó la mezcla tanto del resolving como del stacking gel. Para la fabricación de los geles se utilizaron las siguientes medidas:

*Tabla 2: Cantidades para la fabricación del stacking gel*

1 GEL Stacking	
Concentración final de poliacrilamida	4%
H <sub>2</sub> O	2192 µl
10% SDS (0,1% final)	40 µl
0,375 Tris pH 6,8 (0,126M final)	1344 µl
Acilamida 40% (1:29)	400 µl
APS 10% (0,05% final)	20 µl
TEMED (0,1% S 0,5% R Final)	4 µl
Volumen TOTAL	4000 µl

Tabla 3: Cantidades para la fabricación del resolving gel

1 GEL Resolving	
Concentración final de poliacrilamida	10%
H2O	3876 $\mu$ l
10% SDS (0,1% final)	80 $\mu$ l
1,5 M Tris-HCL pH 8,8 (0,375 final)	2000 $\mu$ l
Acrilamida 40% (1:29)	2400 $\mu$ l
APS 10% (0,05% final)	40 $\mu$ l
TEMED (0,1% S 0,5% R Final)	4 $\mu$ l
Volumen TOTAL	8000 $\mu$ l

Al empezar, primero se preparó el resolving gel con las medidas y cantidades representadas anteriormente y se pipeteó en el hueco entre los dos cristales hasta llegar al límite, y se añadió una pequeña cantidad de isopropanol para que polimerizase de forma correcta antes de añadir el stacking gel. Una vez polimerizado se añadió el stacking gel y se depositó el peine en el borde para crear los pocillos donde se depositaron las muestras.

### 3.6.2 Análisis de Western Blot

#### 3.6.2.1 Carga y corrida del Gel

Una vez preparados varios geles para poder emplear diferentes muestras, se colocaron los geles en la cubeta de electroforesis junto con el running buffer y se pipetearon las muestras en el gel junto con el marcador. De marcador se pipeteó 12  $\mu$ l y de las muestras, consistiendo en muestras de las células, muestras de pacientes o de sangre periféricas, y muestras control se pipeteó entre 17,5 y 25  $\mu$ l, dependiendo del gel, utilizando generalmente la cantidad de 19  $\mu$ l. La cubeta de electroforesis se conectó a la corriente a un voltaje constante de 150 V y se dejó correr durante 1h.

### **3.6.2.2 Transferencia del Gel**

El siguiente paso consistió en preparar la transferencia. Primero de todo sacamos el gel de la cubeta de electroforesis y separamos del soporte quitando las pinzas laterales. Posteriormente se pusieron los geles del revés, y con la ayuda de una pequeña espátula levantamos el cristal de menos tamaño. Debido a que el gel queda adherido en uno de los dos cristales al llevar a cabo la separación, se eliminó el stacking gel cuidadosamente.

Antes de comenzar este proceso, cabe recordar que se necesitan dos pequeñas bandejas, una conteniendo transfer buffer, para mojar los papeles de filtro, y otra conteniendo metanol para mojar la membrana utilizada. Una vez mojados los papeles de filtro, uno de ellos se depositó sobre el gel y se dio la vuelta, para que el papel de filtro, junto con el gel, quedase depositado en la mesa. Con la ayuda de la espátula de nuevo, separamos el gel del cristal. A continuación, cogimos la membrana, situada en la bandeja conteniendo metanol, y la dejamos caer, de forma centrada, sobre el gel, para finalizar depositando encima, otro papel de filtro, con el fin de mantener la humedad para que la membrana no se secase. Después continuamos eliminando las burbujas del “sándwich” formado, con la ayuda de una pipeta de 5 ml y una vez completado depositamos el “sándwich” en su soporte y dentro de la cubeta de electroforesis conectada a la corriente con un voltaje de 100 V.

El transfer buffer preparado con anterioridad se guardó en la nevera para enfriarlo antes de depositarlo en la cubeta, al igual que la cubeta de electroforesis se depositó en una caja rodeada con hielo ya que la transferencia fue necesaria hacerla en frío.

Al finalizar la transferencia, el soporte con el “sándwich” se extrajo de la cubeta y se desmontó separando con cuidado y mediante el uso de pinzas la membrana, la cual se posó durante 1 hora en otra bandeja conteniendo leche con PBS-T que se había preparado anteriormente con el objetivo de bloquear la membrana. Para preparar la leche se pesó 5 gr de leche en polvo y se mezclaron con 100 ml de PBS o PBS-T. Se puso a hervir y se dejó enfriar. Posteriormente, tras realizarse el bloqueó, la membrana se extrajo, y se preparó para añadir los anticuerpos.

### 3.6.2.3 Adición de los anticuerpos

Los anticuerpos para las diferentes membranas realizadas a lo largo de los días se listan a continuación (tabla 4 y 5):

Tabla 4: Lista de anticuerpos primarios empleados

Anticuerpo	Proveedor y #Catálogo	Antígeno	Tipo de Anticuerpo	Peso Molecular
<b>Primario</b>				
RNase L (C-17)	Santa Cruz Biotechnologies sc-22870	Against a peptide mapping near the C-terminus of RNase L of human origin	Goat polyclonal	83 kDa, 37kDa
RNase L (E-9)	Santa Cruz Biotechnologies sc-74405	against amino acids 442-741 mapping at the C-terminus of RNase L of human origin	Mouse monoclonal	83 kDa, 37kDa
RNase L (2E9.2G5)	Santa Cruz Biotechnologies sc-23955	Against human RNase L	Mouse monoclonal	83 kDa, 37 kDa
RNase L custom (POLY 33)	Abgent Technologies	Péptido sintético MSKLRHRQIIFPTTQNNQ ( <i>ABGENT Technologies, Ab custom service</i> )	Rabbit polyclonal	70 kDa
$\beta$ -Actin	Santa Cruz Biotechnologies sc- 130657	Against a peptide mapping near the C-terminus of $\beta$ -Actin of rat origin	Rabbit polyclonal	43 kDa, 15 kDa
Filamin 1	Santa Cruz Biotechnologies sc-17749	Specific for an epitope mapping between amino acids 5-40 near the N-terminus of Filamin 1 of human origin	Mouse monoclonal	280 kDa
SIGMA	Sigma Aldrich av-09034	Synthetic peptide directed towards the C terminal región oh human RNase L. Region: MKLKIGDPSLYFQKTFPDLVIYVY-TKLQNTTEYRKHFQTHSPNKQCDGA	Rabbit polyclonal	84 kDa

Tabla 5: Tabla de anticuerpos secundarios empleados

Anticuerpo	#Catálogo	Fuente
<b>Secundario</b>		
Goat anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnologies sc-2004	Goat against mouse
Goat anti-mouse	Santa Cruz Biotechnologies sc-2005	Goat against mouse
Mouse anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnologies sc-2357	Mouse against rabbit

Cabe destacar que los anticuerpos primarios C-17 y E9 no se emplearon finalmente al realizar el resto de la investigación. En primer lugar, cada membrana se depositó en una bolsa sellada junto con 10  $\mu$ l anticuerpo primario y 2 ml de PBS-T suplementada con leche desnatada al 3-5% preparada anteriormente. Se emplearon diferentes anticuerpos primarios señalados en la *tabla 4* para los diferentes western blots realizados. Las membranas con los anticuerpos primarios se dejaron reposar “overnight” con un balanceo de 25 oscilaciones/minuto. Al día siguiente, las membranas con los anticuerpos primarios se lavaron 3 veces durante 5 minutos por lavado con PBS-T o PBS, en una pequeña bandeja. Tras lavarse los anticuerpos primarios, se pusieron los anticuerpos secundarios en una cantidad de 2  $\mu$ l de anticuerpo por 5 ml de leche.

#### **3.6.2.4 Visualización y revelado de las membranas**

El siguiente paso consistió en revelar las fotos con el programa IMAGEQUANT 2000. Para revelar las muestras primero de todo se utilizaron fundas de plástico en las cuales

se depositó 0,5 ml de sustrato Pierce ECL Western Blotting substrate y posteriormente las membranas, con el objetivo de observar quimioluminiscencia a través del ordenador.

### **3.6.2.5 Reblotting**

Al no visualizar ninguna señal se llevó a cabo la técnica de re-blot, que consistió en la adición de un segundo anticuerpo primario sin eliminar ("strip") el anticuerpo primario usado en primera instancia. Es una práctica habitual cuando no hay registro de señal o el registro que se espera del re-blot corresponde a pesos moleculares claramente distintivos. Para ello se lavó la membrana 3 veces con PBST durante aproximadamente 20 minutos, y se volvió a añadir otro anticuerpo primario junto con el anticuerpo secundario. Tanto el anticuerpo primario como el secundario se incubaron durante 1h.

## **3.7 TINCIÓN CON ROJO PONCEAU**

Al terminar de visualizar las membranas con el software IMAGE QUANT 2000, se llevó a cabo la tinción con rojo Ponceau, preparado anteriormente disolviendo 0,5 g de Ponceau S en 1 ml de ácido acético y añadiendo hasta 100 ml con agua.

En primer lugar, la membrana se separó de la funda de plástico en la que se había depositado junto con el sustrato. Para continuar, se cogió una pequeña bandeja donde se añadió el rojo Ponceau y se sumergió la membrana en su interior. Justo después se puso en el see-saw rocker a un balanceo de 25 oscilaciones/min durante aproximadamente 5 minutos. Finalmente se lavó con agua bidestilada para quitar el exceso de colorante y se pudieron observar las diferentes bandas de color rojo gracias a la tinción.

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO RECOMBINANTE DE EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE RNASE L**

La técnica de la Maxiprep es una técnica utilizada para aislar grandes cantidades de ADN plasmídico de una alta calidad, en este caso, conteniendo específicamente, el vector mencionado con anterioridad pCDNA 3.1 con la RNasa L de 83 kDa wild type y

RNasa L de 70 kDa mutante. Tras realizar la Maxiprep se determinó la cantidad de DNA obtenido y sus respectivas absorbancias con el NanoDrop obteniendo los siguientes resultados (tabla 6):

Tabla 6: Resultados del Nanodrop

<b>Constructos de DNA</b>	<b>ng/μl de DNA</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>	<b>μgTotales</b>
pCDNA 3.1 RNasa L 83 kDa wild type	488 ng/μl	1,85	2,19	6μg
pCDNA 3.1 RNasa L 70 kDa mutante	570,6 ng/μl	1,84	2,16	6μg

Como se puede observar, a una absorbancia de 260/280 todas las muestras obtuvieron un valor entre 1,8 y 2,0, lo que establecería que todas las muestras tenían una pureza óptima, y no existió contaminación por proteínas. Sin embargo, si la A260/280 fuese menor de 1,6 significaría que las muestras posiblemente estuviesen contaminadas por la presencia de determinados compuestos como proteínas y fenoles. Por el contrario, una A260/280 mayor de 1,8, establecería que existe presencia de ARN en las muestras. Esto coincide con los valores representados en el “Programa Control de Calidad de Muestras de ADN y ARN” (Banco ADN; 2020)

De la misma forma, todas las muestras presentaron un valor en torno a 1,8 y 2,2 a una A260/230, lo que también establecería la pureza de la muestra, ya que, por el contrario, un valor menor de 1,8 supondría la contaminación de las muestras con compuestos orgánicos, agentes caotrópicos, fenoles o carbohidratos, ya que absorben a 230nm. Cuanto menor sea el valor de la absorbancia por debajo de 1,8, mayor presencia de contaminantes presentarían las muestras. (Banco ADN, 2020). Por lo tanto, estos

resultados también con los valores establecidos en el “Programa Control de Calidad de Muestras de ADN y ARN”

## **4.2 PRODUCCIÓN DE LAS ISOFORMAS DE RNASE L DE 83 KDA Y 70 KDA EN CÉLULAS HEK-293T**

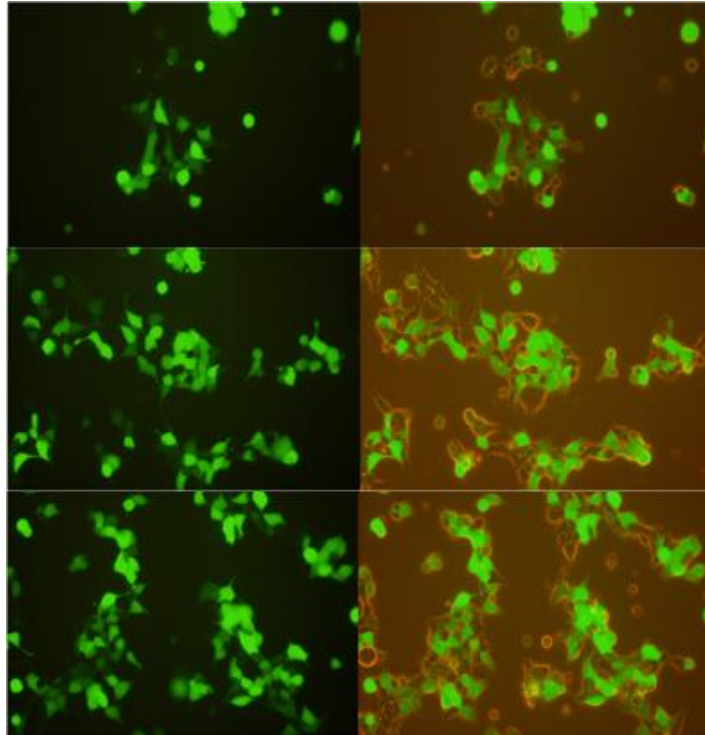
El siguiente paso consistió en producir las isoformas de RNasa L de 83 kDa y de 70 kDa en las células HEK-293T. Las células HEK-293T, o células embrionarias de riñón, fueron empleadas en la investigación para llevar a cabo la transfección con la RNasa L de 83 kDa wild type y de 70 kDa. Estas células se usan comúnmente como un huésped para llevar a cabo la transfección, ya que su tamaño, morfología, y tasa de división las hacen apropiadas para llevar a cabo este proceso (Ooi et al., 2016). La línea celular empleada fue la 293T, siendo esta una variante de las células 293, que contienen el antígeno SV40 y que es fácilmente transfectable (Ooi et Al., 2016). Por otra parte, se emplearon otros tipos celulares con el objetivo de encontrar posibles isoformas en los distintos tipos celulares. Los MEF se seleccionaron al disponer de células MEF de ratones knockout que podían ayudar a conocer mejor los mecanismos de acción de las isoformas en estudios de continuación. Las células SH son comúnmente utilizadas por su origen humano y sus propiedades neurológicas (Martens et al., 2017). Se utilizaron en esta investigación ya que los pacientes con SFC presentan problemas cognitivos, e infecciones virales con tropismo al SNC (Larun et al., 2019), por lo tanto, podían ser empleadas para estudiar la isoforma de 70 kDa. Sin embargo, las únicas células que pudieron ser transfectadas, fueron las primeras mencionadas, y, por lo tanto, se realizó western blots de muestras del resto de tipos celulares, pero sin transfectar.

La transfección se realizó con diferentes agentes, tales como Xtreme-Gene HP (Sigma Aldrich, #6366236001) y Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, #L3000001), sin embargo, se decidió emplear el segundo para el resto de la investigación, ya que es considerado como el agente de transfección con mayor porcentaje de éxito en células HEK-293T, y fue con el único con el que se obtuvieron resultados. A su vez, se añadió 7 µl de GFP para poder visualizar fluorescencia en el caso de que la transfección fuese exitosa.

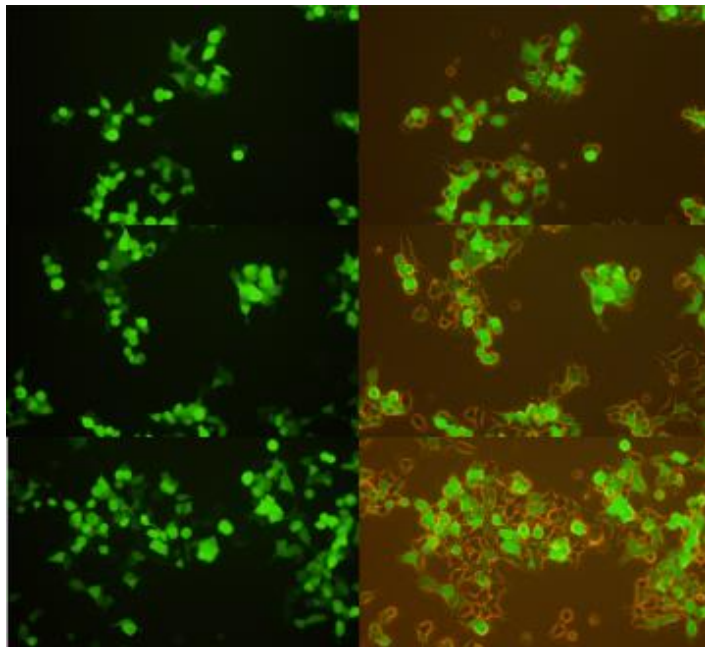
Tras realizar la transfección, las células se incubaron un tiempo entre 24 y 72 horas, en las cuales se observó si existía fluorescencia en los pocillos y se llevó a cabo la captura de imágenes tras 24 y 48 horas.

En primer lugar, las figuras 6 y 7 corresponden a imágenes de las transfecciones realizadas con el constructo pcDNA3.1-RNasaL/83kDa para la expresión de la proteína RNasa L de 83 kDa, a 24 y 48 h post-transfección respectivamente; mientras que las figuras 8 y 9 representan las realizadas con el constructo pcDNA3.1-RNasaL/70kDa para la producción/sobreexpresión de la enzima RNasa L de 70 kDa, a 24 y 48 h post-transfección respectivamente. En todos los casos se co-transfectó con el constructo pEGFP-C1 (a una relación 1:4) para que actuara como reportero de la eficiencia de transfección.

Como se puede observar en la fluorescencia con contraste de la *Figura 6* a la *Figura 9* (*paneles derechos*), la eficiencia de la transfección fue aproximadamente superior al 70% del total de las células como era de esperar, ya que como se describe en el estudio “Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents” (Ragimi et al., 2019) en el que se demuestra que la eficiencia de transfección en células HEK-293T para dos determinados vectores es superior al 52% (vector 1) y 53% (vector 2) con el agente de transfección lipofectamina 3000, destacando en esta investigación que el número de células transfectadas fue mayor a las 48 horas que las primeras 24 horas, coincidiendo con lo esperable para células en proliferación. Cabe destacar que algunas células que poseen una forma más circular y una fluorescencia más intensa podrían corresponder a células muertas, posiblemente a causa de la toxicidad del propio agente de transfección o de la sobreexpresión de la enzima RNasa L como se establece en el artículo “A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2–5A system. *The Journal of experimental medicine*” (Castelli et al., 1997). También podrían ser células en mitosis ya que durante división se redondean y la fluorescencia parece más notoria. No se utilizó ningún tinte dependiente de permeabilidad, como el Trypan blue para averiguar si se trataba de células en división o apoptóticas ya que el objetivo era simplemente producir extractos de proteínas a ensayar.



*Figura 6: Células HEK-293T transfectadas (3 pocillos) con el constructo pcDNA-3.1- RNasa L/83kDa 24 horas post transfección. Fluorescencia 488nm (izquierda), fluorescencia 488nm con contraste (derecha) (Objetivo 10X).*



*Figura 7: Células HEK-293T transfectadas (3 pocillos) con el constructo pcDNA-3.1- RNasa L/83kDa 48 horas post transfección. Fluorescencia 488nm (izquierda), fluorescencia 488nm con contraste (derecha) (Objetivo 10X).*

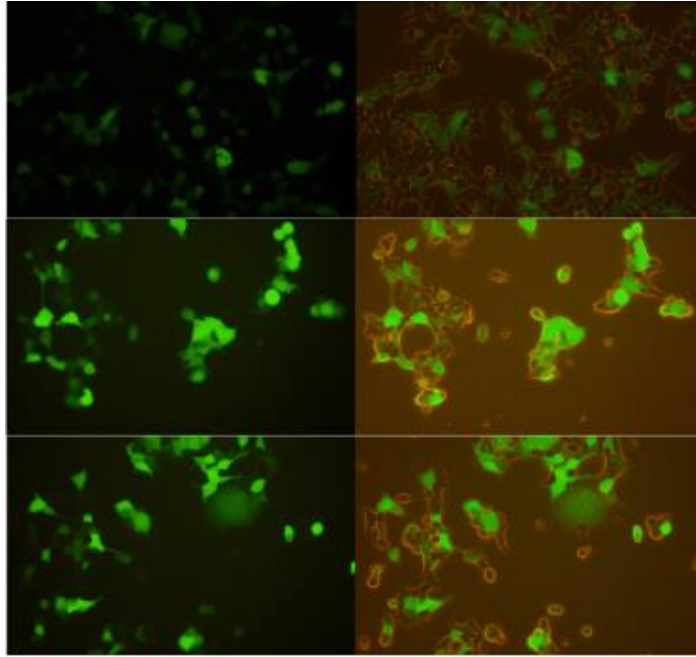


Figura 8: Células HEK-293T transfectadas (3 pocillos) con el constructo pcDNA-3.1- RNasa L/70kDa 24 horas post transfección. Fluorescencia 488nm (izquierda), fluorescencia 488nm con contraste (derecha) (Objetivo 10X).

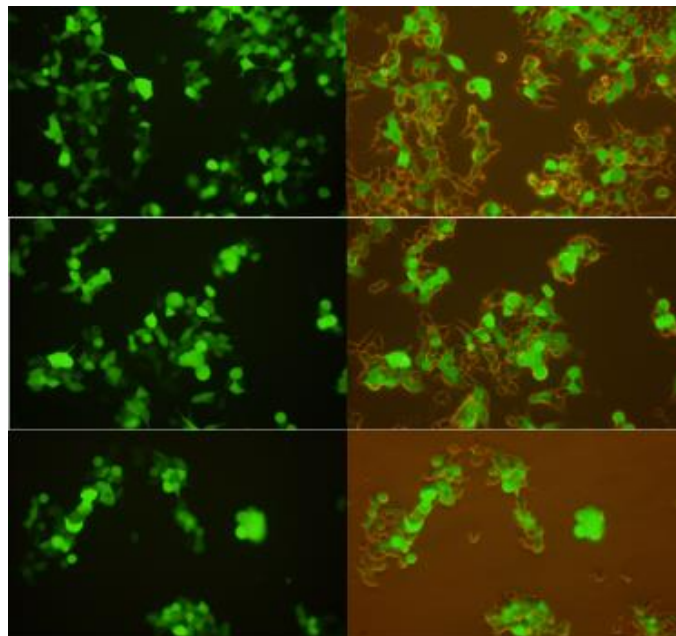


Figura 9: Células HEK-293T transfectadas (3 pocillos) con el constructo pcDNA-3.1- RNasa L/70kDa 48 horas post transfección. Fluorescencia 488nm (izquierda), fluorescencia 488nm con contraste (derecha) (Objetivo 10X).

Una vez transfectadas todas las células, se llevó a cabo la extracción de las proteínas con el reactivo M-PER ("Thermo Fisher Scientific", #78501), según descrito en Métodos, para pasar a realizar los western blots de las muestras extraídas.

#### **4.3 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LAS ISOFORMAS DE RNASE L 83 y 70 kDa**

Por consiguiente, se realizó la técnica de western blot tras la extracción de las proteínas. Esta es una técnica que consiste en la separación de diferentes proteínas llevada a cabo por una electroforesis en gel, para posteriormente ser transferidas a una membrana y llevar a cabo la detección del antígeno inmovilizado. Depende de la interacción específica entre el antígeno y el anticuerpo (Hnasko et Al., 2015). Es una técnica muy importante utilizada en diferentes campos como la biología celular y molecular para identificar diferentes proteínas por su peso molecular. Puede dividirse en tres partes principales: separación por tamaño, transferencia a un soporte sólido, y marcaje de las proteínas de interés con un anticuerpo tanto primario, como secundario con el objetivo de visualizar las membranas correspondientes. (Mahmood et Al., 2012).

Para realizar esta investigación se utilizaron los anticuerpos primarios 2E9, SIGMA, y POLY 33, siendo este último un anticuerpo personalizado creado a partir de anticuerpos de conejo. Como anticuerpos secundarios se emplearon los anticuerpos anti-mouse y anti-rabbit. En los diferentes geles se depositaron muestras de tipos celulares como MEF, MEF  $-/-$ , SH, HEK, destacando en especial las células HEK transfectadas con la RNasa L de 83 y de 70 kDa. También se utilizaron muestras de sangre periféricas extraídas de pacientes en el año 2012 y muestras control.

En un principio, al realizar los diferentes western blots, debido al gran número de muestras que se encontraban almacenadas desde el 2012, para conocer su estado tras el largo periodo de almacenamiento y al no obtener resultados (señal) empleando los anticuerpos primarios 2E9 y POLY33.1, se utilizaron los anticuerpos primarios  $\beta$ -actina y Filamina, como controles positivos, para verificar la presencia de proteínas celulares comunes en las muestras, y de que el ensayo de western blot funcionaba.

Se comenzó realizando western blots de diferentes muestras extraídas de diversos tipos celulares tanto sin transfectar como transfectadas, para posteriormente realizar los

mismos con muestras de PBMCs, y finalmente western blots conteniendo a la vez muestras celulares y de pacientes.

#### **4.3.1 WESTERN BLOT DE CÉLULAS**

Como se puede observar en la *Figura 10*, el gel contuvo en un inicio el anticuerpo primario 2E9 (sc-23955), y el anticuerpo secundario anti-mouse (sc-2005), sin embargo, no se observó ninguna banda ya que el anticuerpo no se unió de forma correcta a la membrana o la cantidad introducida de 10 µl de anticuerpo primario no fue suficiente. En un ensayo como este que requiere varios pasos, es difícil conocer el problema que puede haber llevado a la falta de detección. Para comprobar si el estado de los extractos almacenados era el problema, se lavó la membrana y se añadió el anticuerpo primario anti-filamina (sc-17749), utilizado al igual que la actina, como control positivo en muchos experimentos de western blot, y el anticuerpo secundario anti-mouse (sc-2005). La banda perteneciente al peso molecular de la Filamina no entró en el gel ya que tiene un peso molecular de 280 kDa como se menciona en el artículo "Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis." (Browne et Al., 2000) y la banda de mayor tamaño del marcador empleado es de 180 kDa, es por ello, que no se observó en el gel.

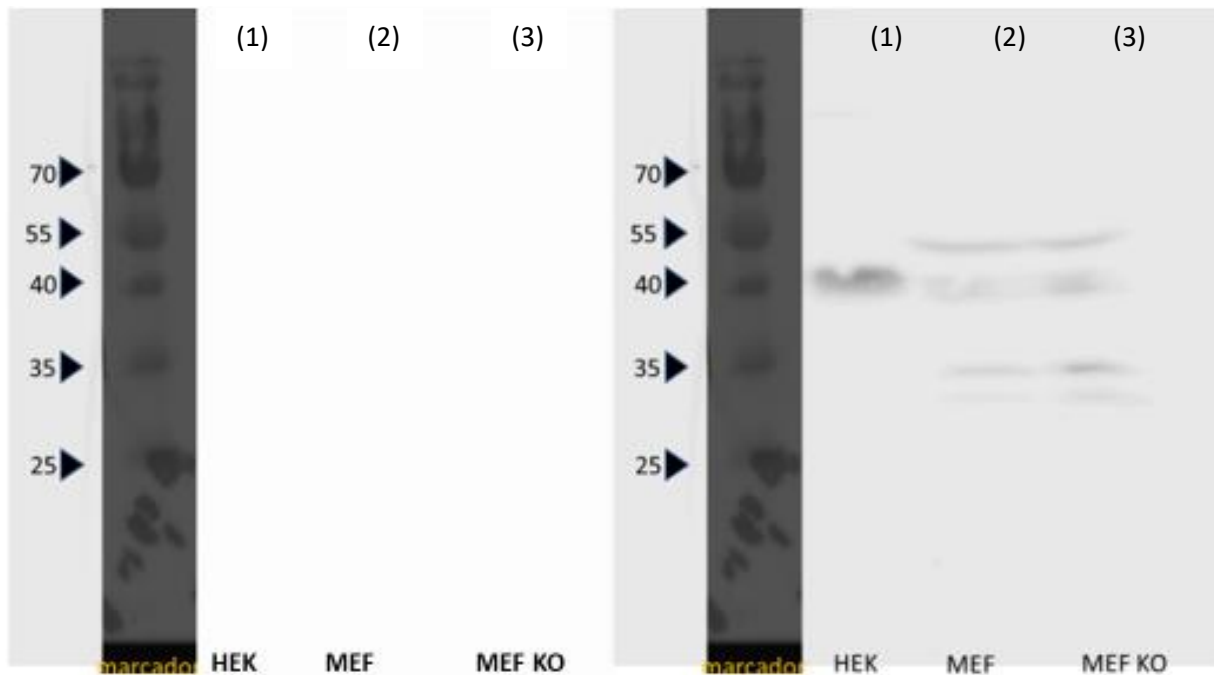


Figura 10: Análisis de western blot de células HEK-293T, MEF y MEF knockout (KO). Panel izquierdo muestra western blot utilizando el anticuerpo primario anti-RNasa L 2E9 (sc-23955) a una dilución 1:200, 16h a 25°C seguido de una incubación con el anticuerpo secundario anti-mouse (sc-2005) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. Panel derecho muestra western blot utilizando el anticuerpo primario Filamina (sc-17749) a una dilución 1:200, 16h a 25°C y anticuerpo secundario anti-mouse (sc-2005) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. La carrera 1 contiene una muestra de células HEK, mientras que las carreras 2 y 3 contiene las muestras de células MEF y MEF knockout. El marcador empleado es el Page Ruler Protein Ladder (10 a 180 kDa) (Thermo Fisher Scientific, #26616), a la izquierda se indican con triángulos los pesos moleculares en kDa.

A continuación, como se puede observar en la Figura 11, las 2 primeras líneas del gel de derecha a izquierda y contabilizando desde el marcador, conteniendo extractos de células HEK transfectadas con los constructos de expresión de la RNasa L de 83 kDa y de 70 kDa, respectivamente mostraron las bandas esperadas, detectadas por el anticuerpo primario 2E9 (sc-23955), y anticuerpo secundario anti-mouse (sc-2005). Como comentado en Métodos, el anticuerpo 2E9 comercial es capaz de detectar la RNasa L tanto de 83 kDa como de 70 kDa como se referencia en el artículo “Recurrent loss-of-function mutations reveal costs to OAS1 antiviral activity in primates” (Clayton et al., 2019) en el cual se emplea el anticuerpo 2E9 para la detección de la enzima. También destaca en la segunda carrera electroforética una banda de menor intensidad de 83 kDa.

Debido a que la enzima RNasa L es una enzima que está presente en el organismo en forma latente, y se activa por la vía 2-5 A cuando existe algún tipo de inflamación o infección (Nogimori et Al., 2019), es muy probable que esa banda observada sea la RNasa L endógena de las células. Sin embargo, en la carrera 3 (HEK sin transfectar) debiéramos detectar esta banda endógena. Aunque la cantidad total de extracto debiera ser equivalente (mismo número de células transfectadas que sin transfectar), al no contar con un control de proteínas totales de los extractos (ensayo Bradford o BCA, del inglés bicinchoninic acid assay) no se puede descartar que la diferencia resida en la carga de una cantidad inferior de proteínas totales. Tampoco se realizó en este caso una tinción rojo Ponceau de la membrana ni un re-blot con un anticuerpo house-keeping como el anticuerpo anti-actina que permitiera concluir si hubo diferencias de carga. Alternativamente, es posible pensar, sin embargo, que la fusión de liposomas durante la transfección puede inducir la expresión de la RNasa L endógena.

Para las células SH y HEK sin transfectar, no se pudo determinar ningún resultado significativo, debido a que, las ligeras bandas observadas podrían representar ruido de fondo. Posiblemente los bajos niveles de expresión de RNasa L requieran la preparación de extractos más concentrados que permitan su detección por western blot.

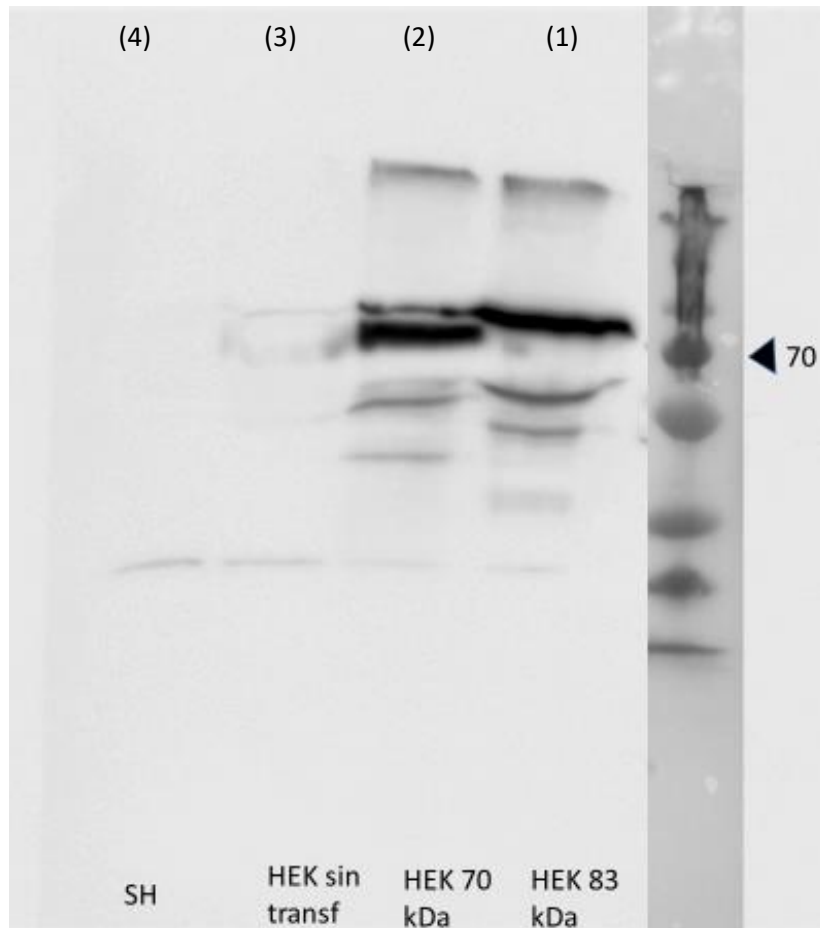


Figura 11: Análisis de western blot de células HEK-293T transfectadas y sin transfectar y células SH. Gel utilizando el anticuerpo primario anti-RNasa L 2E9 (sc-23955) a una dilución 1:100, 16h a 25°C y anticuerpo secundario anti-mouse (sc-2005) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. Las carreras 1 y 2 corresponden a las muestras de células HEK transfectadas con RNasa L, perteneciendo la carrera 1 a la RNasa L de 83 kDa y la carrera 2 a la RNasa L de 70 kDa. Las carreras 3 y 4 pertenecen a las células HEK sin transfectar y SH. Contiene el marcador Page Ruler Plus Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, #26620) (10 a 250 kDa), a la derecha se indican con triángulos los pesos moleculares en kDa.

En el siguiente gel se empleó el anticuerpo SIGMA (av-09034) y anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357). El anticuerpo de la casa comercial SIGMA (av-09034), que tal como se indica en la tabla de Métodos (tabla 4) reconoce una secuencia de la parte C-terminal, en concreto acorde a un alineamiento BLASTP (Figura 13) reconoce los aminoácidos en posiciones 681-730 y por tanto sólo debiera reconocer la isoforma de 83kDa y no la de 70kDa que no contiene esa región. Sin embargo, en la *Figura 12*, se aprecian dos bandas diferentes en todos los pocillos conteniendo los dos diferentes tipos celulares, células HEK transfectadas y sin transfectar con la RNasa de 83 kDa, y RNasa de 70 kDa, y células SH. Las bandas poseen en tamaño aproximado entre 55 kDa y 70kDa. Se presume que este anticuerpo reconoce otras secuencias de manera inespecífica, ya que el alineamiento BLASTP de secuencias humanas no identifica ninguna otra proteína que contenga esta secuencia peptídica (ver Figura 14).

Sirviendo, en este caso como ensayo house-keeping de los extractos, permitiendo apoyar la hipótesis que la falta de detección de la RNasa L en el western blot de la Figura 11 pudiera deberse a la estimulación del gen de la RNasa L por la lipofectamina más que a una diferencia a la baja en proteínas totales de la preparación HEK sin transfectar.

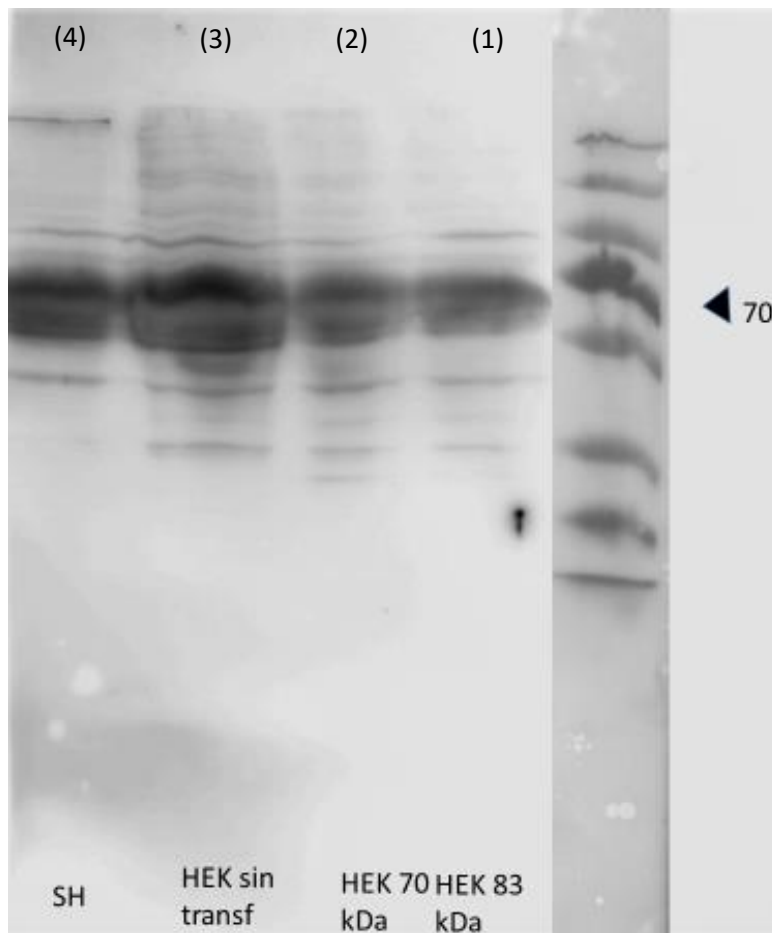


Figura 12: Análisis de western blot de células HEK-293T transfectadas y sin transfectar y células SH. Gel utilizando el anticuerpo primario SIGMA (av-09034) a una dilución 1:200, 16h a 25 °C, y anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357) a una dilución 1:2500. Las carreras 1 y 2 corresponden a las muestras de células HEK transfectadas perteneciendo la carrera 1 al tamaño de 83 kDa y la carrera 2 a 70 kDa. Las carreras 3 y 4 pertenecen a las células HEK sin transfectar y SH. Contiene el marcador Page Ruler Plus Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, #26620) (10 a 250 kDa), a la derecha se indican con triángulos los pesos moleculares en kDa.

### 2-5A-dependent ribonuclease [Homo sapiens]

Sequence ID: [NP\\_066956.1](#) Length: 741 Number of Matches: 1

[See 4 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 681 to 730 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [P](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
115 bits(289)	2e-28	Composition-based stats.	50/50(100%)	50/50(100%)	0/50(0%)
Query 1	MKLIKGDPSLYFQKTFPDLVIYVYTKLQNTTEYRKHFPQTHSPNKPQCDGA			50	
Sbjct 681	MKLIKGDPSLYFQKTFPDLVIYVYTKLQNTTEYRKHFPQTHSPNKPQCDGA			730	

Figura 13: Alineamiento BLASTP de la RNasa L

Sequences producing significant alignments									
Download <span>▼</span> <span style="color: red;">New</span> Select columns <span>▼</span> Show 100 <span>▼</span> <span>?</span>									
<input checked="" type="checkbox"/> select all 3 sequences selected <span style="float: right;"> <a href="#">GenPept</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a> <a href="#">Multiple alignment</a> <span style="color: red;">New</span> <a href="#">MSA Viewer</a> </span>									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">2-5A-dependent ribonuclease [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	115	115	100%	3e-31	100.00%	741	<a href="#">NP_066956.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Ribonuclease L (2' 5'-oligoadenylate synthetase-dependent) [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	115	115	100%	3e-31	100.00%	741	<a href="#">AA115698.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Complete human RNase L in complex with biological activators [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	89.4	89.4	78%	5e-22	100.00%	699	<a href="#">4OAU_C</a>

Figura 14: Alineamiento BLASTP de la RNasa L de secuencias humanas

### 4.3.2 WESTERN BLOT DE PBMCS

La Figura 15, muestra el resultado de western blot usando el anticuerpo primario “custom” POLY 33.1, y el anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357), sin embargo, no se observó ninguna banda. Ya que los extractos pertenecían a una colección almacenada desde 2012, se procedió a reincubar la membrana con el anticuerpo primario del gen house-keeping  $\beta$ -actina como control de calidad. Este método se usa con frecuencia como control interno de carga en western blots con propósito semicuantitativo o como control positivo del método, tal como se referencia en el artículo “Regulation of autophagy in rat hepatocytes treated in vitro with low concentration of mercury. *Toxicological & Environmental Chemistry*” (Chatterhee et Al., 2013) para confirmar la existencia de las muestras en la membrana. En el caso de la  $\beta$ -actina, como era de esperar se observaron las bandas señaladas en la figura de aproximadamente un tamaño de 43 kDa, peso molecular de la  $\beta$ -actina como está citado en el artículo “Pulmonary GLP-1 receptor increases at birth and exogenous GLP-1 receptor agonists augmented surfactant-protein levels in litters from normal and nitrofen-treated pregnant rats.” (Romaní-Pérez et Al., 2013).

En la muestra de paciente FM1 no se observó ninguna banda significativa, y en la FM25 es muy tenue, destacando simplemente la presencia de ruido de fondo, indicando una menor concentración de proteínas totales en los preparados de enfermos que en los controles. Dado que las muestras contenían ya solución de carga, no se pudo realizar un ensayo tal como Bradford o BCA para confirmar esta posibilidad.

Dado que el objetivo es el hallazgo de resultados cualitativos: presencia o no de banda de 83 kDa y de 70 kDa, o de la relación entre ellas, la cuantificación de proteínas totales

no resulta indispensable si bien puede limitar la detección por encontrarnos con isoformas poco abundantes.

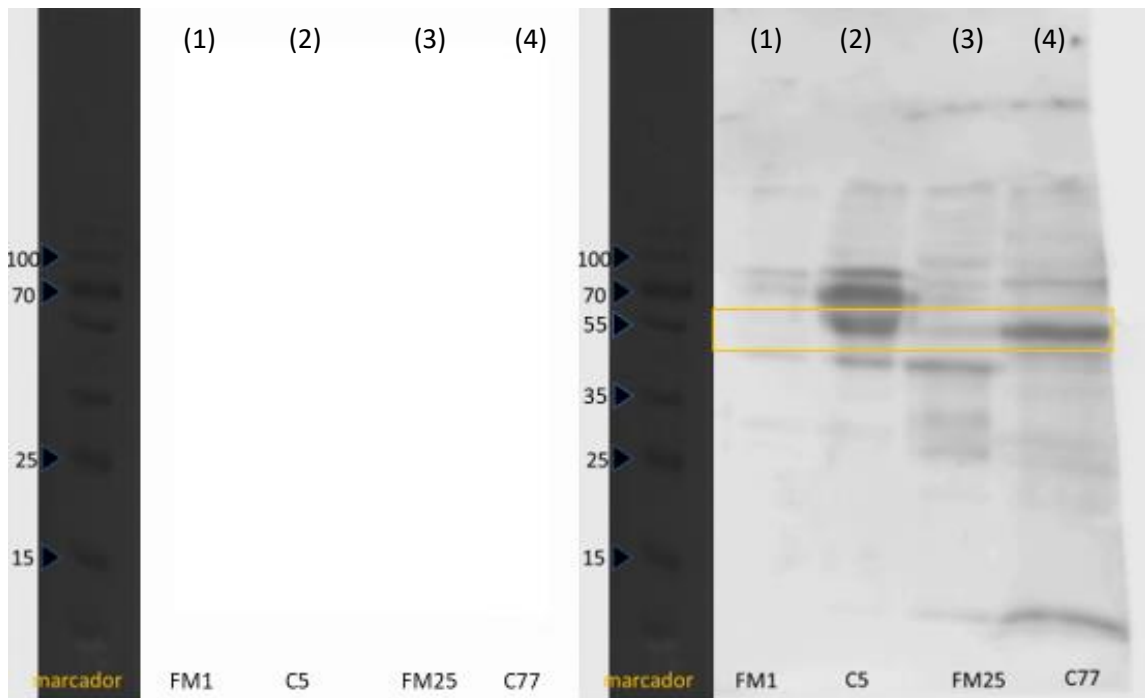


Figura 15: Análisis de western blot de PBMCs con SFC y controles. Panel izquierdo muestra western blot utilizando el anticuerpo primario anti-RNasa L custom POLY 33 a una dilución 1:200, 16h a 25°C seguido de una incubación con el anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. Panel derecho muestra western blot utilizando el anticuerpo primario Actina (sc-130657) a una dilución 1:200, 16h a 25°C y anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. Las carreras 1 y 3 contienen muestras de PBMCs y las carreras 2 y 4 muestras de controles. El marcador empleado es el Page Ruler Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, #26616) (10 a 180 kDa), a la izquierda se indican con triángulos los pesos moleculares en kDa.

### 4.3.3 WESTERN BLOTS DE CÉLULAS Y PBMCs

Como se puede observar en el panel inferior de la *Figura 16* el anticuerpo primario “custom” POLY 33.1, seguido del anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357), no permitió observar ninguna banda indicando niveles de expresión endógenos de todas nuestras muestras, incluyendo PBMCs y una serie de líneas celulares sin transfectar, por debajo de niveles detectables. Aspecto que quedó confirmado por el re-blot con anticuerpo anti-filamina (sc-17749). Como ya se ha mencionado anteriormente, la banda perteneciente al peso molecular de la Filamina no entró en el gel ya que tiene un peso molecular de 280 kDa como se menciona en el artículo “Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis.” (Browne et Al., 2000) y la banda de mayor tamaño del marcador empleado es de 180 kDa, y es por ello por lo que no se observó en el gel.

Sin embargo, en la *Figura 17*, tras teñir la membrana con rojo Ponceau sí que se observó presencia de bandas definidas indicando que los extractos no estaban degradados y que la falta de carga o problemas de transferencia no fueron los responsables de falta de señal en el western, sino que la ausencia de bandas sea posiblemente consecuencia de niveles de expresión muy bajos de RNasa L. Resulta interesante destacar en esta tinción que, así como el patrón de bandas en células de cultivo siguen un patrón de bandas mayoritarias similar, junto con controles, las muestras de PBMCs de pacientes muestran un patrón claramente distintivo. Patrón que pudiera deberse a algún sesgo de procedimiento (artefacto de extracción), o alternativamente, a la condición de la enfermedad. Esta última posibilidad debería contrastarse con análisis de muestras adicionales de PBMCs, quizás usando más de un método de extracción de proteínas.



Figura 16: Análisis de western blot de células HEK-293T, MEF y MEF knockout (KO), PBMCs con SFC y controles. Panel inferior muestra western blot utilizando el anticuerpo primario anti-RNasa L custom POLY 33 a una dilución 1:200, 16h a 25°C seguido de una incubación con el anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. Panel superior muestra western blot utilizando el anticuerpo primario Filamina (sc-17749) a una dilución 1:200, 16h a 25°C, y anticuerpo secundario anti-mouse (sc-2005) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. Las 3 primeras carreras contienen muestras de células HEK, MEF y MEF (KO), las 4 siguientes carreras de PBMCs y las 2 últimas de controles. El marcador empleado es el Page Ruler Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, #26616) (10 a 180 kDa), a la derecha se indican con triángulos los pesos moleculares en kDa.

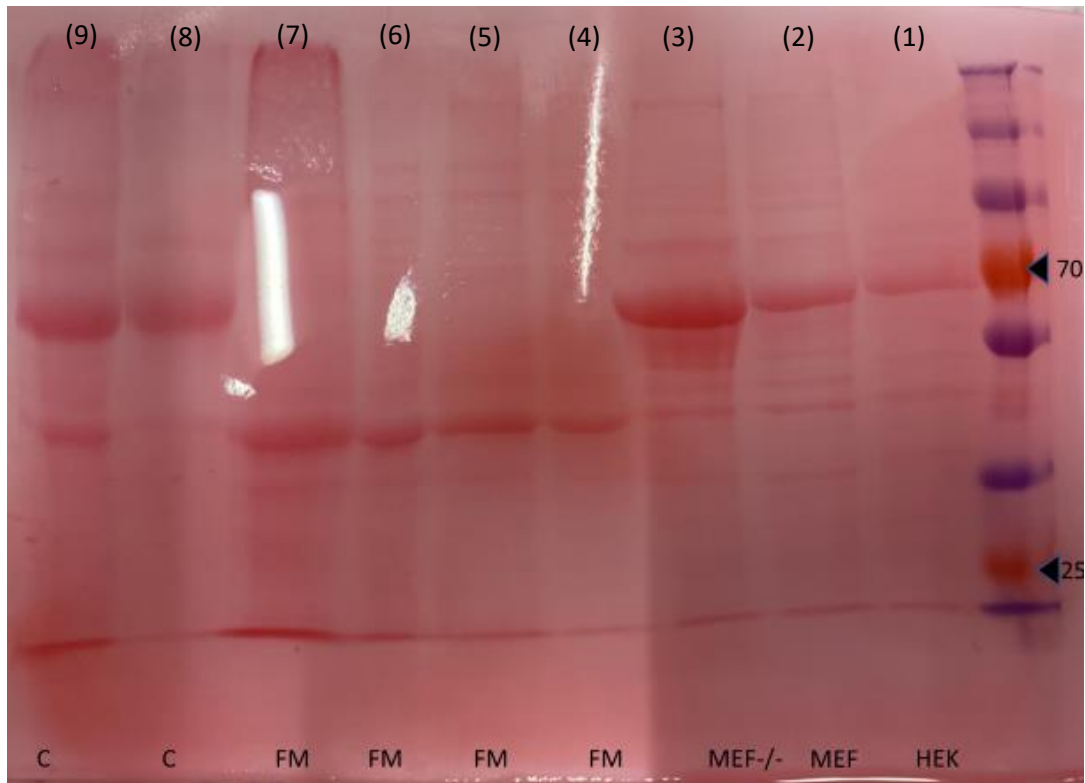


Figura 17: Tinción con rojo Ponceau de la figura 16

Las Figuras 18 y 19, muestran, similar al análisis anterior (Figuras 16 y 17) que el anticuerpo primario comercial 2E9 (sc-23955), al igual que el custom POLY33 no permitió detectar ninguna banda (Figura 17, panel inferior). El motivo no es la ausencia de proteínas en gel ni su transferencia a membrana ya que la Figura 18 claramente muestra la presencia de bandas definidas no degradadas en todas ellas con contenidos totales similares. El anticuerpo primario  $\beta$ -actina (sc-130657) como control positivo (Chatterjee et Al., 2013) y, por lo tanto, al estar establecido que su peso molecular es de 43 kDa en el artículo "Pulmonary GLP-1 receptor increases at birth and exogenous GLP-1 receptor agonists augmented surfactant-protein levels in litters from normal and nitrofen-treated pregnant rats." (Romaní-Pérez et Al., 2013), confirma claramente la presencia de esa banda correspondiente en todas las muestras, tanto de muestras de células, como de pacientes y control. Una vez más el patrón de proteínas totales en tinción Ponceau de las muestras de enfermos de FM aparece claramente distintas a las de PBMCs de sujetos sanos (control) y a las de células en cultivo (Figura 19).

A su vez, la Figura 18, muestra bandas adicionales de entre 50 y 70 kDa aproximadamente en todas las muestras de células HEK, MEF y MEF -/- posiblemente correspondiendo a la unión inespecífica de los anticuerpos.

Debido a que al emplear los anticuerpos 2E9 y POLY 33, no se obtuvieron resultados ni bandas concluyentes como se ha explicado anteriormente, se decidió aumentar su concentración utilizando extractos de células con niveles de transfección optimizados (Figuras 6-9), así como aumentar la cantidad de anticuerpo primario a dilución 1:75, en lugar de 1:200.

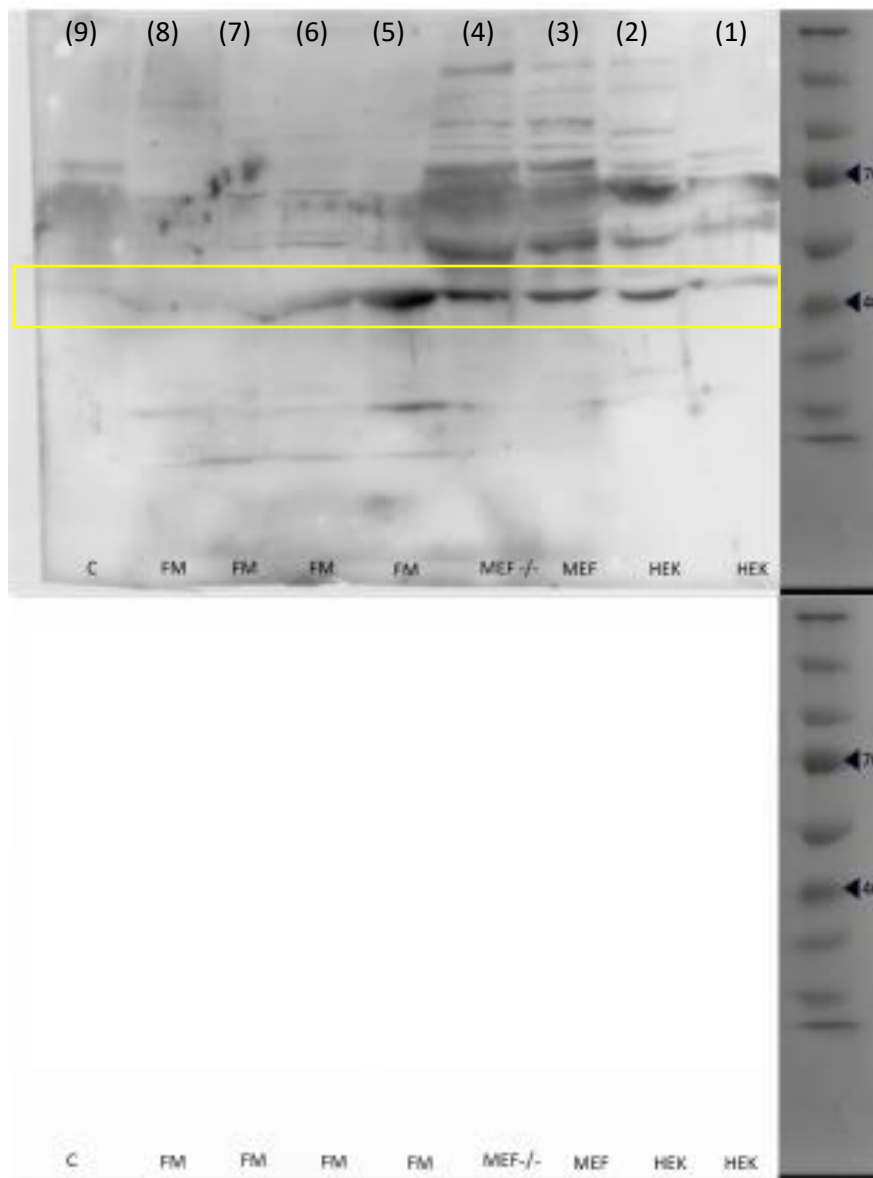


Figura 18: Análisis de western blot de células HEK-293T, MEF y MEF knockout (KO), PBMCs con SFC y controles. Panel inferior muestra western blot utilizando el anticuerpo primario anti-RNasa L 2E9 (sc-23955) a una dilución 1:200, 16h a 25°C seguido de una incubación con el anticuerpo secundario anti-mouse (sc-2005) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. Panel superior muestra western blot utilizando el anticuerpo primario Actina (sc-130657) a una dilución 1:200, 16h a 25°C, y anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C). Las 4 primeras carreras contienen diferentes líneas celulares, teniendo las 2 primeras células HEK,

y las 2 siguientes células MEF y MEF KNOCKOUT. Las carreras 5,6,7 y 8 contienen muestras de pacientes, o de sangre periféricas, y el ultimo pocillo contiene una muestra control. El marcador empleado es el Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (#26623) (10 a 260 kDa), a la derecha se indican con triángulos los pesos moleculares en kDa.

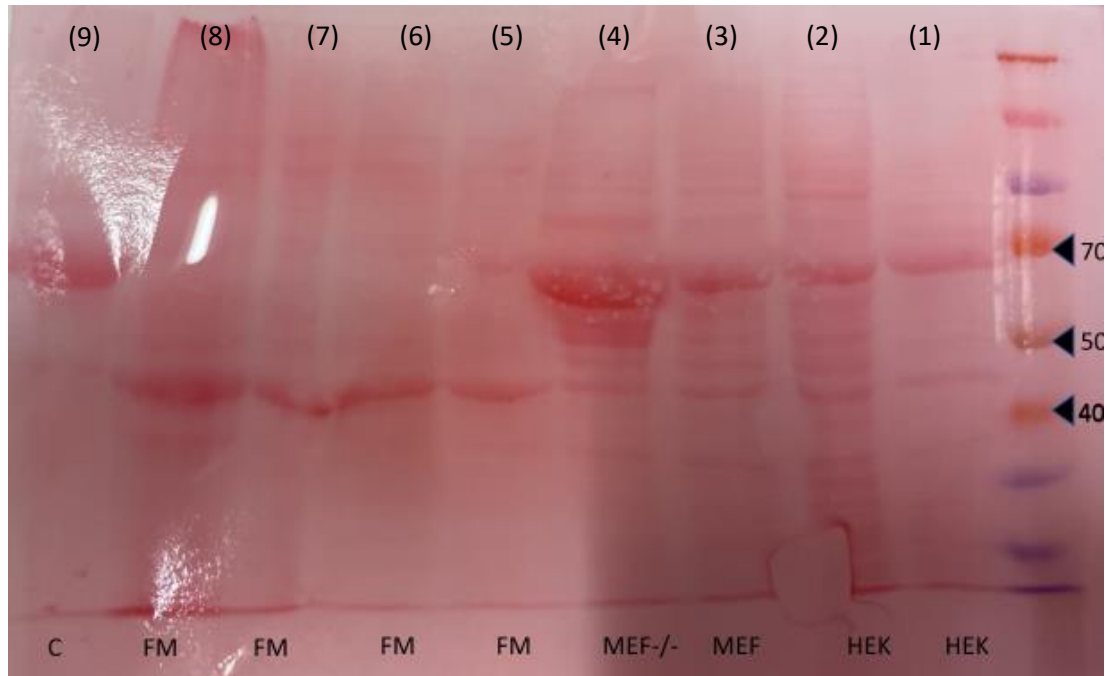
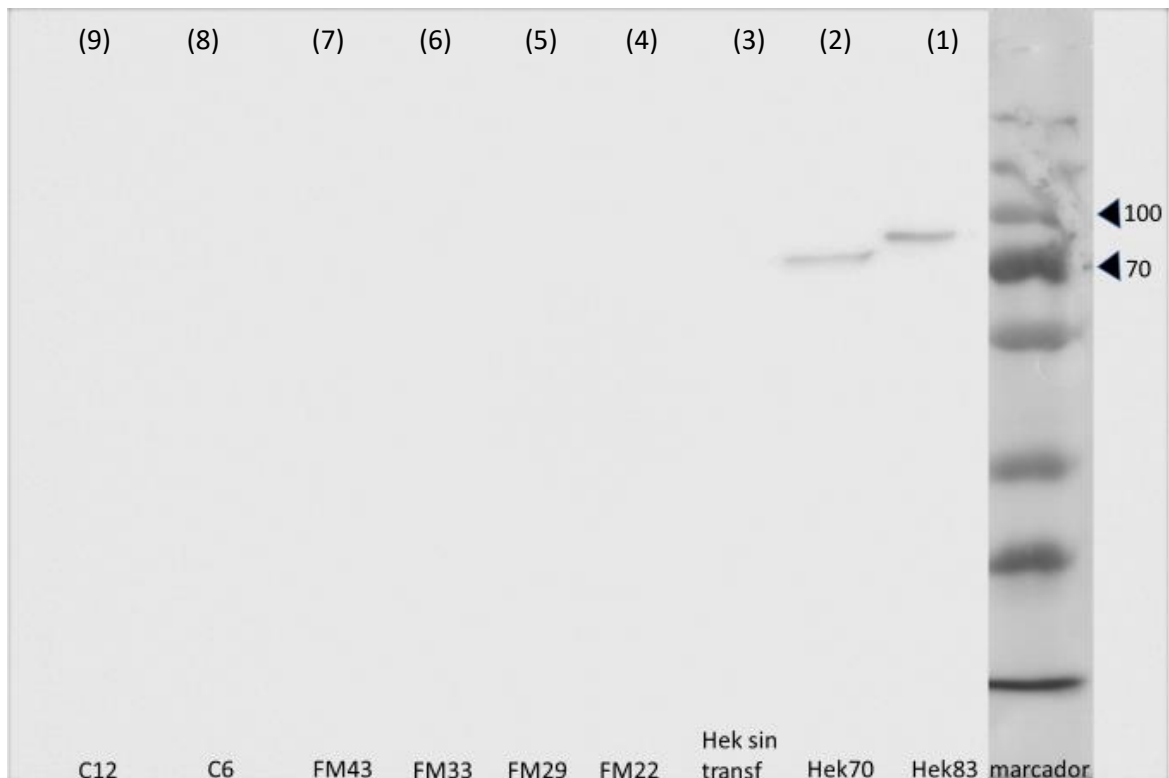


Figura 19: Tinción con rojo Ponceau de la figura 18

La Figura 20, claramente mostró una banda de 70 kDa en la muestra de extractos de la línea celular HEK, transfectadas con el constructo de expresión de la isoforma RNasa L de 70 kDa. Otra banda de aproximadamente 83 kDa, se observó en la carrera que contuvo la línea celular HEK transfectadas con la RNasa L de 83 kDa. Como era de esperar, la visualización de ambas es detectable con el anticuerpo 2E9 comercial (sc-23955), que detecta tanto la banda de 83 como de 70 kDa si los niveles de expresión aumentan. Para las muestras de pacientes o de sangre periférica no se observó ninguna banda significativa siendo el motivo más probable, que la expresión de estas proteínas es muy baja. También la antigüedad de las muestras haya contribuido a esta falta de señal.

Quizás aumentando el volumen de muestra de PBMCs pudiese permitir su detección. Los mismo puede aplicar a las células HEK sin transfectar.



*Figura 20: Análisis de western blot de células HEK-293T transfectadas con la RNasa L de 83 kDa y 70 kDa, y HEK sin transfectar, PBMCs con SFC y controles. Gel utilizando el anticuerpo primario anti-RNasa L 2E9 (sc-23955) a una dilución 1:75, 16h a 25°C seguido de una incubación con el anticuerpo secundario anti-mouse (sc-2005) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. Los 3 primeros pocillos contienen células HEK transfectadas con la RNasa L de 83 kDa, 70 kDa, y células HEK sin transfectar. Los pocillos 4,5,6 y 7 contienen muestras de pacientes, mientras que los últimos dos pocillos contienen muestras control. El marcador utilizado es el Page Ruler Plus Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, #26616) (10 a 250 kDa), a la derecha se indican con triángulos los pesos moleculares en kDa.*

La *Figura 21* conteniendo el anticuerpo primario POLY 33 y secundario anti-rabbit (sc-2357), permitió apreciar una banda de 70 kDa, en los extractos que contuvieron la línea celular HEK transfectadas con el constructo de expresión de la isoforma de RNasa L de 70 kDa, como era de esperar, ya que el anticuerpo POLY 33, tiene la función de detectar dicha señal. Para las muestras de pacientes, o de sangre periférica no se observó ninguna banda significativa, siendo uno de los motivos más probables los mencionados anteriormente para la *Figura 20*.

Es decir, posiblemente no se cargó la cantidad necesaria de muestra de sangre periférica, para que alguna banda pudiese ser observada. En este caso particular, sin embargo, uno pudiera afirmar la no existencia de la nueva isoforma de 70 kDa. Es

importante destacar que el control realizado con el anticuerpo de 83 kDa nos permiten más posiblemente asignar la falta de señal a la baja expresión general desde este gen y por tanto aplicable a ambas isoformas.

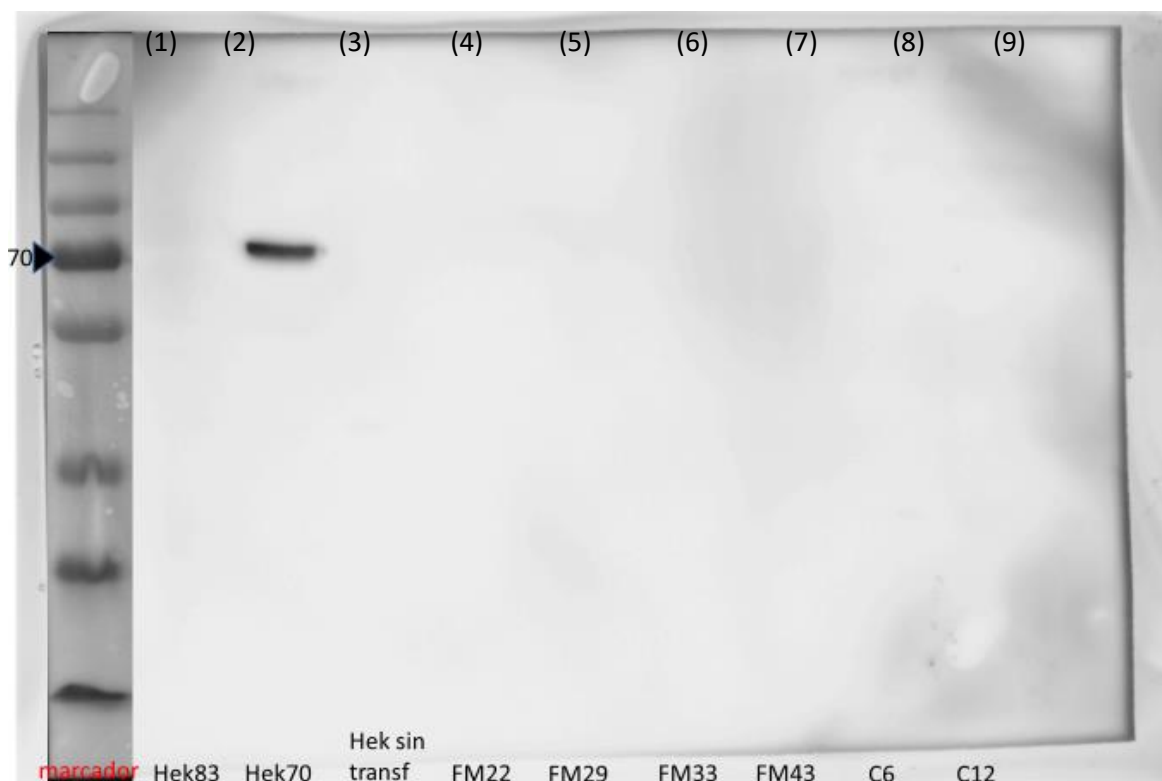


Figura 21: Análisis de western blot de células HEK-293T transfectadas con la RNasa L de 83 kDa y 70 kDa, y HEK sin transfectar, PBMCs con SFC y controles. Gel utilizando el anticuerpo primario anti-RNasa L custom POLY 33 a una dilución 1:75, 16h a 25°C seguido de una incubación con el anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357) a una dilución 1:2500, 1h a 25°C. Los 3 primeros pocillos contienen células HEK transfectadas con la RNasa L de 83 kDa, 70 kDa, y células HEK sin transfectar. Los pocillos 4,5,6 y 7 contienen muestras de pacientes, mientras que los últimos dos pocillos contienen muestras control. El marcador utilizado es el Page Ruler Plus Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, #26616) (10 a 250 kDa), a la izquierda se indican con triángulos los pesos moleculares en kDa.

En definitiva, los resultados obtenidos determinaron que al aumentar la cantidad del anticuerpo primario comercial 2E9 (sc-23955) y el “custom” POLY 33 la señal de las muestras de células transfectadas la RNasa L de 83 kDa y de 70 kDa se pudieron observar. Sin embargo, sería necesario repetir los western blots conteniendo muestras de PBMCs, aumentando la concentración de proteínas totales de estas muestras, ya

que con los 2 anticuerpos mencionados con anterioridad no se visualizó ninguna banda, como sí paso con los controles  $\beta$ -actina y filamina 1.

## 5 CONCLUSIONES

Con relación al objetivo general y a los diferentes objetivos específicos establecidos durante la investigación, se alcanzan las siguientes conclusiones:

- El ensayo de la utilidad del anticuerpo “custom” para detectar la isoforma de 70 kDa de la enzima RNasa L, y como posible herramienta para futuros estudios de interés con esta nueva isoforma se llevó a cabo de forma satisfactoria como se pudo comprobar al observar los resultados de los western blots realizados, ya que se visualizó la señal correspondiente a la banda deseada en células HEK transfectadas con constructos de expresión de esta isoforma.
- La producción de preparaciones stock de constructos de expresión de las isoformas se realizó correctamente, evitando la contaminación de las muestras como se estableció en los resultados de las absorbancias realizadas con el Nanodrop.
- La transfección realizada en células humanas HEK-293T con los constructos de expresión de la isoforma de 70 kDa y la “wild type” de 83 kDa para conseguir su sobreexpresión se confirmó mediante la visualización de la fluorescencia otorgada a las células por la introducción de un vector de expresión de GFP en co-transfección.
- Además de confirmarse la utilidad y funcionamiento tanto del anticuerpo “custom” POLY 33, creado a partir de un péptido sintético específico de la isoforma de 70 kDa, también se confirmó la utilidad de anticuerpos comerciales, específicamente el 2E9, para detectar ambas isoformas.
- Sin embargo, no fue posible evidenciar la forma de 70 kDa, además de la ya descrita de 83 kDa en células mononucleares de sangre periférica, y su posible relación con el SFC o fibromialgia al no obtenerse señal en los western blots realizados conteniendo muestras de PBMCs, posiblemente a causa de la baja sensibilidad del ensayo junto a bajos niveles de expresión endógenos.



## 6 BIBLIOGRAFÍA

Afari, N., & Buchwald, D. (2003). Chronic fatigue syndrome: a review. *American Journal of Psychiatry*, 160(2), 221-236.

Banco ADN (2020) "Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca)." Página Web recuperada de: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>

Bisbal, C., & Silverman, R. H. (2007). Diverse functions of RNase L and implications in patología. *Biochimie*, 89(6-7), 789-798.

Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B., & Salehzada, T. (1995). Cloning and Characterization of a RNase L Inhibitor.: A NEW COMPONENT OF THE INTERFERON-REGULATED 2-5A PATHWAY\*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13308-13317.

Browne, K. A., Johnstone, R. W., Jans, D. A., & Trapani, J. A. (2000). Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39262-39266.

Burgess, H. M., & Mohr, I. (2015). Cellular 5'-3' mRNA exonuclease Xrn1 controls double-stranded RNA accumulation and anti-viral responses. *Cell host & microbe*, 17(3), 332-344.

Casey, G., Neville, P. J., Plummer, S. J., Xiang, Y., Krumroy, L. M., Klein, E. A., ... & Witte, J. S. (2002). RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nature genetics*, 32(4), 581-583.

Casey, G., Neville, P. J., Plummer, S. J., Xiang, Y., Krumroy, L. M., Klein, E. A., ... & Witte, J. S. (2002). RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nature genetics*, 32(4), 581-583.

Castelli, J. C., Hassel, B. A., Wood, K. A., Li, X. L., Amemiya, K., Dalakas, M. C., ... & Youle, R. J. (1997). A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *The Journal of experimental medicine*, 186(6), 967-972.

Chakrabarti, A., Jha, B. K., & Silverman, R. H. (2011). New insights into the role of RNase L in innate immunity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(1), 49-57.

- Chatterjee, S., Nandi, P., Mukherjee, S., Chattopadhyay, A., & Bhattacharya, S. (2013). Regulation of autophagy in rat hepatocytes treated in vitro with low concentration of mercury. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(3), 504-504.
- Chitrakar, A., Rath, S., Donovan, J., Demarest, K., Li, Y., Sridhar, R. R., ... & Korennykh, A. (2019). Real-time 2-5A kinetics suggest that interferons  $\beta$  and  $\lambda$  evade global arrest of translation by RNase L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(6), 2103-2111.
- Cleare, A. J. (2003). The neuroendocrinology of chronic fatigue syndrome. *Endocrine reviews*, 24(2), 236-252.
- Dayal, S., Zhou, J., Manivannan, P., Siddiqui, M. A., Ahmad, O. F., Clark, M., ... & Malathi, K. (2017). RNase L suppresses androgen receptor signaling, cell migration and matrix metalloproteinase activity in prostate cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 529.
- Dong, B., & Silverman, R. H. (1995). 2-5A-dependent RNase Molecules Dimerize during Activation by 2-5A (\*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 4133-4137.
- Donovan, J., Rath, S., Kolet-Mandrikov, D., & Korennykh, A. (2017). Rapid RNase L-driven arrest of protein synthesis in the dsRNA response without degradation of translation machinery. *Rna*, 23(11), 1660-1671.
- Donovan, J., Whitney, G., Rath, S., & Korennykh, A. (2015). Structural mechanism of sensing long dsRNA via a noncatalytic domain in human oligoadenylate synthetase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13), 3949-3954.
- Drappier, M., & Michiels, T. (2015). Inhibition of the OAS/RNase L pathway by viruses. *Current opinion in virology*, 15, 19-26.
- Eiermann, N., Haneke, K., Sun, Z., Stoecklin, G., & Ruggieri, A. (2020). Dance with the devil: stress granules and signaling in antiviral responses. *Viruses*, 12(9), 984.
- Gusho, E., Baskar, D., & Banerjee, S. (2020). New advances in our understanding of the "unique" RNase L in host pathogen interaction and immune signaling. *Cytokine*, 133, 153847.
- Han, J. Q., & Barton, D. J. (2002). Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *Rna*, 8(4), 512-525.

Hnasko, T. S., & Hnasko, R. M. (2015). The western blot. In *ELISA* (pp. 87-96). Humana Press, New York, NY.

Huang, H., Zeqiraj, E., Dong, B., Jha, B. K., Duffy, N. M., Orlicky, S., ... & Sicheri, F. (2014). Dimeric structure of pseudokinase RNase L bound to 2-5A reveals a basis for interferon-induced antiviral activity. *Molecular cell*, *53*(2), 221-234.

Ireland, D. D., Stohlman, S. A., Hinton, D. R., Kapil, P., Silverman, R. H., Atkinson, R. A., & Bergmann, C. C. (2009). RNase L mediated protection from virus induced demyelination. *PLoS Pathog*, *5*(10), e1000602.

Karasik, A., Jones, G. D., DePass, A. V., & Guydosh, N. R. (2021). Activation of the antiviral factor RNase L triggers translation of non-coding mRNA sequences. *Nucleic Acids Research*, *49*(11), 6007-6026.

Kawai, T., & Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology*, *7*(2), 131-137.

Larun, L., Brurberg, K. G., Odgaard-Jensen, J., & Price, J. R. (2019). Exercise therapy for chronic fatigue syndrome. *Cochrane database of systematic reviews*, (10).

Li, Y., Banerjee, S., Wang, Y., Goldstein, S. A., Dong, B., Gaughan, C., ... & Weiss, S. R. (2016). Activation of RNase L is dependent on OAS3 expression during infection with diverse human viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(8), 2241-2246.

Liu, S. W., Katsafanas, G. C., Liu, R., Wyatt, L. S., & Moss, B. (2015). Poxvirus decapping enzymes enhance virulence by preventing the accumulation of dsRNA and the induction of innate antiviral responses. *Cell host & microbe*, *17*(3), 320-331.

Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, *4*(9), 429.

Malathi, K., Siddiqui, M. A., Dayal, S., Naji, M., Ezelle, H. J., Zeng, C., ... & Hassel, B. A. (2014). RNase L interacts with Filamin A to regulate actin dynamics and barrier function for viral entry. *MBio*, *5*(6).

Manivannan, P., Siddiqui, M. A., & Malathi, K. (2020). RNase L amplifies interferon signaling by inducing protein kinase R-mediated antiviral stress granules. *Journal of virology*, *94*(13).

Martinand, C., Montavon, C., Salehzada, T., Silhol, M., Lebleu, B., & Bisbal, C. (1999). RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and

down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *Journal of virology*, 73(1), 290-296.

Nilsen, T. W., Maroney, P. A., & Baglioni, C. (1982). Synthesis of (2'-5') oligoadenylate and activation of an endoribonuclease in interferon-treated HeLa cells infected with reovirus. *Journal of Virology*, 42(3), 1039-1045.

Nogimori, T., Nishiura, K., Kawashima, S., Nagai, T., Oishi, Y., Hosoda, N., ... & Hoshino, S. I. (2019). Dom34 mediates targeting of exogenous RNA in the antiviral OAS/RNase L pathway. *Nucleic acids research*, 47(1), 432-449.

Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-Chlieh, F., & Gehring, C. (2016). A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization. *Frontiers in physiology*, 7, 300.

Ovejero, T., Sadones, O., Sánchez-Fito, T., Almenar-Pérez, E., Espejo, J. A., Martín-Martínez, E., ... & Oltra, E. (2020). Activation of Transposable Elements in Immune Cells of Fibromyalgia Patients. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1366.

Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*, 20(9), 537-551.

Rennert, H., Bercovich, D., Hubert, A., Abeliovich, D., Rozovsky, U., Bar-Shira, A., ... & Orr-Urtreger, A. (2002). A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delAAAG, is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *The American Journal of Human Genetics*, 71(4), 981-984.

Rice, A. P., Roberts, W. K., & Kerr, I. M. (1984). 2-5A accumulates to high levels in interferon-treated, vaccinia virus-infected cells in the absence of any inhibition of virus replication. *Journal of virology*, 50(1), 220-228.

Rökman, A., Ikonen, T., Seppälä, E. H., Nupponen, N., Autio, V., Mononen, N., ... & Schleutker, J. (2002). Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. *The American Journal of Human Genetics*, 70(5), 1299-1304.

Romaní-Pérez, M., Outeiriño-Iglesias, V., Gil-Lozano, M., González-Matías, L. C., Mallo, F., & Vigo, E. (2013). Pulmonary GLP-1 receptor increases at birth and exogenous GLP-1 receptor agonists augmented surfactant-protein levels in litters from normal and nitrofen-treated pregnant rats. *Endocrinology*, 154(3), 1144-1155.

Silverman, R. H. (2003). Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry*, 42(7), 1805-1812.

- Slattery, E., Ghosh, N., Samanta, H., & Lengyel, P. (1979). Interferon, double-stranded RNA, and RNA degradation: activation of an endonuclease by (2'-5') An. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 4778-4782.
- Sorgeloos, F., Jha, B. K., Silverman, R. H., & Michiels, T. (2013). Evasion of antiviral innate immunity by Theiler's virus L\* protein through direct inhibition of RNase L. *PLoS pathogens*, 9(6), e1003474.
- Tanaka, N., Nakanishi, M., Kusakabe, Y., Goto, Y., Kitade, Y., & Nakamura, K. T. (2004). Structural basis for recognition of 2', 5'-linked oligoadenylates by human ribonuclease L. *The EMBO journal*, 23(20), 3929-3938.
- Williams, B. R. G., Golgher, R. R., Brown, R. E., Gilbert, C. S., & Kerr, I. M. (1979). Natural occurrence of 2-5A in interferon-treated EMC virus-infected L cells. *Nature*, 282(5739), 582-586.
- Xiang, Y., Wang, Z., Murakami, J., Plummer, S., Klein, E. A., Carpten, J. D., ... & Silverman, R. H. (2003). Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2', 5'-oligoadenylates. *Cancer research*, 63(20), 6795-6801.
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 1-11.
- Zhao, L., Jha, B. K., Wu, A., Elliott, R., Ziebuhr, J., Gorbalenya, A. E., ... & Weiss, S. R. (2012). Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell host & microbe*, 11(6), 607-616.