

Informe final publicable de proyecto

Identificación de vías de señalización reguladas por p53 de forma post-transcripcional en la respuesta a proteínas desplegadas (UPR)

Código de proyecto ANII: FCE_3_2020_1_161877

12/12/2023

LÓPEZ FERREIRA, Luis Ignacio (Responsable Técnico - Científico)

DURÁN MUÑOZ, María Del Rosario (Investigador)

FÂHRAEUS, Robin (Investigador)

FERNÁNDEZ CALERO, Tamara (Investigador)

LARGHERO VALDIVIA, Irene (Investigador)

MARIN, Monica (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\ INSERM U1131 \\

UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL URUGUAY DÁMASO ANTONIO LARRAÑAGA. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

\\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

p53 es una proteína clave en la conservación del estado normal de las células, contribuye con la salud del organismo y es esencial para prevenir el desarrollo de cáncer. p53 se encuentra modificada en más del 50% de los casos de cáncer en humanos, lo que demuestra la importancia de conservar su actividad inalterada. Su función principal es la de regular el encendido y/o apagado, lo que llamamos expresión, de varios y muy diversos genes vinculados a procesos celulares vitales. La expresión de genes depende de procesos moleculares que actúan de forma sucesiva y coordinada y que usan la información almacenada en el ADN para producir moléculas efectoras dentro de la célula. Uno de ellos es la transcripción, proceso por el que se lee el ADN y se sintetiza ARN que es utilizado como molde para producir proteínas. Aunque se conoce bastante sobre la regulación de la transcripción mediada por p53, estudios recientes sugieren que p53 también controla otras instancias, en particular en células que desarrollan la respuesta a proteínas desplegadas (abreviada UPR en inglés). Si bien la UPR es una respuesta normal de algunas células, su alteración ha sido asociada con patologías como la diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer. En este proyecto, utilizando células humanas mantenidas en el laboratorio y técnicas de biología molecular de gran cobertura llamadas “ómicas” que nos permiten estudiar todos los ARNs y una altísima cantidad de proteínas presentes en la célula, identificamos de forma global genes cuyo encendido y apagado durante la UPR depende del accionar de p53 en procesos que ocurren luego de la transcripción y que llamamos post-transcripcionales. Estos resultados brindan nueva información sobre respuestas celulares coordinadas por p53 y, además, evidencian que en algunas situaciones celulares como la UPR, p53 efectivamente actúa a través de otros mecanismos además de la transcripción.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Regulación post-transcripcional

Palabras clave: p53 / regulación post-transcripcional / UPR /

Introducción

p53 es un supresor de tumores que controla la actividad de numerosos factores en respuesta a diversas situaciones de estrés, dentro de las que sobresalen el daño en el ADN y la activación de oncogenes como las dos más estudiadas [1]. p53 es un nodo o “hub” de control de la homeostasis celular. Esto se evidencia en la elevada tasa de mutaciones encontrada en pacientes con cáncer [2], así como en la capacidad de regular diferentes procesos de la expresión génica, desde la organización de la cromatina hasta la degradación de proteínas [3,4]. Sin embargo, el control de la transcripción por p53 ha eclipsado el estudio de otras etapas debido a la descripción temprana de sus dominios de unión al ADN y de transactivación de la transcripción y a la identificación de una gran cantidad de genes regulados a este nivel [1,5]. Tal es el caso de p21, Mdm2 y Bax, tres de los blancos más estudiados cuya transcripción es promovida por p53 en respuesta al daño en el ADN para prevenir el crecimiento celular anormal o inducir la apoptosis [6–8]. No obstante, trabajos más recientes han resaltado la capacidad de p53 de controlar el proteoma de forma más directa. Por ejemplo, nuestros trabajos anteriores han mostrado que cuando se activa la respuesta a proteínas desplegadas o UPR (del inglés “Unfolded Protein Response”), la expresión de p21 y MDM2 es opuesta a la descrita cuando se daña el ADN y además es controlada por p53 de forma post-transcripcional [9,10]. Esto sugiere que frente a diferentes tipos de estrés, p53 organiza respuestas específicas establecidas a diferentes niveles y adaptadas a las condiciones de la célula.

La activación de la UPR ocurre cuando el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (RE) es insuficiente. Esto sucede en condiciones fisiológicas y patológicas, como por ejemplo cuando varía la concentración de calcio o hay una insuficiente glicosilación o elevada tasa de producción, secreción o acumulación de proteínas, entre otras [11,12]. Estos procesos son característicos de enfermedades humanas no transmisibles de alta incidencia en Uruguay y en muchas otras regiones del mundo como son la diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer, en las que se detecta un estrés crónico en el RE y una activación defectuosa de la UPR. Esto sugiere que la UPR podría tener algún rol en el desarrollo de estas patologías y en su posible tratamiento, lo que despertó el interés de la academia y la industria [11–13]. En una fase adaptativa temprana, la UPR interviene en el restablecimiento del balance entre proteínas maduras y recién sintetizadas. No obstante, si el daño es irreparable, se induce la apoptosis [11,14]. En este contexto, el mantenimiento de la proteostasis, definida como el proceso por el cual la salud del conjunto de proteínas de la célula es monitoreado y mantenido en homeostasis [15], resulta esencial. Esto lleva a que la activación de procesos que impacten en ella de forma directa y rápida resulten más eficientes. En efecto, la UPR promueve una masiva inhibición de la traducción dependiente

del 5'-Cap como consecuencia de la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2alfa y un aumento de la capacidad de plegamiento y degradación de proteínas mediada por chaperonas y componentes del ERAD (del inglés "Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation") [11]. En contrapartida, la síntesis de un grupo de factores con funciones reparadoras es favorecida por un mecanismo de inicio de la traducción independiente del 5'-Cap [14], entre los que se encuentra una isoforma traduccional de p53 denominada p47. Esta última, descrita más abajo, tiene algunos roles específicos que revisamos recientemente sobre los que proponemos avanzar en esta propuesta [16]. Estas observaciones sugieren que los fenómenos biológicos que ocurren durante la UPR están sujetos a fuertes mecanismos de regulación post-transcripcional.

El control post-transcripcional por p53 ha sido reportado en diferentes condiciones de estrés [17–19]. Nuestros trabajos previos han ampliado el conocimiento sobre la capacidad de p53 de controlar la expresión de conocidos blancos como p21, MDM2 y MDMX y del regulador central de la UPR BiP de forma post-transcripcional, en algunos casos a través de una interacción directa entre p53 y el ARN mensajero (ARNm) [9,10,20,21]. La disminución de la expresión de p21 y BiP promovida por p53 resulta en la detención del ciclo celular e inducción de la apoptosis, lo que demuestra la importancia fisiológica de la regulación post-transcripcional durante la UPR [9,21]. Sin embargo, nuestros estudios previos se enfocaron en blancos puntuales y en la traducción como punto de regulación. Por tanto, profundizar en la relación p53-UPR e identificar otras etapas afectadas resultará en un aporte mayor al entendimiento de la capacidad de p53 de orquestar respuestas celulares basadas en la modulación fina de la proteostasis.

El estudio de la proteostasis requiere de aproximaciones sistémicas ya que depende de intrincados circuitos de control a nivel post-transcripcional y post-traduccional (que aquí englobamos en el término post-transcripcional). En consecuencia, la información proporcionada por el transcriptoma sólo brinda datos aproximados sobre el proteoma. Incluso la incorporación de información adicional, como por ejemplo la tasa de traducción relativa, la vida media de los ARNm, además de su abundancia, es insuficiente para predecir la expresión de muchas proteínas usando modelos computacionales [22]. En el caso de nuestra propuesta, alcanzar un entendimiento global requeriría estudiar la expresión génica a nivel del transcriptoma, translatoma y proteoma y caracterizar el interactoma de p53 (tanto proteínas como ARNs). En el contexto de tiempos y recursos asignados en el presente llamado de consolidación, en este proyecto proponemos enfocarnos en los mecanismos de regulación post-transcripcional dependientes de p53 y p47 durante la UPR basados en la comparación del transcriptoma y proteoma, dejando otros abordajes para proyectos futuros. Además de contribuir con el entendimiento de la biología básica de p53, esta línea de investigación tiene implicancias directas en la comprensión del desarrollo de enfermedades no transmisibles de alta incidencia y en la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

El proyecto busca profundizar en el papel de p53 como regulador post-transcripcional, en particular en el contexto de estrés en el RE y la UPR. Los antecedentes globales y los aportes generados por nuestro equipo nos permiten considerar un escenario en el que la expresión de un grupo mayor de proteínas podría estar regulada por p53 y en particular, por la isoforma p47 que es inducida de forma específica durante la UPR.

En general, p53 es estudiado como un factor de transcripción. Esta concepción está respaldada por la existencia de dominios funcionales de unión al ADN y de transactivación de la transcripción en p53, que además se ven alterados por mutaciones en una gran cantidad de casos de cáncer [1,2]. Asimismo, la acumulación de blancos cuya transcripción es controlada por p53 no cesa de crecer [5]. Sin embargo, p53 también es capaz de regular la expresión génica en etapas posteriores. Por ejemplo, p53 tiene la capacidad de modular la síntesis de proteínas de forma general mediante el control de la expresión de componentes centrales de la maquinaria traduccional como son factores de iniciación de la traducción y ARNs y proteínas ribosomales, o de forma ARNm específica [23]. Esta última puede a su vez ser indirecta, a través de ARNs no codificantes o proteínas de unión a ARN que regulan la traducción de blancos particulares, o directa, mediante la interacción de p53 con el ARNm [23]. En este último caso, nosotros hemos realizado destacadas contribuciones [9,10,20,21].

La pista acerca de que la regulación de procesos post-transcripcionales mediada por p53 pueda afectar un mayor número de blancos está dada, por ejemplo, por el desacople detectado entre el transcriptoma y el translatoma de células tratadas con activadores de p53. Estudios recientes han sugerido que la alteración de la traducción explica entre el 25 y 50% de la variabilidad de la expresión génica [17–19]. Un dato fundamental es que el desacople depende directamente de p53 ya que células desprovistas de la proteína no muestran la misma respuesta. El conocimiento acerca de la existencia de este fenómeno durante la UPR es muy escaso. Hasta el momento, un sólo artículo sugiere que p53 contribuye con la reducción global de la traducción en células en cultivo desprovistas de suero fetal, un conocido activador de la UPR [17]. No obstante, aún no han sido reportados estudios globales que consideren otras posibles formas de regulación post-transcripcional específicas de p53 en la UPR. A la luz de la inhibición general de la traducción y del aumento de la degradación de proteínas [11,16], es sensato pensar que en estas condiciones pueda existir un desacople aún mayor entre los mecanismos

que regulan los niveles de ARN y proteínas activas en la célula. Los trabajos que han reportado el desacople entre los diferentes niveles de regulación de la expresión génica citados más arriba constituyen sólidos antecedentes y fueron el punto de partida de nuestro proyecto.

En este proyecto realizamos un análisis comparativo de la abundancia de ARN y proteínas de forma global a través de la confrontación del transcriptoma y proteoma dependientes de la expresión de p53 durante la UPR. Basados en los datos presentados más arriba, buscamos el desacople en la expresión de genes de forma global en respuesta a p53, lo que evaluamos a través del uso de células que expresan o no p53. Asimismo, validamos algunos blancos de interés detectados en los análisis "ómicos" y dimos pasos en el estudio de su posible dependencia con el aumento relativo de la abundancia de p47 con respecto a p53.

Como revisamos en Fusée et al., 2020 [16], datos recientes sugieren que la expresión de la variante traduccional p47 se ve específicamente incrementada en la UPR en respuesta a la activación de PERK [9,10,24]. Esto contrasta con la inhibición de la síntesis y el incremento de la degradación de p53 [24]. Como resultado, estos cambios llevan a que la cantidad de p47 en relación a p53 aumente durante la UPR (Figura 1 – Anexo Figuras), lo que amplía el abanico de posibles respuestas orquestadas por parte de la "familia p53" para ofrecer soluciones a medida. La isoforma p47 carece de los primeros 39 residuos aminoacídicos de p53. Esta región incluye el dominio de transactivación I y los de unión a varias proteínas, siendo de particular importancia el del regulador negativo MDM2. Como consecuencia, p47 parece tener una vida media más larga [25,26]. Por otro lado, p47 conserva los dominios de oligomerización, de unión al ADN y de transactivación II, lo que le permite modular la actividad de p53 mediante el establecimiento de homo o hetero-oligómeros y controlar la expresión de un set diferente de genes de respuesta a estrés [24,26,27]. Por ejemplo, el grupo de RF ha mostrado que p47 es responsable de la detención del ciclo celular en la fase G2/M durante la UPR en oposición a la detención en G1/S promovida por p53 en respuesta al estrés genotóxico [24]. A la luz de la vasta disminución de la traducción dependiente del 5'-Cap reportada en G2/M [28], la detención del ciclo celular en esta fase en respuesta a la acumulación de proteínas resulta totalmente coherente con el contexto celular. Esto constituye un ejemplo más de la plasticidad de la vía de p53 para detectar diferentes condiciones de estrés y responder de manera acorde y es uno de los pilares sobre los que se sustenta este proyecto.

Metodología/diseño del estudio

En este proyecto utilizamos como modelo de estudio la línea celular humana H1299 (NCI-H1299, CRL-5803) derivada de una muestra de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) que no produce ninguna isoforma de p53 como consecuencia de una deleción parcial homocigota del gen TP53. Son células epiteliales, crecen de forma adherente y fueron cultivadas siguiendo protocolos corrientes de cultivo celular en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino y antibióticos (penicilina/estreptomicina). La ausencia de p53 en estas células las convierte en un modelo adecuado ya que permite evaluar el rol de diferentes isoformas de p53 mediante transfección de ADN como hemos publicado en trabajos anteriores [10,20,21,29]. Esta aproximación experimental resulta fundamental para la caracterización de los blancos encontrados y el rol de cada variante de p53 (ver más abajo). La expresión de p53 se llevó a cabo de forma transitoria por transfección de un plásmido (pcDNA3.1) que contiene la secuencia codificante salvaje de p53. A partir de esta secuencia se producen tanto la proteína p53 como la isoforma p47 (Figura 1 – Anexo Figuras). La construcción y el protocolo de transfección (GeneJuice, Merck) han sido descritos en diferentes publicaciones de integrantes del equipo [10,20,21,29]. La expresión de las proteínas p53 y p47 fue evaluada por western-blot (WB) utilizando el suero CM1 capaz de reconocer ambas isoformas (Figura 1 – Anexo Figuras). Para generar estrés en el retículo endoplásmico (RE) y activar la UPR, las células fueron tratadas con taspigargina (preparada en DMSO), un inhibidor selectivo no competitivo de la bomba ATPasa-Ca²⁺ del retículo endoplásmico/sarcoplásmico (SERCA). La disminución de la concentración de Ca²⁺ dentro del RE altera el funcionamiento de las chaperonas residentes dependientes de Ca²⁺ y resulta en la acumulación de proteínas desplegadas y mal plegadas, induciendo la UPR. La concentración y el tiempo de incubación con el inhibidor usados fueron elegidos en base a lo descrito en publicaciones de integrantes de la propuesta (50 nM durante 24 horas) [9,10,21]. Estas condiciones aseguran una efectiva inducción de la UPR que permite el estudio de las ramas adaptativas y terminales de la respuesta.

Usando este sistema, estudiamos 4 grupos de muestras resultado de la combinación de presencia/ausencia de p53 y presencia/ausencia de estrés, obteniendo: sin p53-normal, sin p53-UPR, con p53 normal y con p53-UPR (Figura 1 – Anexo Figuras). Antes de realizar los ensayos "ómicos" (transcriptoma y proteoma), la inducción adecuada de la UPR fue evaluada por qPCR y WB de p53 y marcadores específicos de respuesta a p53 y a UPR, entre los que se encuentran p21, calreticulina y BiP. Para evaluar los niveles de expresión de los marcadores a nivel de ARN, se utilizó un protocolo clásico de extracción con Trizol con tratamiento con ADNasa (QIAGEN). Se produjo ADN copia usando la enzima SuperScript III (Invitrogen) y las reacciones de qPCR se realizaron usando SYBR Green qPCR Master Mix (Applied Biosystems), en todos los

casos siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. A nivel proteico, los niveles de expresión de los marcadores se evaluaron por WB utilizando extractos totales obtenidos mediante el uso de tampón de lisis y extracción de tipo RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y separados por SDS PAGE. Todos estos procedimientos se realizaron de acuerdo a las publicaciones previas [10,21,30,31].

Para estudiar los cambios en la expresión a nivel de ARN en respuesta a la actividad de p53 durante la UPR, se obtuvo el transcriptoma por análisis de microarreglos usando GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 (Applied Biosystems) empleando los 4 grupos de muestras descritos más arriba. El uso de microarreglos como técnica de estudio del transcriptoma se fundamenta en el hecho de que nuestro objetivo es utilizar los datos de expresión de ARNs anotados, particularmente ARNm, para evidenciar mecanismos de regulación post transcripcional y no caracterizar el transcriptoma en sí mismo. Los microarreglos son relativamente más baratos en comparación a otras técnicas y brindan información robusta con alta cobertura. Asimismo, existen protocolos bien definidos para realizar la hibridación y el análisis y para depositar los resultados en bases de datos, procedimientos que han sido realizados previamente por integrantes de la propuesta [31–33]. Esto se contrasta con procesos de análisis más laboriosos y con mayores requerimientos de capacidad de cálculo y almacenamiento necesarios al usar técnicas con alcance más profundo que no se justifican en este proyecto ya que, por ejemplo, no buscamos identificar nuevos transcritos o nuevas variantes de éstos [32,33]. La calidad del ARN fue evaluada en un 2100 Bioanalyzer (Agilent) y las muestras utilizadas fueron aquellas de buena calidad, lo que corresponde a un “RNA Integrity Number” (RIN) igual o mayor a 7. Se analizaron 3 réplicas biológicas de cada grupo. Estos análisis fueron realizados en el polo genómico de la plataforma tecnológica del hospital Saint-Louis (París, Francia) asociada al laboratorio de Robin Fåhræus en modalidad de contratación de servicios. La intensidad bruta obtenida en el arreglo fue normalizada por “Robust Multi-array Average” (RMA) y el análisis diferencial se realizó empleando el modelo “Linear Models for Microarray Data” (LIMMA) usando el paquete de código abierto Bioconductor en R [34,35]. La caracterización funcional de las variaciones observadas se realizó a través de “Gene Ontology” (GO) y “Gene Set over-representation Analysis” (GSEA) empleando bases curadas. Estas aproximaciones también han sido utilizadas previamente por diferentes integrantes de la propuesta [30,31].

Los cambios en los niveles de expresión a nivel de proteínas en respuesta a la actividad de p53 durante la UPR se analizaron mediante aproximación de tipo “shotgun”. Se analizaron 3 réplicas biológicas cada una con dos réplicas técnicas para los 4 grupos de muestras descritos más arriba. Los extractos proteicos totales obtenidos fueron digeridos con tripsina, los péptidos resultantes fueron separados por cromatografía líquida en fase reversa y detectados en un espectrómetro de masas híbrido Cuadrupolo-Orbitrap (Q-Exactive Plus, ThermoFisher Scientific). En resumen, cada muestra fue inyectada en el sistema nano-HPLC (Ultimate 3000, ThermoFisher Scientific) equipado con una columna comercial (EASY-Spray column, PepMap, ThermoFisher Scientific) y los péptidos fueron separados en un gradiente lineal de acetonitrilo (ACN) conteniendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Los análisis de masa fueron realizados de forma dependiente de la adquisición de datos en dos pasos: (i) adquisición de espectros MS (MS) en modo ion positivo y (ii) análisis MS/MS de los 10 iones más intensos usando una lista de exclusión dinámica. La identificación de las proteínas se realizó a través de la búsqueda en bases de datos de secuencias de proteínas (<https://www.uniprot.org/proteomes/>). La búsqueda en las bases de datos y el análisis proteómico cuantitativo sin marcado (“label-free”) fue realizado en el ambiente computacional integrado PatternLab for Proteomics [36] usando las intensidades extraídas del cromatograma iónico (XIC, del inglés “Extracted-ion chromatogram”). Los espectros asignados a secuencias peptídicas fueron filtrados usando el módulo Search Engine Processor (SEPro) de Patternlab for Proteomics, de manera de obtener un FDR menor a 1% y al menos 1 péptido único por proteína. Se utilizaron análisis bioinformáticos para identificar las proteínas diferencialmente expresadas en las diferentes condiciones. Estos análisis fueron realizados con asesoramiento de integrantes de la propuesta con amplia experiencia en la metodología en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas en modalidad de colaboración [37,38].

El posible desacople entre la abundancia de ARNm y proteína fue evaluado de la siguiente forma. En primer lugar se definió la variación de expresión en condiciones de estrés en comparación a la condición normal usando los datos de transcriptómica y proteómica de forma separada como fue descrito más arriba. Esto se realizó de forma independiente para las muestras sin p53 y con p53. Los cambios de expresión relativos (en valores logarítmicos con base 2, \log_2) de ARNm y proteínas fueron usados para establecer una correlación y aquellos correspondientes a un incremento de aprox. 50% o a una disminución de 33% (valor absoluto del \log_2 del cambio relativo (“fold change”) o $\text{abslog}_2\text{FC} > \text{abslog}_2(1,5)$) con un FDR menor a 5% fueron considerados como cambios significativos. Los genes con $\text{abslog}_2\text{FC} < \text{abslog}_2(1,5)$ en transcriptómica y proteómica fueron considerados como invariables en ambos niveles. Aquellos que responden de forma acoplada (cambios homodireccionales) tienen un $\text{abslog}_2\text{FC} > \text{abslog}_2(1,5)$ en ambos análisis. Los genes que presentan algún tipo de desacople muestran uno de los abslog_2FC mayor y otro menor a $\text{abslog}_2(1,5)$. Por ejemplo, genes con abslog_2FC mayor a $\text{abslog}_2(1,5)$ en el transcriptoma pero menor a $\text{abslog}_2(1,5)$ en el proteoma son aquellos con expresión

diferencial a nivel de ARN que no se refleja en la abundancia de la proteína, debido a alteraciones en la síntesis y/o degradación del primero. Por el contrario, genes con abslog2FC menor a $\text{abslog2}(1,5)$ en el transcriptoma pero mayor a $\text{abslog2}(1,5)$ en el proteoma son aquellos cuya abundancia de ARN no cambia pero que sí presentan variación a nivel de la cantidad de proteína. Los genes que presentan desacople en células sin p53 y con p53 fueron comparados entre sí. Aquellos comunes fueron definidos como dependientes sólo del estrés, sin importar el estatus de p53 de la célula. En contrapartida, los genes que sólo fueron detectados en células con p53 son los que tienen un desacople que sí depende de p53 y son en los que nos enfocamos para hacer análisis de ontología y de enriquecimiento (GO y GSEA). Dependiendo de los resultados, de la relevancia y del grado de desacople, se seleccionaron algunos genes para ser validados y estudiados un poco más.

Los blancos seleccionados para validación y evaluación de la relación con la actividad de p53 fueron estudiados en ensayos celulares y moleculares clásicos. La abundancia a nivel de ARN y proteína del gen de interés fue evaluada por qPCR y WB, respectivamente, utilizando un set de muestras independiente al usado para los estudios "ómicos". En el caso de la proteína y atendiendo a los resultados obtenidos, decidimos clonar las secuencias regulatorias presentes en los 5'UTRs de los mensajeros de los genes seleccionados delante de la secuencia codificante de la proteína reportera GFP y así estudiar por WB el efecto que ellas tienen sobre la expresión de GFP (ver más abajo). A su vez, se abordó parcialmente el rol de la síntesis de proteínas como mecanismo de regulación post-transcripcional potencialmente implicado mediante el tratamiento de células con inhibidores de proteosoma como MG132. Los protocolos de todas estas técnicas han sido puestos a puntos en distintos trabajos previos [10,20,21]. Los mismos tipos de análisis se realizaron para estudiar la relación de los fenómenos observados y la activación de la isoforma p47. En este caso, las células fueron transfectadas con ADN que expresa sólo esta isoforma.

Resultados, análisis y discusión

1. Logramos poner en funcionamiento el modelo de estudio en Uruguay y corroboramos que responde de acuerdo a lo descrito en trabajos anteriores. En concreto, las células replican en cultivo e incorporan el plásmido transfectado, y en consecuencia, expresan las dos isoformas de p53 (p47 y p53) que son detectadas de forma clara por WB (Figura 1 – Anexo Figuras). Además, el tratamiento utilizado (tapsigargina, THAP) induce estrés en el retículo endoplásmico, evidenciado por el cambio en la expresión de marcadores mediante WB (calreticulina, Figura 1 – Anexo Figuras, y p21 y BiP no mostrados) y qPCR (BiP, p21, mdm2, no mostrados), de acuerdo a lo reportado anteriormente. Es importante señalar que también detectamos el cambio de expresión esperado de las isoformas de p53 en condiciones de estrés: la expresión de p47 aumenta y la de p53 disminuye, como también ha sido reportado anteriormente (Figura 1 – Anexo Figuras) [24]. También se realizaron experimentos con diferentes tiempos de tratamiento para definir la ventana en la que el sistema respondía de mejor manera y elegimos trabajar con 50 nM de tapsigargina durante 24 horas.

La puesta a punto del modelo se realizó en colaboración con la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo, con quienes luego se estableció una colaboración formal, vínculo que se mantiene y se proyecta para el futuro para abordar en conjunto temas de interés para ambos equipos.

2. Obtuvimos el transcriptoma para todas las condiciones planteadas. El estudio de los transcriptomas por análisis de componentes principales (PCA) muestra que la presencia de p53 en condiciones normales no induce mayores cambios en la expresión general. Sin embargo, las células estresadas se diferencian claramente de las células normales, de acuerdo a lo esperado, pero más importante en el contexto de este proyecto, las células estresadas sin p53 y las células estresadas con p53 también presentan grandes diferencias entre sí. Esto sugiere que p53 juega un rol central en la respuesta al estrés en el retículo.

Tomamos como cambios relevantes aquellos en los que la variación de la expresión del gen entre las diferentes condiciones tuviera un valor absoluto mayor o igual al $\log_2(1,5)$ (lo que se corresponde con un aumento de 50% o una disminución de aprox. 33%) y respaldadas con un valor corregido de valor p menor a 0,05. De esta manera, se obtuvieron listas de genes diferencialmente expresados (DEGs) a nivel de ARN asociados a la presencia del estrés (independientes de p53, 542 genes) y también genes cuya expresión varía sólo cuando existe la combinación de estrés y presencia de p53 (301 genes) (Figura 2 – Anexo Figuras). De acuerdo a análisis de GO, los genes cuya expresión se ve modificada independiente de p53 indican que el estrés disminuye la replicación del ADN y el ciclo celular, lo que sugiere que las células disminuyen su replicación, de acuerdo a lo esperado. Por otro lado, se inducen la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), procesos de degradación de proteínas (ERAD) y se afectan vías metabólicas, que en conjunto buscan aliviar el estrés. Estos procesos están descritos en la literatura y por tanto señalan que nuestro modelo de estudio responde de forma correcta y validan su uso [11,12]. El grupo de DEGs asociados a la combinación estrés en presencia de p53 sugiere que p53 contribuye a la disminución de la replicación de las células e inhibe la actividad de factores vinculados a la traducción. Por otro lado, promueve la muerte celular y la respuesta al estrés en el retículo. Algunas de estas respuestas celulares han sido

vinculadas a p53 pero nunca en el contexto de la UPR en estas condiciones. Además, los resultados sugieren que p53 actúa principalmente disminuyendo la expresión de genes blanco (260 genes inhibidos vs. 41 genes inducidos), en oposición a la actividad detectada en el contexto de otros tipos de estrés donde de preferencia activa la expresión de genes.

3. También obtuvimos el proteoma para todas las condiciones planteadas. Para estudiar las respuestas a nivel proteico, también consideramos como cambios relevantes aquellos en los que la variación de la expresión de la proteína entre las diferentes condiciones tuviera un valor absoluto mayor o igual al $\log_2(1,5)$ (lo que se corresponde con un aumento de 50% o una disminución de aprox. 33%) y respaldadas con un valor corregido de valor p menor a 0,05. De esta forma obtuvimos listas de proteínas diferencialmente expresadas (DEPs) asociadas al estrés (independientes de p53, 242 proteínas) y también DEPs en respuesta a la combinación de estrés en presencia de p53 (272 proteínas) (Figura 3 – Anexo Figuras). De acuerdo a análisis de GO, las proteínas que se expresan diferencialmente de forma independiente de p53, y en concordancia con los resultados a nivel de ARN, sugieren que diversos procesos relacionados al metabolismo del ADN y proteínas así como a la división celular están inhibidos. Por otro lado, el estrés induce respuestas en el RE como UPR y ERAD y altera el metabolismo celular, lo que sumado tiene como objetivo aliviar el estrés [11,12]. También se observa la actividad de vías de regulación de la muerte celular programada, de acuerdo a lo esperado [14]. Por su parte, las células estresadas que expresan p53 presentan una disminución de procesos como transcripción y biosíntesis de diversas macromoléculas, traducción, procesamiento de ARN, ensamblado de complejos ribonucleoproteicos, autofagia, y ciclo celular. De forma interesante, no se encuentran procesos específicamente inducidos por p53 durante el estrés.

4. Con el fin de evaluar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de los genes mencionados más arriba, realizamos la comparación entre los valores de cambio de expresión obtenidos al contrastar condición de estrés (THAP) vs. normal (DMSO) tanto a nivel de ARN como de proteínas y de forma independiente en ausencia o presencia de p53. De esta forma obtuvimos gráficos de correlación que muestran que la expresión de la mayoría de los genes para los que tenemos datos a nivel de ARN y proteína o no varía (puntos grises en Figura 3A – Anexo Figuras) o está acoplada entre esos dos niveles (puntos azules en Figura 3A – Anexo Figuras). Sin embargo, hay algunos que muestran mayor variación de expresión en uno de los niveles (puntos rojos y verdes en Figura 3A – Anexo Figuras).

5. De forma diferente a lo planteado originalmente en la propuesta, decidimos quitar el foco del estudio en profundidad de unos pocos genes y por el contrario abarcar más blancos desde el estudio de las regiones reguladoras presentes en las secuencias de los 5'UTR de los ARNm seleccionados. La razón de este cambio se fundamenta en el resultado obtenido al comparar los 5'UTR de los ARNm de los genes que mostraban inhibición de la proteína pero que no se correspondía con el mismo cambio a nivel del ARN (o porque aumentaba o permanecía invariable, llamados desacoplados) con aquellos genes para los que detectamos una inhibición tanto a nivel de proteína como de ARN (llamados acoplados), siempre en presencia de p53. Esto nos permitió detectar un enriquecimiento de una secuencia rica en guaninas (G) plausible de formar una estructura de tipo cuarteta-G (o G-quadruplex en inglés) (Figura 3B y 3C – Anexo Figuras). Esta estructura formada por moléculas de ARN o ADN ricas en Gs son muy estables, están siendo reportadas en un número creciente de genes/ARNs, y sus funciones estructurales y regulatorias empiezan a ser cada vez más conocidas y relevantes [39]. La detección de este enriquecimiento nos hizo pensar en la posibilidad de que parte de la regulación ejercida por p53 dependa de ese motivo y para ponerlo a prueba decidimos clonar la secuencia completa de los 5'UTRs de algunos genes candidatos (basados en datos más robustos de expresión y proximidad con la secuencia motivo encontrada) delante de la secuencia codificante de la proteína reportera GFP. De esta manera, redujimos el número de reactivos necesarios para estudiar el posible efecto de la presencia de esa secuencia (un solo anticuerpo contra GFP en lugar de varios anticuerpos específicos para cada una de las proteínas seleccionadas). Así, pudimos detectar que los 5'UTR de varios de los genes seleccionados conducen a una disminución de la expresión de la proteína GFP cuando las células son co-transfectadas con el plásmido que expresa p53. Por el contrario, la secuencia de GFP desprovista de secuencias regulatorias de genes blanco no responde a la presencia de p53, lo que se evidencia por los niveles de expresión similares de GFP en ese caso (Figura 5 – Anexo Figuras). Como control, utilizamos una secuencia proveniente del ARNm de BiP que también resulta en la reducción de la expresión de la proteína reportera, de acuerdo a datos publicados previamente por integrantes del equipo [21]. Esto apunta a que, efectivamente, la presencia de ese motivo de secuencia jugaría un rol en el control de la expresión de genes por parte de p53 de forma post-transcripcional.

6. Con el fin de estudiar si la disminución de la expresión de GFP depende de la degradación de la proteína por parte del proteosoma, las células co-transfectadas con los plásmidos que expresan GFP acoplado a los 5'UTRs de genes seleccionados y p53, fueron incubadas con 25 μ M de MG132 durante las últimas 2 h del experimento, un fármaco que inhibe la degradación de proteínas llevada a cabo por el proteosoma. El tratamiento con MG132 fue incapaz de revertir la disminución de la expresión de la proteína GFP observada en presencia de p53 cuando los plásmidos tienen 5'UTRs de genes blanco (Figura 6 – Anexo Figuras), lo que sugiere que la degradación de la proteína no es la responsable de la disminución de la señal y por el contrario, apunta a mecanismos vinculados a la producción de proteína de novo.

7. La eventual relación entre el fenotipo observado para la proteína reportera GFP bajo la regulación de secuencias 5'UTR de genes blanco con la presencia de la isoforma p47 fue abordada usando el mismo modelo celular. En este caso, células H1299 fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros y con plásmidos que solo expresan o p53 o la isoforma p47, pero no ambas juntas. Estos experimentos muestran que la reducción de la expresión de GFP inducida por la presencia de p53 también es obtenida cuando la isoforma presente en las células es p47 (Figura 7 – Anexo Figuras). Además, si bien no es estrictamente comparable, la disminución de la expresión de GFP en presencia de p47 es similar a la observada al utilizar la isoforma canónica p53. Estas observaciones sugieren que ambas isoformas tienen la capacidad de controlar la expresión del reportero (y por tanto de los genes en cuestión) y que las diferencias de expresión observadas en los estudios "ómicos", a partir de los que fueron seleccionados los genes blancos a estudiar, podrían no solo depender del cambio de expresión relativa de las isoformas de p53 sino que de algún otro fenómeno asociado al estrés.

Conclusiones y recomendaciones

La exitosa puesta en funcionamiento del modelo de estudio no solo es relevante por los resultados obtenidos en el marco de este proyecto en particular sino también por las implicancias que tiene para nuestro grupo. Esto se debe a que comenzamos a utilizar la infraestructura para cultivar células en Facultad y porque adaptamos a nuestras necesidades las herramientas necesarias para hacerlo, lo que ahora nos permite abordar otras preguntas que requieran esta aproximación. En relación a los objetivos del proyecto, optimizamos las condiciones de cultivo, transfección y tratamiento, y pudimos repetir resultados previamente publicados, lo que valida el modelo.

El análisis del transcriptoma de células en las que se indujo la UPR muestra que nuestro modelo en general responde de acuerdo a los datos encontrados en la literatura. Sin embargo, no hay muchos estudios enfocados en el rol de p53 en este contexto y en ese sentido, nuestros resultados son muy relevantes y novedosos ya que remarcan la importancia de p53 en contribuir con la correcta inducción de la respuesta. En concreto, los análisis de PCA adelantan que existen diferencias entre muestras estresadas que no tienen vs. aquellas que tienen p53. En primer lugar, es de destacar que p53 actúa principalmente disminuyendo la expresión de genes (260 genes inhibidos vs. 41 genes inducidos, Figura 2B – Anexo Figuras), en oposición a la actividad detectada en el contexto de otros tipos de estrés donde de preferencia activa la expresión génica. Al poner el foco en los análisis de ontología, detectamos que p53 contribuye a la disminución de la replicación de las células e inhibe la actividad de factores vinculados a la traducción. Por otro lado, promueve la muerte celular y la respuesta al estrés en el retículo. Algunas de estas respuestas celulares han sido vinculadas a p53 pero nunca en el contexto de la UPR en estas condiciones. Asimismo, hemos detectado cambios de expresión hasta ahora no reportados en genes que codifican para factores reguladores centrales de la UPR y que proponemos explorar en el futuro cercano. Estas actividades no previstas en el proyecto serán abordadas para confirmar los resultados obtenidos y eventualmente ahondar en el mecanismo por el que p53 afecta la expresión del ARNm de esos genes, lo que puede derivar en nuevas propuestas de investigación.

En la misma línea, los resultados de proteómica apuntan a que los cambios relativos de expresión dependientes de p53 tienen un fuerte componente inhibitorio, como lo sugiere el número mayor de proteínas con menos expresión en condiciones de estrés en relación a aquellas inducidas (222 vs. 50, respectivamente). Esto resultó en que el enriquecimiento de términos por ontología no arrojará ninguna vía celular que se encuentre específicamente inducida por p53 durante el estrés. Nuevamente, esto muestra que en condiciones de estrés que afectan la expresión de proteínas, las células optan por reducir la producción de nuevas proteínas para aliviar las condiciones y favorecer la reparación. Es importante destacar que el estrés per sé promueve cambios relativos de expresión caracterizados por mayor inhibición de proteínas (y también de ARNs), respuesta que se ve reforzada por la inhibición orquestada por p53 durante la UPR. Esto pone de manifiesto el control que ejerce p53 sobre vías diversas y centrales para la célula y que la firma de expresión que define a la UPR [40] no es completa sin la actividad de p53. Estos resultados están siendo compilados para preparar una publicación que proyectamos enviar en el segundo semestre del 2023.

Los mecanismos moleculares que estén detrás de la disminución de proteínas específicas cuando las células expresan p53 pueden ser varios y a muy diversos niveles; desde la compactación de la cromatina hasta la degradación de proteínas. La regulación de cada uno de esos niveles puede verse afectado para diferentes grupos de proteínas e incluso actuar en ciertos casos de forma coordinada. En ese sentido, nosotros/as decidimos poner el foco en un grupo de genes/proteínas cuya expresión depende de la presencia de p53 durante el estrés y por procesos que ocurren luego de que los ARNm son sintetizados, en particular en la producción de proteínas. Aquí se encuentran genes para los que detectamos un desacople entre la variación relativa de expresión de ARNm y proteína cuando se comparan las condiciones de estrés (THAP) con control (DMSO) y prestamos particular atención a proteínas que disminuyan su expresión de manera independiente de lo que ocurre con el ARNm que la codifica (genes que llamamos con expresión desacoplada). El estudio de las características de esos ARNm reveló en varios de ellos la presencia de una secuencia rica en guaninas (G) plausible de

formar una estructura de tipo cuarteta-G (o G-quadruplex en inglés) en sus 5'UTRs (Figura 3B y 3C – Anexo Figuras). En los últimos años se han acumulado reportes con enfoque estructural y regulatorio que señalan que estas estructuras cumplen funciones muy relevantes en el control de la terminación de la transcripción, en la formación de complejos ribonucleoproteicos, en la regulación de la traducción y el splicing, y en la localización de las moléculas de ARN [39]. Curiosamente, se ha reportado que p53 une estructuras de cuarteta-G en ADN y además interaccionaría con estas estructuras de forma indirecta a través de metabolitos, lo que contribuye al control de la expresión de los genes que presentan cuarteta-G en sus regiones reguladoras [41,42]. Esta observación permite pensar que la presencia de estas estructuras en algunos de los genes identificados como desacoplados podría ser una plataforma a través de la que p53 ejerza, se de manera directa o indirecta, cierto control de la expresión de las proteínas asociadas. Para comenzar a estudiar esa hipótesis, seleccionamos algunos genes desacoplados y clonamos sus regiones 5'UTR delante de la secuencia codificante de la proteína reportera GFP. La expresión de GFP codificada en la mayoría de los plásmidos conteniendo los 5'UTRs, pero no de aquella control sin 5'UTR, se vio reducida tanto en presencia de p53 como también de p47 de forma aislada, lo que sugiere que efectivamente, al menos para la mayoría de estos genes, la regulación post-transcripcional ejercida por estas dos isoformas de p53 depende de la presencia de esas secuencias regulatorias. En este momento estamos lejos de entender cuál es el mecanismo molecular. ¿Existe una regulación de la localización y/o secuestro de los ARNm? ¿Se ve afectado el inicio de la traducción? ¿O la degradación de proteínas? Si bien las respuestas definitivas a estas preguntas aún se nos escapan, en este proyecto, y de acuerdo a lo planteado en el objetivo específico final, realizamos una aproximación inicial que nos brinde pistas sobre cómo continuar en futuras postulaciones. Para eso, analizamos la expresión de GFP en el mismo modelo y en las mismas condiciones pero incorporando la inhibición del complejo 26S proteosoma encargado de parte de la degradación de proteínas en el citoplasma celular. Para eso utilizamos el fármaco MG132, inhibidor selectivo del 26S proteosoma. El tratamiento con MG132 fue incapaz de revertir el efecto de disminución de la expresión de GFP codificada en dos de los plásmidos que contienen 5'UTRs de los genes seleccionados, lo que apunta a que la síntesis de proteínas podría ser el blanco del accionar de p53. En los meses que restan de proyecto intentaremos profundizar en este resultado y sin dudas también serán el foco de futuras postulaciones, que entre otras preguntas propondrán entender si existe una interacción directa entre p53 y los ARNm involucrados.

El conjunto de resultados obtenidos nos permite afirmar que la mayoría de los objetivos planteados fueron logrados de forma satisfactoria. Asimismo, nos ha permitido plantear nuevas y relevantes preguntas sobre la biología básica de p53 en cuanto a sus capacidades bioquímicas y las consecuencias fisiológicas de unir ADN y ARN, el papel que cumple en orquestar la respuesta celular en las condiciones de estrés estudiadas que tiene una relación directa con enfermedades no transmisibles de alta incidencia, y los procesos moleculares que controla para moldear la expresión génica. Lo antes mencionado, sumado a las instancias de divulgación y difusión para compartir nuestro trabajo, el establecimiento de nuevas colaboraciones nacionales, así como la formación de recursos humanos a nivel de grado y posgrado enmarcadas en esta propuesta, nos hacen pensar que el proyecto culmina de forma exitosa y nos alientan a continuar desarrollando esta línea de investigación.

Referencias bibliográficas

1. Vousden, K.H.; Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of P53. *Cell* 2009, 137, 413–431, doi:10.1016/j.cell.2009.04.037.
2. Bouaoun, L.; Sonkin, D.; Ardin, M.; Hollstein, M.; Byrnes, G.; Zavadil, J.; Olivier, M. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum. Mutat.* 2016, 37, 865–876, doi:10.1002/humu.23035.
3. Ogden, S.K.; Lee, K.C.; Wernke-Dollries, K.; Stratton, S.A.; Aronow, B.; Barton, M.C. P53 Targets Chromatin Structure Alteration to Repress β -Fetoprotein Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 42057–42062, doi:10.1074/jbc.C100381200.
4. Wang, S.-P.; Wang, W.-L.; Chang, Y.-L.; Wu, C.-T.; Chao, Y.-C.; Kao, S.-H.; Yuan, A.; Lin, C.-W.; Yang, S.-C.; Chan, W.-K.; et al. P53 Controls Cancer Cell Invasion by Inducing the MDM2-Mediated Degradation of Slug. *Nat Cell Biol* 2009, 11, 694–704, doi:10.1038/ncb1875.
5. Fischer, M. Census and Evaluation of P53 Target Genes. *Oncogene* 2017, 36, 3943–3956, doi:10.1038/ncr.2016.502.
6. Barak, Y.; Juven, T.; Haffner, R.; Oren, M. Mdm2 Expression Is Induced by Wild Type P53 Activity. *EMBO J.* 1993, 12, 461–468.
7. el-Deiry, W.S.; Harper, J.W.; O'Connor, P.M.; Velculescu, V.E.; Canman, C.E.; Jackman, J.; Pietenpol, J.A.; Burrell, M.; Hill, D.E.; Wang, Y. WAF1/CIP1 Is Induced in P53-Mediated G1 Arrest and Apoptosis. *Cancer Res.* 1994, 54, 1169–1174.
8. Miyashita, T.; Harigai, M.; Hanada, M.; Reed, J.C. Identification of a P53-Dependent Negative Response Element in the Bcl-2 Gene. *Cancer Res.* 1994, 54, 3131–3135.
9. Mlynarczyk, C.; Fähræus, R. Endoplasmic Reticulum Stress Sensitizes Cells to DNA Damage-Induced Apoptosis through P53-Dependent Suppression of P21(CDKN1A). *Nat Commun* 2014, 5, 5067, doi:10.1038/ncomms6067.
10. López, I.; Tournillon, A.-S.; Nylander, K.; Fähræus, R. P53-Mediated Control of Gene Expression via mRNA Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Cycle* 2015, 14, 3373–3378, doi:10.1080/15384101.2015.1090066.
11. Hetz, C.; Chevet, E.; Oakes, S.A. Proteostasis Control by the Unfolded Protein Response. *Nat Cell Biol* 2015, 17, 829–838, doi:10.1038/ncb3184.
12. Oakes, S.A.; Papa, F.R. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2015, 10, 173–194, doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
13. Gonzalez-Teuber, V.; Albert-Gasco, H.; Auyeung, V.C.; Papa, F.R.; Mallucci, G.R.; Hetz, C. Small Molecules to Improve ER Proteostasis in Disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 2019, 40, 684–695, doi:10.1016/j.tips.2019.07.003.
14. Urrea, H.; Dufey, E.; Lisbona, F.; Rojas-Rivera, D.; Hetz, C. When ER Stress Reaches a Dead End. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1833, 3507–3517, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.07.024.
15. Costa-Mattioli, M.; Walter, P. The Integrated Stress Response: From Mechanism to Disease. *Science* 2020, 368, doi:10.1126/science.aat5314.
16. Fusée, L.T.S.; Marín, M.; Fähræus, R.; López, I. Alternative Mechanisms of P53 Action During the Unfolded Protein Response. *Cancers (Basel)* 2020, 12, doi:10.3390/cancers12020401.
17. Liang, S.; Bellato, H.M.; Lorent, J.; Lupinacci, F.C.S.; Oertlin, C.; van Hoef, V.; Andrade, V.P.; Roffé, M.; Masvidal, L.; Hajj, G.N.M.; et al. Polysome-Profiling in Small Tissue Samples. *Nucleic Acids Research* 2018, 46, e3–e3, doi:10.1093/nar/gkx940.
18. Loayza-Puch, F.; Drost, J.; Rooijers, K.; Lopes, R.; Elkon, R.; Agami, R. P53 Induces Transcriptional and Translational Programs to Suppress Cell Proliferation and Growth. *Genome Biol.* 2013, 14, R32, doi:10.1186/gb-2013-14-4-r32.
19. Zaccara, S.; Tebaldi, T.; Pederiva, C.; Ciribilli, Y.; Bisio, A.; Inga, A. P53-Directed Translational Control Can Shape and Expand the Universe of P53 Target Genes. *Cell Death Differ.* 2014, 21, 1522–1534, doi:10.1038/cdd.2014.79.
20. Tournillon, A.-S.; López, I.; Malbert-Colas, L.; Findakly, S.; Naski, N.; Olivares-Illana, V.; Karakostis, K.; Vojtesek, B.; Nylander, K.; Fähræus, R. P53 Binds the Mdmx mRNA and Controls Its Translation. *Oncogene* 2017, 36, 723–730, doi:10.1038/ncr.2016.236.
21. López, I.; Tournillon, A.-S.; Prado Martins, R.; Karakostis, K.; Malbert-Colas, L.; Nylander, K.; Fähræus, R. P53-Mediated Suppression of BiP Triggers BIK-Induced Apoptosis during Prolonged Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Death Differ.* 2017, 24, 1717–1729, doi:10.1038/cdd.2017.96.
22. Gunawardana, Y.; Niranjana, M. Bridging the Gap between Transcriptome and Proteome Measurements Identifies Post-Translationally Regulated Genes. *Bioinformatics* 2013, 29, 3060–3066, doi:10.1093/bioinformatics/btt537.
23. Kasteri, J.; Das, D.; Zhong, X.; Persaud, L.; Francis, A.; Muharam, H.; Sauane, M. Translation Control by P53. *Cancers (Basel)* 2018, 10, doi:10.3390/cancers10050133.
24. Bourougaa, K.; Naski, N.; Boularan, C.; Mlynarczyk, C.; Candeias, M.M.; Marullo, S.; Fähræus, R. Endoplasmic Reticulum

- Stress Induces G2 Cell-Cycle Arrest via mRNA Translation of the P53 Isoform P53/47. *Molecular Cell* 2010, 38, 78–88, doi:10.1016/j.molcel.2010.01.041.
25. Yin, Y.; Stephen, C.W.; Luciani, M.G.; Fåhræus, R. P53 Stability and Activity Is Regulated by Mdm2-Mediated Induction of Alternative P53 Translation Products. *Nat. Cell Biol.* 2002, 4, 462–467, doi:10.1038/ncb801.
26. Jorruiz, S.M.; Bourdon, J.-C. P53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016, 6, doi:10.1101/cshperspect.a026039.
27. Ohki, R.; Kawase, T.; Ohta, T.; Ichikawa, H.; Taya, Y. Dissecting Functional Roles of P53 N-Terminal Transactivation Domains by Microarray Expression Analysis. *Cancer Sci.* 2007, 98, 189–200, doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00375.x.
28. Sivan, G.; Elroy-Stein, O. Regulation of mRNA Translation during Cellular Division. *Cell Cycle* 2008, 7, 741–744, doi:10.4161/cc.7.6.5596.
29. Karakostis, K.; Vadivel Gnanasundram, S.; López, I.; Thermou, A.; Wang, L.; Nylander, K.; Olivares-Illana, V.; Fåhræus, R. A Single Synonymous Mutation Determines the Phosphorylation and Stability of the Nascent Protein. *J Mol Cell Biol* 2019, 11, 187–199, doi:10.1093/jmcb/mjy049.
30. Fernández-Calero, T.; Davyt, M.; Perelmuter, K.; Chalar, C.; Bampi, G.; Persson, H.; Tosar, J.P.; Hafstað, V.; Naya, H.; Rovira, C.; et al. Fine-Tuning the Metabolic Rewiring and Adaptation of Translational Machinery during an Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *Cancer Metab* 2020, 8, 8, doi:10.1186/s40170-020-00216-7.
31. López, I.; Chalatsi, E.; Ellenbroek, S.I.J.; Andrieux, A.; Roux, P.-F.; Cerapio, J.P.; Jouvion, G.; van Rheenen, J.; Seeler, J.-S.; Dejean, A. An Unanticipated Tumor-Suppressive Role of the SUMO Pathway in the Intestine Unveiled by Ubc9 Haploinsufficiency. *Oncogene* 2020, doi:10.1038/s41388-020-01457-y.
32. Martin, S.A.M.; Dehler, C.E.; Król, E. Transcriptomic Responses in the Fish Intestine. *Developmental & Comparative Immunology* 2016, 64, 103–117, doi:10.1016/j.dci.2016.03.014.
33. Zhang, W.; Yu, Y.; Hertwig, F.; Thierry-Mieg, J.; Zhang, W.; Thierry-Mieg, D.; Wang, J.; Furlanello, C.; Devanarayan, V.; Cheng, J.; et al. Comparison of RNA-Seq and Microarray-Based Models for Clinical Endpoint Prediction. *Genome Biol* 2015, 16, 133, doi:10.1186/s13059-015-0694-1.
34. Carvalho, B.S.; Irizarry, R.A. A Framework for Oligonucleotide Microarray Preprocessing. *Bioinformatics* 2010, 26, 2363–2367, doi:10.1093/bioinformatics/btq431.
35. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, e47, doi:10.1093/nar/gkv007.
36. Santos, M.D.M.; Lima, D.B.; Fischer, J.S.G.; Clasen, M.A.; Kurt, L.U.; Camillo-Andrade, A.C.; Monteiro, L.C.; de Aquino, P.F.; Neves-Ferreira, A.G.C.; Valente, R.H.; et al. Simple, Efficient and Thorough Shotgun Proteomic Analysis with PatternLab V. *Nat Protoc* 2022, 17, 1553–1578, doi:10.1038/s41596-022-00690-x.
37. Prieto, D.; Sotelo, N.; Seija, N.; Sernbo, S.; Abreu, C.; Durán, R.; Gil, M.; Sicco, E.; Irigoien, V.; Oliver, C.; et al. S100-A9 Protein in Exosomes from Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Promotes NF- κ B Activity during Disease Progression. *Blood* 2017, 130, 777–788, doi:10.1182/blood-2017-02-769851.
38. Tucci, P.; Portela, M.; Chetto, C.R.; González-Sapienza, G.; Marín, M. Integrative Proteomic and Glycoproteomic Profiling of Mycobacterium Tuberculosis Culture Filtrate. *PLoS ONE* 2020, 15, e0221837, doi:10.1371/journal.pone.0221837.
39. Fay, M.M.; Lyons, S.M.; Ivanov, P. RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *Journal of Molecular Biology* 2017, 429, 2127–2147, doi:10.1016/j.jmb.2017.05.017.
40. Reich, S.; Nguyen, C.D.L.; Has, C.; Steltgens, S.; Soni, H.; Coman, C.; Freyberg, M.; Bichler, A.; Seifert, N.; Conrad, D.; et al. A Multi-Omics Analysis Reveals the Unfolded Protein Response Regulon and Stress-Induced Resistance to Folate-Based Antimetabolites. *Nat Commun* 2020, 11, 2936, doi:10.1038/s41467-020-16747-y.
41. Petr, M.; Helma, R.; Polášková, A.; Krejčí, A.; Dvořáková, Z.; Kejnovská, I.; Navrátilová, L.; Adámik, M.; Vorlíčková, M.; Brázdová, M. Wild-Type P53 Binds to MYC Promoter G-Quadruplex. *Bioscience Reports* 2016, 36, e00397, doi:10.1042/BSR20160232.
42. Zhang, L.; Lu, Y.; Ma, X.; Xing, Y.; Sun, J.; Jia, Y. The Potential Interplay between G-Quadruplex and P53: Their Roles in Regulation of Ferroptosis in Cancer. *Front Mol Biosci* 2022, 9, 965924, doi:10.3389/fmolb.2022.965924.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)