



# Caracterización funcional de la interacción de la proteína p53 con la ubiquitina ligasa HERC2

Mónica Cubillos Rojas

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Caracterización funcional  
de la interacción de la proteína p53  
con la ubiquitina ligasa HERC2**

**Mónica Cubillos Rojas**

Tesis Doctoral

2014

## ***Materiales y métodos***

---



## 1. Plásmidos

Los plásmidos utilizados durante este trabajo y su aplicación se indican en la tabla M1.

**Tabla M1. Inserto, vectores y utilidad de los plásmidos utilizados en este trabajo**

Plásmido	Inserto	Vector	Utilidad	Referencia
GST	Epítipo GST	pDEST15	Clonaje de genes o fragmentos fusionados a GST, inducible por IPTG para expresión en bacterias y purificación proteína recombinante	Invitrogen.
GST-CPH (pMCR7)	Dominio CPH de HERC2 humano (2547-2640), fusionado a GST.	pDEST15	Dominio CPH fusionado a GST para expresión en bacterias y purificación de proteína recombinante.	Producido en el laboratorio.
GST (pEBG)	Epítipo GST	pEBG	Clonaje de genes o fragmentos fusionados a GST para expresar en células humanas	(Long et al., 2005)
GST-HERC2 (4785-4834)	Aminoácidos 4785-4834 de la proteína humana HERC2 fusionados a GST	pDEST15	Expresión en bacterias y purificación de proteína recombinante	Producido en el laboratorio.
GST-p53	p53 total, humana fusionada a GST	pEBG	Expresión en células humanas	(Andrews et al., 2006)
GST-p53 ΔN200	Proteína p53 humana delecionada de los primeros 200 aminoácidos fusionada a GST	pEBG	Expresión en células humanas	(Andrews et al., 2006)
GST-p53 ΔN300	Proteína p53 humana delecionada de los primeros 300 aminoácidos fusionada a GST	pEBG	Expresión en células humanas	(Andrews et al., 2006)
GST-p53 ΔN300ΔC43	Proteína p53 humana delecionada de los primeros 300 y últimos 43 aminoácidos fusionada a GST	pEBG	Expresión en células humanas	(Andrews et al., 2006)
His-p53 (1-320)	Proteína p53 humana, aminoácidos 1-320	pET-15b	Expresión en bacterias para purificación de proteína recombinante	(Sheng et al., 2008)
His-p53 (1-393)	Proteína p53 humana entera, aminoácidos 1-393)	pET-15b	Expresión en bacterias para purificación de proteína recombinante de la proteína	(Sheng et al., 2008)

## Materiales y métodos

Plásmido	Inserto	Vector	Utilidad	Referencia
Myc- HERC2 Pro594Leu	HERC2 humana de los aminoácidos 1-1295 con la mutación Pro594Leu con el epítipo Myc	pcDNA3	Expresión en células humanas, con el tag Myc. Se derivó a partir de Myc-HERC2 (1-1295) por mutagénesis dirigida para incorporar la mutación	Producido en el laboratorio, (Harlalka et al., 2013)
Myc-HERC2 (1-1295)	HERC2 humana de los aminoácidos 1-1295 con el epítipo Myc	pcDNA3	Expresión en células humanas	(Wu et al., 2010)
Myc-HERC2 F3	HERC2 humana de los aminoácidos 2292-2923 con el epítipo Myc	pcDNA3	Expresión en células humanas	(Wu et al., 2010)
p53 <sup>WT</sup>	Proteína p53 humana entera	pCMV	Expresión en células humanas	(Itahana et al., 2009)
p53 <sup>L344P</sup>	p53 con la mutación L344P	pCMV	Expresión en células humanas. Mutación presente en pacientes con síndrome Li-Fraumeni	(Itahana et al., 2009)
p53 <sup>R337C</sup>	p53 con la mutación R337C	pCMV	Expresión en células humanas. Mutación presente en pacientes con síndrome Li-Fraumeni	(Itahana et al., 2009)
p53 <sup>NES</sup>	Proteína p53 entera con sustituciones en las posiciones 340, 344, 348 y 350 por alanina	pCMV	Expresión en células humanas. Mutante de p53 retenido en el núcleo	(Itahana et al., 2009)
p53 <sup>NLS</sup>	Proteína p53 entera con sustituciones en las posiciones 305, 306, 319, 320 y 321 por alanina	pCMV	Expresión en células humanas. Mutante de p53 retenido en el citoplasma	(Itahana et al., 2009)
p53 CFP	Proteína p53 humana entera fusionada al epítipo CFP	pCMV	Expresión en células humanas de p53 fusionada al epítipo CFP (Ex 458; Em 480) para visualizar la expresión in vivo por microscopía	(Itahana et al., 2009)
p53 <sup>NES</sup> CFP	Proteína p53 entera con sustituciones en las posiciones 340, 344, 348 y 350 por alanina, fusionada al epítipo CFP	pCMV	Expresión en células humanas de p53 fusionada al epítipo CFP para visualizar la expresión in vivo por microscopía	(Itahana et al., 2009)
p53 <sup>NLS</sup> CFP	Proteína p53 entera con sustituciones en las posiciones 305, 306, 319, 320 y 321 por alanina, fusionada al epítipo CFP	pCMV	Expresión en células humanas proteína p53 fusionada al epítipo CFP para visualizar la expresión in vivo por microscopía	(Itahana et al., 2009)

Plásmido	Inserto	Vector	Utilidad	Referencia
p21WAF1	Promotor <i>p21<sup>waf1</sup></i>	pcBluescript II KS (+) + luc	Expresión en células humanas, para ensayos de reportero luciferasa	(Enari et al., 2006)
p53R2	Promotor <i>p53R2</i>	550RE-luc	Expresión en células humanas, para ensayos de reportero luciferasa	(Enari et al., 2006)
p53AIP1	Promotor <i>p53AIP1</i>	pCAGGS	Expresión en células humanas, para ensayos de reportero luciferasa	(Enari et al., 2006)

## 2. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados durante este trabajo se indican en la tabla M2.

**Tabla M2. Anticuerpos utilizados en este trabajo, su aplicación (IF: inmunofluorescencia, WB; western blot, IP: inmunoprecipitación) dilución, fuente y casa comercial**

Anticuerpo	Aplicación	Origen	Compañía
53BP1	IF (1:5000)	Mouse (IgG2b)	BD Transduction Laboratories (612523)
Acetyl-p53 (Lys382)	WB (1:1000)	Rabbit	Cell Signaling (#2525)
Akt	WB (1:1000)	Rabbit	Cell Signaling (#9272)
ATR	WB (1:1000)	Goat	Santa Cruz Biotechnology (sc-1887)
Clathrin Heavy Chain (CHC)	WB (1:1000)	Mouse, IgG1	BD Transduction Laboratories (610499)
c-myc (9E10)	WB (1:1000)	Mouse, IgG1	Roche (1 667 149)
E6-AP (F-1)	WB (1:1000)	Mouse, IgG2a	Santa Cruz Biotechnology (sc-166688)
GST	WB (1:1000)	Mouse, IgG1	GenScript (A00865)
Hamartin/TSC1	WB (1:1000)	Rabbit	Cell Signaling (#4906)
HERC1 (363)	IP (5µl)	Rabbit	Producción propia
HERC1 (410)	WB (1:1000) IP (5µg)	Rabbit	Producción propia
HERC1 (Bvg6)	WB (1:1000) IP (5µl)	Rabbit	Producción propia
HERC1(417)	IP (5µl)	Rabbit	Producción propia
HERC2	WB (1:1000)	Mouse, IgG1	BD Transduction Laboratories (612366)
HERC2 (Bvg1)	IP (5 µl)	Rabbit	Producción propia

Anticuerpo	Aplicación	Origen	Compañía
HERC2 (Bvg2)	IP (5 µl) IF (1:50)	Rabbit	Producción propia
HERC2 (Bvg3)	IP (5 µg)	Rabbit	Producción propia
HERC2 (Bvg4)	IP (5 µl)	Rabbit	Producción propia
HERC3	WB (1:1000)	Rabbit	Producción propia
His	WB (1:1000)	Mouse, IgG1	GenScript (A00186)
Lamin A/C (4C11)	WB (1:1000)	Mouse, IgG2a	Cell Signaling (#4777)
LC3	WB (1:1000)	Rabbit	MBL
MDM2 (2A10)	WB (1:500)	Mouse, IgG2a	Abcam (ab16895)
MDMX	WB (1:1000)	Rabbit	Bethyl Laboratories, Inc
mTOR	WB (1:1000)	Rabbit	Cell Signaling (#2972)
p21 (C-19)	WB (1:1000)	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-397)
p53 (D0-1)	WB (1:1000)	Mouse, IgG2a	Santa Cruz Biotechnology (sc-126)
p53 (FL-393)	WB (1:1000) IF (1:100)	Goat	Santa Cruz Biotechnology (sc-6243-9)
p53 Ab5 (D0-7)	WB (1:2000)	Mouse, IgG2b	Thermo Scientific (MS-186-P0)
p70 S6 kinase α	WB (1:1000)	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-230)
Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (JBW301)	IF (1:500)	Mouse, IgG1	Millipore (05-636)
Phospho-p53 (Ser15)	WB (1:1000)	Rabbit	Cell Signaling (#9284)
Ran	WB (1:1000)	Rabbit	Producción propia
RSK	WB (1:1000)	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-231)
Tuberin/TSC2 (C-20)	WB (1:1000)	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-893)
XPA	WB (1:1000)	Mouse (IgG2a/k)	Kamiya Biomedical Company
α-Tubulin	WB (1:5000)	Mouse, IgM	Calbiochem (CP06)
β-actina	WB (1:5000)	Mouse, (IgG1)	Sigma (A5441)

### 3. Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron:

H1299: Células epiteliales derivadas de carcinoma de pulmón de células no pequeñas que presentan una delección parcial homocigota y falta de expresión de la proteína p53.

HCT116: Células epiteliales derivadas de carcinoma colorectal. Presentan una mutación en el codón 13 del proto-oncogen ras.

HEK-293: Células epiteliales derivadas de riñón embrionario transformadas con el adenovirus 5.

HeLa: Línea epitelial derivada de adenocarcinoma de cérvix humano. Contiene la secuencia del papiloma humano 18 (HPV-18). La expresión para p53 es baja, pero los niveles de pRb (supresor retinoblastoma) son normales.

MCF7: Derivadas de cáncer de mama, retienen varias características de epitelio mamario diferenciado como la respuesta a estrógenos. Expresan el oncogen WNT7B.

U2OS: Línea derivada de un sarcoma moderadamente diferenciado de la tibia de una niña de 15 años.

Las células se crecieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina y 100U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomycin. Todos los reactivos son de Biological Industries. Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para el mantenimiento de los cultivos primarios de los fibroblastos humanos cedidos por el Dr. Andrew Crosby, el DMEM se suplementó con 20% de suero fetal bovino.

#### 4. Transfección de plásmidos y siRNAs

Para la transfección de células se utilizó el método estándar de fosfato cálcico. Las células se sembraban el día anterior a la transfección en medio de cultivo DMEM sin antibiótico. El día de la transfección, las células alcanzaban una confluencia del 60%. Los siRNAs se utilizaban a una concentración final de 100 nM. El DNA total plasmídico transfectado para un pocillo de una placa de 6 pozos era de 4 µg.

La secuencia del siRNA utilizado como control negativo fue *NT*: UAGCGACUAAACACAUCA. Para *HERC2* se utilizaron dos secuencias *H2.2*: GACUGUAGCCAGAUUGAAA y *H2.4*: GGAAAGCACUGGAUUCGUU; para *HERC1 Q1*: CGGCAUGGAUGAACAAAUU; para *p53 p53*: GACUCCAGUGGUAUCUAC; para *MDM2 MDM2*: UGGUUGCAUUGUCCAUGGC. Los siRNAs fueron adquiridos de Ecogen o GenePharma.

El análisis de las células transfectadas con siRNAs se realizaba a las 72 horas post-transfección. Cuando la transfección se había realizado con plásmidos se analizaban a las 48 horas.

Para la transfección con Lipofectamina LTX (Invitrogen), se siguieron las instrucciones del fabricante.

## 5. Tratamientos con drogas o inhibidores

Las drogas o inhibidores utilizados durante este trabajo y las concentraciones finales a las cuales se realizaron los tratamientos se muestran en la tabla M3.

**Tabla M3. Inhibidores, drogas, casa comercial y concentraciones utilizadas en este trabajo.**

Inhibidor/Droga	Concentración
Bleomicina (Calbiochem)	0.006 $\mu$ M
Doxorrubicina (Sigma)	0.5 $\mu$ M
Cicloheximida (Calbiochem)	0.007 $\mu$ M
Nutlina-3a (Calbiochem)	10 $\mu$ M
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al)(Sigma)	10 $\mu$ M

Los tratamientos con bleomicina, doxorrubicina o cicloheximida se realizaron a las 48 o 72 horas de transfección (dependiendo si eran plásmidos o siRNAs, respectivamente) a los tiempos indicados. El tratamiento con nutlina-3a se hizo por 16 horas; a las 48 horas post-transfección el compuesto se adicionaba sobre el medio de cultivo y luego de 16 horas de tratamiento las células se lisaron para análisis por *western blot*. El tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 se realizó a las 72 horas post-transfección con siRNAs por 6 horas.

## 6. Curvas de crecimiento y ensayos de clogenicidad

Para las curvas de crecimiento, las células transfectadas (24 horas post-transfección) se sembraron a una densidad de 1.000 ó 3.000 células/pocillo por triplicado en placas de 6 pocillos. Las células se contaron utilizando el contador de células automatizado Scepter (Millipore). Día a día, las

células se fijaron con cristal violeta al 0.2% (con etanol al 2%) por 30 minutos a 37°C. Al final del experimento, el colorante se disolvió con SDS al 1% y la absorbancia se cuantificó a 550 nm.

Para los ensayos de clonogenicidad, las células se sembraban a las 72 horas post-transfección a 500 o 1000 células/pocillo por triplicado en placas de 6 pocillos. Las colonias se dejaban crecer hasta alcanzar un tamaño aproximado de 50 células por colonia (aproximadamente 10-15 días). Después de este tiempo, las células se fijaban con el cristal violeta y el número de colonias se cuantificaba por el software ImageJ.

## 7. Expresión y purificación de proteínas

Para la purificación de proteínas se inoculó 40 mL de medio LB con el *stock* de bacterias que contenían el plásmido que expresaba la proteína de interés y el correspondiente antibiótico y se dejaba crecer durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, el cultivo se ampliaba a 600 mL y se dejaba crecer hasta que la absorbancia medida a 600 nm alcanzara valores entre 0.5-0.8. En este momento, el IPTG se adicionaba a una concentración final de 0.3 mM y el cultivo se crecía por 2 horas más. Después de este tiempo, el cultivo se centrifugaba a 5.000 rpm por 10 minutos. Cuando las proteínas contenían el epítipo 6x-His, el pellet se resuspendió en PBS con inhibidores de proteasas y fosfatasa ( $\beta$ -glicerofosfato 50 mM, vanadato de sodio 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 5  $\mu$ g/mL, aprotinina 5  $\mu$ g/mL, pepstatina A 1  $\mu$ g/mL y benzamidina 100  $\mu$ g/mL) e Imidazol 1 mM. Después, se sonicaba hasta el cambio de turbidez y total ruptura de las células, se adicionaba el detergente Tritón X-100 al 1% de concentración final y se agitaba por 20 minutos en hielo. Luego de este tiempo, se centrifugaba a 15.000 rpm por 20 minutos y el sobrenadante se recuperaba para la incubación con 200  $\mu$ l de resina. La resina utilizada fue *TALON metal affinity resin* (BD Bioscience). La incubación con resina se realizaba a 4°C durante 2-4 horas en agitación. La resina se lavaba tres veces así: PBS con Imidazol 1 mM; PBS con Imidazol 1 mM y NaCl 0.5 M; PBS con Imidazol 1 mM. La resina se resuspendía en PBS y glicerol al 10% concentración final y se valoraba la pureza y concentración. Si era necesario eluir la proteína de la resina, se resuspendía en tampón de elución (Imidazol 100 mM, Tris-HCl 200 mM pH8) y se dejaba en agitación por 10 minutos en hielo, luego se centrifugaba y el sobrenadante se recuperaba. El sobrenadante se dializaba frente a PBS y se valoraba nuevamente la concentración.

Si las proteínas contenían el epítipo GST, el procedimiento era similar al anterior con las siguientes modificaciones. El pellet se resuspendió en tampón de homogenización Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM con los inhibidores de proteasas y fosfatasa mencionados anteriormente. Después de sonicar se adicionaba el detergente CHAPS al 0.3% concentración final. La resina utilizada fue *Glutathione-sepharose* (GE Healthcare) y se utilizaba 200 µl por proteína para purificar. Los lavados se realizaron así: tampón de homogenización con CHAPS al 0.3%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM; tampón de homogenización con NaCl 0.5 M; tampón de homogenización con CHAPS al 0.3%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. El pellet final se resuspendía en Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y glicerol al 10% concentración final. Para eluir de la resina, se resuspendía en tampón de elución (glutatión reducido 50 mM, TrisHCl 50 mM, pH7.5) y se dejaba en agitación por 10 minutos en hielo, luego se centrifugaba y se recuperaba el sobrenadante. El sobrenadante se dializaba frente a PBS y se valoraba nuevamente la concentración.

## 8. Electroforesis de proteínas y western blot

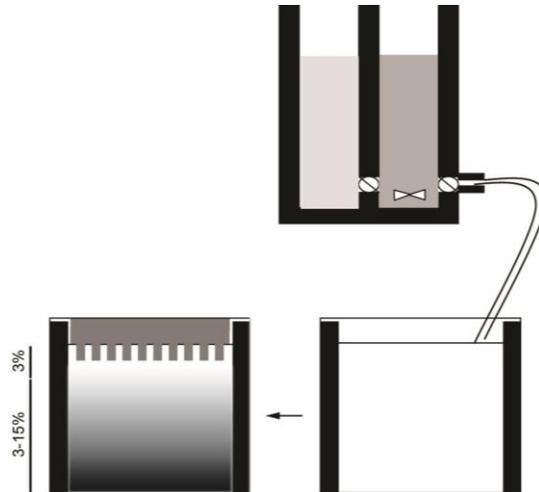
Las células o tejidos se lisaban con tampón CHAPS (TrisHCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, CHAPS 0.3%) o tampón NP40 (TrisHCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, NP40 0.5%) e inhibidores de proteasas y fosfatasa: β-glicerofosfato 50 mM, NaF 50 mM, vanadato de sodio 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 5 µg/mL, aprotinina 5 µg/mL, pepstatina-A 1 µg/mL y benzamidina 100 µg/mL. Se agitaba durante 20 minutos en hielo y se centrifugaba a 13.000xg por 10 minutos. Con el sobrenadante postnuclear (Input), se valoraba la concentración de proteína por el método del BCA de la casa comercial Pierce. Las muestras se resuspendieron con tampón de muestra LDS 4X que contenía Tris-HCl 250 mM pH 8.5, LDS (*lithium dodecyl sulfate*) 2% (p/v), DTT 100mM, EDTA 0.4 mM, glicerol 10% (v/v), rojo fenol 0.2 mM, Azul Coomassie brillante G 0.2 mM y se guardaban a -20°C hasta su uso. Para el análisis simultáneo de proteínas de alto y bajo peso molecular se utilizó el sistema de geles en gradiente Tris-acetato (Cubillos-Rojas et al., 2010; Cubillos-Rojas et al., 2012).

Las cantidades requeridas para preparar un gel en gradiente del 3 al 15% de 8X8 cm que pueda ser utilizado con el sistema Miniprotean II de Biorad, son indicadas en la tabla M4.

Tabla M4. Composición de un gel para hacer un gel en gradiente del 3-15%

	3%	15%
3M Tris-acetato pH 7 (15X) (mL)	0.47	0.27
40% Solución acrilamida (mL)	0.53	1.5
Agua MiliQ (mL)	6	2.23
Volúmen total (mL)	7	4
TEMED ( $\mu$ L)	8.75	5
Persulfato de amonio 10% ( $\mu$ L)	33.25	19

Para preparar un gel en gradiente se utilizaba un fabricante de gradiente (Hoefer) conectado a través de una fina manguera al *cassette* de los cristales (Figura M1). En el compartimento de la izquierda, más lejos de la válvula de salida, se colocaban 4 mL de la solución con menor concentración (3%), mientras que en el derecho equipado con un agitador, se colocaba 4 mL de la solución más concentrada (15%) con el imán. La válvula de salida se abría para permitir que la solución concentrada llegara al fondo de los cristales y en ese momento se abría la otra válvula. De esta forma las soluciones se iban mezclando y formando el gradiente, cuando las soluciones estaban a punto de consumirse, 3 mL de la solución al 3% se adicionaba dentro del compartimento de la derecha y se permitía salir hasta que el volumen alcanzara el borde de los cristales (Cubillos-Rojas et al., 2012).



**Figura M1. Gel de poliacrilamida en gradiente Tris-acetato.** Representación esquemática de cómo hacer un gel en gradiente del 3-15% utilizando un fabricante de gradiente. Se preparan las soluciones de acrilamida al 3 y al 15% con el tampón Tris-acetato cómo se indica en Materiales y métodos y se colocan sobre los compartimentos del fabricante de gradiente: 3% en la izquierda y 15%, cuando el gradiente está por terminarse de hacer, el gel se completa hasta la parte superior del vidrio con solución al 3%.

Para la electroforesis, se utilizaba el tampón Tricina 50 mM, Tris 50 mM, SDS 0.1%, bisulfito de sodio 1.3 mM, pH 8.2. La electroforesis se realizó a 130V. Para la transferencia, se utilizaban membranas de PVDF (Millipore) y el tampón consistía en metanol 20%, bicina 25 mM, bis-tris 25 mM, EDTA 1 mM, bisulfito de sodio 1.3 mM, pH 7.2. La transferencia se realizó a 200mA por 2 horas a 4°C. El bloqueo se realizaba con tampón TBST y leche desnatada en polvo al 10%. La incubación con los diferentes anticuerpos primarios se realizaba durante toda la noche en agitación a 4°C. Para la incubación con anticuerpos secundarios, se utilizaron anticuerpos conjugados a peroxidasa (Invitrogen) a una dilución 1:10.000 preparados en el tampón de bloqueo e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Para la captura de imágenes se utilizó el analizador de imágenes por luminescencia LAS-3000 (Fujifilm). El análisis de las bandas por densitometría se realizó con el software Multi Gauge V3.0.

## 9. Ensayos de inmunoprecipitación, *pull-down*, interacción directa y *oligo pull-down*

Los ensayos de inmunoprecipitación y de *pull-down* se realizaban con células o tejidos lisados en tampón CHAPS o tampón NP40 con inhibidores de proteasas y fosfatasas como se describió en el apartado anterior. 1 mg de extracto de proteína contenida en el sobrenadante postnuclear

recuperado después de la centrifugación (Input) se incubaba con 5 µl del suero pre-inmune (PI) o de anticuerpos anti-HERC2 o anti-HERC1 durante 2 horas a 4°C y se inmunoprecipitaban con 100 µl de proteína A-sefarosa (GE Healthcare) por 1 hora a 4°C. Después la resina se lavaba 5 veces con tampón CHAPS o NP40 sin inhibidores y el pellet final se resuspendía en tampón LDS 2X. Para los ensayos de *pull-down*, los sobrenadantes (Input) se incubaban con 5 µg de las proteínas de fusión a GST purificadas unidas a la resina de glutatión por 2h a 4°C. Los pellets finales se analizaban por *western blot*.

Para los ensayos de interacción indirecta, 4 µg de las proteínas purificadas His-p53 (*wild-type* aminoácidos 1-393), His-p53 delecionada (aminoácidos 1-320) unidas a resina se incubaban con 2 µg de GST-CPH en 0.2 mL de tampón de unión que contenía TrisHCl 50 mM pH7.5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Imidazol 5 mM, NP40 0.5%, DTT 2 mM, BSA 1 mg/mL durante 1 hora a 4°C. Los pellets se lavaban cuatro veces con el tampón de unión y se analizaban por *western blot*.

Para los ensayos de *oligo pull-down*, las células se resuspendían en el tampón que contenía KCl 100 mM, HEPES 10 mM pH 7.9, glicerol 10% (v/v), DTT 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NP40 0.1% (p/v) e inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados se dejaban en agitación por 20 minutos en hielo y luego se centrifugaba a 13.000 xg por 10 minutos. Al sobrenadante recuperado después de la centrifugación, se adicionaban los oligonucleótidos biotinilados a una concentración final de 20 µM y 1 µg poly(dI/dC) (GE Healthcare). La incubación con los oligonucleótidos se realizaba a 4°C por 16 horas. Después se añadía 25 µL de sefarosa-estreptavidina (GE Healthcare) y se dejaba por 1 hora a 4°C. Luego la resina se lavaba cuatro veces en el tampón de lisis sin NP40. El pellet final se resuspendía en tampón LDS 2X y se analizaba por *western blot*. Las secuencia de los oligonucleótidos p53R1 utilizados para el *forward* correspondía a la secuencia 5'GTCAGGAACATGTCCCAACATGTTGAGCTC3' y para el *reverse* 5'AGAAATGAGTGATGTGTC3' (Jeon et al., 2009).

## 10. Fraccionamiento subcelular

Cuando las células fueron tratadas con bleomicina, el tratamiento se realizaba por 3 horas. Después las células se resuspendían en un tampón que contenía HEPES 10 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 10 mM, 0.34 M sacarosa, glicerol 10% (v/v), NaF 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, DTT 1 mM, 0.1% tritón X-100 y se dejaban permeabilizando durante 5 minutos en hielo (Hu et al., 2011). Luego, se

centrifugaba a 4.000 rpm por 5 min, el sobrenadante (fracción citoplasmática) y el pellet (fracción nuclear) se recuperaban. El pellet se lavaba dos veces con el tampón para eliminar restos de citoplasma. Al final el pellet se resuspendía con tampón LDS 2X en la mitad del volumen final del sobrenadante. Para analizar por *western blot*, las muestras se sonicaban antes de cargarlas en el gel. Cuando se realizaron inmunoprecipitaciones después del fraccionamiento, el pellet correspondiente a la fracción nuclear se resuspendía en la mitad del volumen del tampón en el que estuviera el sobrenadante y se sonicaba. En este momento, se adicionaba el detergente NP40 al 0.5% concentración final a la fracción citoplasmática y a la fracción nuclear. Se incubaba en agitación por 20 minutos en hielo. Luego la fracción nuclear se centrifugaba a 13.000xg por 10 minutos y con el sobrenadante se continuaba la inmunoprecipitación como se indicó antes.

### **11. Ensayos de *cross-linking***

Las células transfectadas con siRNAs o plásmidos se lisaban en tampón CHAPS o NP40 a las 72 o 48 horas post-transfección, respectivamente. Después de la lisis, las células se centrifugaban y el sobrenadante se recuperaba. A partir de un stock de glutaraldehído al 1% se adicionaba a los sobrenadantes a las concentraciones indicadas y se incubaba durante 30 minutos en hielo con agitación (Itahana et al., 2009). La reacción se detenía con tampón LDS 4X y se analizaba por *western blot*.

### **12. Inmunofluorescencia**

Las células transfectadas con siRNAs a las 48 horas post-transfección se sembraban sobre placas de 24 pocillos con cubreobjetos para alcanzar una confluencia al día siguiente del 50%. Para las inmunofluorescencias con fibroblastos humanos fue necesario sembrar las células sobre cubreobjetos con poli-lisina. Cuando las células se trataron con bleomicina, la droga se dejó por 1 hora. Después, el medio se aspiraba y se lavaba tres veces con PBS. La fijación se realizaba con paraformaldehído al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Para el bloqueo y la permeabilización, las células se incubaban con PBS, suero fetal bovino al 10% y tritón X-100 al 0.1% por una hora. Los anticuerpos primarios utilizados para las inmunofluorescencias se dejaban durante toda la noche a 4°C. La incubación con los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488/546 anti-rabbit o anti-mouse, Molecular probes) y el TO-PRO3 (Life Technologies) para la tinción de núcleos se realizaba por dos horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios se

preparaban en el tampón de bloqueo y permeabilización. Para el montaje se utilizaba el ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal (Leica TCS-SL).

### 13. Ensayos de reporteros luciferasa

Las transfecciones se realizaron en placas de 6 pocillos y a las 48 horas se sembraron en placas de 24 pocillos. Para un pocillo de 6 pocillos, la cantidad de DNA transfectada era de 4 µg (2.8 µg pcDNA3 o gen regulador, 0.9 µg promotor del gen con actividad luciferasa, 0.3 µg CMV-βgal). Si era necesario transfectar siRNAs se utilizaron a 100 nM concentración final. Para medir la actividad luciferasa se utilizó el kit comercial de Promega y para la actividad β-galactosidasa el de Applied Biosystems, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los valores obtenidos de la actividad β-galactosidasa se utilizaron para normalizar la expresión de los genes con actividad luciferasa.

### 14. RT-PCR en tiempo real

El RNA total de las células fue extraído utilizando el sistema de aislamiento de RNA Ultraspec (BIOTECH) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Con 2 µg del RNA se realizó la reacción de retro-transcripción utilizando el kit High capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems). Con el cDNA, se realizaba la PCR cuantitativa en tiempo real. El volumen final fue de 11 µL: 0.5 µL cDNA (50 ng), 0.5 µL sonda, 5.5 µL Taqman universal PCR master mix 2x, 4.5 µL agua miliQ. La PCR cuantitativa se realizó en un sistema ABI Prism 7900 HT Fast Real Time PCR y se utilizaron sondas humanas Taqman disponibles comercialmente para cuantificar la expresión de *CDKN1A* (p21) (Hs00355782-m1) y del normalizador *GAPDH* (Hs99999905\_m1). Los datos de la PCR fueron capturados y analizados utilizando el software Sequence Detector (SDS versión 2.3; Applied Biosystems).

### 15. Clonación de DNA recombinante

Para generar el dominio CPH de HERC2 (aminoácidos 2547-2640), se amplificó por PCR a partir del cDNA de células HeLa utilizando la pareja de oligos 5' GGGGACAAGTTTGTACAAA-AAAAGCAGGCTCGTACAAAAACGAGCTGA3' y 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-CTCACTTGATGTGAGAAGAAGAA3'. Los fragmentos amplificados se usaron para generar clones de entrada con pDONR221 y vectores de expresión con pDEST15 (fusión a GST) siguiendo los

protocolos estándares del sistema Gateway (Invitrogen). Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados para confirmar la inserción y las proteínas de fusión expresadas en bacterias y purificadas para los ensayos de *pull-down* o de interacción *in vitro*, como se indica en el apartado purificación y expresión de proteínas.

## 16. Mantenimiento de la colonia de ratones y genotipado

Los ratones se han mantenido a 22°C con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con ilimitado acceso al agua y a la comida. La eutanasia de los ratones se ha realizado por dislocación cervical. Para el genotipado de los ratones se usaron cortes de 5mm de la cola, embriones o placenta de hembras gestantes. El DNA genómico se purificó con el kit NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las parejas de oligonucleótidos utilizadas para las PCRs del genotipado fueron: *530KO01* 5'GGCTGCCAGTCTCGCCTTG3'; *530KO04* 5'CTGTCACCTCTCCGGGAGAAC3'; *Gal7* 5'TTTCCATATGGGGATTGGTG3'; *Gal8* 5'TGTCTGTTGTGCCAGTCAT3'; *p53 036* 5'ACAGCGTGGTGGTACCT3'; *p53 037* 5'TATACTCAGAGCCGGCCT; *p53 038* 5'CTATCAAGGCATAGCGTTGG. Para el genotipaje de la línea *Herc2<sup>530</sup>*, la pareja de oligos *KO01/KO04* se utilizó a 0.15 µM y la pareja *Gal7/Gal8* a 0.6 µM. Los oligos para *p53-036*, *037*, *038* se utilizaron a 0.3 µM concentración final. Las condiciones de PCR para la línea *Herc2<sup>530</sup>* y *p53* fueron: 94°C por 3 minutos, 94°C por un minuto, después anillamiento a 60°C por un minuto y elongación a 72° por un minuto; número de ciclos:35. Para la RT-PCR, los oligonucleótidos utilizados fueron: *530KO02* 5'CAGGTCTGACCACCCGGAGG3'; *530KO09* 5'GGGAGTTCTCGATTTTGTGC3'; *β-geo40/60* 5'AGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'. Las condiciones de PCR fueron: 94°C por 3 minutos, 94°C por un minuto, después anillamiento a 55°C por 30 segundos y elongación a 72° por 45 segundos; número de ciclos:30.

## 17. Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como la media±SEM. Los datos fueron analizados por T de Student o ANOVA, según correspondiera. Para la comparación de significancia, se utilizaron los test de Dunnet o Tukey de acuerdo al programa estadístico GraphPad Prism (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001).