



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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (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

Resultados

1. Implementación de un sistema de análisis simultáneo de proteínas de alto y bajo peso molecular

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*) probablemente es la herramienta más utilizada para el análisis de proteínas. Existen diferentes variantes de PAGE que proporcionan distintos tipos de información sobre las proteínas como son el peso, carga, pureza, entre otros. Dentro de estas variantes, se encuentran el sistema Glicina-SDS-PAGE y el Tricina-SDS-PAGE que se basan en el uso de un tampón de glicina o de tricina respectivamente, para la separación de proteínas en función del tamaño. La concentración de acrilamida y del *crosslinker* bisacrilamida junto con el uso de alguno de estos tampones permite la separación de proteínas dentro de un determinado rango de tamaño. Así, por ejemplo, para proteínas de ≤ 30 kDa es recomendable el uso del sistema Tricina-SDS-PAGE y para proteínas ≥ 30 kDa se utiliza el sistema Glicina-SDS-PAGE (Schägger, 2006).

Para separar proteínas con pesos moleculares muy distintos se suele utilizar un gel con un gradiente de concentración de poliacrilamida: una mayor concentración para la parte inferior y una menor para la parte superior de un gel. Un sistema de geles en gradiente con los tampones Tricina o Bicina permiten analizar proteínas entre 300 kDa y 20 kDa en un mismo gel. Sin embargo, estos sistemas resultaban bastante limitantes para lograr analizar las proteínas gigantes HERC, objetivo de nuestro laboratorio. Por este motivo, anteriormente el laboratorio había introducido y patentado el sistema de geles LAG (low-percentage acrylamide gel), un sistema que combinaba de forma continua un gel de acrilamida de bajo porcentaje (4%) con una proporción de acrilamida:bisacrilamida 80:1, con un gel en gradiente del 6 al 15% con una proporción de acrilamida:bisacrilamida 40:1 (Casas-Terradellas et al., 2006). Este sistema aunque era bastante útil para separar proteínas grandes y pequeñas en el mismo gel, utilizaba geles grandes de 16 x 18 cm, que requerían una mayor cantidad de reactivos, así como extractos de proteínas por encima de los 100 μg .

Durante los últimos años, se han comercializado un sistema de electroforesis basado en geles de Tris-acetato para separar proteínas de distinto peso molecular en un mismo gel. Sin embargo, la composición de estos geles no está disponible y deben comprarse ya hechos y al gradiente determinado por el comerciante.

Por este motivo, la primera etapa de esta tesis consistió en implementar un sistema de electroforesis en geles de gradiente Tris-acetato que pudieran realizarse en cualquier laboratorio de bioquímica de manera accesible, utilizando el sistema de electroforesis Mini-Protean II (Bio-rad) para hacer mini geles de 8 cm x 8 cm. Con un sistema así sería posible analizar las proteínas gigantes HERC junto con otras de menor tamaño molecular en un mismo gel.

Inicialmente, se probaron distintas concentraciones de acrilamida:bisacrilamida y del tampón Tris-acetato pH 7.0 hasta conseguir un gel con una densidad manejable y que pudiera utilizarse para otras aplicaciones como la tinción o el *western blot*. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando una concentración final del tampón de 0.2 M y la solución estándar de acrilamida: bisacrilamida (40:1) que contiene 2.6% del *crosslinker* bisacrilamida. El siguiente paso fue probar diferentes concentraciones de acrilamida para hacer geles en gradiente. Se probaron gradientes del 3-8%, 3-10%, 3-15% y 3-20%. En la figura R1 se observa la separación que se obtiene de los marcadores de proteínas preteñidos con un gradiente del 3-15% y la tinción de este gel con azul de Coomassie.

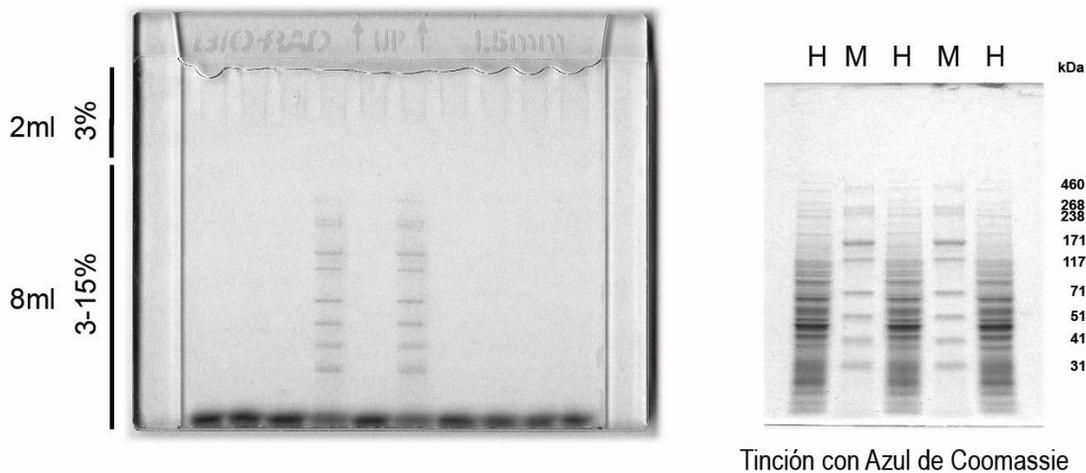


Figura R1. Gel de poliacrilamida en gradiente Tris-acetato. Ejemplo de un gel en gradiente del 3-15% Tris-acetato realizado con el sistema Miniprotean II de Bio-rad después de la electroforesis. Un extracto de proteínas de 50 µg obtenido de células HEK-293 (H) y el marcador de proteínas preteñido (M) de Invitrogen (31, 41, 51, 71, 117, 171, 238, 268 y 460 kDa) se analizaron en este gel posteriormente teñido con azul de coomassie.

Además de establecerse las condiciones óptimas para la preparación de un gel en gradiente con el tampón Tris-acetato, se introdujeron modificaciones en los diferentes tampones utilizados para la electroforesis, *western blot* y preparación de la muestra. El tampón para la electroforesis contenía los tampones Tricina, Tris, el detergente SDS y el reductor bisulfito de sodio (Tricina 50 mM, Tris 50 mM, SDS 0.1%, bisulfito de sodio 1.3 mM pH 8.2). El tampón para la preparación de la muestra también fue modificado con respecto al tradicional tampón de muestra Laemli. A diferencia del tampón Laemmli que contiene el detergente SDS, nuestro tampón contenía LDS (*lithium dodecyl sulfate*), un detergente aniónico como el SDS pero que impide la rotura de los enlaces aspartato-prolina (Kubo, 1995) y permite una completa denaturación de las proteínas a 70°C (Tris-HCl 250 mM pH 8.5, LDS 2% peso/volumen, DTT 100 mM, EDTA 0.4 mM, glicerol 10% peso/ volumen, rojo de fenol 0.2 mM, azul de coomassie G 0.2 mM).

La mejor aplicación para comprobar la utilidad de estos geles era sin duda el *western blot*. Por ello, estos geles fueron probados para ser transferidos a membranas de PVDF y la posterior detección de proteínas por *western blot*. El tampón de transferencia que se utilizó contenía los tampones Bicina y Bis-Tris así como el reductor bisulfito de sodio (Bicina 25 mM, Bis-Tris 25 mM, EDTA 1 mM, bisulfito de sodio 13 mM pH 7.2, metanol 20%). Bajo estas condiciones, estándares de proteínas comerciales de 10 a 460 kDa se transferían completamente a la membrana y se detectaban con la tinción S-Ponceau (Figura R2) y proteínas con pesos moleculares muy distintos se detectaban en el mismo gel mediante anticuerpos. Así, proteínas gigantes como HERC1 (532 kDa) o HERC2 (528 kDa), grandes como mTOR (289 kDa) o Clatrina (192 kDa), medianas como RSK (90 kDa), p70-S6K1 (70 kDa) o β -actina (42 kDa), o las más pequeñas como Ran (24 kDa) o LC3 (18 kDa) se podían separar y analizar en un mismo gel. Sorprendentemente, este sistema tiene una alta sensibilidad al conseguir detectar la mayoría de estas proteínas con 10 μ g de lisado celular.

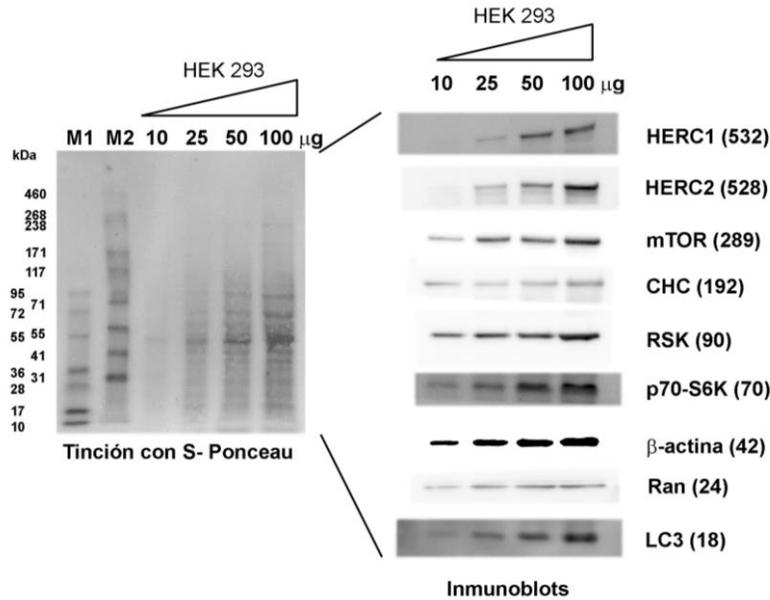


Figura R2. Western blot de proteínas obtenido en un gel de poliacrilamida en gradiente Tris-acetato que permite analizar proteínas en un rango de 10-500 kDa en un mismo gel. Lisados de 10, 25, 50 o 100 µg de proteína obtenidos de células HEK-293 fueron separados en un gel en gradiente del 3-15%, teñido con S-Ponceau (izquierda) y transferidos a membranas PVDF para analizar por *western blot* (derecha) con anticuerpos para las proteínas indicadas con su peso molecular. Dos marcadores de proteínas preteñidos se utilizaron: M1 (10, 17, 28, 36, 55, 72 y 95 kDa de Fermentas) y M2 (31, 41, 51, 71, 117, 171, 238, 268 y 460 kDa de Invitrogen).

Por último, se decidió comparar la resolución y sensibilidad que se había logrado obtener con el sistema de geles en gradiente Tris-acetato con respecto al sistema tradicional con el tampón Tris-HCl. Para ello, se realizaron 2 geles en gradiente del 3-15% con el tampón Tris-acetato o Tris-HCl y se utilizaron las mismas condiciones de corrida, transferencia y *western blot*. En la figura R3, se observa como con el gel realizado con el tampón Tris-acetato se obtiene una resolución similar pero una mayor sensibilidad en la detección de las distintas proteínas y mejor aún para las proteínas gigantes (HERC1, HERC2) y pequeñas (LC3, Ran) con respecto al sistema Tris-HCl.

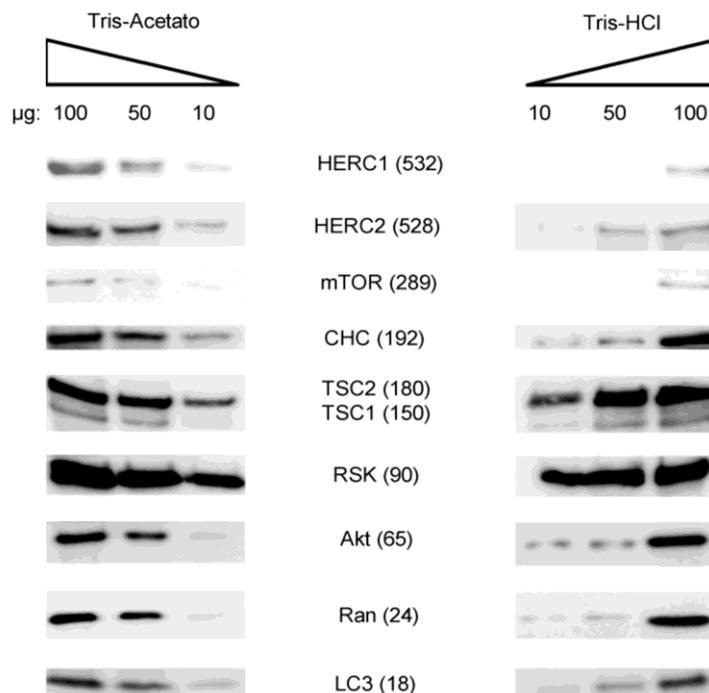


Figura R3. Comparación de los sistemas de electroforesis de geles de poliacrilamida Tris-acetato y Tris-HCl. Análisis por *western blot* de proteínas utilizando los tampones Tris-acetato y Tris-HCl. Lisados de 10, 50 o 100 µg de proteína de células HEK-293 fueron cargados y separados en geles de gradiente del 3-15% utilizando el tampón indicado y analizado por *western blot* con anticuerpos específicos para las proteínas indicadas con su peso molecular.

Todos estos datos demuestran que el sistema de geles en gradiente de poliacrilamida Tris-acetato permite la separación y el análisis simultáneo de proteínas en un rango de 10-500 kDa con una buena resolución, alta sensibilidad, bajo coste y en poco tiempo, haciendo de este sistema una herramienta útil en el análisis de proteínas.

2. Caracterización de la interacción HERC2-p53

2.1 Caracterización de la proteína HERC2: validación de anticuerpos y RNAs de interferencia para estudios funcionales

Cuando se inició el estudio de HERC2 en nuestro laboratorio no estaban disponibles anticuerpos contra la proteína, por lo cual se desconocía su expresión en las diferentes líneas celulares, así como en los tejidos de ratón. Por ello, el primer paso fue la generación de distintos anticuerpos policlonales para la detección de HERC2. Tanto el proceso de generación como de purificación fue un trabajo previo de máster desarrollado por la estudiante de postgrado Roser Peiró-Jordán. Estos anticuerpos policlonales se generaron contra el extremo carboxilo y amino de la proteína humana HERC2, fueron denominados bvg1 y bvg2 para el extremo carboxilo y bvg3 y bvg4 para el amino (Figura R4). Con estos anticuerpos se logró detectar específicamente a HERC2 tanto en fragmentos purificados de la proteína, como en lisados de diferentes líneas celulares HEK-293, HeLa, U2OS y H1299, observando que HERC2 era una proteína ubicua que se expresaba en todos los tipos celulares analizados, tal como su homólogo HERC1. De esta manera era posible trabajar con la proteína endógena, tal como se hizo durante todo este trabajo, combinado además con la buena resolución que se obtenía con los geles en gradiente Tris-acetato fue posible analizar una proteína gigante como es HERC2.

Más tarde, apareció el primer anticuerpo comercial para HERC2 de *BD Transduction Laboratories*, anticuerpo monoclonal contra los aminoácidos 1781-1974 que se usó para confirmar la especificidad de los anticuerpos policlonales contra HERC2. Como se observa en la figura R5, el anticuerpo monoclonal detectó una banda con la misma movilidad electroforética que los policlonales, confirmándose así la detección de HERC2 con diferentes anticuerpos, y validando el uso de los anticuerpos policlonales generados en el laboratorio.

Luego los anticuerpos fueron testados para otros usos diferentes a la detección de HERC2 por *western blot*, como las inmunoprecipitaciones. En este tipo de ensayos, el anticuerpo monoclonal falló para inmunoprecipitar HERC2, pero con todos los anticuerpos policlonales si fue posible inmunoprecipitar HERC2 en lisados de células HEK-293 (Figura R6).

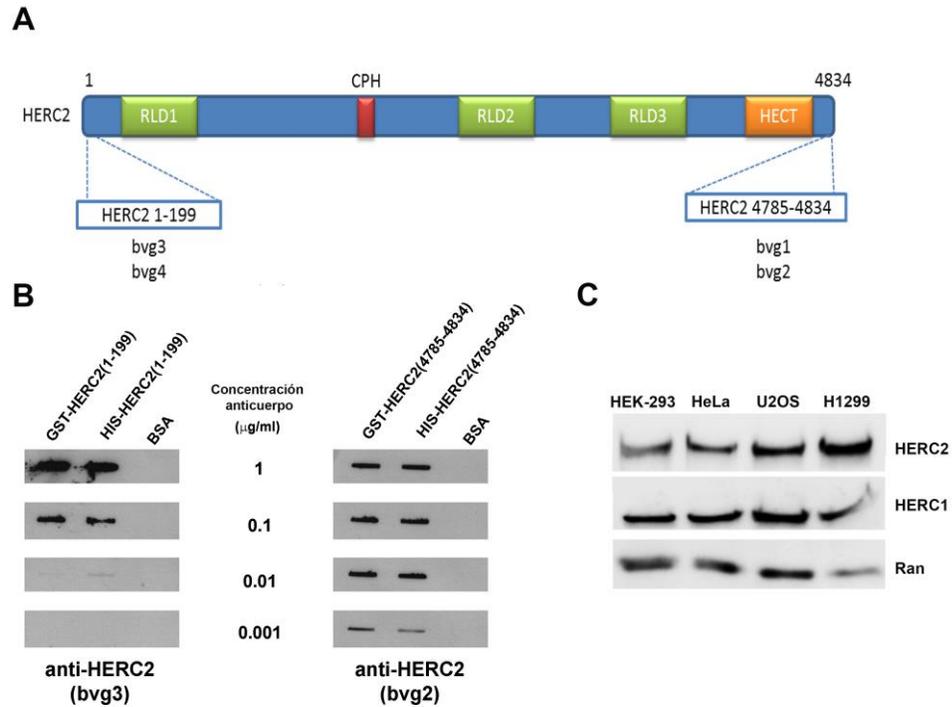


Figura R4. Validación de los anticuerpos policlonales contra HERC2. (A) Estructura de la proteína HERC2 que indica los aminoácidos contra los que se generaron los anticuerpos bvg1, bvg2, bvg3 y bvg4. (B) Sensibilidad de los anticuerpos bvg3 y bvg2, diferentes concentraciones de anticuerpo purificado se testaron sobre *slot-blots* que contenían 100 ng de proteínas de fusión a GST o 6x-His o BSA (albúmina sérica bovina) como control negativo. (C) Detección de HERC2 con el anticuerpo bvg2 en lisados de las líneas celulares indicados. La detección de HERC1 y Ran con anticuerpos específicos se muestran como controles del experimento.

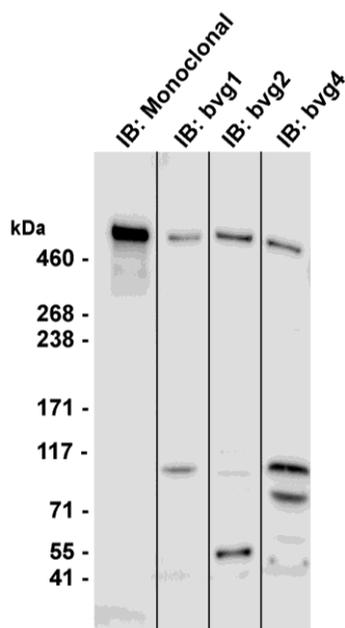


Figura R5. Especificidad de los anticuerpos policlonales contra la proteína HERC2 comparada con el anticuerpo monoclonal. Lisado obtenido de células HEK-293 fue analizado para la proteína HERC2 por *western blot* (IB) utilizando tanto el anticuerpo monoclonal como los policlonales bvg1, bvg2 y bvg4 contra HERC2. Todos los anticuerpos reconocen una banda con una movilidad electroforética por encima de 460 kDa correspondiente a HERC2.

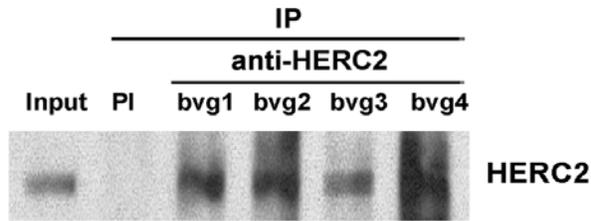


Figura R6. Inmunoprecipitación de HERC2 con diferentes anticuerpos policlonales. Los diferentes anticuerpos policlonales contra HERC2, bvg1 y bvg2 (extremo carboxilo terminal), bvg3 y bvg4 (extremo amino terminal) fueron analizados para la inmunoprecipitación (IP) de la proteína endógena HERC2 en lisados de células (Input) HEK-293. PI (suero pre-inmune).

Adicionalmente, para demostrar la especificidad de los anticuerpos policlonales y validar los RNAs de interferencia o siRNAs contra HERC2 para anular o disminuir su expresión, se realizaron ensayos de *knockdown* en células HEK-293. Se utilizaron como controles, un siRNA control negativo (NT: Non Targeting) y un siRNA contra HERC1, proteína homóloga de HERC2 y con una movilidad electroforética similar a HERC2. Tras 72 horas de transfección con los siRNAs, se observó un total silenciamiento de las proteínas HERC2 y HERC1 con los siRNAs, así como la especificidad de los anticuerpos anti-HERC2 al no reconocer HERC1 en células donde la expresión de HERC2 estaba anulada y vice-versa para los anticuerpos anti-HERC1 (figura R7). La expresión de proteínas como mTOR, TSC2 o TSC1 no se vieron modificadas por el silenciamiento de HERC2 o HERC1.

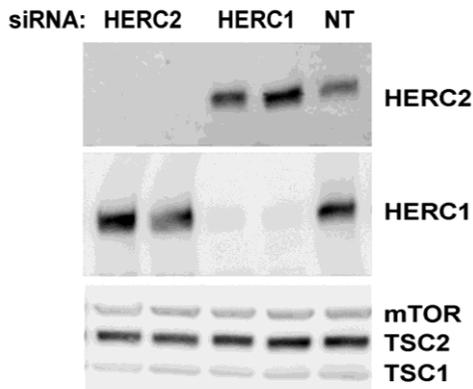


Figura R7. Validación de los siRNAs contra HERC2. Células HEK-293 fueron transfectadas con los siRNAs HERC2, HERC1 o NT y analizadas a las 72 horas post-transfección por *western blot* con los anticuerpos específicos para las proteínas HERC2, HERC1, mTOR, TSC2, TSC1.

Se había descrito las proteínas pequeñas HERC forman heteroméricos (Hochrainer et al., 2008). Para analizar la posibilidad de la existencia de un complejo heteromérico entre las proteínas gigantes HERC1 y HERC2, se realizaron ensayos de inmunoprecitación tanto con anticuerpos anti-HERC1 como con anticuerpos anti-HERC2, y se analizó si HERC2 o HERC1 se asociaban

respectivamente a la proteína inmunoprecipitada. Con cuatro anticuerpos diferentes que inmunoprecipitaban HERC2, HERC1 no se asociaba. Resultados similares se obtuvieron con cuatro anticuerpos para HERC1, donde HERC2 no formaba un complejo con HERC1 (Figura R8). Con estos resultados se concluyó que las proteínas HERC2 y HERC1 no forman complejos heteroméricos entre ellas.

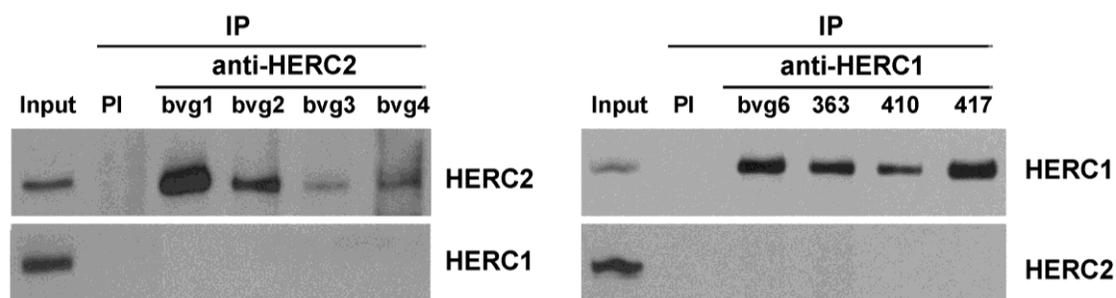


Figura R8. Las proteínas HERC2 y HERC1 no forman complejos heteroméricos. Ensayos de inmunoprecitación con diferentes anticuerpos anti-HERC2 bvg1, bvg2, bvg3 y bvg4 (izquierda) o HERC1 bvg6, 363, 410 y 417 (derecha) a partir de lisados de células HEK-293 (Input). HERC2 no co-inmunoprecipita HERC1 y HERC1 no co-inmunoprecipita HERC2. PI (Suero pre-inmune).

2.2 Identificación de la interacción HERC2-p53

Las proteínas CUL7, PARC y HERC2 tienen en común un dominio de unos 100 aminoácidos denominado CPH (Kaustov et al., 2007). Tanto para CUL7 como para PARC se ha demostrado que a través de este dominio ambas proteínas se unen a p53 (Kasper et al., 2006; Kaustov et al., 2007; Nikolaev et al., 2003). Por ello nos preguntamos si en el caso de HERC2, este dominio también permitiría una interacción con p53. Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecitación con las proteínas endógenas en la línea celular U2OS que está descrita como una línea p53 *wild-type* utilizando los diferentes anticuerpos contra HERC2. Con dos de los tres anticuerpos analizados se observó co-inmunoprecitación entre HERC2 y p53 (figura R9), estos dos anticuerpos (bvg3 y bvg4) correspondían al epítipo contra el extremo amino-terminal de HERC2. El anticuerpo bvg1 y el anticuerpo bvg2 (datos no mostrados) no co-inmunoprecitaron p53. Además, es interesante observar como p53 se asocia proporcionalmente a la cantidad de HERC2 que logra inmunoprecipitarse con cada anticuerpo. Cuanto más HERC2, más p53 asociado (comparar IP de bvg3 con bvg4).

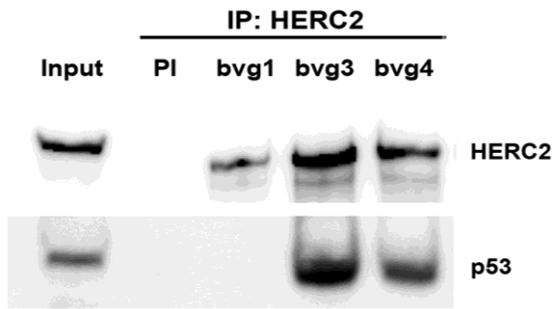


Figura R9. HERC2 interacciona con p53. Ensayos de inmunoprecipitación (IP) con diferentes anticuerpos contra HERC2 bvg1, bvg3 y bvg4 para analizar la asociación con p53 en lisados de células U2OS (Input). Anticuerpos contra el extremo amino-terminal de HERC2 bvg3 y bvg4 co-inmunoprecipitan HERC2 y p53. PI (suero pre-inmune).

Para descartar una posible reactividad cruzada entre los anticuerpos anti-HERC2 con p53, los ensayos de inmunoprecipitación se repitieron esta vez con células U2OS donde la expresión de HERC2 había sido anulada o disminuida mediante la transfección con siRNAs. El siRNA NT se utilizó como control. En la figura R10, se observa como al disminuir la expresión de HERC2 la cantidad de p53 asociada también lo hizo, indicando que la interacción es específica y que no hay reactividad cruzada entre los anticuerpos de HERC2 y p53.

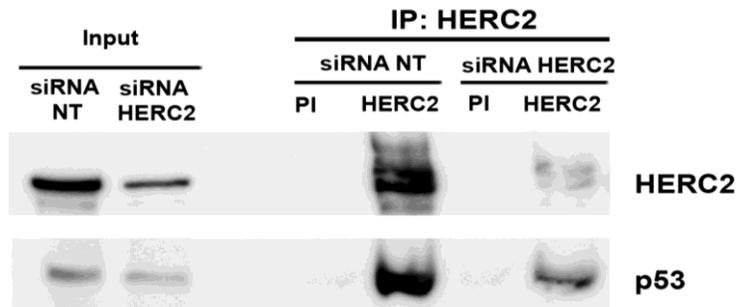


Figura R10. Disminución en la expresión de HERC2 reduce la asociación entre HERC2 y p53. Células U2OS fueron transfectadas con los siRNAs NT y HERC2 y a las 72 horas post-transfección se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos contra HERC2 o con el suero pre-inmune (PI). Después de 2 horas de incubación y 1 hora adicional con la resina, se analizó por *western blot* los niveles de HERC2 y p53. Al disminuir los niveles de HERC2 con el siRNA (Input), p53 se asocia menos (IP).

Para confirmar la interacción HERC2-p53 se utilizó otra aproximación experimental que excluía el uso de anticuerpos. Así, células H1299, las cuales no expresan p53, fueron transfectadas con GST-p53 y se realizaron experimentos de *pull-down* utilizando resina de glutatión. Como control

negativo se transfectó GST. En la figura R11 se puede observar la específica asociación de HERC2 con GST-p53.

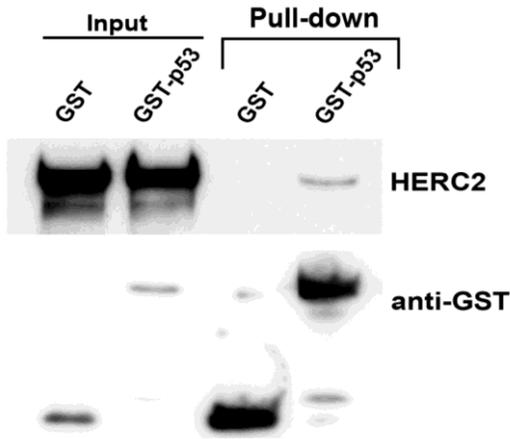


Figura R11. p53 se asocia con HERC2. Ensayos de pull-down en células H1299 transfectadas con GST o GST-p53. A las 48 horas post-transfección, los lisados (Input) fueron incubados con resina de glutatión durante toda la noche y analizados por *western blot* con anticuerpos específicos para HERC2 o GST. GST-p53 se asocia específicamente con HERC2.

La interacción entre HERC2 y p53 no se restringió únicamente a las células U2OS; la interacción se confirmó en otras líneas celulares humanas que expresan p53 como HEK-293 y HeLa. Como era de esperar en la línea H1299 la interacción no se observó (Figura R12).

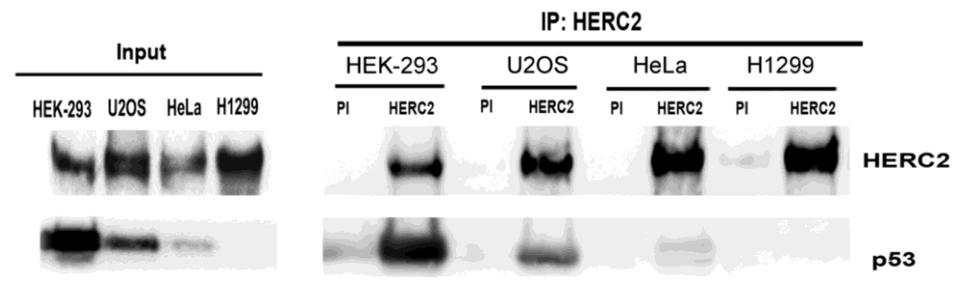


Figura R12. HERC2 se asocia con p53 en diferentes líneas celulares. Ensayos de inmunoprecipitación de HERC2 utilizando el anticuerpo bvg3 en lisados de células HEK-293, U2OS, HeLa y H1299 (Input) y analizados para la asociación HERC2-p53. Después de 2 horas de incubación en presencia del anticuerpo, las proteínas asociadas se analizaron por *western blot* para HERC2 y p53. PI (suero pre-inmune)

La interacción entre HERC2 y p53 también ocurre en tejidos de ratones. Así en la figura R13 se puede observar la interacción entre HERC2 y p53 en un extracto de cerebro. En este experimento se puede observar que HERC1, el homólogo estructural de HERC2, que no tiene el dominio CPH, no se asocia con p53.

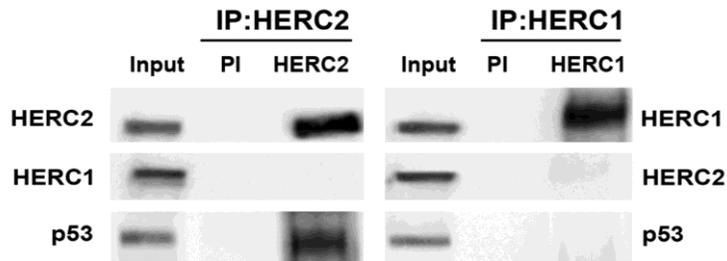


Figura R13. HERC2 pero no HERC1 se asocia con p53 en cerebro de ratón. Ensayos de inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos para HERC2 (bvg3) y HERC1(410) en extractos obtenidos de cerebro de ratón (Input) y análisis por *western blot* para HERC2, HERC1 y p53.

Una vez identificada y confirmada la interacción entre las proteínas endógenas HERC2 y p53, quisimos determinar cuáles eran los dominios importantes o necesarios para la interacción de ambas proteínas. Para demostrar que el dominio CPH de HERC2 era suficiente para unirse a p53, el dominio se clonó a partir del cDNA de células HeLa y se expresó dentro de un vector que contenía el epítipo GST, y así producir una proteína de fusión GST-CPH para purificarla a partir de cultivos bacterianos. Otro dominio de HERC2 (aminoácidos 4785-4834) fusionado a la proteína y la propia proteína GST se utilizaron como controles. Con las tres proteínas purificadas se realizaron ensayos de *pull-down* con extractos de células HEK-293. Los resultados obtenidos indican que el dominio CPH de HERC2 es suficiente para unirse a p53 y que esta asociación es específica para este dominio de HERC2. El otro dominio de la misma proteína HERC2 (GST-HERC2 aminoácidos 4785-4834) o la proteína GST no se unían a p53 (Figura R14).

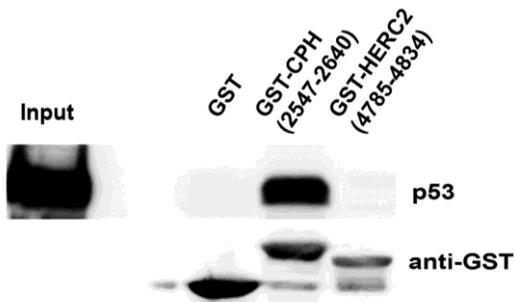


Figura R14. El dominio CPH de HERC2 es suficiente para la unión con p53. *Pull-down* de lisados de células HEK-293 con 5µg de las proteínas purificadas a partir de bacteria: GST, GST-CPH (aminoácidos 2547-2640) y GST-HERC2 (aminoácidos 4785-4834). La asociación entre la proteína purificada y los extractos de células se analizó por *western blot* con anticuerpos contra p53 y GST.

En la estructura de p53 se distinguen varios dominios muy bien caracterizados: el dominio amino-terminal (aminoácidos 1-100) que contiene el sitio para la activación de factores transcripcionales, una secuencia de unión a la ubiquitina ligasa MDM2 y varios sitios de fosforilación en respuesta al daño al DNA activados por diferentes quinasas y una señal de exportación nuclear;

un dominio central (aminoácidos 100-300) encargado de la unión de p53 al DNA y un dominio carboxilo-terminal que contiene el dominio de tetramerización (aminoácidos 320-360), una señal de exportación nuclear (aminoácidos 339-352) y un extremo carboxilo-terminal (aminoácidos 363-393) que contiene la mayoría de residuos de lisina para la ubiquitinación por MDM2 (Ko and Prives, 1996; Levine, 1997; Zhang and Xiong, 2001). Para mapear la interacción de p53 con HERC2, diferentes construcciones que contenían los dominios de p53 fusionados a GST fueron expresadas en células H1299 y su asociación a HERC2 fue evaluada mediante ensayos de inmunoprecipitación (Figura R15). La delección de los primeros 200 o 300 aminoácidos no impidió la asociación de las proteínas de fusión con HERC2 pero si lo hizo la delección de los últimos 43 aminoácidos de p53. Estos datos demostraron que ni el dominio amino-terminal ni el dominio central de p53 eran necesarios para la interacción de p53 con HERC2 y que HERC2 se estaría uniendo a p53 al dominio carboxilo-terminal de p53. Datos similares se observaron en las células HEK-293 (Figura R16).

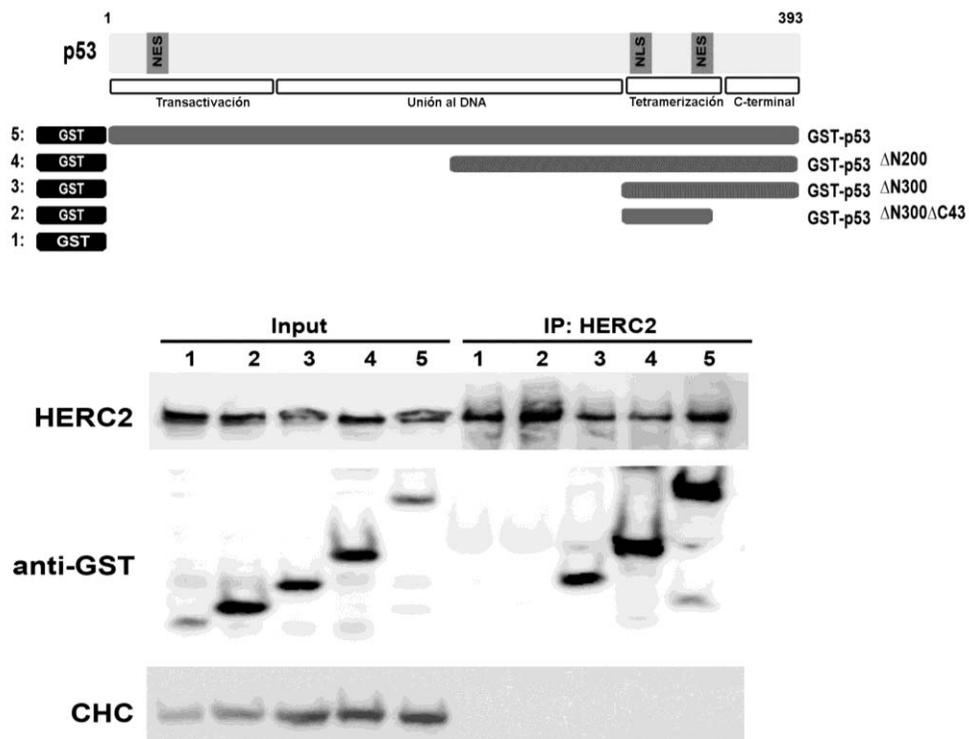


Figura R15. Mapeo de los dominios de p53 necesarios para la interacción con HERC2 en células H1299. Esquema de los diferentes dominios de p53 y las construcciones utilizadas para mapear la interacción con HERC2 (arriba). Las células H1299 fueron transfectadas con las diferentes construcciones (Input) y a las 48 horas se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-HERC2 (bvg3) y se analizó por *western blot* con anticuerpos específicos para las proteínas indicadas. La cadena pesada de la clatrina (CHC) se utilizó como control de negativo.

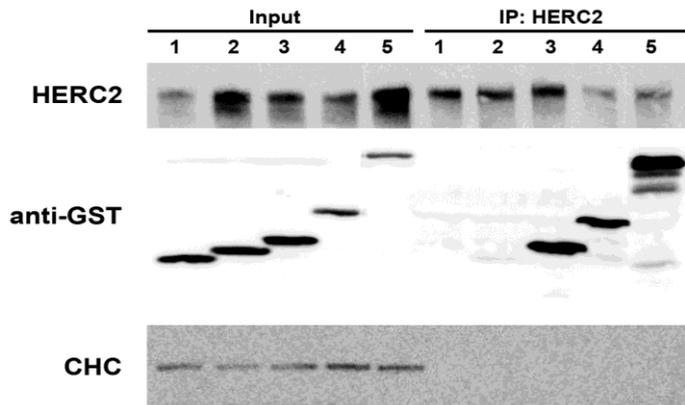


Figura R16. Mapeo de los dominios de p53 necesarios para la interacción con HERC2 en células HEK-293. Las células HEK-293 fueron transfectadas con las diferentes construcciones de p53 (Input 1-5) indicadas en el esquema de la figura R15. A las 48 horas de la transfección se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti- HERC2 (bvg3) y se analizó por *western blot* con anticuerpos específicos para las proteínas indicadas.

Para demostrar una asociación directa entre HERC2 y p53, se realizaron ensayos de interacción *in vitro* con las proteínas purificadas. Las proteínas p53 fusionadas a su extremo amino a un epítipo de 6X-His y el dominio CPH de HERC2 fusionado a GST fueron purificados de bacterias. Con las proteínas purificadas se realizaron experimentos de *pull-down* con resina de cobalto que tiene afinidad por el epítipo 6X-His. En la figura R17 se observa la específica asociación del GST-CPH con la proteína entera p53 (1-393). Como control negativo, una proteína de fusión 6X-His-p53 con el extremo carboxilo deletado His-p53 (1-320) fue utilizado en estos experimentos, que como era de esperar no se asoció con la proteína GST-CPH (Figura R17).

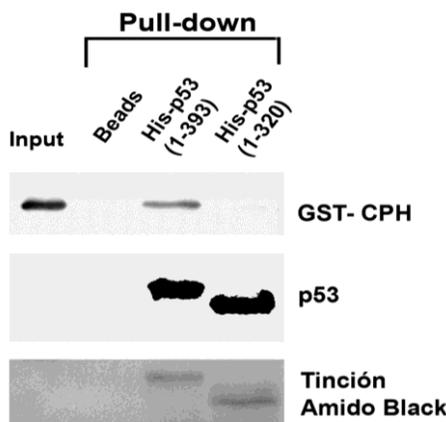


Figura R17. Interacción *in vitro* entre HERC2 y p53. Proteínas purificadas de bacteria, His-p53 (aminoácidos 1-393), His-p53 (1-320) y GST-CPH (aminoácidos 2547-2640 de HERC2) fueron incubadas con la resina de cobalto como se describe en materiales y métodos y la asociación entre las proteínas fue analizada por *western blot* con anticuerpos específicos contra GST y p53. Se muestra la tinción con el colorante Amido Black para las proteínas de p53.

2.3 Regulación de la actividad transcripcional de p53 por HERC2

Una vez comprobada la interacción HERC2 y p53, se quiso determinar cuál era la relevancia funcional de dicha interacción. Como HERC2 es una E3 ubiquitina ligasa, nos preguntamos si p53 podía ser sustrato de ubiquitinación de HERC2. Si esto fuera así, en células donde la expresión de HERC2 estuviese anulada esperaríamos observar un aumento en los niveles de p53. En la figura R18, se observa como con dos siRNAs distintos para HERC2, los niveles de p53 no variaron significativamente con respecto a las células con el siRNA control NT. Los niveles de expresión de p53 se normalizaron con la proteína Ran, utilizado como control. Estos resultados descartaban la idea que HERC2 fuera una ubiquitina ligasa para p53.

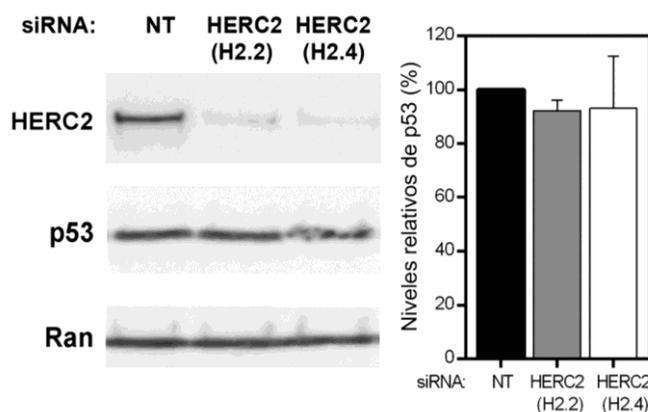


Figura R18. La ausencia de HERC2 no afecta los niveles de p53. Células U2OS fueron transfectadas con los siRNAs NT y HERC2 (H2.2 y H2.4) y analizadas a las 72 horas post-transfección. Los niveles de expresión para HERC2, p53 y Ran se analizaron mediante *western blot* con anticuerpos específicos. Los niveles de p53 (%) se normalizaron con respecto a Ran y se representan como la media \pm SEM (n=8).

Como HERC2 no tenía un efecto significativo sobre los niveles de p53, nos preguntamos a continuación si HERC2 podía afectar a la actividad transcripcional de p53. p53 es un factor transcripcional que regula la expresión de un gran número de genes. Uno de los más ampliamente estudiados es el inhibidor del ciclo celular *p21*. En este contexto, se analizaron los niveles de la proteína p21 en células U2OS transfectadas con los diferentes siRNAs de HERC2. En estos experimentos se observó una disminución hasta del 80-90% de los niveles totales de p21 con dos siRNAs diferentes contra HERC2 (H2.2 y H2.4). Los niveles de la proteína Ran permanecieron constantes en todas las condiciones (Figura R19). Estos resultados sugerían una regulación de la actividad transcripcional de p53 por HERC2.

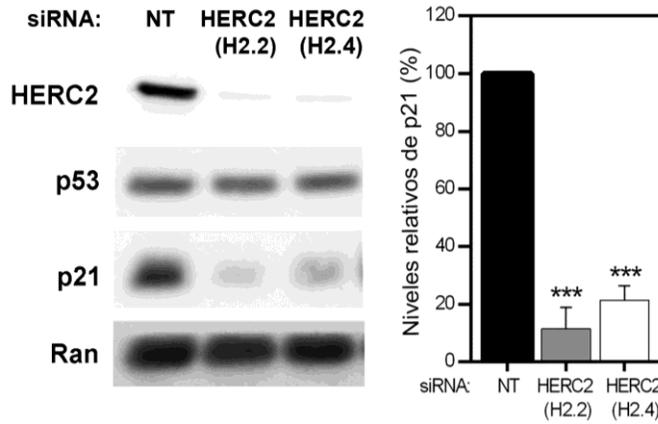


Figura R19. La ausencia de HERC2 disminuye los niveles de la proteína p21 en las células U2OS. Células U2OS fueron transfectadas con los siRNAs NT y HERC2 (H2.2 y H2.4) y a las 72 horas post-transfección se comprobaron los niveles para HERC2, p53, p21 y Ran mediante *western blot*. Los niveles de p21 (%) se normalizaron con respecto a Ran, se representan como la media +/- SEM (n=8).

Para descartar que el efecto sobre p21 estuviera restringido a una única línea celular, los niveles de p53 y p21 fueron analizados en otras líneas celulares humanas como, HEK-293 y HCT116, donde la expresión de HERC2 había sido disminuida mediante siRNAs. En estas líneas, se confirmó que la ausencia de HERC2 disminuía p21 sin alterar los niveles de p53 (Figura R20).

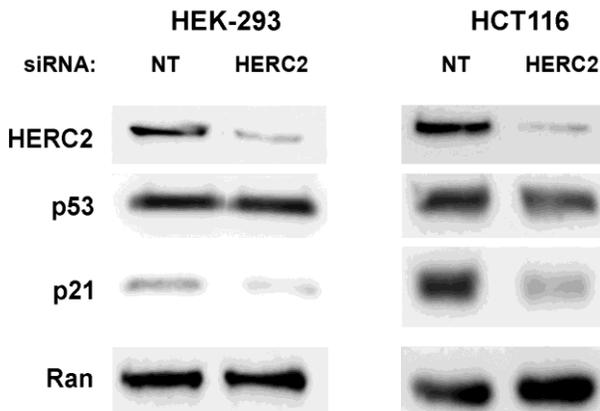


Figura R20. La ausencia de HERC2 disminuye los niveles de p21 sin modificar los de p53 en otras líneas celulares humanas. Células HEK-293 o HCT116 fueron transfectadas con los siRNAs NT o HERC2 (H2.2) y analizadas por *western blot* para HERC2, p53, p21 y Ran. En ausencia de HERC2, los niveles de p21 disminuyen en ambas líneas.

Observando los resultados previos, nos preguntamos si HERC2 podría estar regulando la vida media de la proteína p21. Para responder esta pregunta, se realizaron experimentos con el inhibidor de síntesis proteica cicloheximida (CHX) en las células U2OS con siRNAs control o HERC2. Durante los tiempos analizados se observó que la ausencia de HERC2 no modificaba significativamente la vida media de p21 (Figura R21). Para las células control NT la vida media de la proteína p21 fue de 0.6 horas, mientras que para las células sin HERC2 fue de 0.7 horas. α -Tubulina fue usada como control del experimento, permaneciendo constantes los niveles de proteína durante el experimento.

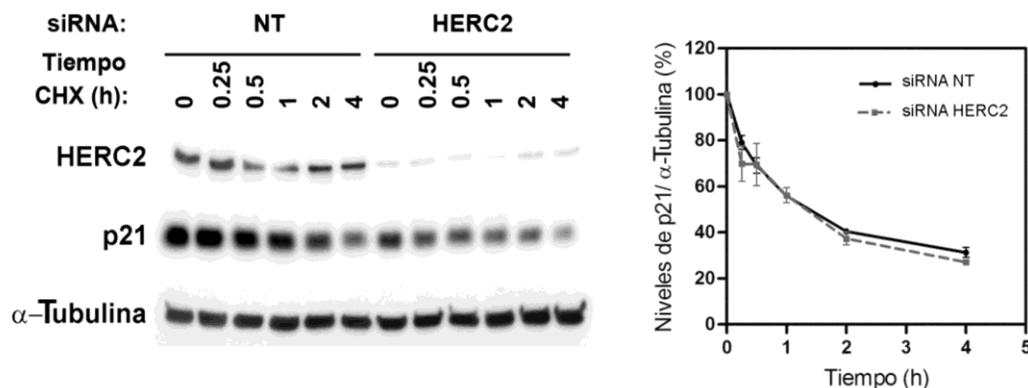


Figura R21. La ausencia de HERC2 no afecta la vida media de p21. Células U2OS fueron transfectadas con los siRNAs NT y HERC2 (H2.2) y a las 72 horas tratadas con cicloheximida (CHX) durante los tiempos indicados. Las proteínas se analizaron por *western blot* con anticuerpos específicos para HERC2, p21 y α -Tubulina. En el panel de la derecha, se representan los niveles de p21 a los diferentes tiempos del tratamiento normalizados con respecto a los niveles de α -Tubulina. Estos datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Si los niveles de la proteína p21 disminuían en ausencia de HERC2 y la estabilidad proteica no estaba afectada, era posible que la transcripción del gen *p21* estuviera afectada. Para analizar este punto, se analizaron los niveles de RNA mensajero (mRNA) de *p21* mediante PCR cuantitativa en células U2OS con siRNAs control, HERC2 y p53. Como p53 regula la transcripción del gen *p21*, el siRNA contra p53 también se analizó como control positivo. Tanto con los siRNAs contra HERC2 y p53, se observó una disminución significativa de los niveles de mRNA de *p21* (Figura R22). Los niveles fueron normalizados con respecto a la expresión del gen *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Para demostrar que la regulación de la expresión de p21 por HERC2 era dependiente de p53, realizamos el mismo experimento en las células H1299 que no expresan p53. Como puede observarse en la figura R22 (panel derecho), la ausencia de HERC2 no reguló los niveles de mRNA de *p21* en las células H1299.

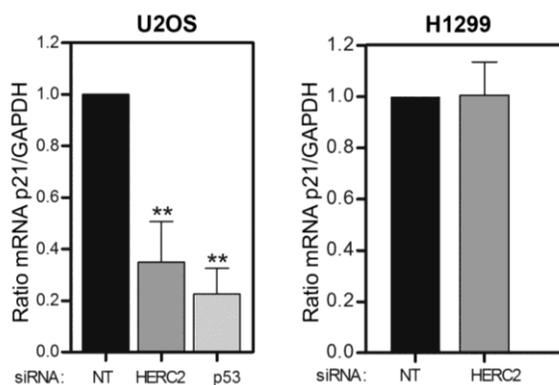


Figura R22. Ausencia de HERC2 afecta los niveles de mRNA de p21 en una manera dependiente de p53. mRNA de células U2OS y H1299 transfectadas con los siRNAs NT, HERC2 (H2.2) o p53 fue analizado mediante PCR cuantitativa en tiempo real para la expresión de los genes *p21* y *GAPDH*. Los niveles de expresión fueron normalizados con respecto al control NT. Se representan como la media \pm SEM. Estos datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Los datos anteriores indicaban que la transcripción de p21 mediada por p53 estaba regulada por HERC2. Para confirmarlo, analizamos la actividad del promotor de p21 acoplado al gen de la luciferasa. Células U2OS fueron transfectadas con este gen reportero y con siRNAs de HERC2 (H2.2 y H2.4), de p53 o de control (NT) y a las 72 horas la actividad luciferasa se analizó. En la figura R23 (panel izquierdo) se observa una disminución de la actividad luciferasa en ausencia de HERC2 similar a la obtenida en ausencia de p53. Estos resultados fueron confirmados con otros genes regulados por p53 como *p53R2* y *p53 AIP1* (Figura R23, panel central y panel derecha). Los ensayos de actividad luciferasa con los promotores *p53AIP1* y *p53R2* demostraron que la ausencia de HERC2 también disminuyó significativamente su expresión aunque no al mismo nivel de p53 sugiriendo que otros factores adicionales en la regulación de estos genes podrían estar implicados.

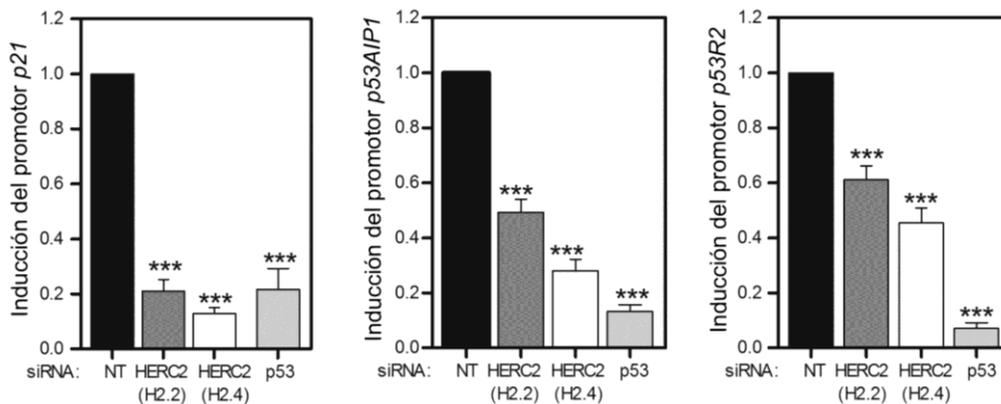


Figura R23. HERC2 regula la transcripción de genes regulados por p53. Ensayos de actividad de los promotores de *p21*, *p53AIP1* y *p53R2* acoplados al gen reportero luciferasa en células U2OS transfectadas con los siRNAs NT, HERC2 (H2.2, H2.4) o p53 y el gen para la β -galactosidasa como control interno. Los datos se expresan como la actividad de cada promotor en cada condición con respecto a la actividad medida en las células con el siRNA control NT, denominada 1 que representa la media \pm SEM. Los valores de la actividad luciferasa fueron corregidos con respecto a la actividad β -galactosidasa. Estos datos son representativos de al menos cinco experimentos independientes.

p53 es un factor transcripcional que se une a secuencias específicas del DNA situadas en los promotores de los genes que regula. Como HERC2 se une a p53, era posible que HERC2 también estuviera unido a estas secuencias a través del complejo con p53. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron ensayos de *oligo pull-down* utilizando el oligonucleótido p53 RE-1, elemento distal del gen *p21*, que contiene la secuencia de unión de p53 al promotor del gen *p21* (Jeon et al., 2009). Para ello, lisados de células U2OS se incubaron con el oligonucleótido y luego con la resina de sefarosa-estreptavidina y por *western blot* se comprobó si HERC2 estaba unido o no al oligonucleótido. Como control positivo de la unión a p53 RE-1, se analizó p53. En paralelo se utilizó

como control negativo, un oligonucleótido no relacionado denominado Sp1 que está en la región reguladora del promotor del gen *Col1a1*. En la figura R24, se observa que la proteína HERC2 no se une a p53 RE-1, pero si p53. La unión de p53 es específica al no observarse con el oligonucleótido Sp1. Estos datos parecen indicar que HERC2 no está asociado a p53 cuando este está asociado al DNA funcionando como factor transcripcional.

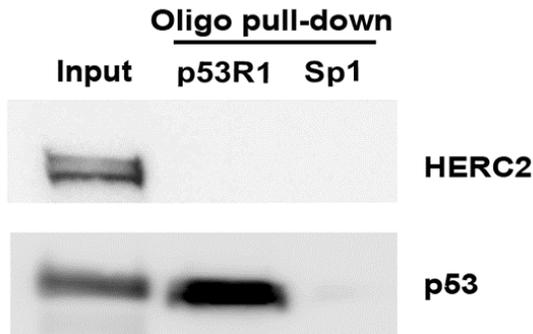


Figura R24. HERC2 no se une al elemento distal del gen p21 p53 RE-1. Lisados de células U2OS fueron incubados durante 16 horas con los oligos p53 RE-1 o Sp1 y luego con la resina apropiada como se describe en materiales y métodos y se analizó por *western blot* si HERC2 se unía a p53 RE-1.

Al no observarse unión de HERC2 al oligonucleótido p53 RE-1 en condiciones basales, se repitió el experimento en células sometidas a estrés genotóxico causado por las drogas bleomicina o doxorubicina las cuales están descritas que inducen la activación de p53 y por consecuencia, su fosforilación y acetilación (Colman et al., 2000). Después del tratamiento con la bleomicina o con la doxorubicina se detectó tanto la fosforilación como la acetilación de p53, así como un incremento de los niveles totales de p53. Tanto p53 total como fosforilado y acetilado se unieron al oligonucleótido p53RE1 (Figura R25). En estas condiciones de estrés genotóxico, HERC2 tampoco se observó asociado a p53.

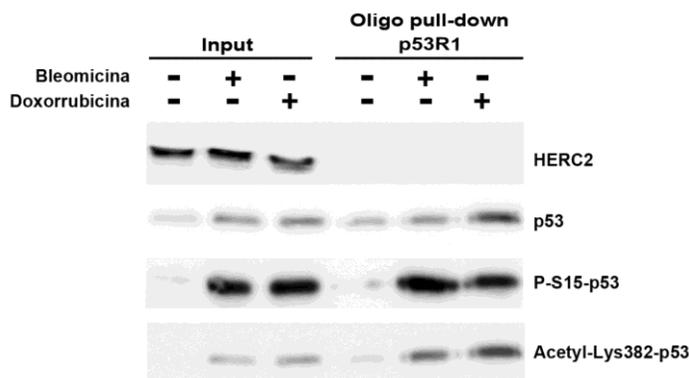


Figura R25. HERC2 no se une al elemento distal del gen p21 p53 RE-1 con estrés genotóxico. Lisados de células U2OS fueron previamente tratadas con bleomicina o doxorubicina por 3 horas antes de la incubación con el oligonucleótido p53 RE-1. Las proteínas asociadas se analizaron por *western blot* con anticuerpos específicos para las proteínas indicadas.

2.4 Efecto de HERC2 en el crecimiento celular

La actividad supresora de tumores de p53 está definida por su habilidad para inhibir la proliferación y el crecimiento celular la cual está mediada por la transcripción de genes como *p21*, *GADD45* o *14-3-3 σ* (el-Deiry, 1998). La inducción de *p21* es extremadamente sensible a los bajos niveles de la proteína p53, lo cual respalda la idea de porqué el bloqueo temporal en la fase G1 inducido por daño o estrés celular permite la supervivencia celular hasta que la reparación se haya producido. Sin embargo, una parada transitoria del ciclo celular puede ser arriesgada en una célula con un potencial oncogénico elevado, porque esto se traducirá en una proliferación incontrolada aun cuando haya ocurrido daño celular y no esté reparado (Vousden and Prives, 2009).

Por este motivo, nos parecía interesante analizar la capacidad de proliferación y crecimiento celular en condiciones donde HERC2 se hubiera anulado, y por consecuencia los niveles de p21 disminuidos. Para ello, a las 24 horas post-transfección con los siRNAs NT o HERC2, las células fueron sembradas a baja confluencia y durante 5 ó 7 días el crecimiento fue analizado. Inicialmente, estos ensayos se realizaron con las células HeLa y MCF7, líneas celulares donde hay mayor número de publicaciones para analizar proliferación celular, además esto permitía estandarizar las condiciones óptimas para realizar este tipo de ensayo (densidad celular, método de fijación, método de conteo, área de superficie del cultivo). Tanto las células HeLa como MCF7 en ausencia de HERC2 presentan una tasa de proliferación más rápida con respecto a las células con siRNA NT. En las células HeLa donde los niveles de p53 y p21 son más bajos, el efecto se observa desde el inicio. Para las MCF7, las diferencias se observan a partir del día 4 (Figura R26).

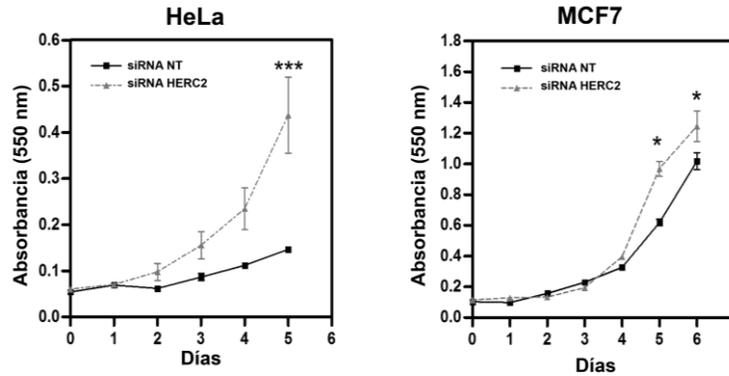


Figura R26. Ausencia de HERC2 aumenta el crecimiento celular en las líneas HeLa y MCF7. Las células fueron transfectadas con los siRNAs NT o HERC2 (H2.2) y a las 24 horas post-transfección fueron resembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 1.000 células/pocillo. Día a día las células fueron fijadas con el colorante cristal violeta. Al final del ensayo, el colorante era disuelto y la absorbancia cuantificada a 550 nm. Las eficiencias de transfección del siRNA de HERC2 fueron comprobados (datos no mostrados), observando una disminución significativa de los niveles de HERC2. Los datos son representados como la media +/- SEM.

Con las condiciones estandarizadas para las curvas de crecimiento, se repitieron esta vez en las células U2OS, que expresan niveles más elevados de p53, transfectadas con dos siRNAs distintos para HERC2 y el control y se analizó como antes. En estas células se observaron diferencias a partir del día 3 que fueron aumentando hasta el último punto del ensayo (día 7). Cuando HERC2 no se expresa, el crecimiento celular está aumentando con respecto a las células control (NT) (Figura R27).

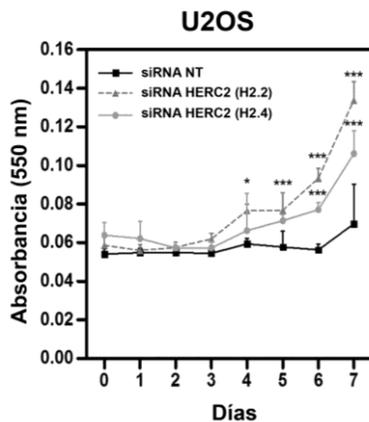


Figura R27. Ausencia de HERC2 con dos siRNAs específicos aumentan el crecimiento celular en la línea U2OS. Las células fueron transfectadas con los siRNAs NT o HERC2 (H2.2 o H2.4) y a las 24 horas post-transfección fueron resembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 1.000 células/pocillo. Los datos son representados como la media +/- SEM.

Con estos resultados anteriores, se esperaría que el efecto sobre el crecimiento celular fuera comparable al que se obtendría cuando p53 no está. Por ello, repetimos estos experimentos en las células U2OS con el siRNA para p53. En la figura R28, se observa un incremento similar en el crecimiento celular cuando HERC2 o p53 son anulados.

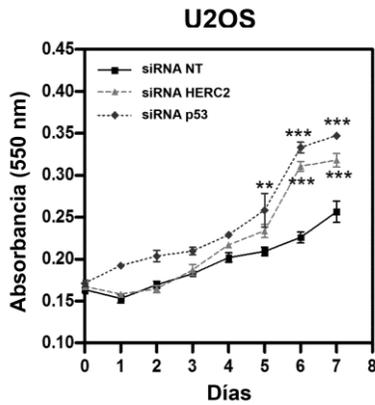


Figura R28. Ausencia de HERC2 o p53 afectan de manera similar el crecimiento celular. Las células fueron transfectadas con los siRNAs NT, HERC2 (H2.2) o p53 y tras 24 horas de transfección, las células se resembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 3.000 células/pocillo. Los datos son representados como la media +/- SEM.

Para comprobar que los efectos sobre el crecimiento celular en ausencia de HERC2 son dependientes de la actividad de p53, las curvas de crecimiento se realizaron en las células H1299. En estas células la anulación de HERC2 no altera el crecimiento celular con respecto a las células con siRNA control (Figura R29).

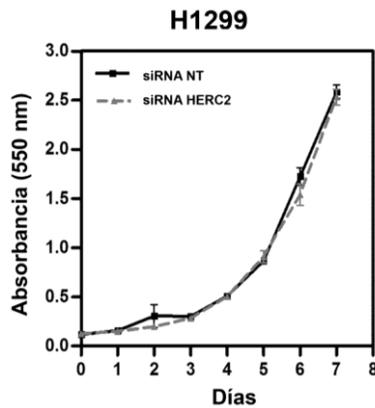


Figura R29. Ausencia de HERC2 en las células H1299 (p53 null) no influye sobre el crecimiento celular. Las células H1299 fueron transfectadas con los siRNAs NT o HERC2 (H2.2) y a las 24 horas de la transfección se resembraron 1.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se analizaron a los tiempos indicados. Los datos son representados como la media +/- SEM.

Los datos obtenidos por las curvas de crecimiento se confirmaron por ensayos de clonogenicidad, los cuales permiten evaluar si una célula tiene el potencial para formar una colonia (Franken et al., 2006). Al igual que las curvas de crecimiento, inicialmente se realizaron en las células MCF7 y HeLa. Después de 15 días de la siembra a baja densidad, se observa un mayor número de colonias cuando HERC2 no estaba. Las diferencias coinciden con lo observado en las curvas de crecimiento (Figura R30).

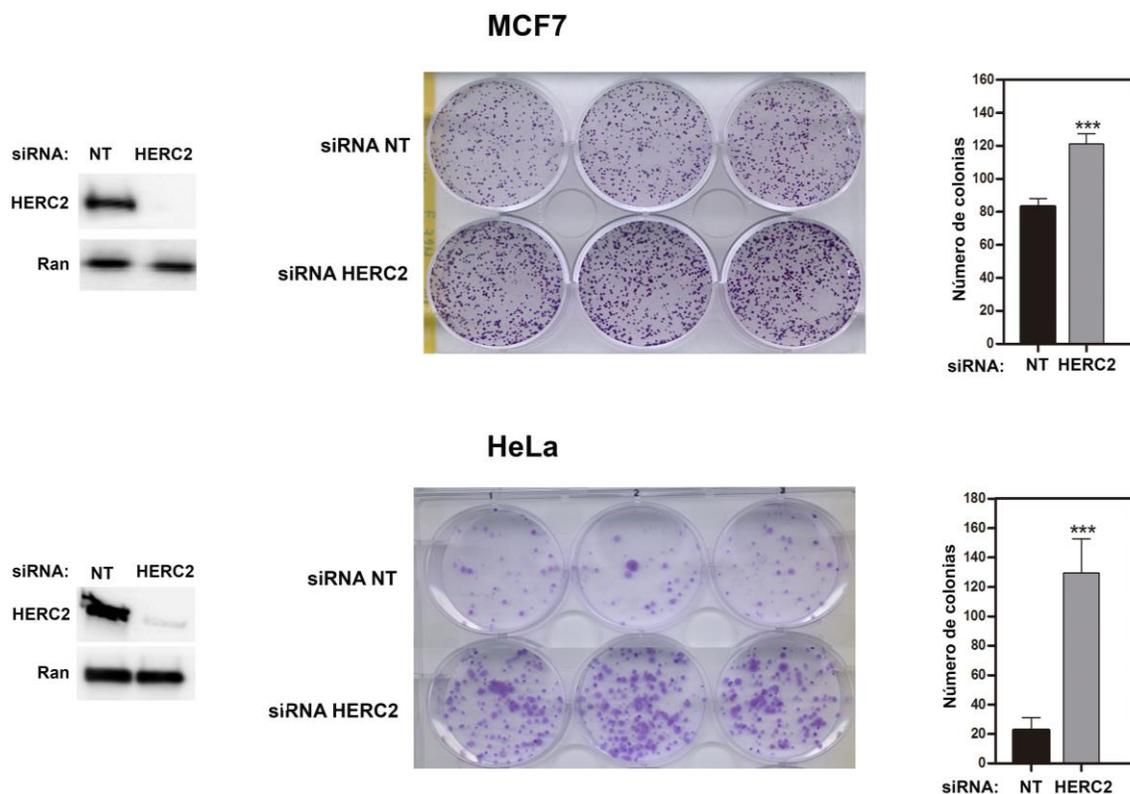


Figura R30. La ausencia de HERC2 aumenta el número de colonias en ensayos de clonogenicidad. Células HeLa o MCF7 fueron transfectadas con los siRNAs NT o HERC2 (H2.2) y a las 72 horas fueron resebradas a 500 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en cultivo hasta observar colonias de 50 células aproximadamente (10-15 días). El efecto del siRNA fue verificado por *western blot* (panel de la izquierda). Los datos son representados como la media \pm SEM.

Con las células U2OS se realizaron estos ensayos con los dos siRNAs específicos para HERC2. Con ambos siRNAs, se observó un mayor número de colonias, casi 3 veces más con respecto a las células transfectadas con siRNA NT (Figura R31).

El efecto observado en ausencia de HERC2 fue comparable al obtenido cuando p53 fue anulado en las células U2OS. En ambas situaciones se observan 3 veces más del número de colonias respecto a las células con el siRNA NT (Figura R32).

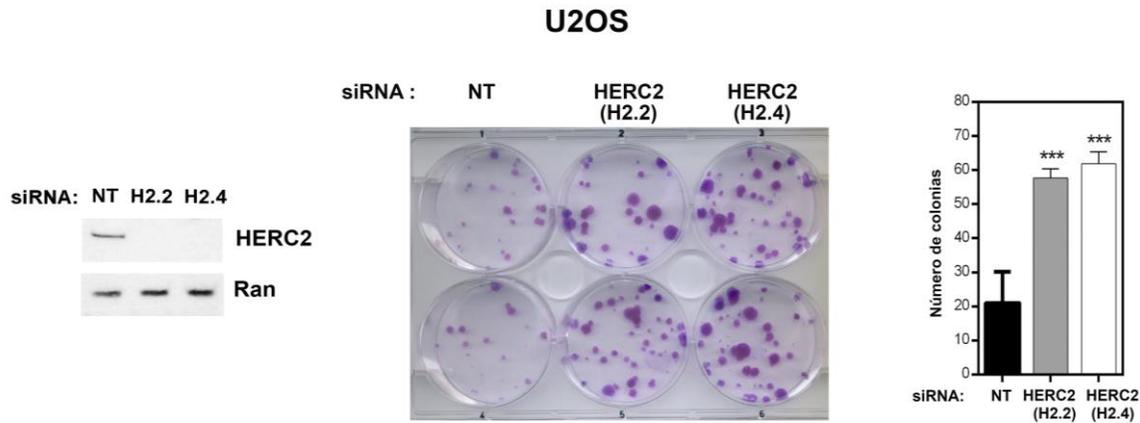


Figura R31. La ausencia de HERC2 aumenta el número de colonias en ensayos de clonogenicidad en células U2OS. Las células U2OS se transfectaron con los siRNAs NT, HERC2 (H2.2 o H2.4) y a las 72 horas fueron resembradas a 500 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en cultivo por 10-15 días hasta observar colonias de 50 células aproximadamente. El efecto del siRNA fue verificado por *western blot* (panel de la izquierda). Los datos son representados como la media +/- SEM.

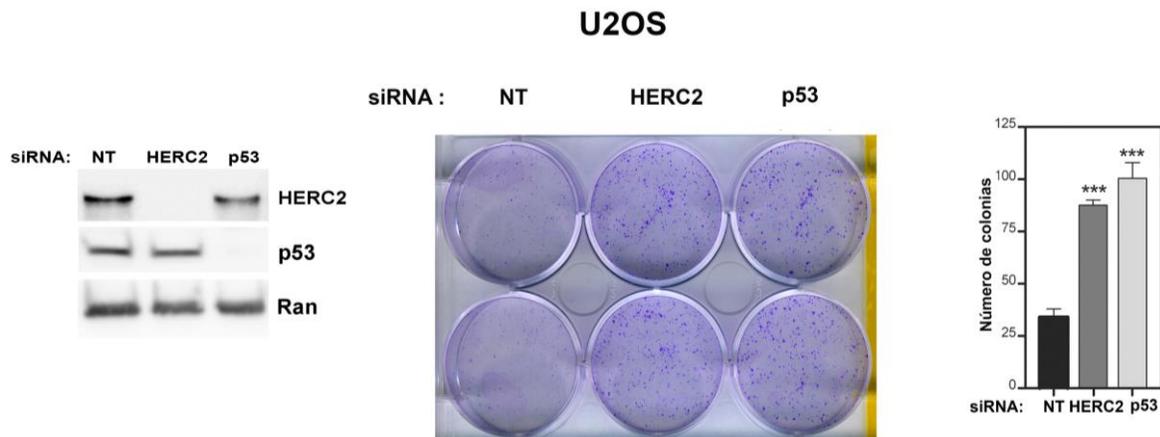


Figura R32. La ausencia de HERC2 o p53 aumenta de manera similar el número de colonias en ensayos de clonogenicidad. Las células U2OS se transfectaron con los siRNAs NT, HERC2 (H2.2) o p53 y a las 72 horas fueron resembradas a 500 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en cultivo por 10-15 días hasta observar colonias de 50 células aproximadamente. El efecto del siRNA fue verificado por *western blot* (panel de la izquierda). Los datos son representados como la media +/- SEM.

Como era de esperar en las células H1299 el silenciamiento de HERC2 no tiene ningún efecto. El número de colonias no varió entre una condición y otra (Figura R33).

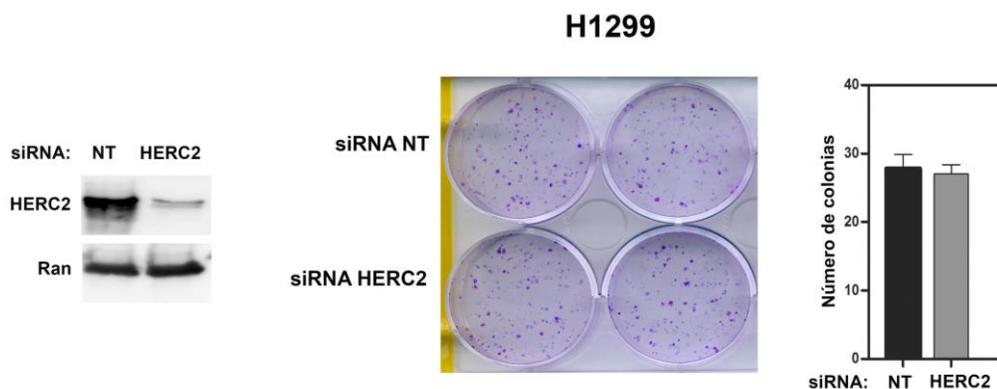


Figura R33. La ausencia de HERC2 no afecta la formación de colonia en las células H1299. Las células H1299 se transfectaron con los siRNAs NT o HERC2 (H2.2) y se resembraron a baja densidad a las 72 horas post-transfección. El efecto del siRNA fue verificado por *western blot* (panel de la izquierda). Los datos son representados como la media \pm SEM.

En su conjunto, todos estos datos demuestran que HERC2 regula el crecimiento y la proliferación celular a través de la regulación de p53.

2.5 Efecto del proteasoma y de otras ubiquitininas ligasas en la regulación de p53 por HERC2

El estricto control de los niveles de p53 en la célula se da principalmente por la degradación a través del proteasoma mediado por el sistema de ubiquitinación (Scheffner et al., 1993). La principal ubiquitina ligasa de p53 es MDM2 (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997) y un importante regulador de MDM2 es MDMX quien al favorecer la estabilización del complejo MDM2-p53, permite la degradación de p53 (Tanimura et al., 1999). Por otra parte, se ha descrito que E6AP, una ubiquitina ligasa de la misma familia HECT de la cual forma parte HERC2, interacciona con HERC2 y de esta manera la actividad ubiquitina ligasa de E6AP es estimulada (Kühnle et al., 2011). E6AP puede interaccionar con la oncoproteína E6 de ciertos papilomavirus humanos contribuyendo a la carcinogénesis cervical en parte por la desregulada degradación de p53 (Kühnle et al., 2011).

Es bien conocido que la inhibición de la actividad del proteasoma incrementa los niveles de p53, así como los de MDM2 y MDMX. Así, para examinar si la regulación de la actividad transcripcional de p53 por HERC2 era independiente o no del efecto del proteasoma, analizamos los niveles de p21 en células U2OS en presencia del inhibidor del proteasoma MG132. Como se

observa en la figura R34, el MG132 incrementa los niveles de p53 que se correlacionan con un aumento en los de la proteína p21. MDM2 y MDMX también aumentan cuando el proteasoma es inhibido. E6AP no es alterado por el tratamiento. Cuando la expresión de HERC2 era anulada, p53 y p21 aumentaban después del tratamiento con el inhibidor MG132, pero no en la misma extensión con relación a las células control (NT) (Figura R34, comparar carriles 4, 5 y 6). Además, podemos observar que la ausencia de HERC2 no afecta los niveles de otras E3 ligasas como MDM2 o E6AP. Estos datos sugerían que la inhibición de la actividad de p53 por HERC2 era independiente de los efectos del proteasoma y de la posible regulación en este contexto de otras ubiquitinas ligasas como MDM2 o E6AP o reguladores negativos de p53 como MDMX.

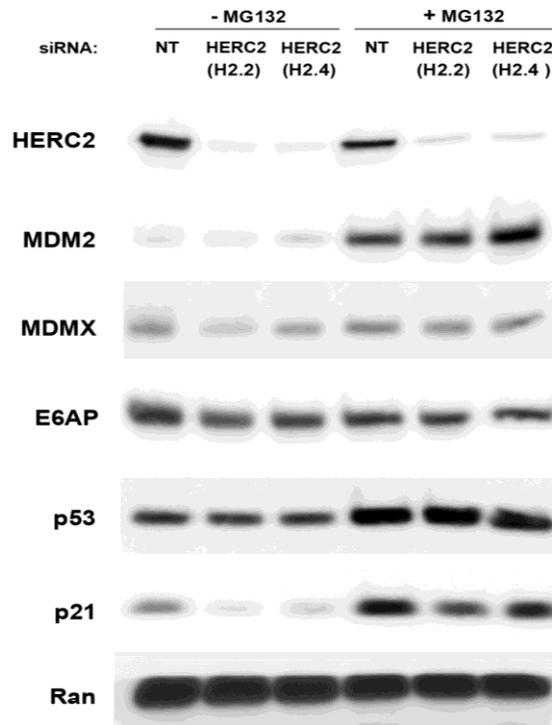


Figura R34. Regulación transcripcional de p53 por HERC2 es independiente del proteasoma. Células U2OS fueron transfectadas con los siRNAs NT o HERC2 (H2.2 o H2.4) y a las 72 horas post-transfección se trataron con el inhibidor del proteasoma MG132 durante 6 horas. Después, los lisados fueron analizados por *western blot* con anticuerpos específicos para las proteínas HERC2, MDM2, MDMX, E6AP, p53, p21 y Ran.

Aumentar los niveles de la proteína p53 puede ser una terapia en cánceres con p53 no mutado. Una de las estrategias seguidas ha sido la de inhibir la degradación de p53 por MDM2. Así, han sido diseñados fármacos como la nutlina-3A (Vassilev, 2004) o el MI-219 (Shangary and Wang, 2009). En este contexto, nos preguntamos si MDM2 estuviera mediando algún tipo de regulación sobre los

efectos de HERC2 en la actividad transcripcional de p53. Por ello, realizamos experimentos similares a los anteriores, pero esta vez en presencia de nutlina-3A. El tratamiento con nutlina-3A incrementó los niveles de MDM2 pero también aumentó la actividad transcripcional de p53, observada por un incremento en los niveles de la proteína p21 (Figura R35, comparar carriles 1 y 4). Cuando HERC2 no estaba MDM2 aumentaba y también los niveles de p21, pero este incremento seguía siendo menor con respecto a las células control (NT). Estos datos indicaban que el efecto regulador de HERC2 sobre la actividad transcripcional de p53 parece independiente de la actividad de MDM2.

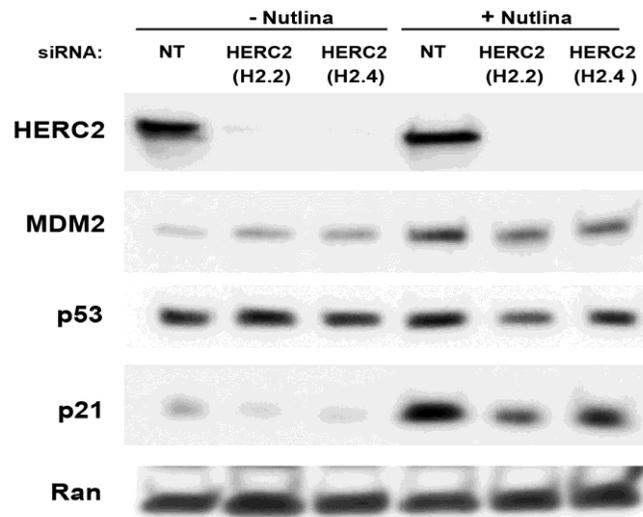


Figura R35. Inhibición de MDM2 por nutlina-3A no regula los efectos de HERC2 sobre la actividad transcripcional de p53. Células U2OS fueron transfectadas con los siRNAs NT o HERC2 (H2.2 o H2.4). A las 48 horas post-transfección, se adicionó el tratamiento con nutlina-3A por 16 horas. Después de este tiempo, las células fueron analizadas por *western blot* con anticuerpos específicos para HERC2, MDM2, p53, p21 y Ran.

Estos resultados fueron confirmados por ensayos con RNAs de interferencia para anular la expresión de MDM2. El silenciamiento de MDM2 causaba un aumento en los niveles de p53 y de p21. Cuando el silenciamiento de MDM2 fue combinado con el de HERC2, la disminución de p21 causada por la ausencia de HERC2 se mantuvo, confirmándose que los niveles de p21 están siendo regulados en una manera independiente de MDM2 (Figura R36, carriles 1-4). Cuando estos experimentos se realizaron en presencia del inhibidor del proteasoma MG132, los resultados obtenidos sobre la actividad de p53 fueron similares (Figura R36, carriles 5-8).

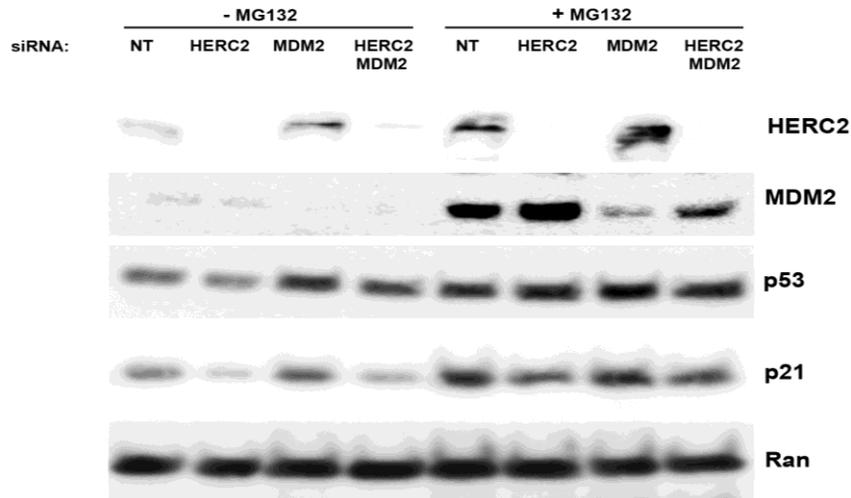


Figura R36. Regulación de HERC2 sobre p53 y su actividad es independiente de MDM2. Células U2OS fueron transfectadas con siRNAs específicos para HERC2 (H2.2) o MDM2 solos o combinados, y el control negativo siRNA NT. El tratamiento con MG132 se realizó a las 72 horas post-transfección. Los lisados recuperados fueron analizados por inmunoblot con anticuerpos específicos para HERC2, MDM2, p53, p21 y Ran.

2.6 Análisis de la respuesta de p53 al estrés genotóxico en ausencia de HERC2

El modelo clásico de activación de p53 consiste básicamente en tres pasos: estabilización mediada por la fosforilación en las serinas 15 y 20 por quinasas como ATM y ATR inhibiendo la interacción con MDM2, unión al DNA por su secuencia específica y activación de genes diana. Sin embargo, la gran diversidad de modificaciones post-traduccionales que ocurren sobre p53 sugieren un mecanismo más complejo (Kruse and Gu, 2009). p53 tiene un papel clave en la respuesta celular por daño al DNA, regulando el ciclo celular y la apoptosis. Por ello decidimos analizar la respuesta de p53 al daño al DNA causado por el agente quimioterapéutico bleomicina. Las lesiones sobre el DNA causadas por la bleomicina ocurren principalmente por la ruptura de la doble cadena y se requiere de un mecanismo de recombinación de extremos no homólogos (*NHEJ: non homologous end joining*) para reparar el daño (Bonner et al., 2008; Helleday et al., 2008; Jackson and Bartek, 2009).

A las 72 horas de haber sido transfectadas con siRNAs de HERC2, las células U2OS fueron incubadas con bleomicina a diferentes tiempos (0-6 horas). En la figura R37, se puede observar como una hora de tratamiento con la bleomicina, permite la fosforilación de p53 en serina 15 que

siguió aumentando durante las siguientes 6 horas. Este incremento va acompañado del aumento de los niveles de p53 y de p21 (Figura R37A). Cuando analizamos las células donde HERC2 no se expresaba, observamos la fosforilación de p53 aunque esta era menor que la observada en las células con siRNA HERC2 con respecto a las células con el siRNA NT. En estas condiciones, p53 se incrementó ligeramente con el tratamiento con bleomicina y los niveles de p21 no aumentaron de la misma manera que las células control. Al observar que los niveles totales de p53 no aumentaban de la misma manera cuando HERC2 no se expresaba, y que esto podría explicar la menor fosforilación observada, se cuantificó la relación de p53 fosforilado/p53 total, observando que la relación no variaba significativamente entre las células control y sin HERC2, por lo cual la cantidad de fosforilación observada era proporcional a los niveles de p53 totales (datos no mostrados), y la ausencia de HERC2 no afectaba a la fosforilación de p53 por el tratamiento con bleomicina.

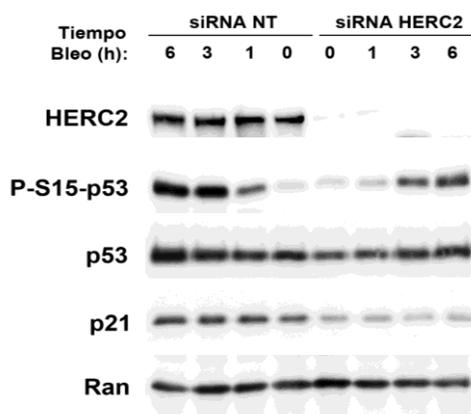


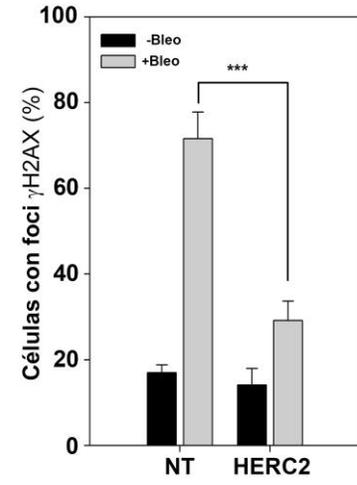
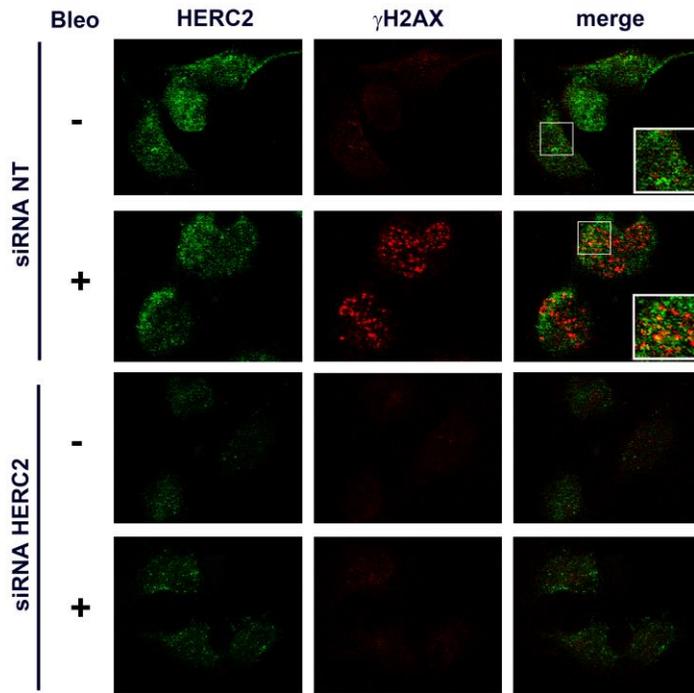
Figura R37. HERC2 no regula la fosforilación de p53 en células sometidas a estrés genotóxico por bleomicina. Células U2OS fueron transfectadas con siRNA NT o HERC2 (H2.2) para anular la expresión de HERC2 y analizar la respuesta ante el tratamiento con bleomicina (Bleo) a los tiempos indicados. Los lisados recuperados de cada punto fueron analizados por inmunoblot con anticuerpos específicos para las proteínas indicadas. Este resultado es representativo de al menos 10 experimentos independientes.

Adicionalmente a la importancia de la activación de p53 durante la reparación del daño al DNA, la regulación de este proceso por procesos de ubiquitinación y deubiquitinación ha emergido como un mecanismo primordial para la mantener la integridad del genoma. En 2010, Bekker-Jensen *et al.* implicaron por primera vez a HERC2 en los procesos de reparación del DNA, observando que en células donde HERC2 se había anulado, el reclutamiento de factores de reparación como 53BP1, RAP80 y BRCA1 disminuían. En este tipo de experimentos, el daño al DNA era causado por

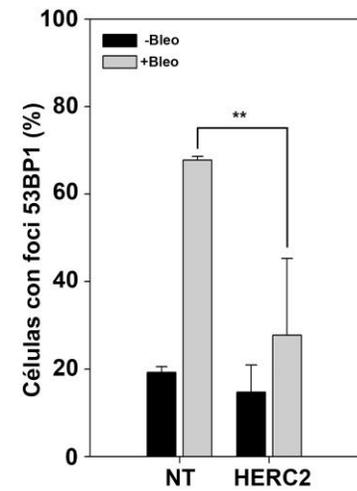
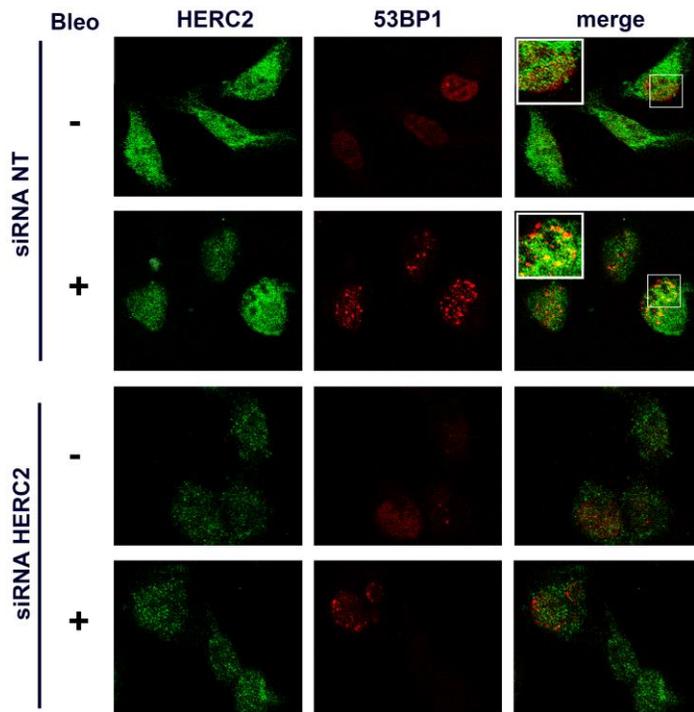
irradiación que también causa rotura de la doble cadena de DNA. Por ello, quisimos evaluar si los efectos de la bleomicina podrían ser comparables o no a los observados con la irradiación, y analizar la respuesta de HERC2 ante el daño por la bleomicina. Para ello se analizaron estructuras subnucleares llamadas *foci* que son formadas por el reclutamiento de factores de reparación. La formación de estos *foci* depende mayoritariamente de la fosforilación de la variante de la histona H2AX (γ H2AX). Otro factor de reparación importante es 53BP1 (p53-binding protein 1) (Lee and Paull, 2007; Lukas et al., 2011). Después del tratamiento con bleomicina, la formación de *foci* para γ H2AX y 53BP1 fue observada en células U2OS. Sin embargo, en las células donde HERC2 no se expresaba el número de *foci* disminuyó significativamente tanto para γ H2AX como para 53BP1 (Figura R38). De manera interesante, parece haber colocalización de HERC2 con ambas proteínas de reparación.

Figura R38. HERC2 afecta la formación de *foci* de γ H2AX y 53BP1 en células tratadas con bleomicina. Células U2OS transfectadas con siRNA control NT o HERC2 (H2.2) fueron tratadas por 1 hora con bleomicina (Bleo) a las 72 horas post-transfección. Después de este tiempo las células fueron fijadas para inmunofluorescencia. Las imágenes fueron captadas en un microscopio confocal. La cuantificación del número de *foci* es expresada como la media +/- SEM y es representativo de al menos 5 experimentos independientes.

A



B



2.7 Localización celular de la interacción HERC2-p53 y el efecto del estrés genotóxico sobre esta interacción

PARC y CUL7, proteínas que presentan en su estructura el dominio CPH al igual que HERC2 y que interaccionan con p53 mediante este dominio (Kasper et al., 2006; Kaustov et al., 2007; Nikolaev et al., 2003) controlan la localización subcelular de p53. Así, cuando PARC es silenciado en células U2OS, p53 se relocaliza predominantemente en el núcleo incrementando su actividad transcripcional (Nikolaev et al., 2003), mientras que para CUL7 este dominio es importante para su propia localización citoplasmática (Kasper et al., 2006).

Por ello nos preguntamos, si HERC2 estaría regulando la localización de p53 y así afectar su actividad transcripcional. Realizamos experimentos de fraccionamiento subcelular en células U2OS transfectadas con los siRNAs control NT y HERC2, en presencia y ausencia de bleomicina. A partir de las fracciones citoplasmática y nuclear aisladas de células U2OS, analizamos la distribución de HERC2 y p53, así como del p53 fosforilado y de HERC1. Utilizamos la distribución de la Lamina A/C y de la α -Tubulina como controles de las fracciones nucleares y citoplasmáticas, respectivamente. Como se observa en la figura R39, HERC2 se localizaba tanto en citoplasma como en núcleo, HERC1 se observó únicamente en la fracción citoplasmática. Después del tratamiento con bleomicina, p53 es fosforilado y se distribuye tanto en la fracción citoplasmática como nuclear. Cuando HERC2 no se expresa y después del tratamiento con bleomicina, se observa una ligera retención de p53 en la fracción citoplasmática (Figura R39, comparar carriles 6 y 8 con carriles 5 y 7), p53 fosforilado también parece quedarse retenido, sin embargo al ser menores los niveles iniciales de p53 total y fosforilado sin HERC2, no se puede concluir que HERC2 afectó la localización celular de p53.

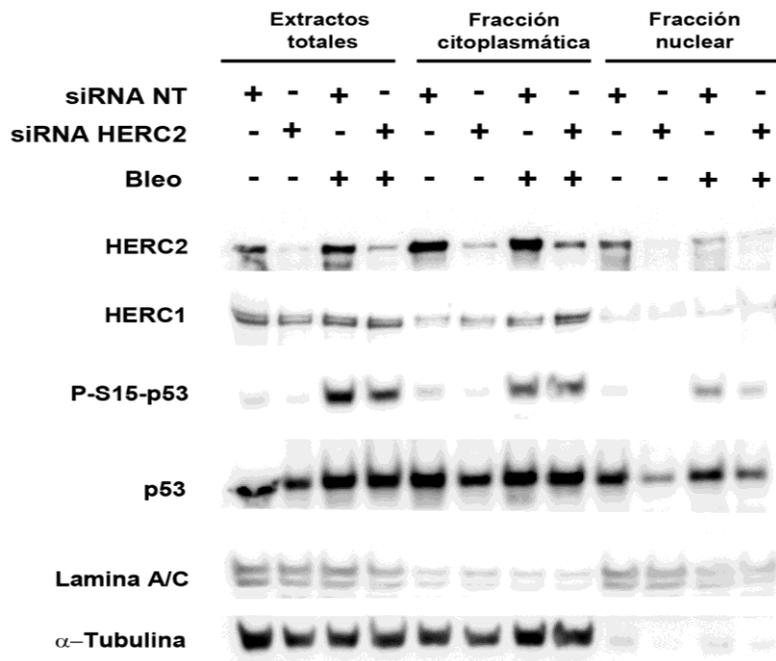


Figura R39. HERC2 podría regular la localización subcelular de p53. Células U2OS transfectadas con siRNAs NT o HERC2 se trataron por 3 horas con bleomicina (Bleo) y separadas en fracción citoplasmática y nuclear como se describe en materiales y métodos para analizarlas por *western blot* para las proteínas indicadas. La lamina A/C se utilizó como marcador de la fracción nuclear y la α -Tubulina para la fracción citoplasmática.

Al no haber observado un claro efecto de HERC2 sobre la localización de p53, analizamos si el tratamiento con bleomicina mantenía o no la interacción HERC2-p53. Por ello, realizamos ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-HERC2 en células U2OS tratadas y no con bleomicina. La interacción entre HERC2 y p53 se mantiene después del tratamiento con bleomicina (Figura R40).

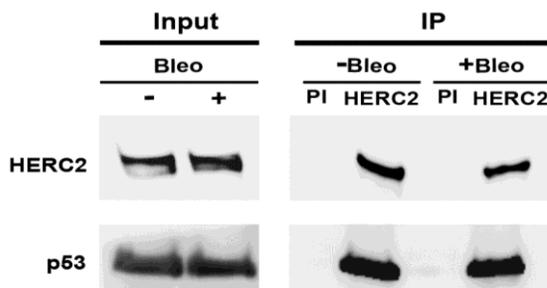


Figura R40. La interacción HERC2-p53 se mantiene después del tratamiento con bleomicina. Células U2OS fueron tratadas con bleomicina (Bleo) por 3 horas y lisadas para ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HERC2 (bvg3) o PI (suero pre-inmune) y analizadas por *western blot*.

Al determinar que HERC2 y p53 se localizaban tanto en citoplasma como en núcleo, nos preguntamos donde estaría ocurriendo la interacción. Para analizar esto, las fracciones citoplasmática y nuclear fueron aisladas y sobre estas se realizaron ensayos de inmunoprecipitación

con el anticuerpo contra HERC2. Como se observa en la figura R41, la interacción HERC2-p53 ocurre tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura R41).

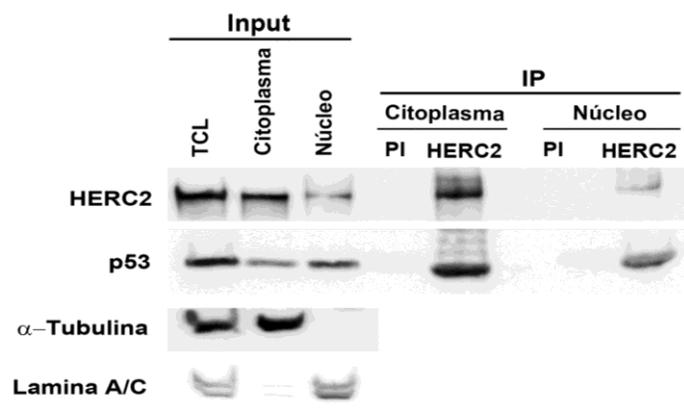


Figura R41. La interacción entre HERC2 y p53 ocurre en citoplasma y núcleo. Las células U2OS fueron separadas en fracciones citoplasmática y nuclear. Con estas fracciones se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpo anti-HERC2 (bvg3) y se analizó por *western blot*. La α -Tubulina y la Lamina A/C se analizaron como marcadores de la fracción citoplasmática y nuclear, respectivamente.

2.8 Regulación de la oligomerización de p53 por HERC2

Previamente, habíamos demostrado la importancia de los últimos 43 aminoácidos de p53 para la interacción con HERC2 (Figura R15 y R16). Este dominio contiene en parte el dominio de tetramerización de p53 que permite que p53 pueda oligomerizar. El dominio de tetramerización se localiza en el extremo carboxilo-terminal, donde también se encuentra una secuencia señal de exportación al núcleo (NES), sugiriendo que la oligomerización y la exportación al núcleo son hechos ligados (Itahana et al., 2009). Por todo esto, decidimos analizar si HERC2 podría regular la oligomerización de p53.

Una primera aproximación fue analizar la interacción de HERC2 con proteínas de p53 que contenían mutaciones en la señal de localización nuclear (NLS) o en la señal de exportación (NES). Estos mutantes estaban fusionados al epítipo CFP (*Cyan fluorescent protein*), por lo cual podíamos analizarlos por microscopía de fluorescencia y determinar su localización celular. Así, mientras la proteína p53^{NLS} se localizaba en el citoplasma, la p53^{NES} estaba retenida en el núcleo. La proteína p53^{WT} se localizaba predominante nuclear (Figura R42A). Para estudiar la interacción con HERC2

con las diferentes proteínas de p53, estas fueron expresadas en las células H1299 y por ensayos de inmunoprecipitación se analizó la interacción HERC2-p53. En la figura R42B, se puede observar que HERC2 interacciona con la proteína p53^{NLS} pero no con la proteína p53^{NES}. La expresión de p53^{WT} se llevaba como un control positivo del experimento, mientras que la del pcDNA3 como un control negativo. Como era de esperar, la actividad transcripcional de p53 solo se mantuvo con p53^{WT} al inducir los niveles de expresión de la proteína p21. Como previamente, habíamos demostrado que la interacción entre HERC2 y p53 ocurre en el citoplasma y en el núcleo (Figura R41), no parecía probable que la ausencia de interacción entre HERC2 y p53^{NES} fuera por su localización subcelular. Curiosamente, estudios previos habían demostrado que el mutante p53^{NLS} mantiene su capacidad de oligomerizar mientras que el p53^{NES} no (Itahana et al., 2009).

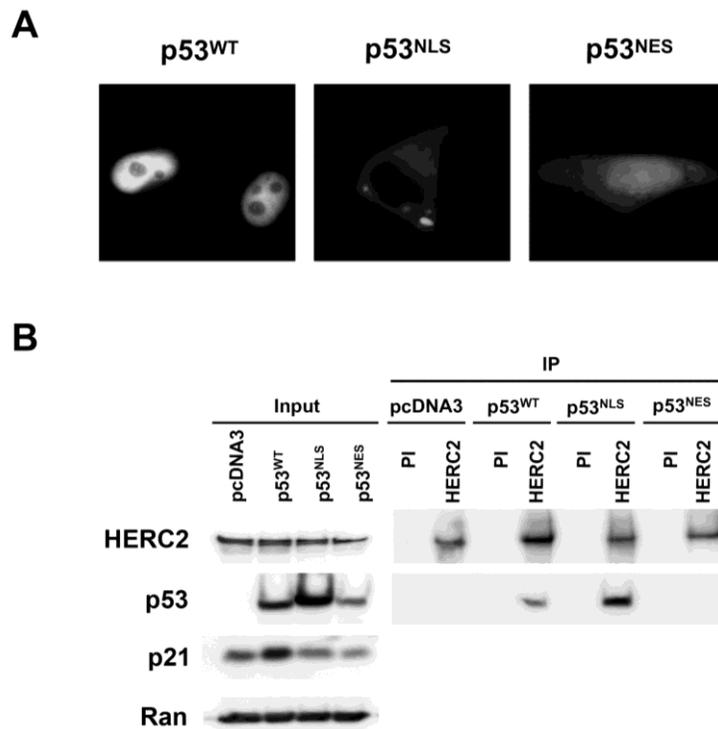


Figura R42. La proteína p53^{NES} no interacciona con HERC2. (A) Células H1299 fueron transfectadas con los plásmidos p53^{WT}, p53^{NLS} y p53^{NES} que tienen fusionado el epítipo CFP y visualizadas por microscopía de fluorescencia a las 48 horas post-transfección. (B) Los lisados fueron utilizados para ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra HERC2 (bvg3) y analizados por *western blot*. PI (suero preinmune). Células transfectadas con pcDNA3 se utilizaron como control negativo.

Para confirmar nuestras observaciones de que la capacidad intacta para oligomerizar de p53 era necesaria para la interacción con HERC2, utilizamos otras proteínas mutantes de p53 que están descritas que presentan mutaciones en el dominio de tetramerización. Así, usamos los mutantes p53^{R337C} y p53^{L344P} que no pueden oligomerizar, ni acetilarse ni inducir la transcripción de p21 (Itahana et al., 2009). Estos mutantes se expresaron y se analizó en ensayos de inmunoprecitación la interacción entre HERC2 y p53. Con ninguno de los mutantes, HERC2 era capaz de interactuar (Figura R43), confirmando la importancia de un dominio de tetramerización intacto en p53 que permita su oligomerización e interacción con HERC2.

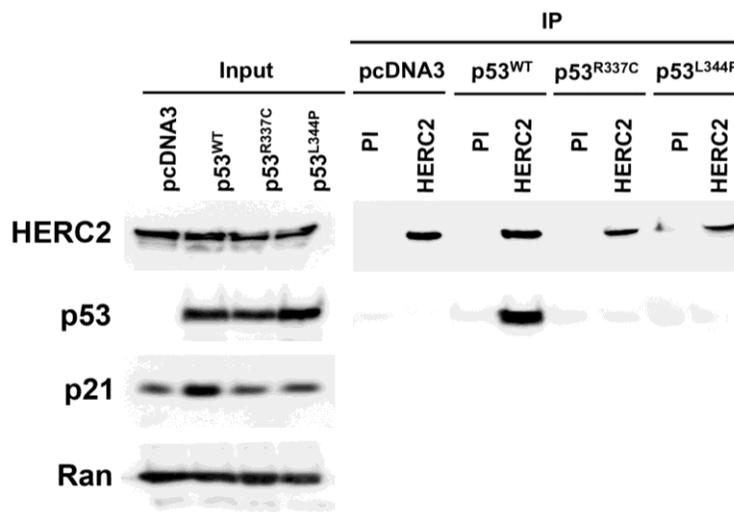


Figura R43. Proteínas de p53 con mutaciones en el dominio de tetramerización no interactúan con HERC2. Células H1299 fueron transfectadas con los plásmidos p53^{WT}, p53^{R337C} y p53^{L344P} y analizadas en ensayos de inmunoprecitación con anticuerpo anti-HERC2 (bvg3 o bvg4) por *western blot* para las proteínas indicadas. PI (suero preinmune). Células transfectadas con pcDNA3 se utilizaban como control negativo.

La oligomerización de p53 es esencial para su actividad transcripcional porque facilita la interacción con el DNA y con otras proteínas que pueden unirse a p53 dependiente de su estatus oligomérico. La observación de que HERC2 solo interactúa con p53 oligomerizado nos llevó a preguntarnos si HERC2 podría regular la oligomerización de p53.

Para estudiar la oligomerización de p53 utilizamos ensayos de *cross-linking* con diferentes concentraciones del *cross linker* glutaraldehído (Itahana et al., 2009). Para ello, se expresó el plásmido p53^{WT} en combinación con los siRNAs NT o HERC2, y se analizó las diferentes formas de

oligomerización de p53. En estas condiciones se detectaban las diferentes formas oligoméricas de p53 (dímeros, tetrámeros) en las células con el siRNA NT pero no en las células que no expresan HERC2 (Figura R44A, izquierda). Como previamente se había observado que la bleomicina activaba p53, estos experimentos se realizaron también en presencia de bleomicina. La bleomicina estimulo la oligomerización de p53. En ausencia de HERC2, la oligomerización se disminuyó (Figura R44A, derecha). Para confirmar estos datos con la proteína p53 endógena, experimentos similares pero sin transfectar plásmidos se realizaron en células U2OS. En la figura R44B, se puede observar como la oligomerización de p53 fue estimulada por bleomicina y que en todas las condiciones la ausencia de HERC2 disminuyó la oligomerización de p53.

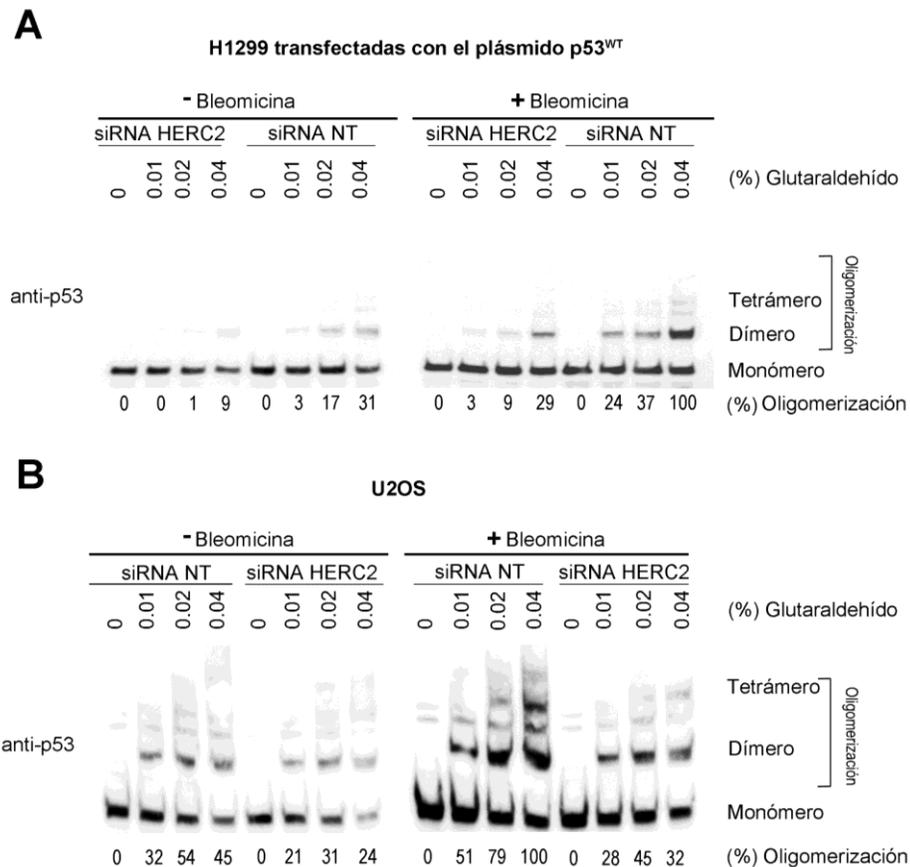


Figura R44. HERC2 regula la oligomerización de p53. (A) Células H1299 fueron transfectadas con el plásmido p53^{WT} y siRNAs NT o HERC2 y tratadas o no con bleomicina por 3 horas. Para analizar la oligomerización de p53, los lisados se trataron con glutaraldehído a las concentraciones indicadas y se analizó por *western blot* con anticuerpo anti-p53 tal y como se describe en materiales y métodos. La oligomerización es expresada en porcentaje como la suma de dímeros y tetrámeros por carril. La oligomerización observada en las células NT con bleomicina y glutaraldehído al 0.04% se consideraron el 100%. Los demás carriles se cuantificaron con respecto a este 100%. (B) Oligomerización de p53 en células U2OS. La oligomerización del p53 endógeno se analizó y cuantificó igual que para las células H1299 pero sin transfectar plásmidos.

Estos datos mostraban claramente que HERC2 podría ser necesario para mantener la oligomerización de p53, sin embargo no se podía determinar si HERC2 regulaba este proceso. Para demostrarlo, expresamos en las células H1299 un fragmento de HERC2 (Myc-HERC2 F3) con los aminoácidos 2292-2923 que incluía el dominio CPH junto con el plásmido p53^{WT}. En presencia del Myc-HERC2 F3, los niveles de p21 aumentan, mientras que los de HERC2, p53 o Ran permanecen constantes (Figura R45A). El aumento de los niveles de proteína de p21 se correlacionó con el aumento de la transcripción al observarse mayor actividad de su promotor por ensayos de luciferasa (Figura R46B).

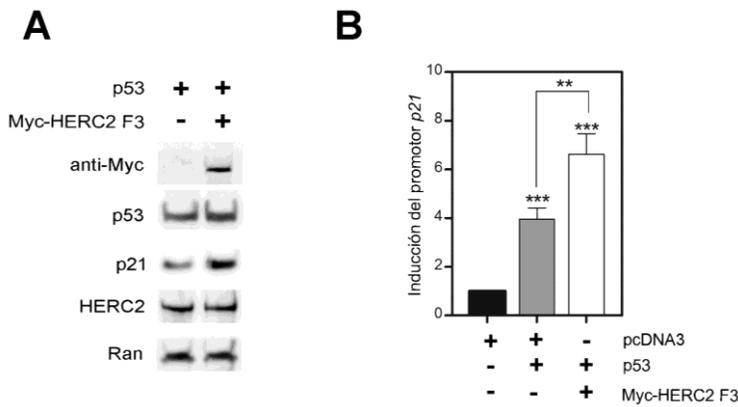


Figura R45. Dominio de HERC2 que contiene el dominio CPH incrementa la actividad transcripcional de p53. (A) Células H1299 fueron transfectadas con p53^{WT} y el dominio Myc-HERC2 F3 (aminoácidos 2292-2923) o no y los niveles para las proteínas indicadas se analizaron por *western blot*. (B) Actividad del promotor del gen *p21* mediante ensayos luciferasa en las condiciones indicadas. Los datos se expresan como la media +/- SEM.

Cuando analizamos la oligomerización de p53 en las condiciones donde el dominio Myc-HERC2 F3 se expresó, se observó un incremento en el porcentaje de oligomerización, demostrando así que HERC2 promueve la oligomerización de p53 (Figura R46).

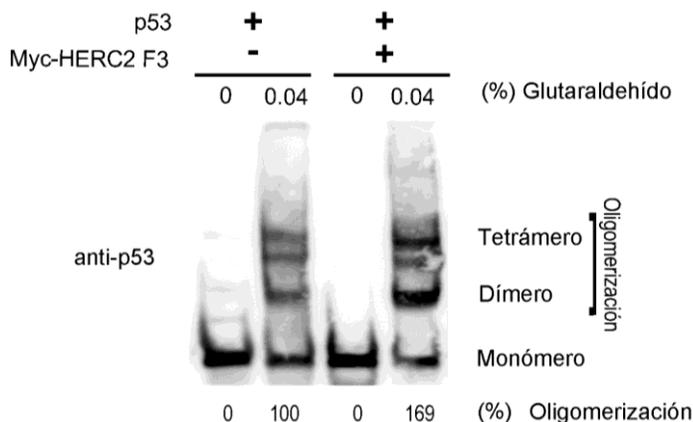


Figura R46. HERC2 promueve la oligomerización de p53. Las células H1299 fueron transfectadas con p53^{WT} y/o Myc-HERC2-F3 y la oligomerización de p53 se analizó como se describió en materiales y métodos.

3. Función de *HERC2* en modelos *in vivo*

3.1 Caracterización molecular de una la mutación de *HERC2* que causa una enfermedad similar al síndrome de Angelman

El síndrome de Angelman (AS) y el síndrome Prader-Willi (PWS) son enfermedades que afectan al desarrollo del sistema nervioso central. Pacientes con estas enfermedades presentan un profundo retraso mental e incapacidad para hablar, trastornos en el movimiento como ataxias o inestabilidad en el andar, hiperactividad, personalidad alegre y episodios de risa excesiva. Estos desórdenes se producen por anormalidades en el *imprinting* que altera la expresión de un grupo de genes, alcanzando deleciones de hasta 5-7 Mb en el cromosoma 15q11-q13. Si el *locus* materno es el alterado, se produce el síndrome de Angelman, y si es el alelo paterno el afectado, se origina el síndrome Prader-Willi (Ji et al., 1999; Ji et al., 2000). Uno de los genes frecuentemente mutados en este tipo de enfermedades, es el gen *UBE3A*, que codifica para la proteína ubiquitina ligasa E6AP. El 70% de los casos se correlaciona su falta de expresión con la enfermedad (Rougeulle et al., 1997).

El grupo del Doctor Andrew H. Crosby del Centro de Genética Humana St. George de la Universidad de Londres analizó un grupo de 15 individuos entre 11 meses y 39 años de edad, pertenecientes a la comunidad Amish en Ohio (Estados Unidos) con un fenotipo muy similar a los pacientes con el síndrome de Angelman. Estos individuos presentan un retraso global en el desarrollo, hipotonía, marcha inestable, problemas para gesticular y hablar, así como problemas para concentrarse e hiperactividad. Diferentes análisis de secuenciación identificaron en todos los individuos afectados una única región en homocigosis de 1.8Mb en el cromosoma 15q13.1-q13.3. El *screening* de esta región identificó una variante de base no-sinónima en el exón 13 del gen *HERC2* que produce una sustitución de prolina por leucina en el residuo 594 de la proteína (Harlalka et al., 2013). Este aminoácido se localiza en el dominio RLD1 de *HERC2* y está muy conservado entre las especies (Figura R47). En estos individuos no había mutación ni deleción del gen *UBE3A*. Para determinar las consecuencias funcionales de la mutación en el gen *HERC2*, nuestro grupo fue contactado por la experiencia que posee en el estudio de la familia de las proteínas *HERC*.

Para analizar la relevancia funcional que podría tener la mutación identificada sobre la proteína HERC2, nos proporcionaron fibroblastos de piel de cuatro individuos afectados con la mutación HERC2^{Pro594Leu} (RM144, AM145, AR184, LR185) y de tres individuos no afectados (C6, C7, AY).

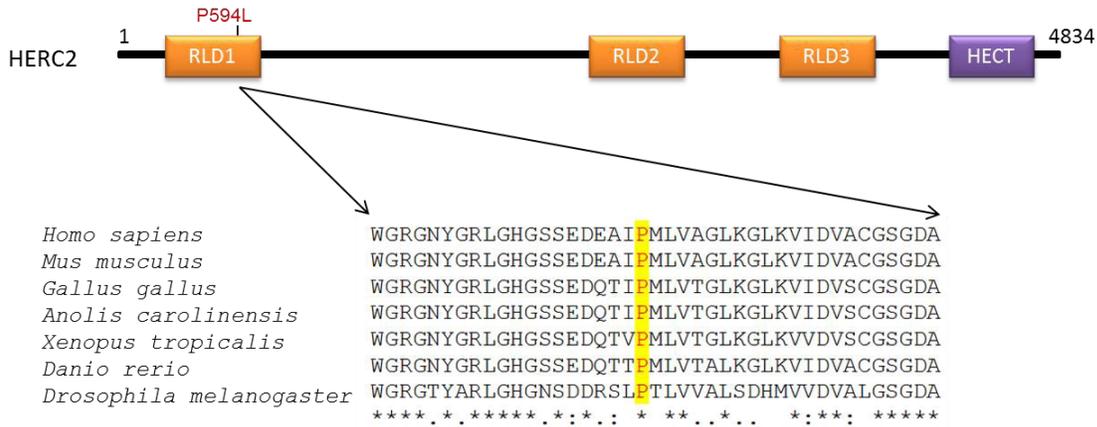


Figura R47. Estructura esquemática de HERC2 y alineamiento de secuencias para diferentes especies para el dominio RLD1. La mutación Pro594Leu (P594L) se localiza dentro del dominio RLD1 de la proteína HERC2. Este aminoácido es conservado entre todas las especies analizadas.

Morfológicamente, los fibroblastos de los individuos no afectados eran bastante diferentes a los fibroblastos con la mutación. Los fibroblastos con HERC2^{Wild-type} eran células alargadas, de forma ahusada y crecían más uniformemente alcanzando la confluencia en las placas de cultivo. Por el contrario, los fibroblastos HERC2^{Pro594Leu} eran más anchos y crecían a manera de agregados distribuidos por la placa de cultivo (Figura R48).

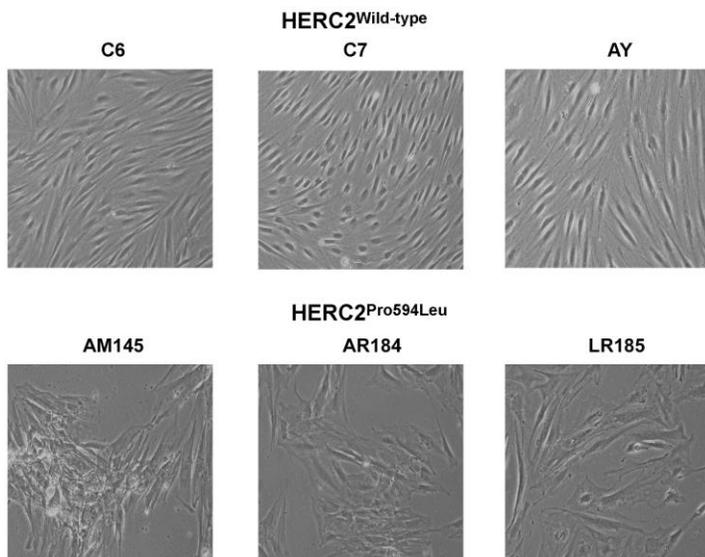


Figura R48. Fibroblastos en cultivos de individuos con HERC2 wild-type o HERC2^{Pro594Leu}. Fotografías de fibroblastos en cultivo en el mismo pase derivados de individuos con HERC2^{Wild-type} o HERC2^{Pro594Leu}.

Las diferencias morfológicas se observaron aún mejor, cuando el citoesqueleto fue marcado con faloidina que tiñe los filamentos de actina o utilizando un anticuerpo contra la α -tubulina (Figura R49).

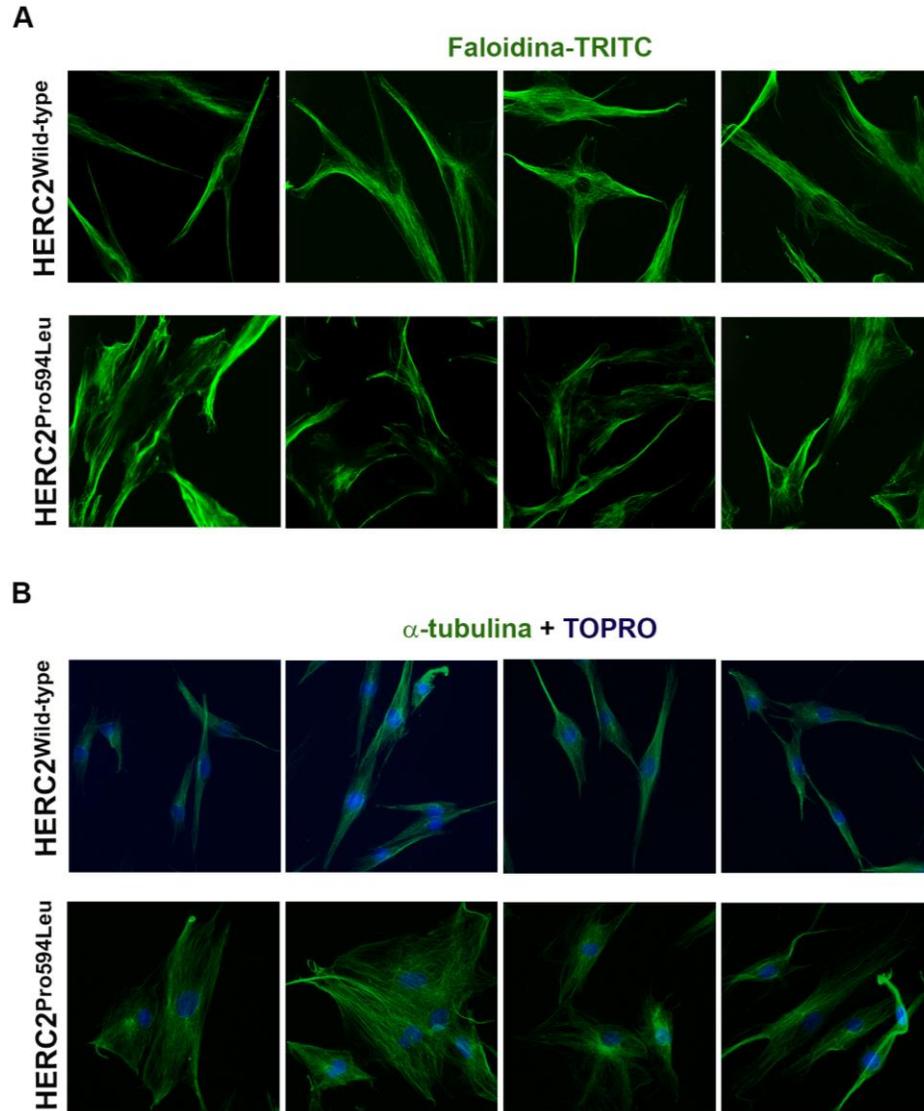


Figura R49. Citoesqueleto de fibroblastos derivados de individuos con $HERC2^{Wild-type}$ o $HERC2^{Pro594Leu}$. (A) Fibroblastos de individuos con $HERC2^{Wild-type}$ (C6) o $HERC2^{Pro594Leu}$ (RM144) fueron teñidos con faloidina-TRITC y visualizados en el microscopio confocal, o fueron incubados con anticuerpo anti- α -tubulina (B) y TOPRO-3 para teñir los núcleos (tinción azul).

Con las diferentes líneas de fibroblastos que se obtuvieron se analizaron los niveles de proteína por *western blot* para HERC2, E6AP, XPA y α -tubulina como control. E6AP se analizaba por la implicación que tiene en el síndrome de Angelman y por estudios previos que mostraban que la actividad ubiquitina ligasa *in vitro* de E6AP se estimulaba por la interacción con HERC2 (Kunhle 2011). Por su parte XPA, fue el primer sustrato de ubiquitinación descrito para HERC2 (Kang et al 2010) y podría dar indicios del efecto de la mutación de HERC2 sobre su actividad ligasa. Como se muestra en la figura R50, los niveles de HERC2 están muy disminuidos en los fibroblastos con la mutación hasta el punto de perderse casi por completo la expresión de la proteína HERC2 en 3 de las 4 líneas analizadas. El efecto de la mutación parece ser específico para HERC2 ya que los niveles de E6AP ni de la α -Tubulina no cambian. Inesperadamente, los niveles de XPA tampoco parecen verse afectados por los bajos niveles de HERC2.

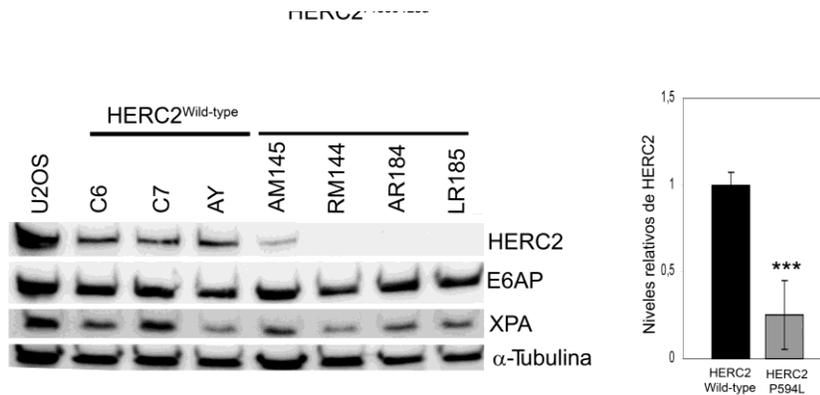


Figura R50. Fibroblastos con la mutación HERC2 Pro594Leu expresan menos niveles de HERC2. Lisados de fibroblastos derivados de individuos control (HERC2^{Wild-type}) o afectados (HERC2^{Pro594Leu}) fueron analizados por *western blot* con los indicados anticuerpos. Los niveles de HERC2 fueron normalizados con respecto a α -Tubulina y expresados como la media \pm SEM, como se muestra en el panel de la derecha. Extractos de células U2OS fueron usados como control de detección de las proteínas por los anticuerpos.

Los niveles de HERC2 detectados en individuos con la mutación fueron tan bajos que sugerían que esta podría afectar a la estabilidad de la proteína. Para analizar este punto, se intentó sobreexpresar los 4.832 aminoácidos de HERC2, pero no pudimos por el tamaño tan inmensamente grande. Como estrategia alternativa, expresamos los primeros 1.295 aminoácidos de la proteína HERC2 introduciendo la mutación Pro594Leu. Este dominio estaba fusionado al epítipo myc y de esta manera podíamos determinar su expresión. Así, en células U2OS se expresaron los plásmidos Myc-HERC2 y Myc-HERC2 Pro594Leu. Como se puede observar en la figura R51, un único cambio

de aminoácido es suficiente para causar la inestabilidad de la proteína y de ahí los bajos o nulos niveles de HERC2 en los fibroblastos de los individuos afectados. Los niveles de E6AP ni de Ran son afectados.

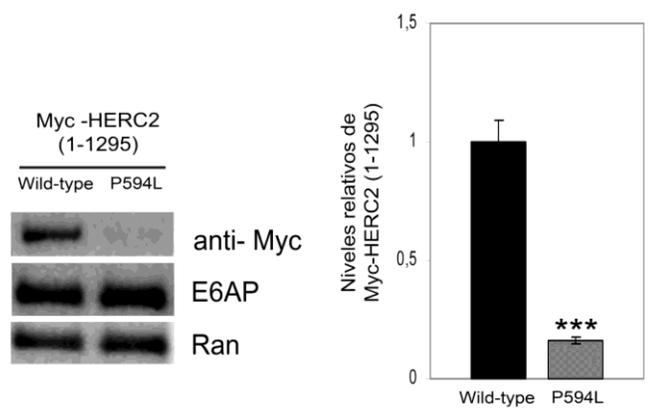


Figura R51. El cambio de prolina por leucina en la posición 594 de HERC2 causa inestabilidad en la proteína. Células U2OS fueron transfectadas con Myc-HERC2 1-1295 *Wild-type* o Pro594Leu (P594L) y a las 48 horas los lisados se analizaron por *western blot*. La expresión de los plásmidos fue comprobada por el anticuerpo anti-Myc. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a Ran y se expresan como la media +/- SEM.

Una posible explicación para la inestabilidad de la proteína HERC2^{Pro594Leu} puede ser obtenida a partir de los datos estructurales obtenidos del banco de datos para proteínas. HERC2 es un miembro de la superfamilia RCC1, que presenta tres dominios similares a RCC1 (RLD1-3). La sustitución de aminoácido en la proteína mutante afecta a un aminoácido del dominio RLD1 de HERC2. Los dominios RLD presentan una estructura heptagonal formada por hojas beta asemejándose a una hélice de siete aspas, similar a RCC1 (Renault et al., 1999). Aunque no hay datos estructurales disponibles para el dominio RLD1 de HERC2, dada su alta similaridad con el dominio RLD3, es muy probable que presente la misma estructura. Teniendo en cuenta esta aproximación, realizamos la superposición de RCC1 y la estructura disponible para el dominio RLD3 de HERC2 y se extrapola la posición de la prolina⁵⁹⁴. La sustitución de la prolina por leucina se encuentra dentro de la cuarta aspa de la hélice y es probable que el cambio de un aminoácido tan conservado alterará el bucle entre la cuarta y la quinta aspa, cambiando la conformación de la proteína y haciéndola inestable (Figura R52).

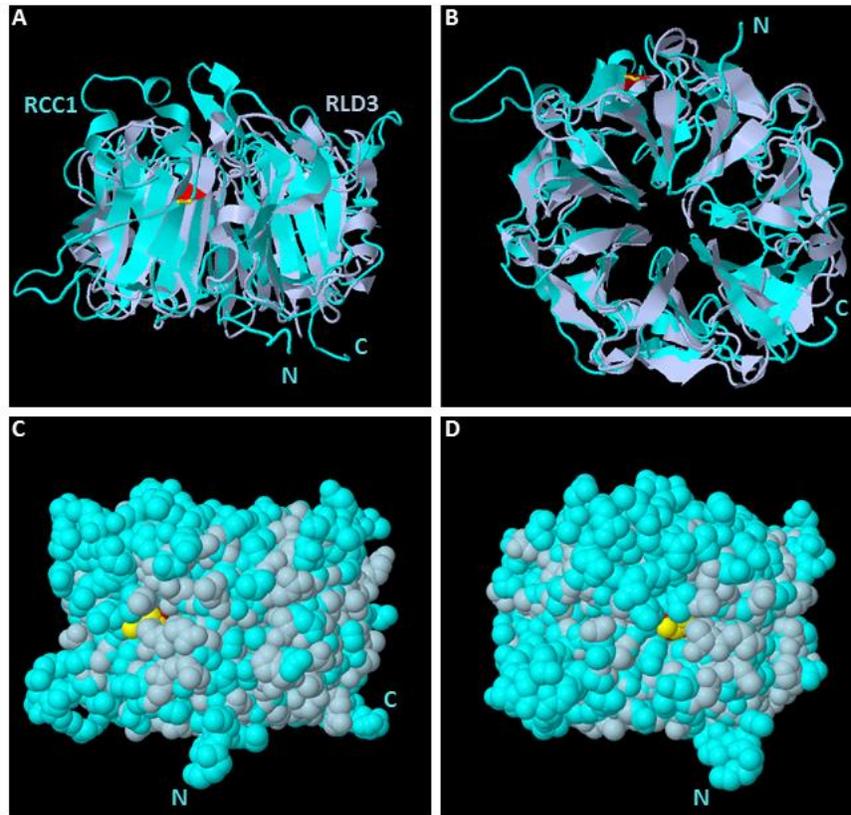


Figura R52. Estructura de RCC1 y superposición con el dominio RLD3 de HERC2. (A,C y D) Vista lateral de la superposición de RCC1 (azul cyan) y el dominio RLD3 de HERC2 (gris) para humanos. (B) Vista desde debajo de la hélice β . La posición equivalente a la prolina 594 de HERC2, es mostrada en amarillo en RCC1 y en rojo para RLD3. El extremo N-terminal y C-terminal para RCC1 son indicados. La figura fue generada y editada utilizando SuperPose y FirstGlance en programas Jmol. Número de entrada para el banco de datos de proteínas: 1A12 para RCC1 y 3KCI para RLD3 HERC2.

Para encontrar la posible relación entre la inestabilidad de HERC2 y la actividad de E6AP, se contactó con el grupo del Dr Martin Scheffner, debido a su gran experiencia en el estudio de E6AP y por haber descrito la interacción HERC2-E6AP (Kühnle et al., 2011). Este grupo es especialista en ensayos de ubiquitinación *in vitro* y ante la imposibilidad de realizar estos ensayos con los fibroblastos, se desarrollaron en células HEK-293 transfectadas con HERC2^{Wild-type} o HERC2^{Pro594Leu}. En este tipo de ensayos, observaron una ligera disminución de la actividad ubiquitina ligasa de E6AP sobre Ring1B, un sustrato de E6AP, cuando HERC2 Pro594Leu era expresado (Harlalka et al., 2013). También observaron que la vida media de la proteína HERC2 Pro594Leu era menor con respecto al control.

3.1.1 Regulación de la vía de señalización de p53 por la proteína HERC2^{Pro594Leu}

Teniendo en cuenta el papel regulador de HERC2 sobre la actividad transcripcional de p53 en líneas celulares, decidimos analizar que implicación podría tener la sustitución de la prolina por leucina en la posición 594 de HERC2 sobre la vía de señalización de p53. Este modelo resultaba bastante atractivo, al ser un modelo derivado de una patología humana. Así, analizamos los niveles de p53 y de p21 en fibroblastos con HERC2^{Wild-type} y HERC2^{Pro594Leu}. De manera interesante, observamos menores niveles de p21 en los fibroblastos afectados con respecto a los fibroblastos control. Los niveles de p53 eran similares en ambas situaciones (Figura R53).

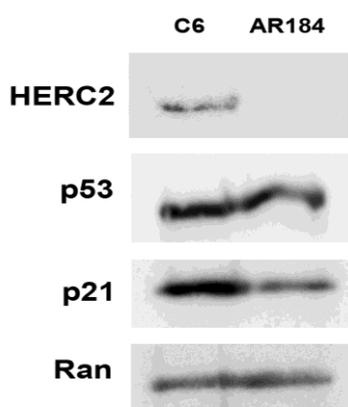


Figura R53. Fibroblastos con la mutación HERC2^{Pro594Leu} expresan niveles menores de p21. Lisados de fibroblastos con HERC2^{Wild-type} (C6) o HERC2^{Pro594Leu} (AR184) fueron analizados por *western blot* para HERC2, p53, p21 y Ran.

Aunque estos resultados sugerían que la actividad transcripcional de p53 estaría disminuida debido a los niveles bajos de HERC2, no podíamos descartar la posibilidad que los menores niveles de p21 observados en los fibroblastos con la mutación se debieran a la degradación mediada por el proteasoma. Por este motivo, repetimos estos experimentos en células tratadas con el inhibidor del proteasoma MG132 y analizamos los niveles de las distintas proteínas. Después del tratamiento con MG132, p53 y p21 se estabilizan, lo mismo ocurre con MDM2 que se usaba como control positivo. Sin embargo, los niveles de p21 en los fibroblastos con la mutación continuaban siendo menores con respecto a los observados en los fibroblastos control. La inhibición del proteasoma tampoco favorece que HERC2^{Pro594Leu} se detecte, en concordancia de que los niveles de la proteína HERC2 no se regulan por el proteasoma (Figura R54).

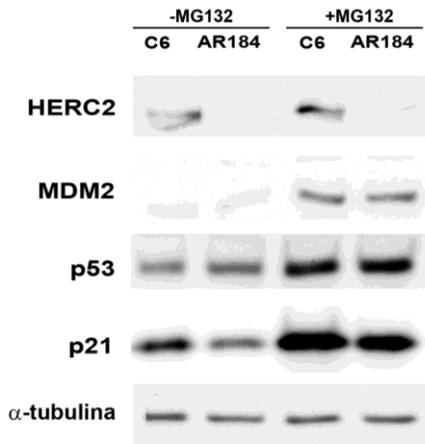


Figura R54. Efecto de la inhibición del proteasoma en fibroblastos con la mutación en HERC2. Fibroblastos con HERC2^{Wild-type} (C6) o HERC2^{Pro594Leu} (AR184) fueron tratados con MG132 e inmediatamente procesados para análisis por *western blot* de las proteínas indicadas.

A continuación analizamos si la activación de p53 por daño al DNA causado por la bleomicina era diferente en los fibroblastos control y con la mutación. Para ello, tratamos las células por 1 y 3 horas con bleomicina y los lisados se analizaron por *western blot*. En ambas situaciones, se observa fosforilación en la serina 15 de p53, así como un aumento de p53 por el tratamiento. Estos efectos se correlacionan con un aumento en los niveles de la proteína p21. Sin embargo, para los fibroblastos con HERC2^{Pro594Leu}, los niveles de p21 son menores. De manera interesante, la fosforilación de p53 y los niveles totales de p53 parecen ser mayores en los fibroblastos con HERC2 mutado a las 3 horas de tratamiento (Figura R55).

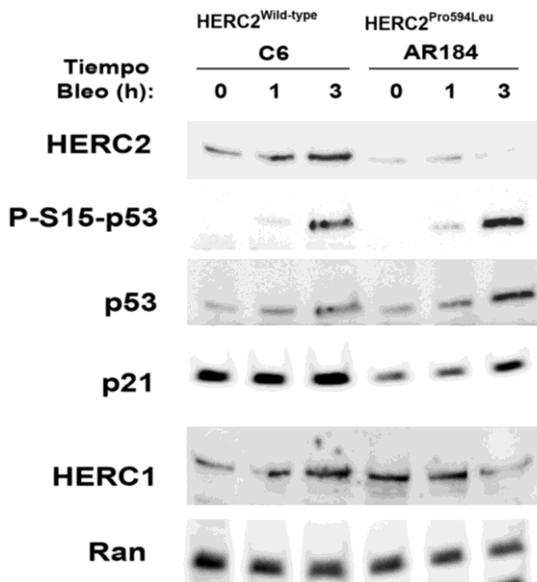


Figura R55. Respuesta al tratamiento con bleomicina en fibroblastos HERC2^{Wild-type} y HERC2^{Pro594Leu}. Fibroblastos con HERC2^{Wild-type} (C6) o HERC2^{Pro594Leu} (AR184) fueron tratados con bleomicina (Bleo) a los tiempos indicados y procesados para análisis por *western blot* de las proteínas indicadas.

3.2. Caracterización de los ratones *Herc2*⁵³⁰ : *Herc2* es un gen esencial

Para analizar la importancia fisiológica de HERC2, nos planteamos el estudio de ratones *knockout* de *Herc2*. El Instituto Sanger disponía de una línea de células madre embrionarias denominada AR0530 que presentaba la inserción de un *trap* o *cassette* dentro del gen de *Herc2*. Este *trap* corresponde al gen β -*geo* que codifica para la proteína β -galactosidasa. En colaboración con el instituto Pasteur, estas células fueron inyectadas en hembras pseudogestantes para la generación de las primeras quimeras y posteriormente de los animales heterocigotos. Esta línea de ratones la hemos denominado *Herc2*⁵³⁰. Esta línea puede considerarse un *knockout* total para *Herc2*, debido a que la inserción del *cassette* se localiza entre el segundo y el tercer exón, no llegándose a expresar ningún dominio de la proteína, además el primer exón no es codificante (Figura R56A y R56B). Este mutante produce una proteína teórica con los primeros 24 aminoácidos de la proteína HERC2 fusionada a la β -galactosidasa de aproximadamente 120 kDa (Figura R56B). En la figura R55, se puede observar la detección de los primeros animales heterocigotos (líneas 2, 3, 4, 5, 7 y 8) a partir del DNA genómico obtenido de la cola de los ratones. Para el genotipado de los animales se diseñaron diferentes oligos contra el alelo *wild-type* y el alelo mutante con β -*geo*, obteniendo los mejores resultados con la pareja 530KO01/530KO04 para el alelo *wild-type* y Gal7/Gal8 para el alelo mutado con el *cassette* o *trap* insertado (Figura R56C).

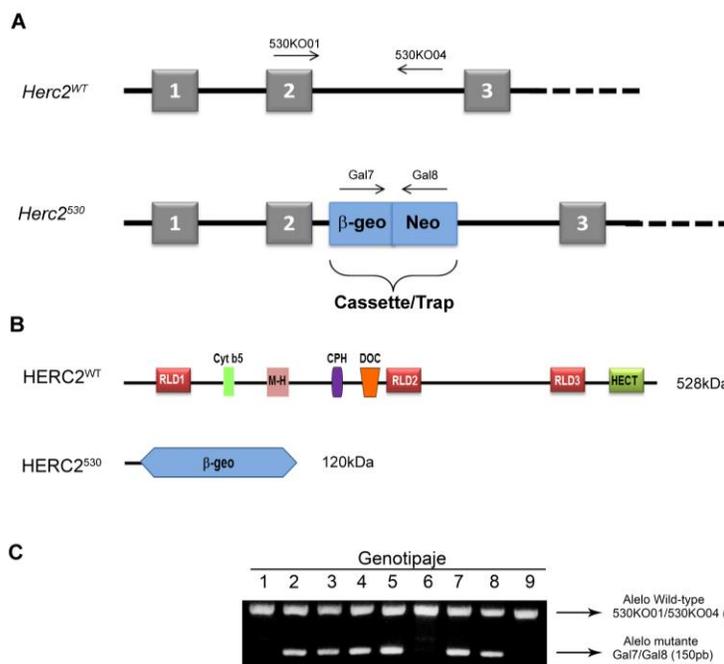


Figura R56. Generación de los ratones *Herc2*⁵³⁰. (A) Representación esquemática del alelo *wild-type* y del alelo con la inserción del *cassette* para generar la línea *Herc2*⁵³⁰. (B) La inserción del *cassette* origina una proteína sin ningún dominio funcional fusionada a la β -galactosidasa. (C) Por PCR es posible identificar el alelo *wild-type* con la pareja de oligos 530KO01/530KO04 y el alelo mutado con Gal7/Gal8.

Para comprobar que el *trap* estuviera insertado en el sitio esperado y que efectivamente se expresaba, diseñamos oligonucleótidos para realizar una RT-PCR y poder identificar el alelo *wild-type* y el alelo mutante con el *trap* incorporado en el cDNA (esquema en la figura R57A). Obtuvimos RNA de diferentes tejidos en los que se expresa *Herc2* y preparamos cDNA a partir de ellos. Los resultados de la RT-PCR se muestran en la figura R57B, en la que se observa la aparición de las dos bandas con los tamaños esperados para cada alelo: 200pb para el alelo *wild-type* y 230pb para el alelo con el *trap*. Además, para confirmar el punto de inserción del *trap*, se secuenció la PCR correspondiente. Observamos que el *trap* se expresa inmediatamente a continuación del final del exón 2 de *Herc2*, con lo que únicamente se llegan a expresar los primeros 24 aminoácidos de la proteína HERC2 (Figura R57C), con lo que esperamos que la proteína de fusión no sea funcional.

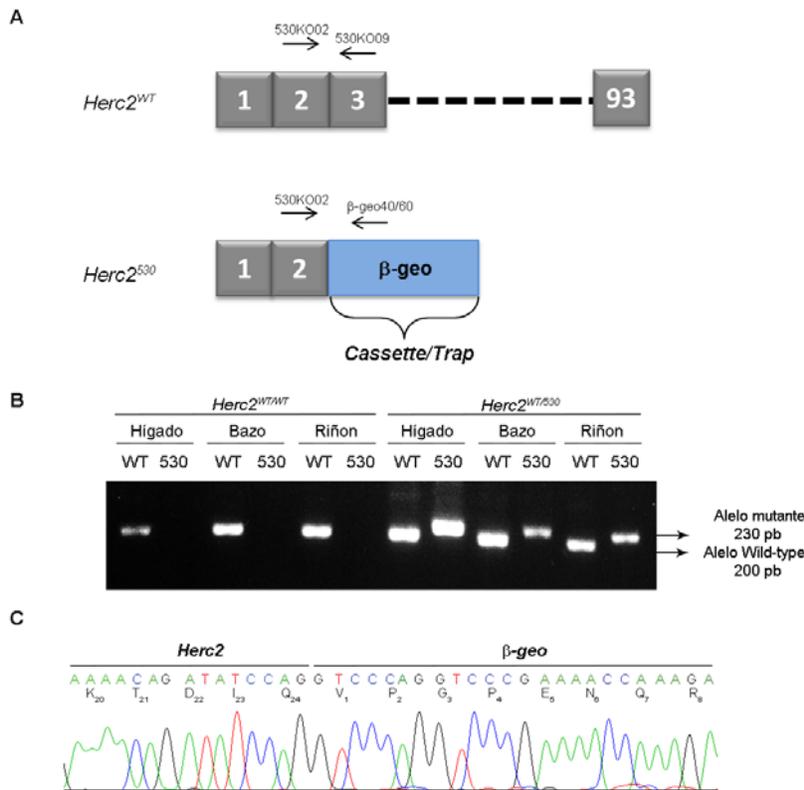


Figura R57. Comprobación de la inserción y expresión del trap en la línea de ratones *Herc2*⁵³⁰. (A). Representación del diseño de oligonucleótidos para identificar el alelo *wild-type* o con el *trap* dentro del cDNA. (B). RT-PCR de distintos tejidos en animales *Herc2*^{WT/WT} y *Herc2*^{WT/530}. (C). El *trap* se inserta después de la última base del exón 2 del gen *Herc2*. Se indican los últimos aminoácidos de *Herc2* y los primeros del *trap* β-geo.

Adicionalmente al genotipado, se comprobó la expresión de β-galactosidasa del *cassette* en los animales heterocigotos para *Herc2*⁵³⁰. Estos estudios fueron desarrollados en colaboración con los Dres Joan Durán y Josep Maria de Anta del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universidad de Barcelona. La expresión de la β-galactosidasa fue testada mediante ensayos de actividad β-galactosidasa usando X-Gal como sustrato en testículos, corazón, cerebro, riñón,

pulmón, músculo, bazo, hígado, páncreas e intestino. La mayor expresión fue detectada en testículos, corazón, cerebro y riñón, y niveles menores o nulos en los demás tejidos (Figura R58).

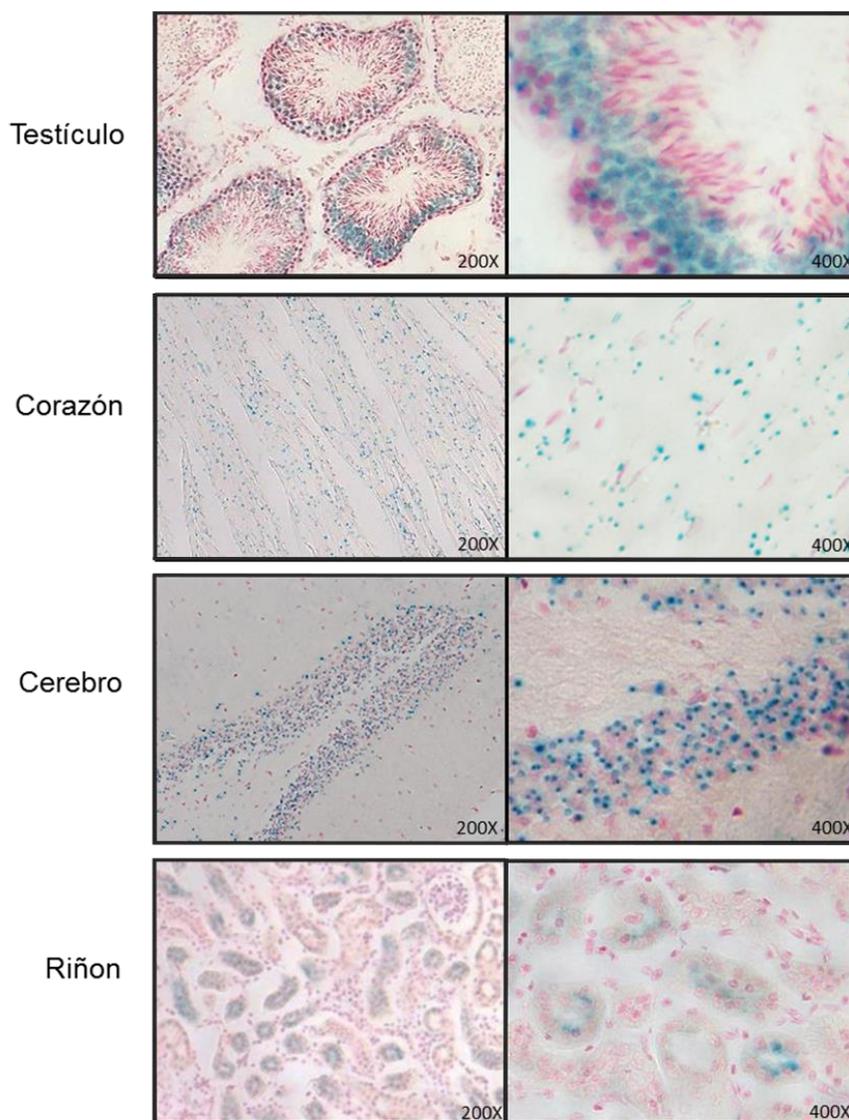


Figura R58. Actividad β-galactosidasa en tejidos de ratones heterocigotos *Herc2*⁵³⁰. La actividad β-galactosidasa fue analizada en testículo, corazón, cerebro y riñón de ratones de 8 semanas de edad utilizando X-gal como sustrato.

Para obtener ratones *knockout* para *Herc2*⁵³⁰ se realizaron diferentes cruces entre animales heterocigotos. Las progenies se genotiparon por PCR de DNA genómico. En una cohorte de 91 animales obtenidos, 34 (37.3%) fueron *wild-type* *Herc2*^{WT/WT} y 57 (62.4%) heterocigotos *Herc2*^{WT/530}. Aunque estos datos son consistentes con las ratios mendelianas (Tabla R1) para animales *wild-type*

sobre heterocigotos, ningún embrión *knockout Herc2^{530/530}* fue obtenido, sugiriendo que la expresión de *Herc2^{530/530}* está asociada con una letalidad embrionaria en ratones.

Tabla R1. Análisis de los genotipos obtenidos del cruce entre ratones *HERC2^{WT/530}*

Variable	Frecuencia esperada, % (n)	Frecuencia observada, % (n)
<i>Herc2^{WT/WT}</i>	25 (23/91)	37.3 (34/91)
<i>Herc2^{WT/530}</i>	50 (45/91)	62.4 (57/91)
<i>Herc2^{530/530}</i>	25 (23/91)	0/91

Para determinar la edad donde se producía la letalidad embrionaria en los ratones *Herc2^{530/530}*, se analizaron embriones de diferentes estadios de cruces procedentes entre animales *Herc2^{WT/530}*. Para ello, las placentas eran separadas de los embriones en caso de existir y se genotipaban. De 34 placentas analizadas, 14 (41%) estaban vacías. Todas las placentas tenían el genotipo *Herc2^{WT/530}* como era de esperar. En los embriones a diferentes edades embrionarias pudimos detectar animales *Herc2^{WT/WT}* y *Herc2^{WT/530}* pero no homocigotos *Herc2^{530/530}* (Tabla R2). Debido al tamaño tan pequeño de los embriones del día 7.5, no fue posible analizar con anterioridad a este día, ni realizar estudios histológicos en estos embriones que permitieran determinar la causa de la letalidad embrionaria temprana para los *Herc2^{530/530}*. Estos resultados indicaban que el gen *Herc2* es esencial en el desarrollo de los ratones.

Tabla R2. Análisis de la letalidad embrionaria de los ratones *Herc2^{530/530}*

Edad	Placentas observadas	Placentas con embrión	Placentas sin embrión	Genotipo de los embriones		
				<i>Herc2^{WT/WT}</i>	<i>Herc2^{WT/530}</i>	<i>Herc2^{530/530}</i>
10.5 dpc	8	5	3	2	3	0
8.5 dpc	11	8	3	1	7	0
7.5 dpc	15	7	8	4	3	0

Para determinar el patrón de expresión de *HERC2* durante el desarrollo se analizaron los niveles de proteína en muestras de cerebro de diferentes etapas de desarrollo cedidas por la Dra Soledad Alcántara del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universidad de Barcelona. Estas muestras habían sido obtenidas en el día de gestación E16 y a los días 0 (P0), 5

(P5) y 15 (P15) post-parto y de animal adulto (AD). Además de analizar los niveles de HERC2 en estas muestras se analizaron también los niveles de otros dos miembros de la familia de proteínas HERC: HERC1 y HERC3. Como se observa en la figura R59, los niveles de HERC2 disminuyen a medida que avanza el desarrollo del cerebro, siendo los niveles más bajos en cerebro de animales adultos. Este mismo patrón se observó para HERC1 y HERC3, sugiriendo la importancia de la familia de las proteínas HERC en etapas tempranas del desarrollo.

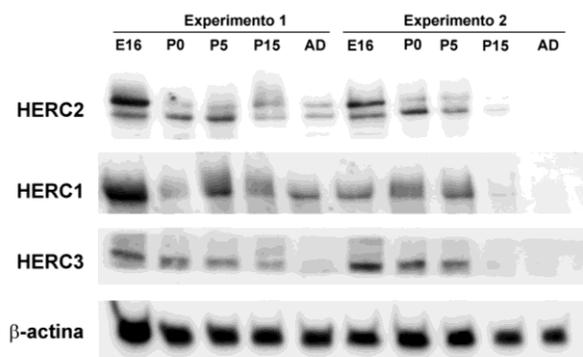


Figura R59. Expresión de las proteínas HERC durante el desarrollo. Muestras de cerebro de distintas etapas de desarrollo: E16 (día 16 de gestación), P0, P5 y P15 (día 0, 5 y 15 respectivamente post-parto) y animal adulto (8 semanas de vida) fueron analizadas por *western blot* para HERC2, HERC1 y HERC3. β -actina se utilizó como control de carga.

Animales *knockout* para las E3 ubiquitinas ligasas de p53 como MDM2 o MDMX también son letales en edad embrionaria (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995; Parant et al., 2001). Curiosamente, la pérdida de p53 en estos ratones rescata por completo la letalidad y pueden llegarse a desarrollar normalmente. Por esta razón, nos planteamos rescatar la letalidad de los animales homocigotos *Herc2*^{530/530} al cruzarlos con animales *knockout* para p53 (*p53*^{-/-}). Realizamos diferentes cruces entre animales dobles heterocigotos para obtener todos los genotipos posibles. En una cohorte de 93 animales, no se observó ningún animal homocigoto *Herc2*^{530/530} (Tabla R3), indicando que la letalidad causada por la expresión de un *Herc2* mutado no puede ser rescatada por la anulación de *p53*.

Tabla R3. Análisis del cruce entre animales *Herc2*^{WT/530}*p53*^{+/-}

Variable	<i>Herc2</i> ^{WT/WT}	<i>Herc2</i> ^{WT/530}	<i>Herc2</i> ^{530/530}	Total
<i>p53</i> ^{+/+}	3	21	0	24
<i>p53</i> ^{+/-}	10	49	0	59
<i>p53</i> ^{-/-}	2	8	0	10
Total	15	78	0	93

Los animales heterocigotos de *HERC2* presentan un desarrollo, comportamiento y esperanza de vida igual a los animales *wild-type*. Durante 80 semanas se han analizado la vida media para todos los posibles genotipos que podrían esperarse del cruce entre animales *Herc2^{WT/530}p53^{+/-}*. La esperanza de vida para los ratones con genotipo *p53^{-/-}* en promedio es de 27 semanas independiente de la presencia de uno o dos alelos *wild-type* para *Herc2* (Figura R60).

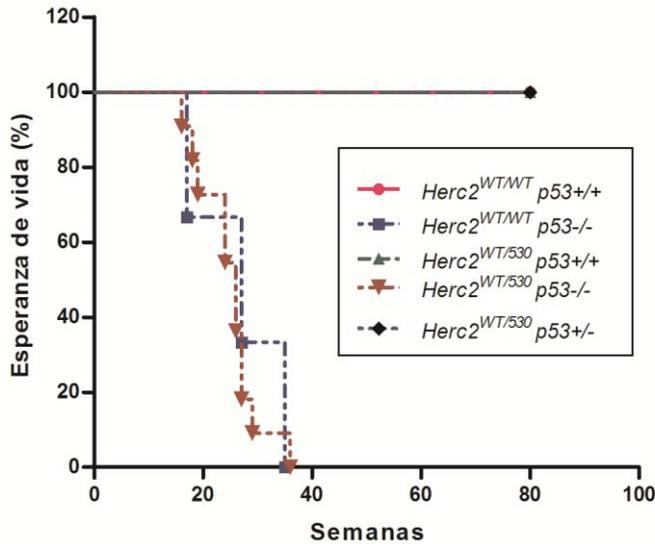


Figura R60. Análisis de la supervivencia de los ratones obtenidos de los cruces entre *Herc2^{WT/530}p53^{+/-}*. Durante 80 semanas se ha seguido la supervivencia para los diferentes grupos de animales con el genotipo indicado.

Actualmente, estamos realizando experimentos para evaluar la sensibilidad a la irradiación de los animales *Herc2^{WT/WT}* y *Herc2^{WT/530}* y determinar si la vía de p53 pudiera estar menos activa en los animales heterocigotos.