Estudio de las ubiquitín-proteasas que controlan la estabilidad de la proteína RAD51, importante para la reparación de ADN

Study of ubiquitin-proteins that control stability RAD51 protein, important for DNA repair

Facultad de Ciencias, Grado en Biología.
Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética.

Trabajo de fin de grado

Alejandro Brito Espinosa
Grado en Biología
Facultad de Ciencias, Universidad de La Laguna

Julio, 2016

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015/2016	**ENTRADA** Fecha: Núm:

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
78855857N	Alejandro Brito Espinosa
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
680565980	abritoespinosa@hotmail.es/alu0100775112@ull.edu.es

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Estudio de las ubiquitín-proteasas que controlan la estabilidad de la proteína RAD51, importante para la reparación de ADN

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Mariano Nicolás Hernández Ferrer	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética.	
y D./Dña. Veronique A.J. Smits	
Profesor/a del Departamento de Unidad Mixta de Investigación, HUC-ULL	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.:	Fdo.: Veronique A.J. Smits

La Laguna, a 04 de Julio de 2016

Firma del interesado/a

SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Índice

1. Resumen 4
2. Abstract 4
3. Introducción 5
3.1 Respuesta al daño en el ADN 5
3.2 RAD51 5
- *3.2.1 RAD51 en HR* 6
- *3.2.2 Regulación de RAD51* 8

3.3 Ubiquitinación 8
4. Objetivos 10
5. Parte experimental 11
5.1 Cultivo y preparación del material celular 11
5.2 Tratamientos del material celular 11
5.3 Conjunto de DUBs 11
5.4 Transfección del material celular 13
- *5.4.1 Transfección de plásmidos para sobreexpresión* 13
- *5.4.2 Transfección con ARN interferente* 14

5.5 Extracción celular completa 14
5.6 Determinación de la concentración de proteínas 15
5.7 Western blot 16
- *5.7.1 Electroforesis de proteínas* 16
- *5.7.2 Transferencia* 17
- *5.7.3 Inmunodetección* 18

6. Resultados y discusión 19
6.1 Visualización de RAD51 endógena 19
6.2 Rastreo de sobreexpresión para la búsqueda de una enzima deubiquitinasa de RAD51 20
- *6.2.1 Varios candidatos DUBs para la regulación de RAD51* 20

6.3 Verificación de candidatos DUBs 24
- *6.3.1 Sobreexpresión* 24

7. Conclusiones 26
8. Bibliografía 27

1. Resumen

El cuerpo humano recibe miles de lesiones en el ADN por día, dada la continua exposición a agentes físicos y químicos capaces de producir daños en el material genético. Estos daños pueden bloquear la replicación del genoma y la transcripción, y en caso de no repararse o hacerlo de manera errónea, pueden generar a mutaciones que amenazan la viabilidad celular. Afortunadamente, se han desarrollado mecanismos precisos para detectar y reparar este tipo de lesiones los cuales forman una red de señalización compleja denominada respuesta al daño del ADN (*DNA damage response,* DDR). Fallos en esta vía de respuesta a daño, se encuentran relacionados directamente con la carcinogénesis, pues ello promueve la acumulación de mutaciones que pueden desencadenar en cáncer. Para evitar que estos errores ocurran, es necesaria la actuación coordinada de muchas proteínas distintas. Una de estas proteínas es RAD51. RAD51 es importante en la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga. RAD51 está regulada por degradación por ubiquitin-proteosoma y fosforilación. Este proyecto ha consistido en estudiar el control de esta proteína por el proceso de (de)ubiquitinación buscando nuevas posibles enzimas deubiquitina (DUBs) que lo regulen. Para analizar este posible control se han elaborado un rastreo a partir de una librería de plásmidos de expresión de DUBs, examinando los niveles de la proteína RAD51 por "Western Blot". Hemos identificado varias DUBs candidatas de RAD51 que pueden ser importantes en controlar la proteína.
Palabras calve: RAD51, DUBs, sobreexpresión, ubiquitina.

2. Abstract

Organisms receive thousands of DNA lesions per day due to continued exposure to physical and chemical agents that can damage the genetic material. These lesions can interfere with genome replication and transcription, and if not or incorrectly repaired, this can lead to mutations that threaten cell or the organism viability. Fortunately, throughout evolution, organisms have developed specific mechanisms to detect and repair these DNA lesions. The combination of mechanisms of different signalling routes is called the DNA damage response (DDR). The DDR is directly related to carcinogenesis as it prevents the accumulation of mutations that potentially can lead to cancer and the coordinated action of many different proteins in this response is essential. A critical protein in DNA repair is RAD51. RAD51 plays a role in repair of double strand breaks by homologous recombination. Tight regulation of DNA repair is important for maintaining genome stability and RAD51 is indeed regulated by different mechanisms: phosphorylation and ubiquitin-mediated chromosomal degradation. In this project the control of RAD51 by (de)ubiquitination was studied, by analysing possible ubiquitin hydrolases/deubiquitinases (DUBs) that regulate the stability of this protein. Individual DUBs of a library containing the majority of human DUBs were overexpressed and RAD51 protein levels were analysed by Western blot. We have identified several candidate DUBs that may be important in the control of RAD51.
Keywords: RAD51, DUBs, overexpression, ubiquitin.

3. Introducción

3.1 Respuesta al daño en el ADN

Hoy en día, el material genético está continuamente expuesto a diferentes agresiones, de origen endógeno o exógeno, que provocan un gran número de lesiones en el ADN y que alteran diversos aspectos en la fisiología celular, lo cual puede desembocar en la transformación celular y el desarrollo de cáncer. Las lesiones endógenas provienen del propio metabolismo celular, siendo las más peligrosas las especies reactivas de oxígeno. Las fuentes exógenas son compuestos químicos o mutágenos físicos por ejemplo las radiaciones (p. ej. los rayos X, los rayos gamma (γ) o la luz ultravioleta) las cuales pueden generar directamente rupturas en una o en ambas cadenas del ADN Existen varios tipos de lesiones, en cuales las roturas de cadena sencilla ("Single Strand Lesion") y de doble cadena ("Double Strand Break", DSB) son los más conocidos.

El conjunto de vías de señalización que detecta el daño en el ADN y transmite esta información a toda la célula, promoviendo su reparación es conocidocomo la respuesta al daño en el ADN o DDR (*DNA Damage Response*) y se encuentra evolutivamente muy conservada, desde organismos unicelulares a mamíferos (Harper y Elledge, 2007; McGowan y Russell, 2004). Esta respuesta tiene varios funciones finales distintas, pero a la vez coordinadas: activar la parada del ciclo celular (o *checkpoints*) para impedir la propagación de la información genética alterada, y coordinar la reparación del ADN dañado. La aparición de errores en cualquiera de las vías de reparación podría desembocar en inestabilidad genómica, lo cual incrementaría la susceptibilidad a padecer cáncer, síndromes neurológicos o incluso inmunodeficiencias (Jasin y Rothstein, 2013).

Las células utilizan varios mecanismos para la reparación de alteraciones en el material genético y en uno de ellos interviene la enzima recombinasa RAD51, la cual ha sido objeto de numerosas investigaciones y foco principal de este trabajo.

3.2 RAD51

En los seres humanos, RAD51 es una proteína de 339 aminoácidos que juega un papel importante en la recombinación homóloga ("Homologous Recombination", HR) del ADN durante la reparación de una rotura de la doble cadena. Estos cortes son muy nocivos para la viabilidad celular y deficiencias en su reparación han sido asociadas a la carcinogénesis. Recombinación homóloga requiere una cromátida hermana como molde

para la reparación. RAD51 participa en la búsqueda de homología y en las etapas del proceso de emparejamiento de las cadenas formando un filamento de nucleoproteína.

La base estructural para la formación de filamentos Rad51 y su mecanismo funcional siguen siendo poco conocida. Sin embargo, estudios recientes con RAD51 con etiqueta fluorescente han indicado que los filamentos Rad51 se alargan a través de múltiples eventos de nucleación, seguido por el crecimiento, con la terminación total del fragmento cuando alcanza aproximadamente 2 micras de longitud (Hilario et al., 2009). Disociación de Rad51 de "double stranded DNA" (dsDNA), sin embargo, es lenta e incompleta, lo que sugiere que existe un mecanismo independiente que lleva a cabo esta.

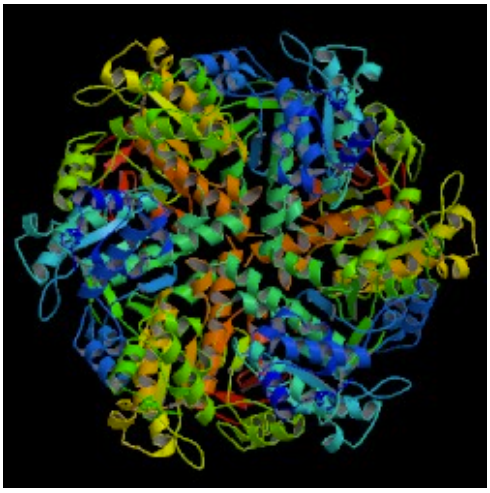

Figura 1. Estructura de la proteína RAD51 (Shinohara et al, 1992).

- *3.2.1 RAD51 en HR*

El mecanismo de recombinación homóloga funciona para la reparación de una rotura de doble cadena. Actúa en las fases S y G2, cuando hay dos cromátidas hermanas de manera que se utiliza la doble hebra homóloga como molde para la reparación. El proceso se inicia cuando el complejo Mre11-Rad50-NSB1 detecta el DSB. A continuación, se produce la degradación exonucleolítica del DSB a partir de sus extremos 5´ generando ssDNA con extremos 3´-OH libres, proceso que ocurre en dos etapas. Una primera conversión a ssDNA en la cual participa el complejo MRN mediante la exonucleasa Mre11 y la endonucleasa CtlP. Y un segundo procesamiento en el cual interviene la proteína EXO1 y un conjunto de proteínas formado por la nucleasa DNA2 y la helicasa BLM que desenrolla el DNA (Chan y Hickson, 2011). Una vez que se ha generado el ssDNA, se une el complejo RPA, el cual se une alrededor de los

extremos 3' generados para proteger el ssDNA contra la degradación de nucleasas y para evitar la formación de horquilla que pueda impedir el montaje de filamentos Rad51 (Holloman, 2011).

RPA se desplaza entonces por la recombinasa RAD51, generando un filamento de nucleoproteína que busca e invade ADN molde homólogo en las inmediaciones (por lo general una cromátida hermana). La segunda hebra de la cromátida hermana se desplaza y una estructura transitoria conocida como D bucle (desplazamiento) se forma. La carga de RAD51 a ssDNA y la formación del bucle D dependen de la acción concertada de otras proteínas, entre ellas RAD52, RAD54 y RAD51AP1. Después de la formación bucle D, el extremo 3' de la cadena invasora se utiliza como un cebador para la elongación de esta cadena, copiando la información genética a partir del ADN molde. Posteriormente, la ADN polimerasa δ replicativa extiende el lazo D mediante la síntesis de nuevo ADN, restaurando la hebra en el cromosoma homólogo que se desplaza durante la invasión de la hebra. Por último, helicasas de ADN como BLM y RTEL1 se han descrito para "resolver" los bucles D y dejar las dos cadenas de ADN separadas, completando así el proceso de HR (Krejci et al., 2012).

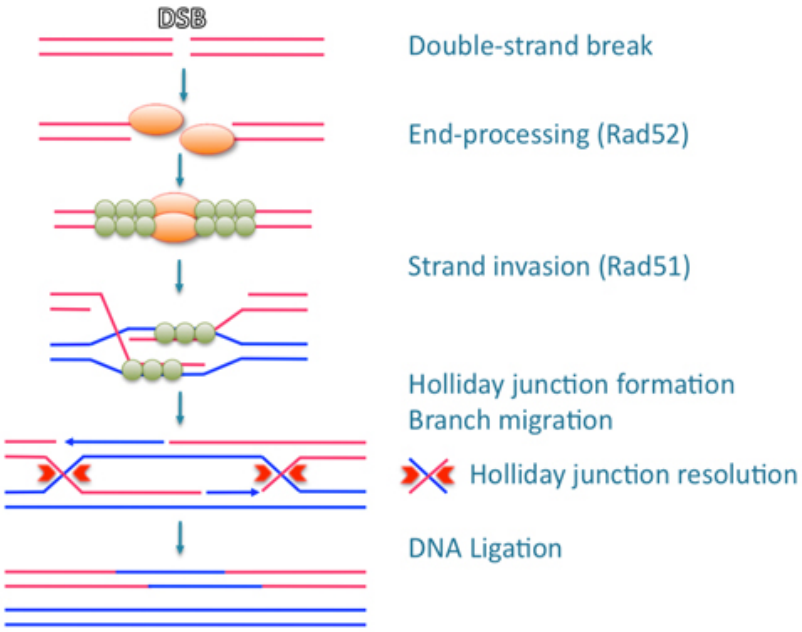

Figura 2. Reparación por recombinación homóloga.

- *3.2.2 Regulación de RAD51*

Al tratarse de un proceso altamente controlado y esencial para el correcto funcionamiento de la célula, se hace esencial que tanto RAD51 como las demás proteínas estén altamente reguladas. RAD51 en levadura se encuentra regulada por fosforilación por Mec1 (el ortólogo de ATM/ATR), influyendo en su actividad (Flott et al, 2011). También la proteína RAD51 está controlada por destrucción por el proteasoma, mediada por ubiquitina (Bennett y Knight, 2005).

3.3 Ubiquitinación

En el sistema de ubiquitinación, las proteínas son conjugadas covalentemente a un pequeño péptido de 8,6 kD denominado ubiquitina. Este proceso se lleva a cabo por una cascada enzimática de tres enzimas principales: una enzima activadora de la ubiquitina (E1), una enzima conjugadora de la ubiquitina (E2), y una ubiquitina ligasa (E3). La enzima E1, forma un enlace tioéster a través de un residuo de cisteína con el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina para transferirla de forma activada a la enzima E2 en una reacción dependiente de ATP. La enzima E2 interacciona con la E3, quien reconoce específicamente al sustrato de la proteína, para que luego se produzca la transferencia de la ubiquitina al sustrato y a la siguiente ubiquitina de la cadena en una reacción secuencial. Esta unión covalente al sustrato se produce por medio de una unión isopeptídica entre su glicina C-terminal y un residuo lisina del sustrato aceptor (Kimura et al., 2010).

La función que ejerce la ubiquitina es distinta dependiendo de las conformaciones de las cadenas de ubiquitina, pudiendo ser monoubiquitinacion, si la conjugación es de una única molécula de ubiquitina a una o varias lisinas, o poliubiquitinación si la propia ubiquitina se conjuga a otros residuos de lisina de la ubiquitina ya conjugada (Xu et al., 2009). Esta conjugación a otra ubiquitina se puede realizar en varios residuos de lisina. Así, las uniones a través de la lisina 48 señalizan a degradación vía proteasoma, mientras que otros tipos (unión de la segunda ubiquitina a través de lisinas 63 o 11) normalmente significan un cambio de función en la proteína modificada (Johnson et al., 1995).

La ubiquitinación es un proceso reversible. Las moléculas de ubiquitina pueden ser retiradas de las proteínas gracias a la acción de las llamadas hidrolasas de ubiquitina o enzimas deubiquitinas (DUBs) mediante la hidrólisis del enlace peptídico entre el

residuo glicina (Gly76) de la ubiquitina y el residuo lisina de la proteína ubiquitinada (Clague et al., 2012).

Se pueden distinguir cinco grupos de enzimas deubiquitinadoras DUBs: las UCHs (*Ubiquitin C-terminal hidrolases*) que hidrolizan la ubiquitina desde sustratos de tamaño pequeño, las USPs (*Ubiquitin-specific proteases*) capaces de hidrolizar diferentes tipos de uniones poliubiquitinas; las MJDs (*Machado-Joseph Disease*), involucradas en desórdenes neurodegenerativos y capaces de hidrolizar cadenas poliubiquitinas que están unidas a través de la lisina 63, las OTU (*Ovarian Tumor)* y los JAMM/MPN (Amerik y Hochstrasser, 2004).

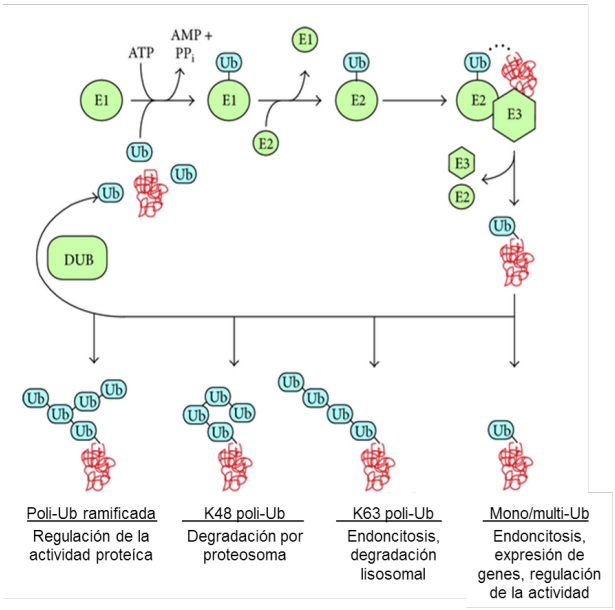

Figura 3. Enzimas implicadas y diferentes formas de ubiquitinación de proteínas. (Hamilton y Zito, 2013).

En este trabajo hemos profundizado en la regulación de RAD51 por ubiquitinación. Hemos llevado a cabo una búsqueda de nuevos reguladores de la proteina RAD51 a través de un rastreo sobreexpresando distintas enzimas deubiquitinasas.

4. Objetivos

La estricta regulación de la respuesta al daño del ADN es fundamental para mantener la estabilidad del genoma. Concretamente, muchas de las proteínas clave que actúan en la respuesta al daño del ADN están reguladas por la conjugación de ubiquitina y su degradación por la proteasoma. Un proceso menos estudiado en la DDR es la deubiquitinación, que consiste en la eliminación de péptidos de ubiquitina unidos a la proteína diana. La acción de las hidrolasas de ubiquitina que llevan a cabo esta reacción resulta, por tanto, en un aumento de los niveles de dicha proteína (evitando su degradación por el proteasoma).

En esta propuesta se pretende identificar hidrolasas de ubiquitina que controlen la estabilidad de RAD51, ya que no se conoce ninguna que actúen en condiciones basales. Este proyecto se realizará por un rastreo genético en células humanas, usando una librería de plásmidos de las distintas DUBs (78 distintas), y se procederá al análisis de los niveles de RAD51 en células transfectadas con las distintas DUBs por la técnica de “Western blot”.

5. Parte experimental

5.1 Cultivo y preparación del material celular

Se utilizó la línea celular 293T, se trata de células humanas de riñón cancerígenas. Éstas se cultivaron en placas con medio DMEM (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino y L-glutamina (200 mM) para el enriquecimiento de nutrientes y penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) como antibióticos para prevenir contaminaciones bacterianas, en unas condiciones de 37ºC en la estufa.

Para llevar a cabo la división de células, en primer lugar lo que se realizó fue eliminar el medio de la placa de cultivo, posteriormente se lavó con PBS dos veces, añadir luego 1 ml de tripsina-EDTA e incubar durante 5 min a 37ºC con el fin de que las células se despeguen de la base de la placa. Una vez pasado este tiempo se sembró la cantidad de células pertinentes para cada uno de los experimentos.

5.2 Tratamientos del material celular

En este caso se sometieron a las células a dos tipos de tratamiento para ver cambios en la expresión de la proteína RAD51: irradiación con luz ultravioleta (UV) y tratamiento con Ciclohexamida (CHX).

- *Irradiación con luz ultravioleta (UV 40J/m2):*

En primer lugar fue necesario preparar las células, por lo que se retiró el medio de la placa y se lavó con PBS, luego se añadió 0,5 ml de PBS para permitir que la irradiación llegue a todo el cultivo celular.

Una vez aplicado el daño, se adicionó 3 ml de medio a la placa, para su posterior incubación el tiempo necesario para cada prueba.

- *Ciclohexamida(30µg/ml):*

Este tratamiento fue usado con el objetivo de inhibir la síntesis de proteínas, las células fueron tratadas durante dos horas.

5.3 Conjunto de DUBs

Se dispuso de una librería de 81 hidrolasas de ubiquitina humanas disponibles en el laboratorio.

LAB	LITER	TAG	LAB	LITER	TAG
DU1	ATXN3	FLAG/MYC?	DU51	USP12	FLAG-HA
DU2	BAP1	FLAG-HA	DU52	USP13	FLAG-HA
DU4	CEZANNE	HA o GFP	DU53	USP14	FLAG

DU5	COPS5	FLAG-HA	DU54	USP15	FLAG-HA
DU7	CXORF53	FLAG-HA	DU55	USP16	FLAG-HA
DU9	DUB3	FLAG-HA	DU56	USP18	FLAG-Ct
DU10	DUBA1	FLAG-HA	DU57	USP19	FLAG
DU11	DUBA3	FLAG-HA	DU58	USP2	FLAG-HA
DU12	EIF3S3	FLAG-HA	DU59	USP20	FLAG-HA
DU13	EIF3S5	FLAG-HA	DU60	USP21	FLAG-HA
DU14	HDAC6	FLAG	DU61	USP22	FLAG
DU16	JOSD1	FLAG-HA	DU62	USP24	FLAG
DU17	JOSD2	FLAG-HA	DU63	USP25	MYC
DU18	JOSD3	FLAG-HA	DU64	USP26	FLAG-HA
DU20	MYSM1	FLAG	DU66	USP28	FLAG
DU21	OTUB1	FLAG-HA	DU67	USP29	FLAG-HA
DU22	OTUB2	FLAG-HA	DU68	USP3	FLAG-HA
DU23	OTUD1	FLAG-HA	DU69	USP30	FLAG
DU25	OTUD4	FLAG-HA	DU72	USP33	FLAG-HA
DU28	OTUD6B	FLAG-HA	DU75	USP36	FLAG-HA
DU30	PARP11	FLAG-HA	DU76	USP37	FLAG-HA
DU32	PSMD14	FLAG-HA	DU77	USP38	FLAG-HA
DU34	SENP1	FLAG-HA	DU78	USP39	FLAG-HA
DU35	SENP2	FLAG/GFP	DU82	USP42	FLAG-HA
DU37	SENP5	3xFLAG	DU83	USP43	FLAG-HA
DU38	SENP6	GFP	DU84	USP44	FLAG-HA
DU39	SENP7	GFP	DU85	USP45	FLAG-HA
DU40	SENP8	FLAG-HA	DU86	USP46	FLAG-HA
DU41	STAMBP	FLAG	DU87	USP47	FLAG
DU42	STAMBPL1	FLAG	DU88	USP48	FLAG-HA
DU43	TNFAIP3	FLAG-HA	DU89	USP49	FLAG-HA
DU44	TRABID	HA	DU90	USP5	FLAG-HA
DU45	UCHL1	FLAG	DU91	USP50	FLAG-HA
DU46	UCHL3	FLAG	DU93	USP52	FLAG-HA
DU47	UCHL5	FLAG	DU94	USP53	FLAG-HA
DU48	USP1	¿FLAG?	DU98	USP7	FLAG

DU49	USP10	FLAG	DU99	USP8	FLAG
DU50	USP11	FLAG	DU100	USP9X	HA

Tabla 1. Lista de la librería de DUBs

5.4 Transfección del material celular

A este respecto, se siguieron dos vías diferentes para sobreexpresar o bien downregular la proteína, según fuera el objetivo del experimento. Tanto para un caso como el otro hay que seguir esta serie de pasos:

- *5.4.1 Transfección de plásmidos para sobreexpresión*

En este caso, la transfección se realizó mediante fosfato cálcico para lograr el obajetivo en las diferentes DUBS en las células 293T. Gracias a esta técnica, se forma un precipitado que se une a la superficie de las células, por tanto el ADN plasmídico se introduce en la capa del cultivo.

Se debe tener en cuenta, que previamente, con un día de antelación, hay que acondicionar el cultivo, de tal forma que las células se encuentren en un punto óptimo de crecimiento en el momento de la transfección. (25-40% de confluencia). Usamos 293T crecidas en placas de 6 cm.

La técnica consiste en preparar una mezcla de 5 μg de plásmido, 225 μl de agua bidestilada y 25 μl de $CaCl_2$ 2,5 M, a la cual se añadió 250 μl de tampón HBS 2X. Se tomaran 333 μl de esta mezcla y se sembró en cada una de las placas de 6 cm, siendo necesario remover bien el medio para lograr un reparto uniforme en toda placa para que el crecimiento de células sea semejante en toda la superficie.

Éstas placas se incubaran durante 16 horas a 37ºC en la estufa; a posteriori, se efectúan dos lavados con PBS estéril para después adicionar medio de cultivo fresco.

Finalmente, pasadas 24 horas del lavado del precipitado, se procede a la recolección de los extractos siguiendo el protocolo que haya sido marcado para cada experimento.

Tampón HBS 2X pH 7,02
280 mM NaCl
1,5 mM Na_2HPO_4
12 mM Glucosa
10 mM KCl
50 mM Hepes

Tabla 2. Tampón HBS 2X

- *5.4.2 Transfección con ARN interferente*

Se llevó a cabo el silenciamiento génico, "downregulación", a partir de la transfección de oligos interferentes (siRNA). Antes de la transfección es necesario preparar las placas (6 cm) necesarias cambiando el medio antiguo por 2 ml de medio DNEM fresco.

Una vez hecho esto, en un tubo eppendorf estéril se mezclaron 5 µl de Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) con 250 µl de Opti-MEM y en otro tubo estéril, se mezclaron 5 µl de siRNA oligo (20 µM) con 250 µl de medio Opti-MEM (Life Technologies). Se mezclaron ambas soluciones, y tras incubar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente se añadieron los 500 µl de la mezcla a cada placa.

Por último, se recogieron los extractos celulares pasadas 48 horas de la transfección. No fue necesario hacer lavados intermedios. Secuencias de los oligos de siRNA (Thermo Fisher):

Luc CGUACGCGGAAUACUUCGA

RAD51 CCAGAUCUGUCAUACGCUA

5.5 Extracción celular completa

Para la obtención de los extractos celulares, se eliminó el medio de la placa para luego lavar éstas dos veces con PBS (1 ml aproximadamente) para una placa de 6 cm. A posteriori se añadió entre 80 y 150 µl de tampón de lisis desnaturalizante (dependiendo de la cantidad de células en cada placa) y se cepilló con un peine, depositando la muestra obtenida en un tubo Eppendorf. El tampón de lisis desnaturalizante usado fue el UREA/SDS.

Finalmente, se sonicó cada extracto durante 15-20 segundos a una amplitud de 60-80% con un sonicador ultrasonido UP50H.

Tampón de lisis desnaturalizante 1X (Urea/SDS)
1 M Tris-HCl pH 8
10 % SDS
7 M Urea
5 M NaCl

Tabla 3. Tampón de lisis desnaturalizante UREA/SDS.

5.6 Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el método colorimétrico de BSA (albúmina de suero bovino). Este método, altamente sensible, permite medir la cantidad de proteína en un medio alcalino, gracias a la conversión debida a la presencia de enlaces peptídicos de las proteínas de Cu^{2+} en iones Cu^{+}. Estos iones Cu^{+} se unen a moléculas de BSA y al hacerlo, les cambian la estructura electrónica de tal manera que ahora absorbe luz a 564 nm y aparecen de color purpura. Por tanto, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente.

Se realizó una curva de calibrado tal y como se muestra en la tabla 6 utilizando concentraciones conocidas de BSA (Albúmina de suero bovina), agua y buffer. La cantidad de albúmina aumenta según avanzamos en la curva mientras que la de agua desciende. Cada columna de la tabla corresponde con cada pocillo que se cargó en una placa plana de 96 pocillos para colorimetría.

Además de la curva patrón, en esta misma placa se cargaron las muestras, añadiendo 3 µl de muestra y 32 µl de agua.

A cada pocillo se añadió al final 150 µl de reactivo formado por una mezcla de BCA (Novagen) y sulfato de cobre (Sigma, 4%) en proporción 50:1.

La placa se incubó a 37ºC durante 20 minutos para luego ser leída por un espectrofotómetro automático usando un filtro a 540 nm (Labsystems). Los datos obtenidos se procesaron en un archivo Excel donde el valor de la absorbancia obtenido en cada pocillo se transformó a valores de concentración de proteínas.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
BSA (µl)	0	2	4	8	16	32
Agua (µl)	32	30	28	24	16	0
Urea/SDS (µl)	3	3	3	3	3	3

Tabla 4. Recta de calibrado para la determinación de proteínas.

5.7 Western blot

Una vez conocida la cantidad de proteína en cada extracto, se llevó a cabo la preparación de las muestras para "Western blot".

Para ello se añadió la misma cantidad de proteína (20-40 µg dependiendo del experimento) calculada en su Eppendorf correspondiente junto con la cantidad de tampón de carga necesaria (7 µl aproximadamente) y en caso de que la cantidad de microlitros de extracto entre cada uno de las muestras fuera muy heterogéneo, se añadió buffer de lisis para compensar las diferencias de volumen. A continuación, se calentaron las muestras en el bloque durante 5 minutos a 95ºC y se centrifugaron durante medio minuto.

- *5.7.1 Electroforesis de proteínas*

El proceso de electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) compuestos por dos fases, una superior o de concentración (stacking) y una inferior que permite la separación de las proteínas en función de su tamaño.

Se utilizó el sistema mini-protean 3 (BioRad) con gel separador preparado con porcentajes de acrilamida de 10% (Tabla 5), pues a estos porcentaje es idóneo visualización de RAD51 endógena. En todos los casos se cargó en el gel como referencia un marcador de peso molecular preteñido que comprende un rango de 7 a 175 kDa (New England Biolabs).

Gel compactador (stacking)	Gel separador
5% Acrilamida:bisacrilamida (29:1) 125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1% SDS	10% Acrilamida:bisacrilamida (29:1) 375 mM Tris-HCl pH 8,8 0,1% SDS

Tabla 5. Buffer utilizado para los geles de electroforesis

La electroforesis se realizó a 120 V durante los primeros 15 minutos y a 160 V durante el tiempo necesario hasta que nuestra proteína migre lo suficiente.

Tampón de Carga Desnaturalizante	Tampón de Electroforesis
1X Stacking buffer 20% Glicerol 2% SDS 5% β-mercaptoetanol 25 µg/ml de Azul de Bromofenol	25 mM Tris-HCl 192 mM Glicina 0,1 % SDS

Tabla 6. Buffer de carga y buffer de electroforesis

- *5.7.2 Transferencia*

Tras la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana nitrocelulosa (GE Healthcare), usando el sistema de transferencia Miniprotean 3 (BioRad).

En el montaje consistió en una esponja, varios papeles de filtro, gel, membrana, más papeles de filtro y otra esponja, todo ello empaquetado en módulos que mantienen los elementos apretados y embebidos en tampón de transferencia (Tabla 7). El proceso de transferencia se realizó durante 60 minutos a una intensidad constante de 300 mA. Una vez terminada la transferencia, la membrana fue bloqueada con una solución de leche desnatada al 5% en TBS + 0,1% Tween (TBS-T) durante una hora.

Tampón de Transferencia	Tampón TBS-T
25 mM Tris-HCl 192 mM Glicina 20 % Etanol	25 mM Tris-HCl pH 7.4 5 mM KCl 137 mM NaCl 0,1% Tween 20

Tabla 7. Buffer de transferencia y buffer TBS-T.

- *5.7.3 Inmunodetección*

Para la inmunodetección, se incubó con el anticuerpo primario diluido en leche desnatada al 5% en TBS-T (solución de bloqueo) durante toda la noche a 4ºC en agitación orbital suave. Al día siguiente, se lavó la membrana con el anticuerpo primario en TBS-T 3 veces cada 10 minutos, para luego incubar con el anticuerpo secundario (unido a HRP, Jackson Immunoresearch), durante 1 hora a temperatura ambiente, diluido 1:10000 en TBS-T en agitación.

Por último, se lavó la membrana con el anticuerpo secundario, realizando 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se reveló por incubación con 2 ml de luminol/H_2O_2 por membrana. Se usó revelador normal de GenScript durante 5 minutos.

La detección se realizó con un equipo de quimioluminiscencia LAS4000 mini (GE Healthcare). Los anticuerpos y diluciones que se utilizaron fueron los siguientes:

Anticuerpo	Peso molecular	Especie	Dilución	Fabricante
RAD51	37 kDa	Conejo	1:1000	Generado en el laboratorio
Ku86	86 kDa	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 8. Relación de anticuerpos utilizados para inmunodetección

6. Resultados y discusión

6.1 Visualización de RAD51 endógena

Con el fin de encontrar nuevos reguladores de RAD51 entre las hidrolasas de ubiquitina, decidimos realizar una detección sistemática mediante vectores de expresión de cada una de las DUBs humanas. La sobreexpresión de una DUB candidata que controle la estabilidad de RAD51, conduciría a una estabilización de dicha proteína. Con el fin de determinar el efecto fisiológico de las diferentes hidrolasas de ubiquitina en RAD51, fue importante visualizar RAD51 endógena.

En primer lugar, debemos asegurar la mejor realización del rastreo de las diferentes DUBs y la reproducibilidad de los resultados. Por eso optimizamos las condiciones del rastreo genético para RAD51, sobre todo condiciones del análisis por Western blot. Fue elegida la línea celular HEK 293T ya que presenta una alta eficiencia de transfección usando fosfato cálcico, un método sencillo y de bajo coste.

Utilizamos extractos totales para el Western blot de RAD51. Se eligió este protocolo en concreto, porque se obtenía una cantidad de muestra aceptable, lo que evitaba tener que recurrir a otras soluciones como hubiera sido aumentar el número de transfecciones, aumentando el número de células en el rastreo por consiguiente, lo cual no es ideal. Para identificar la banda que representa RAD51, utilizamos extractos de células transfectadas con siRNA oligos de Luciferasa como control y RAD51 para inhibir la expresión de la proteína. En las muestras recogidas por extractos totales, observamos una banda que se mueve en la electroforesis con el peso molecular esperado (Figura 1). Además, está banda está menos intensa en la muestra de RAD51 downregulada, confirmando que está banda es RAD51 (Figura 1). El resultado obtenido fue, que el buffer UREA/SDS funciona muy bien para la idónea observación de la proteína RAD51 endógena, por lo que decidimos que a la hora de la recolección de muestras se usaría este buffer.

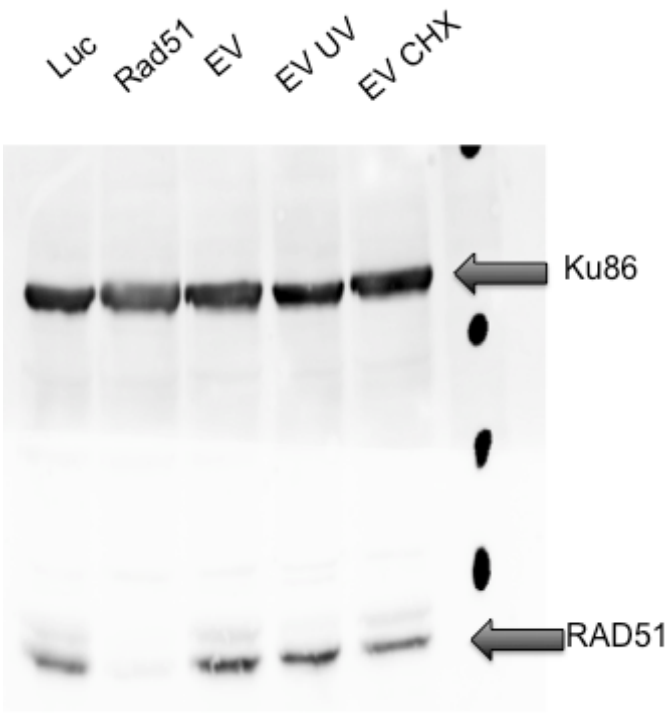

Figura 4. Western blot para RAD51 utilizando el método de extractos totales. Ku86 funciona como control de carga. En el panel se muestra el resultado de la downregulación de RAD51 (banda menos intensa).

6.2 Rastreo de sobreexpresión para la búsqueda de una enzima deubiquitinasa de RAD51

- *6.2.1 Varios candidatos DUBs para la regulación de RAD51*

Queríamos realizar el rastreo para encontrar posibles DUB(s) que regulen la estabilidad de RAD51. Este rastreo implicaría la transfección individual de cada DUB en células 293T, lisis de las células y analizar el efecto en los niveles de proteína RAD51 por Western blot. Dicho rastreo se ha realizado en el laboratorio para otras proteínas antes. Teniendo en cuenta el tiempo y los gastos de cada rastreo, decidimos usar los extractos de un rastreo anterior, presente en el laboratorio. En este rastreo, las células tratados con una combinación de luz ultravioleta y cicloheximida. La sobreexpresión de una DUB candidata que pudiera regular RAD51, resultaría en niveles de proteína RAD51 más altos. Sin embargo, el aumento de los niveles endógenos de la proteína en estas condiciones, no siempre son muy grandes. Por lo tanto, reducir los niveles de RAD51 mediante la inhibición de la síntesis de proteínas por el tratamiento de las células por cicloheximida (CHX) podía ser la manera de ver cambios más grandes después de la sobreexpresión de una DUB candidata. No hay indicaciones en la literatura que la luz UV pueda cambiar los niveles de la proteína RAD51. Por lo tanto,

consideramos estos extractos adecuados para la detección de nuevos reguladores de la estabilidad RAD51.

En cada gel se cargó extractos de células transfectadas con un vector vació (EV) como control negativo y 6-7 muestras de las DUBs transfectadas, cargando la muestra sin tratar contigua a la tratada para poder comparar los niveles. Como los niveles RAD51 variaron un poco entre los experimentos, el efecto de la sobreexpresión de cada DUB se comparó con el control de vector vacío en cada experimento. En algunos casos, cuando el posible efecto de la estabilidad RAD51 no estaba claro, se repitió la transfección de un vector de expresión DUB.

En las figuras 5, 6, 7 y 8 se muestran e los geles del rastreo con las DUBs de la librería que se ha utilizado. En los primeros geles también cargamos los extractos de las celular downreguladas por Luciferasa o RAD51 como control. Aunque la sobreexpresión de la mayoría de las DUBs no dio lugar a mayores cambios en los niveles de RAD51, la expresión de algunas de ellas dio lugar a niveles de la proteína algo más altos. Con un asterisco rojo se han marcado las deubiquitinas que hemos considerado posibles candidatas, en modificar los niveles de la proteína RAD51. Tras terminar el rastreo con todas las DUBs se obtuvo un total de 15 ubiquitin hidrolasas que podrían ser candidatas para modificar los niveles de RAD51.

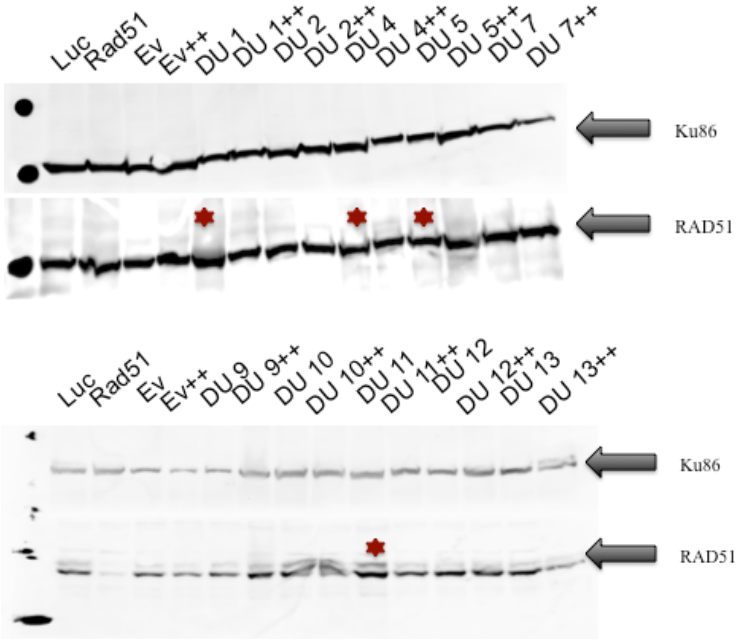

Figura 5. Sobreexpresión de DUBs en 293T. Transfección de DUBs y vector vacío (EV) en 293T. Las células fueron recogidos sin tratamiento o tratadas con UV y CHX durante 2 horas (++). Se muestran Western blots contra RAD51 y KU86 como control de carga.

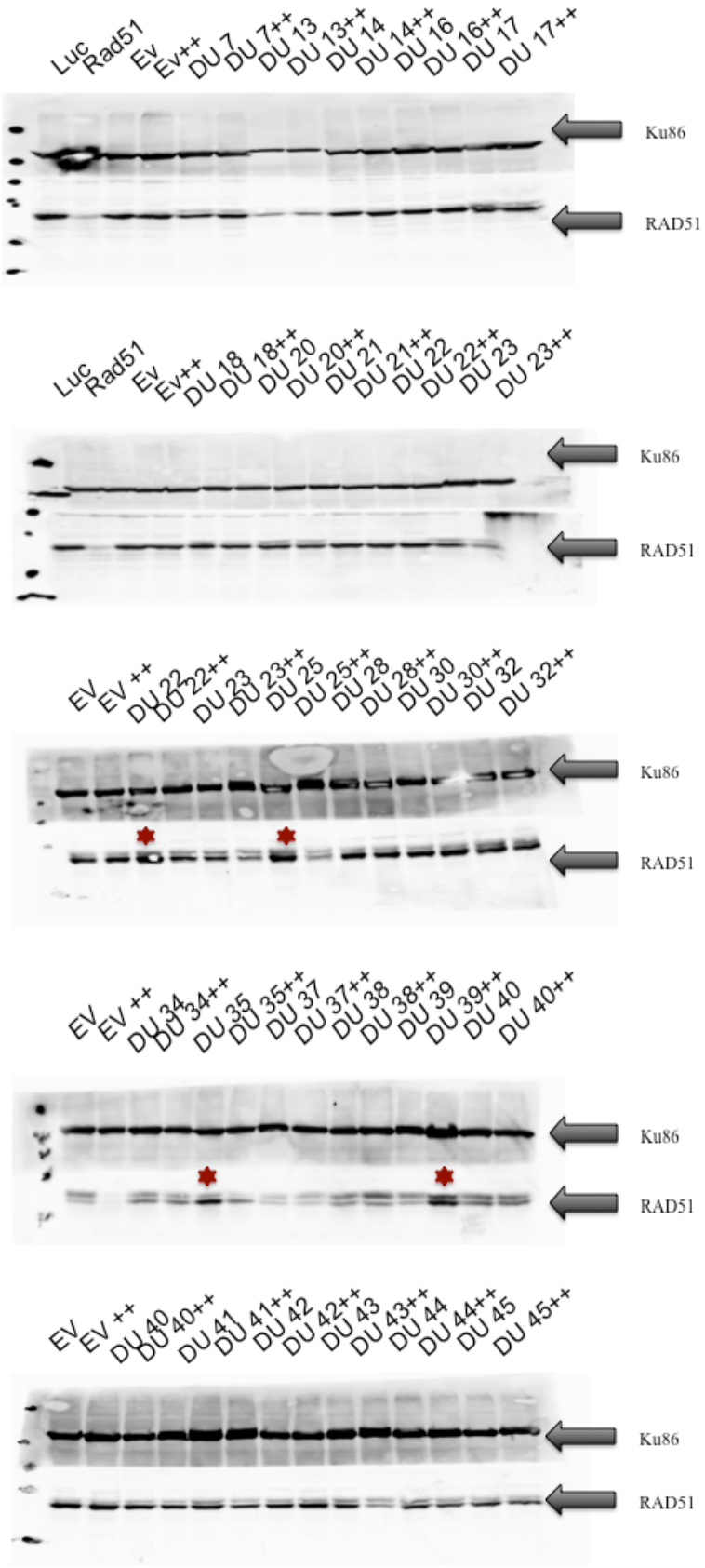

Figura 6. Sobreexpresión de DUBs en 293T. Transfección de DUBs y vector vacío (EV) en 293T. Las células fueron recogidos sin tratamiento o tratadas con UV y CHX

durante 2 horas (++). Se muestran Western blots contra RAD51 y KU86 como control de carga.

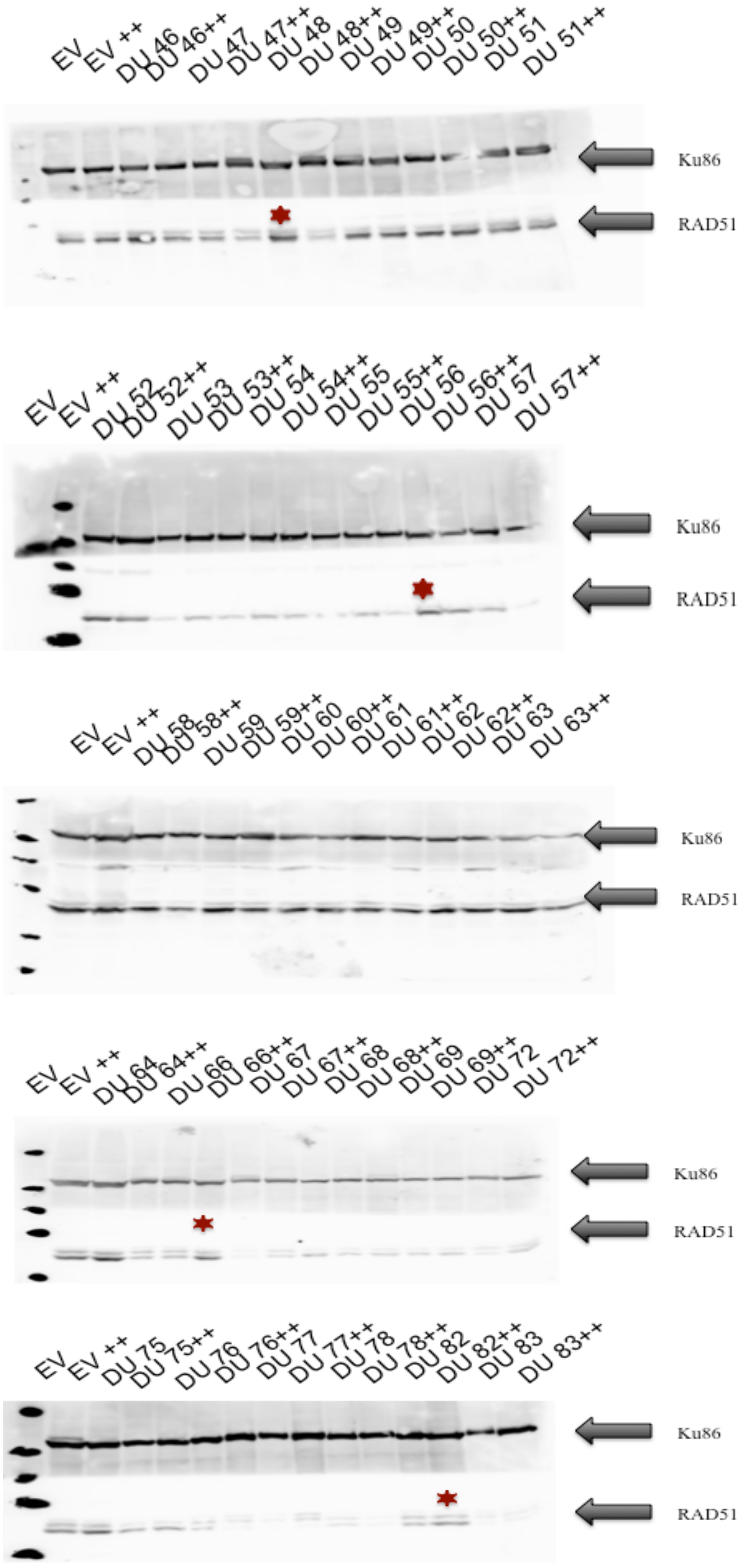

Figura 7. Sobreexpresión de DUBs en 293T. Transfección de DUBs y vector vacío (EV) en 293T. Las células fueron recogidos sin tratamiento o tratadas con UV y CHX durante 2 horas (++). Se muestran Western blots contra RAD51 y KU86 como control de carga.

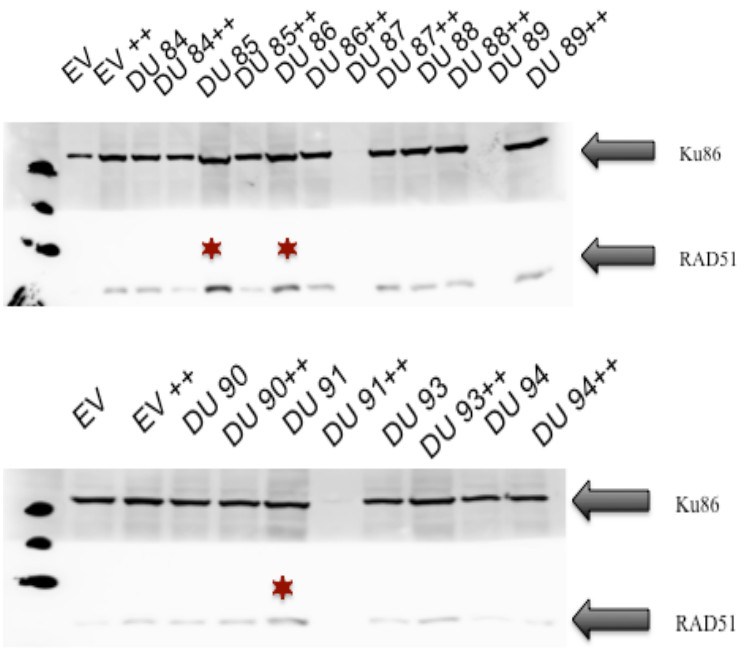

Figura 8. Sobreexpresión de DUBs en 293T. Transfección de DUBs y vector vacío (EV) en 293T. Las células fueron recogidos sin tratamiento o tratadas con UV y CHX durante 2 horas (++). Se muestran Western blots contra RAD51 y KU86 como control de carga.

6.3 Verificación de candidatos DUBs

- *6.3.1 Sobreexpresión*

Nos dispusimos a validar los positivos repitiendo la transfección sólo con aquellas DUBs que inicialmente habían dado un resultado positivo (DU1, DU4, DU5, DU11, DU22, DU25, DU35, DU39, DU48, DU56, DU66, DU82, DU85, DU86, DU91). En este caso, las células no fueron tratadas con UV/CHX.

Al repetir estos positivos para RAD51, observamos que algunas de las candidatas del rastreo inicial, concretamente 4 DUBs, fueron positivas también en este segundo paso (Figura 8), pues la banda correspondiente a la sobreexpresión de estas deubiquitinas parecía ligeramente más intensa comparándola con las otras.

Finalmente, los mejores candidatos por los resultados obtenidos, serían las DUBs: DU11 (DUBA3), DU48 (USP1), DU66 (USP28) y DU82 (USP42); estos se pueden observar en la siguiente figura marcados con un asterisco rojo (Figura 9). Aunque la comprobación no ha resultado todo lo clara que se esperaba, es buen inicio para un estudio más detallado en el futuro para verificar los resultados obtenidos a partir del presente estudio.

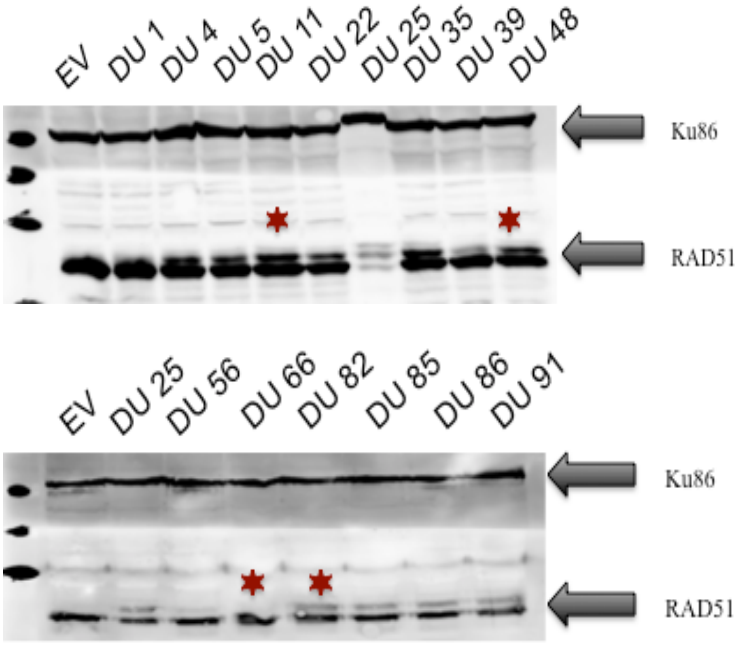

Figura 9. Segundo rastreo con las DUBs candidatas sobreexpresadas por segunda vez**.**. Sobreexpresión de DUBs y vector vacío (EV) en 293T. Se muestran Western blots contra RAD51 y KU86 como control de carga.

7. Conclusiones

A partir de estas evidencias, la experiencia de trabajo de laboratorio y análisis de bibliografía se obtienen estas conclusiones interesantes:

1. RAD51 endógena puede ser visualizada bien por extractos totales por un tampón de UREA/SDS.
2. Los niveles de RAD51 disminuyen después del tratamiento con luz ultravioleta y ciclohexamida.
3. DUBA3, USP1, USP28 y USP42 son candidatas DUBs para la regulación de la estabilidad de RAD51.
4. Los experimentos sugieren llevar a cabo un estudio más detallado en el futuro para, de esta manera, poder verificar los resultados obtenidos a partir del presente proyecto.

This project has led to the following conclusions:

1. Endogenous RAD51 can be visualized well by whole cell extracts using a UREA/SDS buffer.
2. RAD51 protein levels decrease after treatment with ultraviolet light and cycloheximide.
3. DUBA3, USP1, USP28 y USP42 are candidate DUBs for regulating of the stability of RAD51.
4. Experiments suggest that carrying out a more detailed investigation in the future will lead to the verification of the results obtained from this project.

8. Bibliografía

Amerik AY y Hochstrasser M (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1695: 189-207.

Bennett BT y Knight KL (2005). Cellular Localization of Human Rad51C and Regulation of Ubiquitin-Mediated Proteolysis of Rad51. *J. Cell. Biochem*. 96:1095–1109.

Buisson R, Dion-Côté AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, Stasiak A, Xia B, Masson JY (2010). Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat. Struc. Mol. Biol.* 10: 1247–54.

Chan y Hickson ID (2009). On the origins of ultra-fine anaphase bridges. *Cell Cycle* 8: 3065-3066.

Clague MJ, Coulson JM, Urbé S (2012). Cellular functions of the DUBs. *J Cell Science* 125:277-86.

Flott S, Kwon Y, Pigli YZ, Rice PA, Sung P, Jackson SP (2011). Regulation of Rad51 function by phosphorylation. *EMBO Rep*. 8:833-9.

Galkin VE, Wu Y, Zhang XP, Qian X, He Y, Yu X, Heyer WD, Luo Y, Egelman EH (2006). The Rad51/RadA N-terminal domain activates nucleoprotein filament ATPase activity. *Structure* 6: 983–92.

Hamilton AM y Zito K (2013). Breaking it down: the ubiquitin proteasome system in neuronal morphogenesis. *Neural Plast*. 2013: 196848.

Harper JW y Elledge SJ (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell*. 28: 739-745.

Hilario J, Amitani I, Baskin RJ, Kowalczykowski SC (2009). Direct imaging of human Rad51 nucleoprotein dynamics on individual DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2: 361–8.

Holloman WK (2011). Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18: 748-754.

Jasin, M y Rothstein R (2013). Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biology.* 11: a012740.

Johnson ES, Ma PC, Ota IM, Varshavsky A (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem*. 270: 17442-17456.

Kimura Y, Yashiroda H, Kudo T, Koitabashi S, Murata S, Kakizuka A, Tanaka K (2009). An inhibitor of a deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. *Cell* 137: 549-559.

Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X (2012). Homologous recombination and its regulation *Nucleic Acids Res*. 40: 5795-5818.

McGowan CH y Russell P (2004). The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16: 629-633.

Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in S. cerevisiae is a RecA-like protein. *Cell* 3: 457–70.

Xu P, Duong DM, Seyfried N T, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D, Peng J (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137: 133-145.