



Universidad  
de La Laguna



Facultad de Ciencias  
Sección BIOLOGÍA

**Departamento de Bioquímica,  
Microbiología, Biología Celular y  
Genética**

**Identification of new regulators on the  
XPC and Cdc6 proteins.**

**Identificación de nuevos reguladores de  
las proteínas XPC y Cdc6.**

**Trabajo Fin de Grado**

**DÁCIL DEL PILAR ALONSO GIL**

Julio, 2015

<b>SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014/2015</b>	<b>ENTRADA</b>  Fecha: Núm:
--------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------

**Datos Personales**

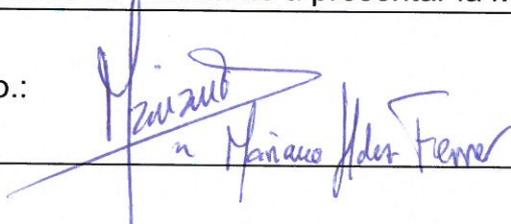
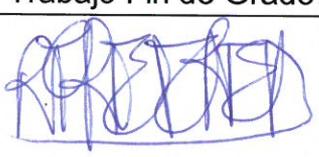
Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
54.134.824-T	DÁCIL DEL PILAR ALONSO GIL
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
627.601.852	alu0100707809@ull.edu.es

**SOLICITA** la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

**TÍTULO**

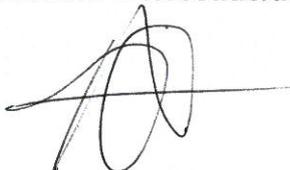
Identificación de nuevos reguladores de las proteínas XPC y Cdc6.
-------------------------------------------------------------------

**Autorización para su depósito, defensa y evaluación**

<b>Don Mariano Hernández Ferrer.</b>	
<b>Profesor del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética.</b>	
<b>y Don Raimundo Freire Betancor.</b>	
<b>Investigador del Departamento de Unidad de Investigación del HUC. Línea de Ciclo Celular y Cáncer.</b>	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado.	
Fdo.: 	Fdo.: 

La Laguna, a 6 de Julio de 2015

**Firma del interesado/a**



**SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLÓGÍA**

## Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	1
Introducción.....	1
Materiales y métodos.....	5
1. Cultivos celulares .....	5
1.1. Células adheridas.....	5
2. Manipulación de células .....	5
2.1. Transfecciones.....	5
2.2. Irradiación de células con luz UV .....	8
3. Manipulación de extractos celulares.....	8
3.1. Lisis desnaturalizante .....	8
3.2. Cuantificación de proteínas .....	8
3.3. Western Blot.....	9
Hipótesis y Objetivos .....	12
Resultados y Discusión.....	14
1. Rastreo genético .....	14
1.1. XPC .....	14
1.2. Cdc6 .....	16
2. siRNA para Cdc6 y DUBs positivas .....	20
Conclusiones.....	22
Conclusions .....	22
Agradecimientos.....	22
Bibliografía.....	23

## **Resumen**

El mantenimiento de la integridad del genoma es un proceso muy regulado debido a su importancia en la supervivencia celular. El ADN está constantemente expuesto a daños tanto internos como externos, por lo que son necesarias vías implicadas en la reparación de estos. Esta respuesta al daño incluye parada del ciclo celular y mecanismos de reparación del daño cuando es posible, o la activación de apoptosis/senescencia cuando el daño causado es irreversible. Además, la incorrecta regulación de la replicación del ADN también puede generar graves problemas en el genoma. Es por ello que existe una exhaustiva regulación del proceso de replicación.

Este estudio se centró en identificar DUBs (ubiquitin hidrolasas) para proteínas implicadas en la DDR (respuesta al daño en el ADN) y en la regulación de la replicación del ADN. Para ello, realizamos un rastreo para XPC, clave en la reparación del ADN por escisión de nucleótidos, y para Cdc6, proteína que tiene un papel esencial en la formación del complejo pre-replicativo y posterior licenciamiento de los orígenes de replicación. Ambas proteínas están reguladas por ubiquitinación, en el caso de XPC modifica su función y en el de Cdc6 regula los niveles presentes en la célula. Ante las dificultades técnicas para el rastreo de DUBs para XPC, nuestros esfuerzos se enfocaron en la proteína Cdc6. Hemos identificado para dicha proteína posibles DUBs que pensamos que controlan la estabilidad de Cdc6.

Palabras clave: Cdc6, daño al ADN, replicación, ubiquitinación, XPC.

## **Abstract**

The maintenance of genomic integrity is a highly regulated process due to its importance in cell survival process. DNA is constantly exposed to both internal and external damage, and that is the reason why those pathways involved in the repair are necessary. The cellular response to DNA insults includes a cell cycle arrest and damage repair mechanisms, or activation of apoptosis/senescence when the damage is irreversible. In addition, defects in the regulation of DNA replication can also cause genomic instability. For this reason, an exhaustive regulation of the replication process exist.

This study focuses on identifying DUBs (ubiquitin hydrolases) for proteins involved in the DDR (DNA damage response) and regulating DNA replication. We perform a screening for XPC, key protein in nucleotide excision repair, and Cdc6 protein that plays a key role in forming the pre-replicative complex and subsequent licensing of replication origins. Both proteins are regulated by ubiquitylation, in the case of XPC modifies its function, and in the case of Cdc6 by regulating the levels in the cell. Given the technical difficulties in the XPC screening, our efforts were focused on the Cdc6 protein. We have identified possible DUBs because we think that this protein controls the stability of Cdc6.

Key words: Cdc6, DNA damage, replication, ubiquitylation, XPC.

## **Introducción**

El mantenimiento de la integridad genómica es un proceso fundamental a la vida ya que los seres vivos están constantemente expuestos a daños en su genoma. Tanto agentes externos o internos, como la incorrecta regulación de la replicación pueden causar una acumulación de mutaciones comprometiendo así la viabilidad celular. Los organismos eucariotas evitan los efectos negativos que tendrían estos daños activando vías implicadas en la respuesta a daño en ADN (DDR). Esta respuesta incluye parada del ciclo celular y mecanismos de reparación del daño cuando es posible, o la activación de apoptosis/senescencia cuando el daño causado es irreversible.

La DDR está relacionada directamente con la carcinogénesis, ya que evita la acumulación de mutaciones que pueden desencadenar en cáncer. El entendimiento en la regulación de las proteínas implicadas en la replicación y la respuesta a daño son puntos clave para la comprensión del cáncer, su prevención y su tratamiento.

Uno de los mecanismos implicados en esta DDR es la reparación global del genoma por escisión de nucleótidos (GG-NER) en la que XPC juega un papel muy importante. Esta proteína se une específicamente a la región del ADN dañado, en concreto a segmentos cortos de ADN de cadena sencilla.

Otro proceso ligado a carcinogénesis y a estabilidad genómica es la replicación, ya que la incorrecta regulación de la replicación del ADN puede generar mutaciones. Así existe una exhaustiva regulación del proceso de replicación que asegura que la célula replique todo su genoma una vez por ciclo celular. Una proteína clave en este proceso es Cdc6 (Cell Division Cycle 6).

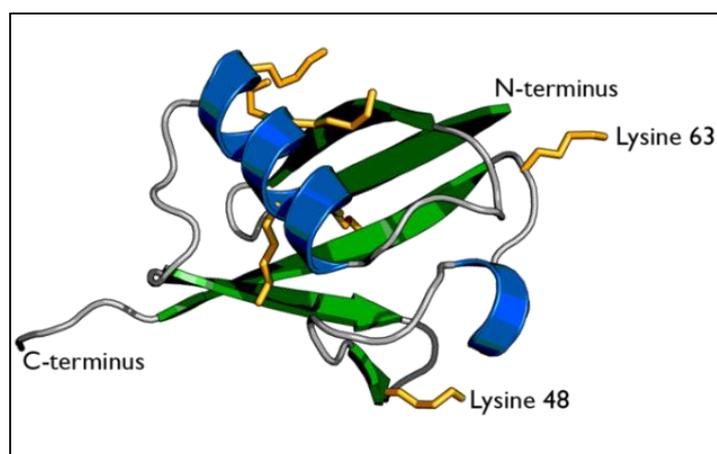
Cdc6, regulador esencial de replicación en ADN en células eucariotas, tiene como función más destacada el ensamblaje de complejos pre-replicativos en los orígenes de replicación junto a otras proteínas (ORC, Cdt1 y MCM), durante la fase G1 del ciclo de división celular. Esta proteína también desempeña papeles importantes en la activación y el mantenimiento de los mecanismos de control que coordinan la fase S y la mitosis. Además, la sobreexpresión de Cdc6 en células primarias puede promover la hiper-replicación de ADN e inducir una respuesta de senescencia similar a la causada por la activación de oncogenes. Estos hallazgos indican que desregulación de la expresión

CDC6 en células humanas supone un serio riesgo de carcinogénesis (Borlado y Méndez, 2008).

Ambas proteínas antes mencionadas, XPC y Cdc6, se encuentran reguladas por procesos de ubiquitinación-deubiquitinación.

La ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos y un peso molecular de 8.5 kDa que fue caracterizado inicialmente como una señal unida covalentemente a las proteínas como señalización de degradación proteasomal (Hershko y Ciechanover, 1998), degradación lisosomal y autofagia (Clague y Urbé, 2010). Desde su descubrimiento, el campo de la ubiquitinación ha sido extensamente estudiado, ya que hasta ahora se conocen más de 20 dominios de unión a ubiquitina en proteínas (Dikic et al., 2009) lo que indica su importancia en la función celular.

Entre las características importantes de la ubiquitina se distinguen una cola C-terminal y siete residuos de lisina. Estos residuos de lisina (Lys 6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63) permiten la formación de un enlace isopeptídico con el extremo C-terminal de otra ubiquitina (Walczak et al., 2012) (Figura 1). La primera ubiquitina también se acompleja vía una lisina de la proteína diana formando un enlace con la glicina C-terminal.

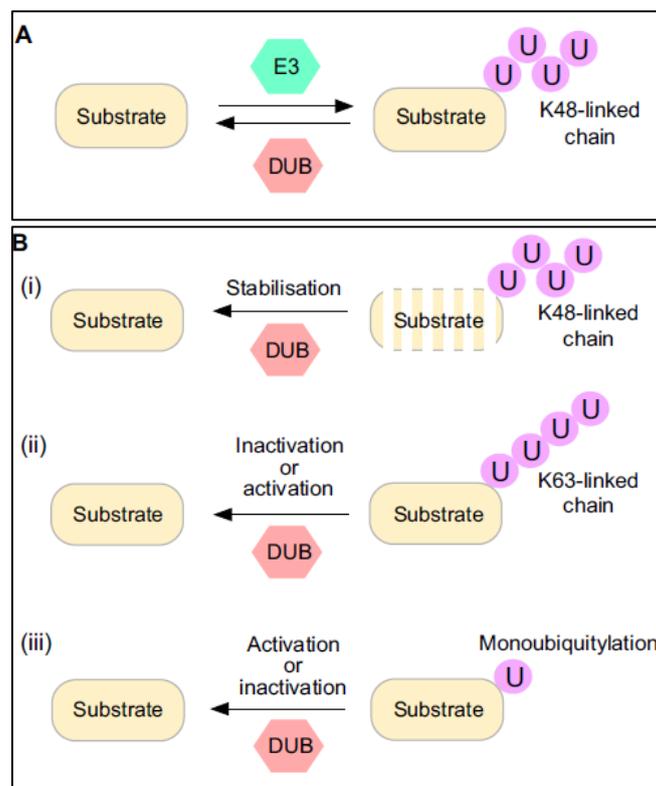


**Figura 1. Estructura tridimensional de una molécula de ubiquitina.** Se observan las dos regiones destacadas de una ubiquitina: los siete residuos de lisina (amarillo) y el extremo C-terminal, con el que se forma un enlace isopeptídico.

La ruta de ubiquitinación incluye tres tipos de enzimas: enzima que activa la ubiquitina (E1), enzima que conjuga la ubiquitina (E2) y ligasa de ubiquitina (E3), que la une a la proteína y es la que confiere especificidad a la proteína diana. De este modo, y en un proceso en cascada, por las tres enzimas se produce el reconocimiento de la proteína

y la conjugación de ubiquitina. A la molécula de ubiquitina se le podrán seguir uniendo ubiquitinas en los residuos de lisina que presentan, formando así cadenas di o poliubiquitinadas, o quedar en forma de monoubiquitina (Xu et al., 2009). La función que ejerce la ubiquitina es distinta dependiendo de la longitud de las cadenas de ubiquitina (mono, o poliubiquitina) y qué lisina se utiliza de la ubiquitina para conjugar otras, en el caso de las poliubiquitinaciones. De este modo, uniones a través de la lisina 48 señalizan la 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.

En contraposición a las E3 ligasas, las moléculas de ubiquitina pueden ser retiradas de las proteínas diana por enzimas deubiquitinas o ubiquitin hidrolasas (DUBs). Por tanto, las enzimas DUBs pueden revertir la función de E3 ubiquitina ligasas. Cabe destacar que estas enzimas ubiquitin-hidrolasas pueden estabilizar, inactivar o activar la función de las proteínas (Michael y Clague, 2012), al igual que ocurre en la ubiquitinación, dependiendo del tipo de cadena ubiquitina unida al sustrato (Figura 2).



**Figura 2. Regulación de la estabilidad o actividad de las proteínas por DUBs.** (A) Efecto opuesto de las DUBs a las E3 ligasas. (B) Dependiendo del tipo de la cadena ubiquitina que se une al sustrato, las DUBs pueden estabilizar, inactivar o activar a las proteínas. (Michael et al., 2012)

En este trabajo de fin de grado comenzamos con el estudio de DUBs encargadas de regular la proteína XPC, descrita como una proteína con función regulada por procesos de ubiquitinación. Cuando el ADN dañado por luz ultravioleta, por ejemplo, XPC es poliubiquitinado gracias a la acción de un complejo E3 ligasa. Este complejo le otorga una mayor afinidad a las regiones internucleosomales (ADN desnudo), donde la tasa de lesiones causadas por luz UV es mucho más frecuente (Sugasawa et al., 2005), permitiendo una mayor rapidez de escisión al ser más accesibles al posterior sistema de reparación (Fei et al., 2011).

También, en este trabajo de fin de grado estudiamos la regulación por DUBs de la proteína Cdc6. Esta proteína también se ha descrito como proteína con estabilidad regulada por ubiquitinación-deubiquitinación. Se sabe que su función principal es el ensamblaje de complejos pre-replicativos en los orígenes de replicación junto a ORC, Cdt1 y MCM durante la fase G1 del ciclo de división celular. Tras este proceso, se desestabiliza debido a la acción de la ubiquitin ligasa APC (Anaphase-Promoting Complex), que induce su degradación por el proteasoma (Petersen et al., 2000) (Méndez y Stillman, 2003). Brevemente, usamos un rastreo de DUBs que regulan Cdc6, sobreexpresando DUBs. La hipótesis es que si realizamos una sobreexpresión de deubiquitinas diana, impedimos su ubiquitinación mediante la ubiquitin ligasa APC y así evitamos su degradación por proteasoma, aumentando su estabilidad en la célula.

## **Materiales y métodos**

### **1. Cultivos celulares**

#### **1.1. Células adheridas**

Se utilizaron células de diferentes tipos de cáncer humanos HCT116 (células tumorales de colon humanas) HEK 293T (células tumorales embrionarias de riñón) y U2OS (células tumorales de osteosarcoma humano) crecidas en medio Dulbecco modificado (DMEM). El medio fue suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Lonza) y complementado con penicilina (100 U/ml), estreptomycinina (100 µg/ml) y L-glutamina (200 mM).

Las células crecieron en una atmósfera saturada de agua, al 5 % de CO<sub>2</sub> y temperatura de 37 °C. La siembra de éstas se realizó en placas especiales para cultivo celular a una confluencia de aproximadamente el 80 %. Para ser divididas, se disgregaron por incubación con tripsina-EDTA (Lonza) previo lavado con tampón PBS 1X.

### **2. Manipulación de células**

#### **2.1. Transfecciones**

##### **2.1.1. Transfección plasmídica**

##### **2.1.1.1. Transfección mediante Polyplus jetprime.**

Se introdujo plásmidos de sobreexpresión de proteínas con el reactivo *jetprime de Polyplus transfection* en la línea celular HCT116.

En los experimentos de este trabajo, se transfectaron células HCT116 en placas de 6 pocillos con 2 ml de medio DMEM y una confluencia de 250.000 céls/ml. Para ello seguimos el siguiente protocolo:

1. Se mezcló bien en un tubo eppendorf estéril, 2 µg de plásmido y 200 µl Buffer jetprime. Se aplicó vórtex durante 10 segundos.

2. Se añadieron al tubo 3 µl de reactivo jetprime. Se aplicó vórtex 10 segundos una vez más, se centrifugó brevemente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añadió la mezcla a cada uno de los 6 pocillos de la placa con células HCT116 y se mezcló bien. Se incubó 37 °C y 48 h después (cuando ocurre el pico de expresión de la proteína) se recogieron las células.

#### **2.1.1.2. Transfección por fosfato cálcico.**

La transfección de plásmidos en la línea celular HEK 293T se llevó a cabo a través el método de precipitación por fosfato cálcico. Esta técnica se fundamenta en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos que son captados por las células. El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Para placas de cultivo de 6 centímetros de diámetro y 3ml de medio DMEM, se mezcló bien en un tubo eppendorf estéril: 5 µg de plásmido, 225 µl de agua bidestilada y 25 µl de CaCl<sub>2</sub> 3.3 M.
2. Tras aplicar vórtex, se dio un pulso de centrifuga y se añadió a esta mezcla 250 µl HBS 2X (280 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mM Glucosa, 10 mM KCl, 50 mM Hepes). Tras ello, se añadió rápidamente 333 µl de esta mezcla a las placas previamente incubadas con 3 ml de medio DMEM y alta confluencia de células.
3. Se incubó la placa durante 12-16 horas, se lavó dos veces con PBS 1X estéril y se añadió medio DMEM fresco.
4. Se recogieron las células 24 h después del lavado del precipitado, ya que se da el mayor pico de expresión y es adecuado su uso.

#### **2.1.2. Transfección de oligonucleótidos interferentes (siRNA)**

Mediante la transfección de ARN pequeño de interferencia, es posible silenciar la expresión génica de un gen interés con una secuencia específica (siRNA). El experimento se llevó a cabo en la línea celular U2OS y en placas de cultivo de 6 cm. Se usó el reactivo *lipofectamine RNAi MAX* (Life Technologies) siguiendo un protocolo ligeramente diferente al recomendado por el fabricante:

1. En un tubo eppendorf, se mezcló 5 µl de oligo (20 µM) con 250 µl de medio Opti-Mem. En otro tubo, se mezcló 5 µl de *lipofectamine RNAi MAX* (Life Technologies) con 250 µl de Opti-mem.
2. Se mezclaron los contenidos de los tubos eppendorf en uno y se incubó durante 10-20 minutos a temperatura ambiente.
3. Durante el tiempo de incubación, se cambió el medio DMEM de las placas por 2 ml de medio DMEM fresco.
4. Se añadió el contenido de la mezcla incubada gota a gota a las placas.
5. Transcurridas 48 h post-transfección se recogieron las células. Los pasos 1-3 se pueden repetir a las 24 horas después de la primera transfección con el fin de aumentar la eficiencia de la inhibición deseada.

Los oligonucleótidos interferentes utilizados fueron los siguientes (sintetizados por Life Technologies):

CDC6 siRNA

5' UUUACACGAGGAGAACAGGdTdT 3'

DUB 4. Cezanne siRNA.

5' GAAUCUAUCUGCCUUUGGAdTdT 3'

DUB 10. DUBA1 siRNA.

5' CUGGGCCUGCCAUCAUUCAdTdT 3'

DUB 53. USP14 siRNA.

5' AGAAAUGCCUUGUAUAUCAdTdT 3'

DUB 69. USP30 siRNA.

5' CCAGAGUCCUGUUCGAUUUdTdT 3'

DUB 78. USP39 siRNA.

5' GCUCUGGAACCCUCGAAAUdTdT 3'

DUB 98. USP7 siRNA.

5' GGCAACCUUUCAGUUCACUdTdT 3'

## **2.2. Irradiación de células con luz UV**

Las células HCT116 fueron irradiadas con una fuente de luz UV-C (Philips) para provocar su poliubiquitinación. Antes de ser irradiadas, se retiró el medio de la placa, se lavaron con PBS 1X y se dejó 0.5 ml de éste en la base de la placa de seis pocillos.

La dosis de luz UV generalmente usada fue  $40\text{J/m}^2$ , se calculó mediante un uvímetro con sonda (Ultra Violet Products). Después de irradiar, se retiró el PBS 1X y se añadió el medio a la placa. Se incubaron las células por los tiempos indicados en cada experimento.

## **3. Manipulación de extractos celulares**

### **3.1. Lisis desnaturalizante**

La obtención de extractos celulares para electroforesis en geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) e inmunoblot se realizó de la siguiente manera:

Se retiró el medio de la placa y se lavó dos veces con PBS 1X. Seguidamente se añadió tampón de lisis desnaturalizante (50 mM Tris-HCl pH 8, 1% SDS, 6 M Urea, 250 mM NaCl) en la placa. Tras ello, se extrajeron las células de la placa y se sonicaron a una potencia de 60-80 % durante 10-15 segundos (sonicador Hielsher Ultrasonic). En ocasiones las muestras se vieron sometidas a dos pulsos de sonicado. Cuando los extractos fueron sonicados se utilizaron inmediatamente o fueron congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3.2. Cuantificación de proteínas**

Una vez los extractos estaban sonicados, se sometieron a un ensayo colorimétrico que permite la determinación de la concentración de proteínas en cada muestra. Para ello se realizó una curva patrón a partir de una solución de BSA (Albúmina de Suero Bovino) de concentración conocida. De este modo, en una placa de 96 pocillos de fondo plano, se presentaba la curva con concentraciones crecientes de BSA. En los pocillos siguientes se preparaba la muestra, añadiendo 3  $\mu\text{l}$  de muestra y 32  $\mu\text{l}$  de agua.

Para inducir la reacción colorimétrica, sobre cada pocillo se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de una mezcla de Ácido Bicinconínico (Novagen): Sulfato de Cobre (Sigma, 4 %) según el ratio 50:1. Se incubó la placa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Luego, la intensidad de la reacción

en cada pocillo fue medida mediante un espectrofotómetro automático usando un filtro a 540 nm (Labsystems). El valor de absorbancia que se obtiene para cada muestra es transformado a valores de concentración de proteínas realizando una regresión lineal de Pearsons con los seis valores de la recta de calibrado (Tabla 1).

	<b>Conc.1</b>	<b>Conc.2</b>	<b>Conc.3</b>	<b>Conc.4</b>	<b>Conc.5</b>	<b>Conc.6</b>
<b>BSA, 1 mg/ml (µl)</b>	0	2	4	8	16	32
<b>Agua (µl)</b>	32	30	28	24	16	0
<b>Urea-SDS (µl)</b>	3	3	3	3	3	3

Tabla 1. Datos para realizar la recta de calibrado y conocer la cantidad de proteínas presentes en los extractos.

### **3.3. Western Blot**

#### **3.3.1. Electroforesis**

La separación de proteínas por electroforesis en condiciones desnaturizantes se llevó a cabo en geles discontinuos de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE). De este modo, mediante el uso del sistema Miniprotean 3 (BioRad), se realizaron geles que constan de dos partes: un gel superior compactador (stacking) (5 % Acrilamida:bisacrilamida (29:1), 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,1 % SDS) en el que se carga la muestra, y un gel separador (running) (6-12 % Acrilamida:bisacrilamida (29:1), 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,1 % SDS) preparado con distintos porcentajes de acrilamida de entre 6 (para estudiar XPC) y 10 % (para estudiar Cdc6) según el tamaño de las proteínas a resolver.

Una vez conocido el volumen de muestra necesario para 50 µg de proteína total en cada pocillo, ésta se diluyó con tampón de carga desnaturizante (1X Stacking buffer, 20 % Glicerol, 2 % SDS, 5 % β-mercaptoetanol, 25 µg/ml de Azul de Bromofenol) y se calentó durante 5 minutos a 96 °C. A continuación, se cargó cada muestra en pocillos separados del gel.

La electroforesis se realizó a diferencia de potencial constante de 120 o 160 V durante el tiempo necesario para que saliera el frente de la electroforesis (1 hora aproximadamente) utilizando el tampón de electroforesis (25 mM Trizma Base, 192 mM

Glicina, 0.1 % SDS). En todos los casos se utilizó un patrón de pesos moleculares preteñidos con rango desde 7 a 175 kDa (NEB).

### **3.3.2. Transferencia**

Una vez realizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de proteínas a una membrana a través del sistema de transferencia Miniprotean 3 (BioRad). Dicho sistema permite el contacto del gel con una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman) en módulos que los mantienen fijos a través de un tampón de transferencia (25 mM Trizma Base, 192 mM Glicina, 20 % Etanol). La transferencia se realizó a una intensidad de corriente constante de 300 mA constantes durante 1 hora.

Posterior a la transferencia, se bloqueó la membrana con una solución de leche desnatada al 5 % en TBS-T 0,1 % (25 mM Trizma Base, 5 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) durante una hora.

### **3.3.3. Incubación con anticuerpos y revelado**

Ya bloqueada la membrana de nitrocelulosa, se incubó con suero inmune o anticuerpos purificados diluidos en leche desnatada al 5 % en TBS-T 0,1 % (solución de bloqueo) durante toda la noche a 4 °C en agitación orbital suave. Al día siguiente, las membranas se lavaron en TBS-T 0.1 % 3 veces cada 10 minutos. A continuación se incubó el anticuerpo secundario adecuado acoplejados a HRP (peroxidasa de rábano, Jackson ImmunoResearch), diluidos 1:10000 en TBS-T 0,1 % durante 45-90 minutos. Posterior a ello, se realizaron otros tres lavados cada 10 minutos con TBS 0.1 % Tween.

Finalmente, para permitir la inmunodetección de las proteínas, se incubaron con 2 ml de luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 40 cm<sup>2</sup> de membrana. La incubación se realizó durante cinco minutos si se trata de un revelador normal (*Gencript, Pierce*), o durante dos minutos si el revelador es sensible *Westernbright Peroxide Advansta*. La detección se realizó con un equipo de quimioluminiscencia Image Quant LAS4000 mini.

Los anticuerpos y diluciones utilizadas para inmunoblot en este trabajo se detallan en la tabla 2.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>
Claspin (propio)	Conejo	1:2000
XPC (Novus)	Ratón	1:5000
Ku86 (Santa Cruz Biotech)	Cabra	1:3500
Cdc6 (propio)	Conejo	1:1000
$\beta$ -Actina (Sigma)	Ratón	1:5000

Tabla 2. Anticuerpos, especies y diluciones utilizados en la técnica analítica *Western Blot*.

## Hipótesis y Objetivos

La ubiquitinación es una modificación postraducciona de proteínas por ubiquitina. Esta modificación puede conducir a un cambio en la función de la proteína o a su degradación por el proteasoma. Existen otras proteínas capaces de eliminar las uniones covalentes que se dan entre las ubiquitinas y las proteínas diana denominadas deubiquitinas o ubiquitin hidrolasas (DUBs).

El objetivo de este proyecto fue identificar una/varias DUBs que regularan la función de la proteína XPC, con papel central en el proceso de reparación por escisión de nucleótidos. Su ubiquitinación en presencia de daño en el ADN es clave para la reparación de un tipo especial de daño en el ADN. Nuestra hipótesis para aislar una DUB que regulara este proceso de reparación de daño y concretamente XPC, se fundamenta en que al sobreexpresar una DUB específica para XPC, esta ubiquitin hidrolasa sería capaz de retirar la ubiquitina también en condiciones de daño al ADN. Para ello pensamos detectar la ubiquitinación de XPC en células transfectadas con plásmidos de sobreexpresión de distintas DUBs y dañadas con luz UV mediante análisis por la técnica de *Western Blot*.

Lamentablemente, ensayos preliminares realizados en distintas líneas celulares con varios métodos de transfección invalidaron esta aproximación. Así, se encontró una línea celular en la que las DUBs mostraban efecto con proteínas diana, ya descritas en la literatura, pero en esa línea celular no pudimos observar la poliubiquitinación de XPC. Por el contrario, líneas celulares en las que éramos capaces de visualizar que XPC se poliubiquitinaba, no eran adecuadas para la transfección y expresión de DUBs usando una proteína diana y su DUB como control.

Por todo ello, ya que en el laboratorio en el que se realizó el TFG se estudian otros procesos que influyen en la estabilidad genómica y su relación con ubiquitinación, decidimos realizar un rastreo para otra proteína regulada por ubiquitinación: Cdc6.

Cdc6 es una proteína esencial en la iniciación de la replicación del ADN en células humanas junto con Cdt1 y sus niveles están fuertemente regulados durante el ciclo celular por poliubiquitinación y degradación por proteasoma. Esta regulación de los niveles de Cdc6 es un mecanismo celular que asegura la replicación del material genético una vez y solo una vez por ciclo celular. Una vez formados los complejos pre-replicativos, Cdc6 se

desestabiliza en G1, induciendo su degradación por proteasoma. Nuestra hipótesis por tanto, es que la sobreexpresión de una DUB específica para Cdc6 debe disminuir su ubiquitinación, y así evitar su degradación por proteasoma y por tanto incrementar sus niveles en la célula.

Para ello utilizamos una librería de plásmidos de DUBs que transfectamos uno a uno en la línea celular HEK 293T. Los extractos de estas células fueron analizados mediante *Western Blot* para estudiar los niveles de Cdc6.

## Resultados y Discusión

### 1. Rastreo genético

#### 1.1. XPC

Como antes en el laboratorio no se había trabajado con XPC y sobreexpresión de DUBs mediante *Polyplus jetprime* en la línea celular HCT116, fue necesaria la realización de algunos ensayos con el fin de optimizar el proceso. De este modo podríamos asegurar la reproducibilidad de los resultados en el rastreo de XPC.

Para conocer la eficiencia de transfección de DUBs en esta línea celular, transfectamos las células HCT116 con un plásmido que expresa Rad9-GFP, una proteína de bajo peso 45 kDa fusionada a otra de 26 kDa que es fluorescente. Permittiéndonos de este modo calcular de forma cualitativa la calidad de la transfección. También transfectamos diferentes cantidades de ADN para la DUB USP7 (conocido estabilizador de Claspin) con el fin de la realización de un *Western Blot* y un posterior revelado contra Claspin. De esta manera, en el revelado se observaría una banda más oscura en aquella transfección plasmídica de USP7 que haya sido más efectiva, ya que mayores cantidades de proteínas estabilizan con más efectividad a Claspin (Figura 3).

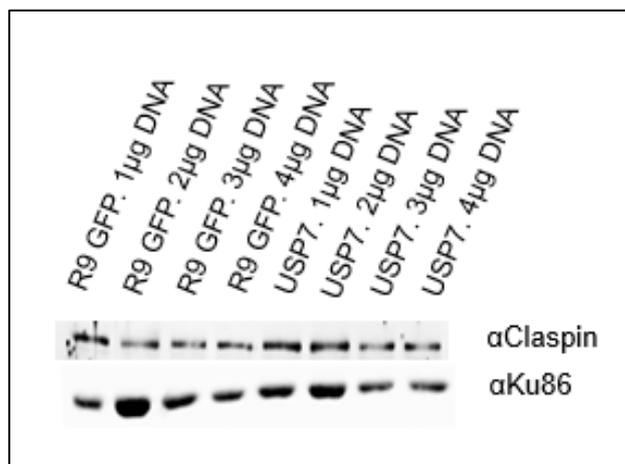


Figura 3. *Western blot* contra Clasping y Ku86 como control de carga. Se muestra la transfección de Rad9-GFP y USP7 con diferentes µg ADN/µl reactivo con el fin de identificar la transfección más efectiva.

Como se observa en la figura 3, la transfección mediante *Polyplus jetprime* no dio buenos resultados en esta línea celular, ya que no observamos ninguna banda destacadamente más intensa.

Para confirmar la poca eficacia en la transfección, decidimos hacer una comparación con dos líneas celulares: HCT116 (mediante *Polyplus jetprime*) y HEK 293T (mediante fosfato cálcico). Para ello realizamos otro *Western Blot* en el que transfectamos el plásmido que sobreexpresa la DUB USP7 en ambas líneas celulares. De este modo, en la figura 4 observamos un incremento significativo de la cantidad de Claspin en HEK 293T en comparación con el vector vacío como consecuencia de la estabilización de Claspin; lo cual no ocurre en la línea celular HCT116. Esto confirma que en HCT116 la transfección no ha sido igual de efectiva que en HEK 293T.

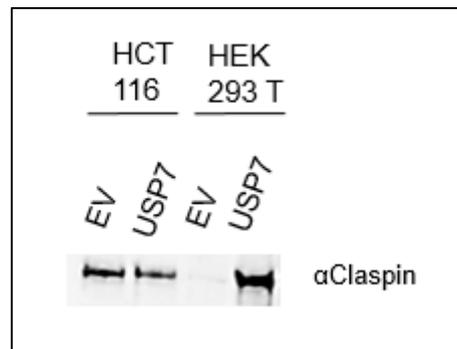


Figura 4. Se muestra *Western Blot* contra Claspin. Control de eficiencia de transfección en HEK 293T y HCT116, control: vector vacío (Empty vector)

De igual modo, tratamos de ver la poliubiquitinación de XPC tras aplicar daño ultravioleta, objetivo antes conseguido en el laboratorio con otras líneas celulares.

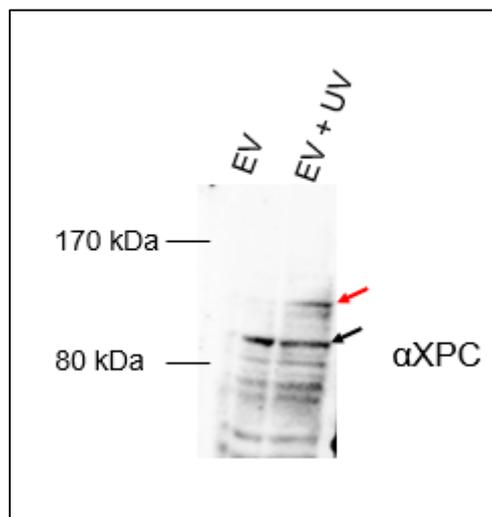


Figura 5. Se muestra *Western Blot* contra XPC. Test ubiquitinación en HCT116.

En la figura 5 se muestra la banda correspondiente a la proteína con una flecha negra, y con una flecha roja, la banda que correspondería a la poliubiquitinación. Así, no se

observa una diferencia significativa entre la poliubiquitinación de XPC en el vector vacío (empty vector) y el vector vacío con daño UV, como cabría esperar. Ya que como hemos explicado anteriormente, tras daño ultravioleta XPC se debería poliubiquitar.

En resumen, debido a la baja tasa de transfección plasmídica de DUBs observada en la línea celular HCT116, y al desconocimiento de la dosis exacta de daño ultravioleta ( $J/m^2$ ) necesaria para aplicar a las células y ver la clara poliubiquitinación en XPC en *Western Blot*, este proyecto no pudo ser llevado a cabo. Así, decidimos hacer un rastreo para otra proteína regulada también por mecanismos de ubiquitinación: Cdc6.

## 1.2. Cdc6

Debido a que el anticuerpo anti-Cdc6 es propio y recientemente obtenido en el laboratorio, era necesario confirmar que el efecto era el correcto. De este modo, transfectamos siRNA de la misma proteína que estudiamos en células U2OS. En la figura 6 podemos observar el silenciamiento de la expresión de esta proteína.

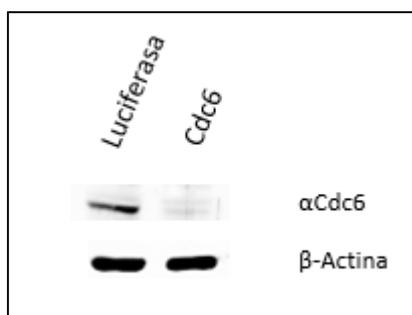


Figura 6. Western Blot para Cdc6 y  $\beta$ -Actina como control de carga. Test para comprobar la efectividad del anticuerpo propio en células U2OS.

Una vez confirmado el efecto del anticuerpo, comenzamos el screening. Utilizando la técnica de transfección de plásmidos mediante fosfato cálcico, sobreexpresamos alrededor de 80 DUBs en HEK 293T con el objetivo de encontrar positivos que estabilicen la proteína Cdc6. En la colección de DUBs que disponemos en nuestro laboratorio hemos ordenado numéricamente de la 1-100, a pesar de que en la literatura presentan un nombre diferente.

En la figura 7 se muestran resultados típicos del análisis realizado incluyendo una de las DUBs positivas, la DUB 69, conocida en la literatura como USP30. La calle de esta DUB positiva se observa con un incremento de la cantidad de Cdc6 en comparación con el vector vacío.

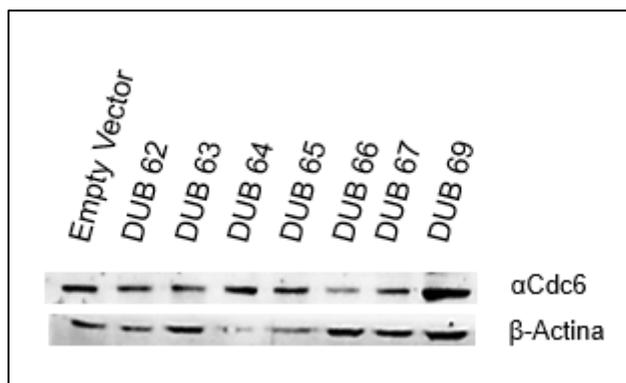


Figura 7. Se muestra *Western Blot* contra Cdc6 y control de carga  $\beta$ -Actina. Sobreexpresión DUBs en HEK 293-T, control: vector vacío (Empty Vector).

El rastreo se realizó con todas las DUBs de nuestra colección y validamos estos resultados repitiendo la transfección solo en aquellas ubiquitin hidrolasas que en un principio nos dieron un resultado positivo para Cdc6. En este caso, tuvimos 10 positivos. En este primer rastreo asumimos que la expresión de las DUBs ocurría sin problemas.

Al repetir estos positivos para Cdc6, identificamos aquellas deubiquitinas positivas en el primer y segundo rastreo (marcados en **negrita**). Observamos cinco candidatas (Cezanne, **DUBA1**, USP30, USP39, USP7) que aumentan la cantidad de proteínas en comparación a la transfección del vector vacío (EV). Esto nos permite concluir que al aumentar la cantidad de ubiquitin hidrolasas, evitamos la degradación por proteasoma que induce la ubiquitinación en esta proteína, lo cual conlleva a un aumento de la estabilidad de Cdc6. Ver figuras 8 y 9.

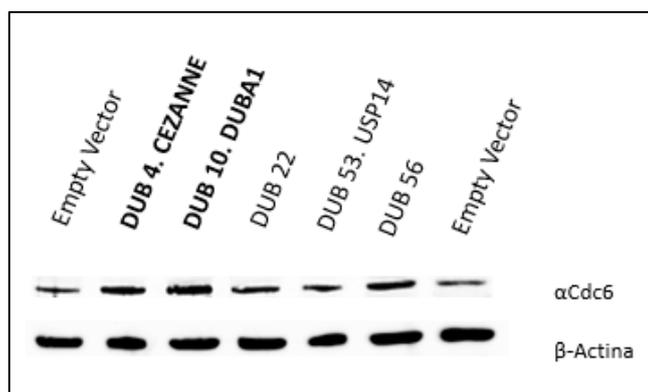


Figura 8. *Western Blot* contra Cdc6 y  $\beta$ -Actina como control de carga. Sobreexpresión de DUBs diana en HEK 293-T, doble control: EV (vector vacío).

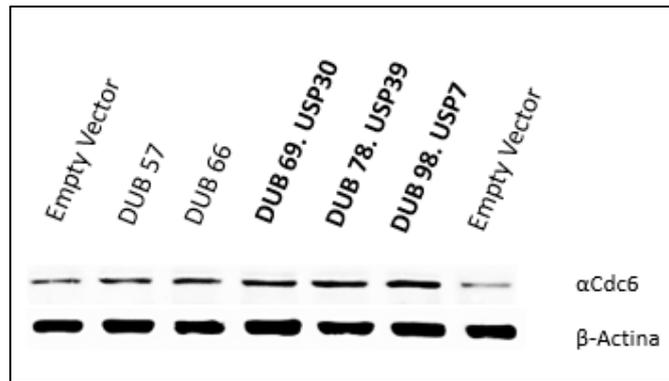


Figura 9. *Western Blot* contra Cdc6 y  $\beta$ -Actina como control de carga. Sobreexpresión de DUBs diana en HEK 293-T, doble control: EV (vector vacío).

Para comprobar que el incremento de Cdc6 que se da en los anteriores *Western Blot* es motivo de la estabilización por actuación de las DUBs y no debido a cualquier otro factor, realizamos otro *Western Blot* para el tag con el que están marcadas las DUBs de nuestra librería en el laboratorio (Figuras 10 y 11). Así, la intensidad de la banda corresponderá a la cantidad de tags que lee el anticuerpo.

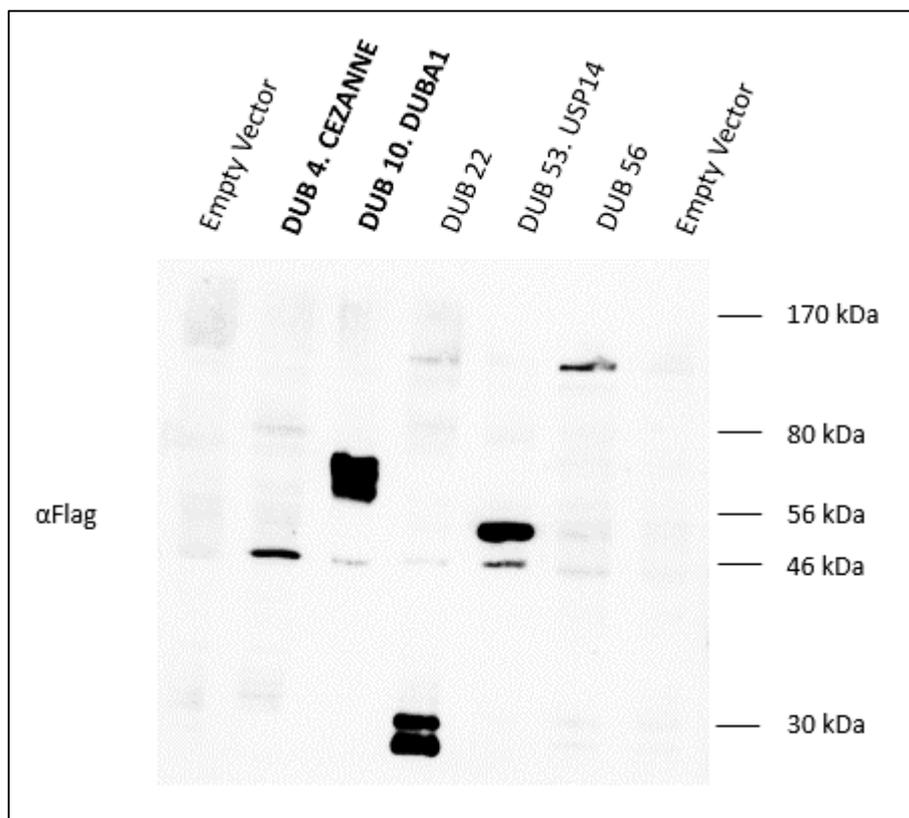


Figura 10. *Western Blot* contra Flag. Expresión del tag que marca nuestras DUBs en HEK 293-T, doble control: EV (vector vacío).

	DUB 4	DUB 10	DUB 22	DUB 53	DUB 56
<b>Peso Molecular (kDa)</b>	92.5	60.6	27.2	56.2	43.0

Tabla 3. Pesos moleculares de DUBs diana.

	DUB 57	DUB 66	DUB 69	DUB 78	DUB 98
<b>Peso Molecular (kDa)</b>	145.7	122.5	58.5	65.4	135

Tabla 4. Pesos moleculares de DUBs diana.

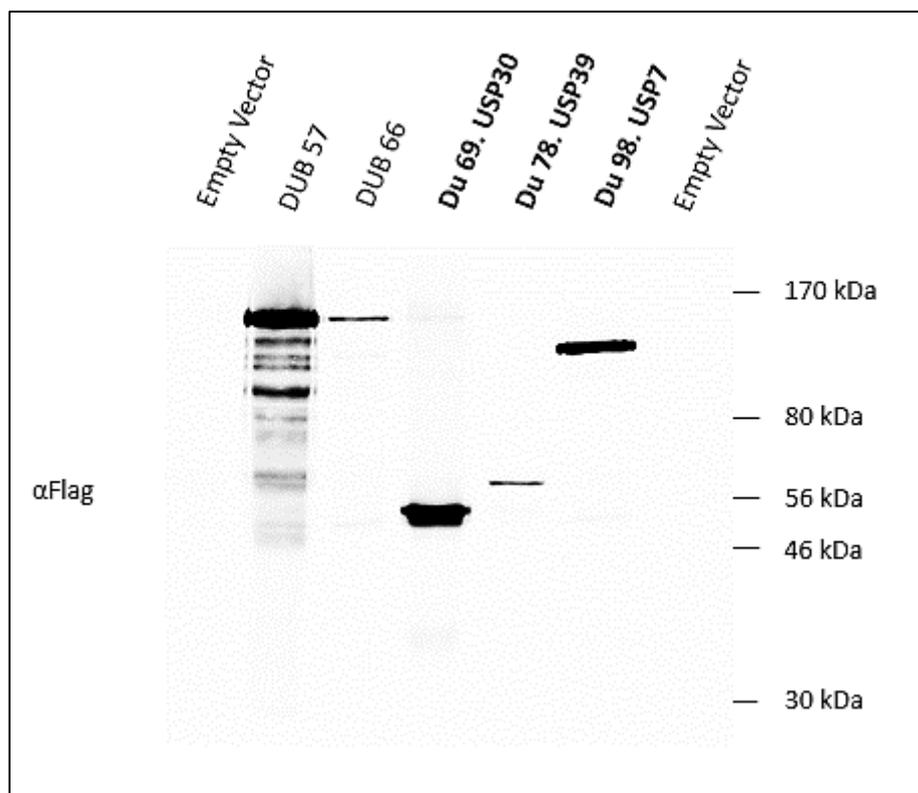


Figura 11. Western Blot contra Flag. Expresión del tag que marca nuestras DUBs en HEK 293-T, doble control: EV (vector vacío).

En los *Western Blot* mostrados en las figuras 10 y 11, observamos que el peso molecular de algunas DUBs (4, 56 y 66) no es el correspondiente como se muestra en las tablas 3 y 4. El motivo de esto puede ser que la identificación de los tags en el registro del laboratorio esté equivocada, ya que todas aparecen marcadas con Flag. Sin embargo,

las demás DUBs confirman su expresión en los *Western Blot* de sobreexpresión, ya que las bandas corresponden a su peso molecular.

Las deubiquitinas candidatas para la estabilización de Cdc6 son las siguientes:

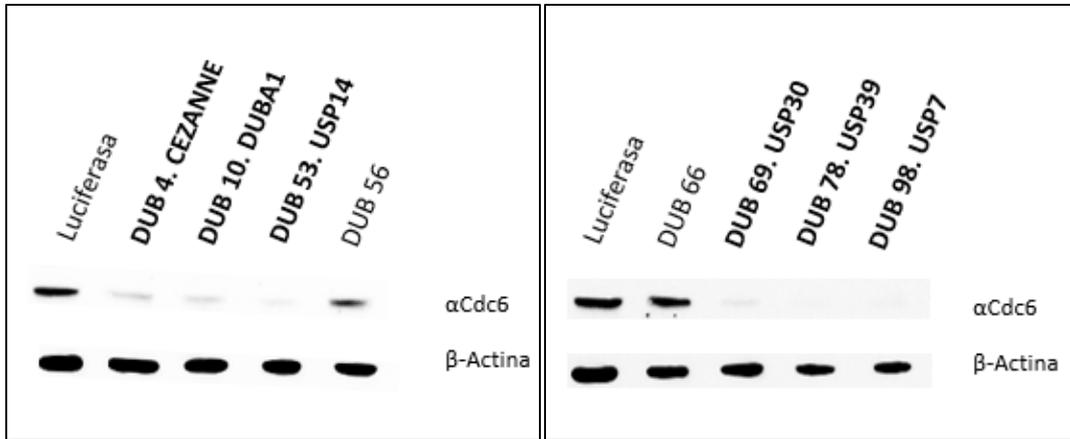
- DUB 4. Cezanne. Deubiquitina con preferencias de hidrólisis en las cadenas de ubiquitina vinculadas a la lisina 11. Cezanne regula la señalización de NF-kappa B (complejo proteico que controla la transcripción del ADN), aunque este proceso es aún desconocido (Harhaj y Dixit, 2011).
- DUB 10. DUBA1. Regulador negativo o supresor de la producción de citoquinas (IL-17A) en células T (Rutz et al., 2015).
- DUB 69. USP30. Proteasa específica de ubiquitina humana que se encuentra en la membrana mitocondrial externa y participa en el mantenimiento de la morfología mitocondrial (Nakamura e Hirose, 2008).
- DUB 78. USP39. Factor necesario para mantener el control de huso mitótico y apoyar la citoquinesis para que se lleve a cabo con éxito. Se sugiere que USP39 participa también en el control de ARNm esenciales de AURORA B, una proteína importante para la transición durante la mitosis (van Leuken et al., 2008).
- DUB 98. USP7. También conocida como HAUSP, tiene función de antagonista directo de Mdm2, la ubiquitina ligasa E3 para la proteína supresora de tumores, p53. Normalmente los niveles de p53 se mantienen bajos en parte debido a la ubiquitinación y la degradación de p53 mediada por Mdm2 (Li et al., 2002).

## **2. siRNA para Cdc6 y DUBs positivas**

Una vez observado el efecto de la sobreexpresión de las DUBs positivas en nuestro screening, estudiamos si la transfección de los oligonucleótidos interferentes revertiría el efecto estabilizador antes observado.

Como se observa en la figuras 12 y 13, las DUBs 4, 10, 53, 69, 78 y 98 de nuestra librería (DUBs Cezanne, DUBA1, USP30, USP39 y USP7 correspondientemente), bajan de forma muy significativa los niveles de Cdc6 en comparación con el control de siRNA luciferasa. Este es un resultado esperado, ya que si provocamos un silenciamiento de deubiquitinas diana, Cdc6 se verá ubiquitinada y degradada vía proteasoma.

Cabe destacar que, como no disponíamos de los anticuerpos específicos contra cada DUB, no podíamos realizar el estudio que permitía observar la disminución del nivel de proteínas. Sin embargo, contamos con secuencias nucleotídicas usadas en la literatura (plásmidos sintetizados por *Life Technologies*) y asumimos que tienen el mismo efecto.



Figuras 12 y 13. *Western Blot* para Cdc6 y como control de carga. Silenciamiento de DUBs diana en U2OS. Control: luciferasa.

Así, cinco de estas deubiquitinas coinciden con las que aumentaban la estabilidad en la sobreexpresión. Esto nos permite confirmar nuestra hipótesis de que las deubiquitinas o ubiquitín hidrolasas son capaces de controlar la estabilidad de Cdc6. Ya que a través del silenciamiento de DUBs diana, conseguimos la correcta ubiquitinación de la proteína y su consecuente degradación por proteasoma.

## **Conclusiones**

- La sobreexpresión de las DUBs Cezanne, DUBA1, USP30, USP39 y USP7 aumenta la estabilidad de Cdc6, presentándose como posibles candidatas a la estabilización de esta proteína en células HEK 293T.
- Los oligonucleótidos interferentes de las Cezanne, DUBA1, USP30, USP39 y USP7 disminuyen la estabilidad de la proteína estudio en células U2OS.

## **Conclusions**

- Overexpression of DUBs Cezanne, DUBA1, USP14, USP30, USP39 and USP7 increases the stability of Cdc6 factor, presenting as potential candidates for the stabilization of this protein in HEK 293T cells.
- siRNA of DUBs Cezanne, DUBA1, USP14, USP30, USP39 and USP7 decreases the stability of protein study in U2OS cells.

## **Agradecimientos**

Agradecer a Raimundo Freire Betancor y todo su equipo de laboratorio en el Hospital Universitario de Canarias por hacer posible el desarrollo de este proyecto, y en especial al doctorando Santiago Hernández Pérez por toda la ayuda proporcionada durante la colaboración.

## Bibliografía

- Borlado L R y Méndez J. 2008. Cdc6: from ADN replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. *Carcinogenesis*. 29 (2): 237–243.
- Clague M J y Urbé S. 2010. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell Research*. 24; 143(5): 682-5.
- Dikic I, Wakatsuki S y Walters K J. 2009. Ubiquitin-binding domains-from structures to functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10(10): 659-71.
- Fei J, Kaczmarek N, Luch A, Glas A, Carell T, Naegeli H. 2011. Regulation of nucleotide excision repair by UV-DDB: prioritization of damage recognition to internucleosoma ADN. *Plos Biology*. 9(10): e1001183.
- Harhaj E W y Dixit V M. 2011. Deubiquitinases in the regulation of NF- $\kappa$ B signalling. *Cell Research*, 21(1), 22–39.
- Hershko A y Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*. 67:425-79.
- Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W. 2002. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*. 11; 416(6881):648-53.
- Méndez J y Stillman B. 2003. Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic ADN replication origins. *Bioessays*. 25, 1158–1167.
- Michael J, Clague M J, Judy M, Coulson y Urbé S. 2012. Cellular functions of the DUBs. *Journal of Cell Science*. 125, 277-286.
- Nakamura N e Hirose S. 2008. Regulation of Mitochondrial Morphology by USP30, a Deubiquitinating Enzyme Present in the Mitochondrial Outer Membrane. *Molecular Biology of the Cell*. 19(5), 1903–1911.
- Petersen BO, Wagener C, Marinoni F, Kramer ER, Melixetian M, Lazzarini Denchi E, Gieffers C, Matteucci C, Peters JM, Helin K. 2000. Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian Cdc6 is dependent on APC-CDH1. *Genes & Development*. 14, 2330–2343.
- Rutz S, Kayagaki N, Phung Q T, Eidenschenk C, Noubade R, Wang X, Lesch J, Lu R, Newton K, Huang O W, Cochran A G, Vasser M, Fauber B P, DeVoss J, Webster J, Diehl L, Modrusan Z, Kirkpatrick D S, Lill J R, Ouyang W, Dixit V M. 2015. Deubiquitinase DUBA is a post-translational brake on interleukin-17 production in T cells. *Nature*. 19; 518(7539):417-21.
- Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K y Hanaoka F. 2005. UV-Induced Ubiquitylation of XPC Protein Mediated by UV-DDB-Ubiquitin Ligase Complex. *Cell Research*. 6; 121(3):387-400.
- Van Leuken R J, Luna-Vargas M P, Sixma T K, Wolthuis R M y Medema R H. 2008. Usp39 is essential for mitotic spindle checkpoint integrity and controls mRNA-levels of aurora B. *Cell Cycle*. 1; 7(17):2710-9.
- Walczak H, Iwai K y Dikic I. 2012. Generation and physiological roles of linear ubiquitin chains. *BMC Biology*. 10:23.
- Xu P, Duong D M, Seyfried N T, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D y Peng J. 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell Research*. 3; 137(1):133-45.