

**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“Efecto de la sobre-expresión de la ligasa de ubiquitina E3,  
Rnf19a, en un modelo celular heterólogo”**

**Autor:**  
**Eduardo de la Vega Toledo**

**Profesor Guía: Mario Párraga San Román**  
**Profesor Co-guía: Juan Villena García.**

**2014**



## AGRADECIMIENTOS

En este pequeño espacio, me gustaría agradecer a todas las personas que estuvieron acompañándome a lo largo de este proceso que resultó ser más largo de lo esperado. Primero quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio que siempre estuvieron conmigo en todo momento, especialmente a Ivo Carrasco que me guió con sus conocimientos de biología molecular, agradecer su gran disposición y amistad. A Iván Montenegro, ahora Dr. Montenegro (aunque detesta que le llamen de esa forma, por eso me referiré a partir de este momento a él como “Dr. Montenegro”). Dr. Montenegro siempre estuvo presente en los buenos y malos momentos, es un gran pilar durante mi formación, muchas gracias amigo. No puedo dejar de nombrar a Caro, Pamela y Tamara, quienes siempre están presente; compartimos muy buenos momentos durante mi estadía en Günther, risas, penas y alegrías que forjaron nuestra amistad. Agradecer también a Elizabeth, no sé si leas esto, pero gracias por la enorme paciencia que tuviste conmigo, sé que soy insoportable (además gracias por regalarme galletas).

También quiero agradecer a mi jefe, Mario Párraga por su gran disposición a ayudarme en todo momento, preocupación y guía a largo de todo este proceso. Espero poder tomarme una cerveza contigo una vez que todo acabe. Aprovechar esta instancia para darte las gracias por soportar y tolerarme durante todos estos años. A Joan Villena por sus consejos en cultivo celular y su abierta disposición sin quejas a ayudarme siempre.

Finalmente dar las gracias a mi familia por todo el apoyo demostrado durante mi estadía en el Bruno Günther. No puedo dejar de agradecer a la gente que pasado y aún queda en ese edificio por darme los mejores años desde que salí de la Universidad, especialmente a Valeria, que cambiaste mi vida por completo y haces cada día de mi un mejor hombre.

*Dedicado a todos los que me han acompañado de alguna u otra manera.*

## ABSTRACT

**Introduction:** Protein degradation constitutes one of the main systems responsible of proper cellular function and maintenance of cellular physiology. This process is directed by the Ubiquitin-Proteasome System (UPS), which catalyzes the transfer of ubiquitin into a target molecule by means of an enzymatic cascade. Rnf19a is an E3 ubiquitin ligase discretely expressed in somatic cells and highly expressed in testis. It has a centrosomal localization in all cells and a differential localization in the XY body of pachytene spermatocytes. DORFIN, the Rnf19a human orthologue, is known to target for degradation a mutant form of SOD1 which form aggregates in the brain via 26S proteasome. E3 ligase over-expression and gain of function constitutes a pathological cue in many diseases including cancer, affecting directly the balance of protein regulation/destination, and therefore, the normal cellular function. Numerous efforts are focused on the study and understanding of E3 ligases dysfunction on pathological conditions in order to develop new therapies.

In this work we explore some cellular effects of murine Rnf19a over-expression on human cells.

**Methods:** Rnf19a over-expression was carried out with transfection of a pCDNA based construct on MCF-7 cells. Cell adhesion and proliferation assays were performed in order to assess the functional effect of Rnf19a over-expression.

**Results:** Rnf19a over-expression induces drastic morphological changes in MCF7 transfected cells. Cell adhesion and proliferation are affected in these cells.

**Conclusions:** Heterologous over-expression of murine Rnf19a on MCF7 human cells induce dramatic changes over the parameter measured. It also allows delineating a possible role of this E3 ligase in living cells, regarding further experimentation.

*Keywords: Ubiquitin proteasome System, Ubiquitin E3 ligase, Rnf19a*

## RESUMEN

**Introducción:** La degradación de proteínas constituye uno de los principales sistemas responsables de la apropiada función celular y mantenimiento de la fisiología celular. Este proceso es dirigido por el sistema de ubiquitina proteasoma (UPS), el cual cataliza la transferencia de una o varias moléculas de ubiquitina a la molécula diana, mediante una cascada enzimática. Rnf19a es una ligasa de ubiquitina E3 expresada discretamente en las células somáticas y altamente expresada en testículos. Tiene una localización centrosómica en todas las células y una localización diferencial en el cuerpo XY de espermatozoides en paquitena. Se sabe que DORFIN, el ortólogo humano de Rnf19a, marca para degradación vía proteasoma 26S a una forma mutante de SOD1 que genera agregados en neuronas. Tanto la sobre-expresión como la ganancia de función de enzimas ligasas de ubiquitina E3, constituye una característica de muchas enfermedades, incluyendo el cáncer, afectando directamente el destino/regulación de proteínas y, por lo tanto, la función celular normal. En este trabajo exploramos algunos efectos celulares de la sobre-expresión de Rnf19a murino en células humanas. Varios estudios se encuentran focalizados en el estudio de enzimas ligasas de ubiquitina E3 en patologías, para el desarrollo de nuevas terapias. En este estudio, evaluamos el efecto de la sobre-expresión de la ligasa de ubiquitina E3 murina, Rnf19a en células humanas.

**Métodos:** La sobre-expresión de Rnf19a se llevó a cabo con una construcción basada en pCDNA en células MCF-7. Ensayos de adhesión celular y proliferación fueron hechos para evaluar los efectos funcionales de la sobre-expresión de Rnf19a.

**Resultados:** La Sobre-expresión de Rnf19a induce drásticos cambios morfológicos en células MCF-7 transfectadas. La adhesión celular disminuye y la proliferación aumenta en estas células.

**Conclusiones:** La sobre-expresión heteróloga de Rnf19a murino en células MCF-7 afecta la proliferación y adhesión celular. Estos resultados nos permite además delinear un posible rol de esta E3 ligasas en células vivas.

*Palabras claves: Sistema ubiquitina Proteasoma, Ligasa de ubiquitina E3, Rnf19a.*

## ÍNDICE TEMÁTICO:

Agradecimientos	Pág: iii
Abstract	Pág: iv
Resumen	Pág: v
Índice Temático	Pág: vi
Índice de figuras y tablas	Pág vii
Abreviaturas	Pág vii
A) Introducción	Pág 1
1.- Recambio proteico y ubiquitinación	Pág 1
2.- Enzimas ligasas de ubiquitina E3	Pág 3
3.- Ligasa de ubiquitina E3, Rnf19a	Pág 4
4.- Localización subcelular de enzimas ligasas de ubiquitina E3	Pág 7
4.1.- Efecto del silenciamiento y la sobre-expresión de BRCA1	Pág 8
5.- Efecto de la desregulación de E3 ligasas en Cáncer	Pág 10
6.- Motivación	Pág 11
B) Hipótesis y Objetivos	Pág 12
1 Hipótesis	Pág 12
2 Objetivos	Pág 12
2.1 Objetivo Principal	Pág 12
2.2 Objetivos Específicos	Pág 12
C) Materiales y Métodos	Pág 13
1 Generación de la construcción para la proteína de fusión Rnf19a/V5	Pág 13
2 Cultivos celulares y Transfecciones	Pág 13
3 Extracción de RNA y Retrotranscripción	Pág 14
4 Caracterización de las construcciones por PCR	Pág 15
5 Caracterización por Western Blot	Pág 15
6 Caracterización por Inmunofluorescencia	Pág 16

7 Ensayo de adhesión a sustrato	Pág 17
8 Ensayo de Proliferación con Suforodamina B (SRB)	Pág 17
<b>D) Resultados</b>	<b>Pág 19</b>
1 Construcción de la ORF de Rnf19a en pCDNA V5 His B	Pág 19
2 Mapa de la construcción Rnf19a/V5	Pág 20
3 Secuenciación de la construcción pCDNA ORF/V5	Pág 20
4 Células MCF7 transfectas con pCDNA-ORF sobreexpresan Rnf19	Pág 24
5 La sobre-expresión de Rnf19a induce cambios morfológicas en células MCF-7	Pág 28
6 La sobre-expresión de Rnf19a afecta la adhesión al sustrato en células MCF-7	Pág 29
7 La sobreexpresión de Rnf19a exógeno afecta la proliferación en células MCF-7	Pág 30
<b>E) Discusión</b>	<b>Pág 32</b>
<b>F) Conclusiones</b>	<b>Pág 37</b>
<b>G) Referencias</b>	<b>Pág 38</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS:

Figura 1	Pág 2
Figura 2	Pág 6
Tabla 1	Pág 15
Figura 3	Pág 19
Figura 4	Pág 19
Figura 5	Pág 20
Figura 6	Pág 22
Figura 7	Pág 23
Figura 8	Pág 25
Figura 9	Pág 26

Figura 10	Pág 27
Figura 11	Pág 29
Figura 12	Pág 30
Figura 13	Pág 31

## **ABREVIATURAS:**

BARD1	BRCA1-associated RING domain 1
BRCA1	Breast cancer 1
BrdU	Bromo desoxi-uridina
BSA	Albúmina sérica bovina
Cdk1	Ciclina dependiente de quinasa 1
cDNA	DNA complementario
Ckis	Inhibidores dependientes de quinasas
C-RING	Dominio RING C-Terminal
CRM1	exportin chromosome region maintenance 1
Cul 1	Cullin 1
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
DORFIN	Double ring finger
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
F-Box	Caja-F
G-418	Geniticina
GEG	Genes expresados en gametogénesis
HECT	homologous to E6-AP carboxy terminus
HPV	Virus humano del Papiloma
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MGP	Mosquito gonadal protein
M-MLV	Moloney-Murine Leukemia Virus
mRNA	RNA mensajero
Nedd4	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated

	protein 4
NES	Señal de Exporte nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
N-RING	Dominio RING N-Terminal
ORF	Open read frame
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pRB	fosfo-Retinoblastoma
Rbx	Ring box protein
RING	Really interesting new gene
RNA	Ácido ribonucleico
Rnf19a	Ring finger 19 <sup>a</sup>
r-SMAD	SMAD regulado por receptor
RT	Retrotranscriptasa
SCF	Skp1, Cullin, F-box
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	short interference RNA
Skp	Seventeen kilodaltons protein
SMAD	SMA (small body size) y MAD (mother against decapentaplegic)
Smurf 1 ó 2	Smad ubiquitylation regulatory factor 1 ó 2
SOD1	Superóxido dismutasa 1
SRB	Surlforodamina B
TBS	Buffer tris salino
TBST	Buffer tris salino con tween-20
TGF-β	Transforming growth factor- β
Ubc3	Ubiquitin conjugating 3
Ubc4	Ubiquitin conjugating 4
Ubc5	Ubiquitin conjugating 5
UbcH7	Ubiquitin conjugating 7
UbcH8	Ubiquitin conjugating 8
U-Box	RING-like-U-box
UTR	Untranslated region
WWP1	WW domain-containing protein 1

## **A) Introducción:**

### **1.- Recambio proteico y ubiquitinación:**

La dinámica del recambio proteico en la célula consiste en una constante producción, reciclaje y degradación de las proteínas, lo cual mantiene la homeostasis del sistema; donde son reemplazadas proteínas senescentes, mal plegadas o dañadas. Este proceso es ubicuo y conservado a través de la evolución (Marin 2013), siendo caracterizado en gran variedad de modelos. Además, se puede afirmar que todas las proteínas son reemplazadas a una tasa específica según su vida media la cual va desde unos pocos minutos a períodos mayores a 60 horas (Dice 1987), dependiendo de la regulación en una ventana de tiempo en particular o frente a requerimientos específicos que afectan la tasa de degradación de proteínas.

Se han descrito hasta la fecha tres posibles mecanismos de degradación proteica, los cuales difieren en la maquinaria celular empleada. 1) La degradación de proteínas extracelulares y algunas proteínas de membrana ocurre en el sistema vacuolar (endosoma/lisosoma), el cual es rico en enzimas proteasas (Mabb and Ehlers 2010). 2) Otro mecanismo de degradación proteica está dado por autofagia, también ligado al sistema de endovesículas, en este caso provenientes del retículo endoplásmico (Zhang and Qian 2011). También se ha caracterizado esta vía en situaciones patológicas como el cáncer (Kon, Kiffin et al. 2011). 3) Finalmente el mecanismo responsable de la mayor parte de la degradación de proteínas en la célula es el sistema de ubiquitinación de proteínas y su posterior reconocimiento con una alta especificidad por el complejo proteasoma 26S.

La reacción de ubiquitinación es un proceso finamente regulado en la célula; requiere de tres tipos de enzimas: enzima activadora de ubiquitina (E1), enzima de conjugación de ubiquitina (E2) y enzima ligasa de ubiquitina (E3) (Figura 1). En gran parte de los organismos existe sólo un tipo de enzima activadora de ubiquitina, la cual inicia la cascada de ubiquitinación. La reacción comienza con la unión de un conjugado de MgATP con una molécula de ubiquitina, lo que conduce a la formación de un intermediario adenilato-ubiquitina que sirve como donante de ubiquitina a una cisteína reactiva en el

sitio activo de la enzima E1 (Pickart 2001). Una vez que se ha generado el complejo ubiquitina-E1, ésta se encuentra activada, la ubiquitina es transferida a una enzima E2 en un residuo activo de cisteína. Finalmente el último paso es catalizado por la enzima ligasa de ubiquitina (E3) la cual es específica de su sustrato, donde la ubiquitina es unida covalentemente al extremo carboxilo terminal de la proteína diana en un enlace isopeptídico de un amino-ε con un residuo lisina de la ubiquitina (Hershko and Ciechanover 1998). Además se pueden formar multicomplejos proteicos que incluyen proteínas adaptadoras además de las enzimas E2 y E3, de esta forma se consigue una alta especificidad en este sistema.

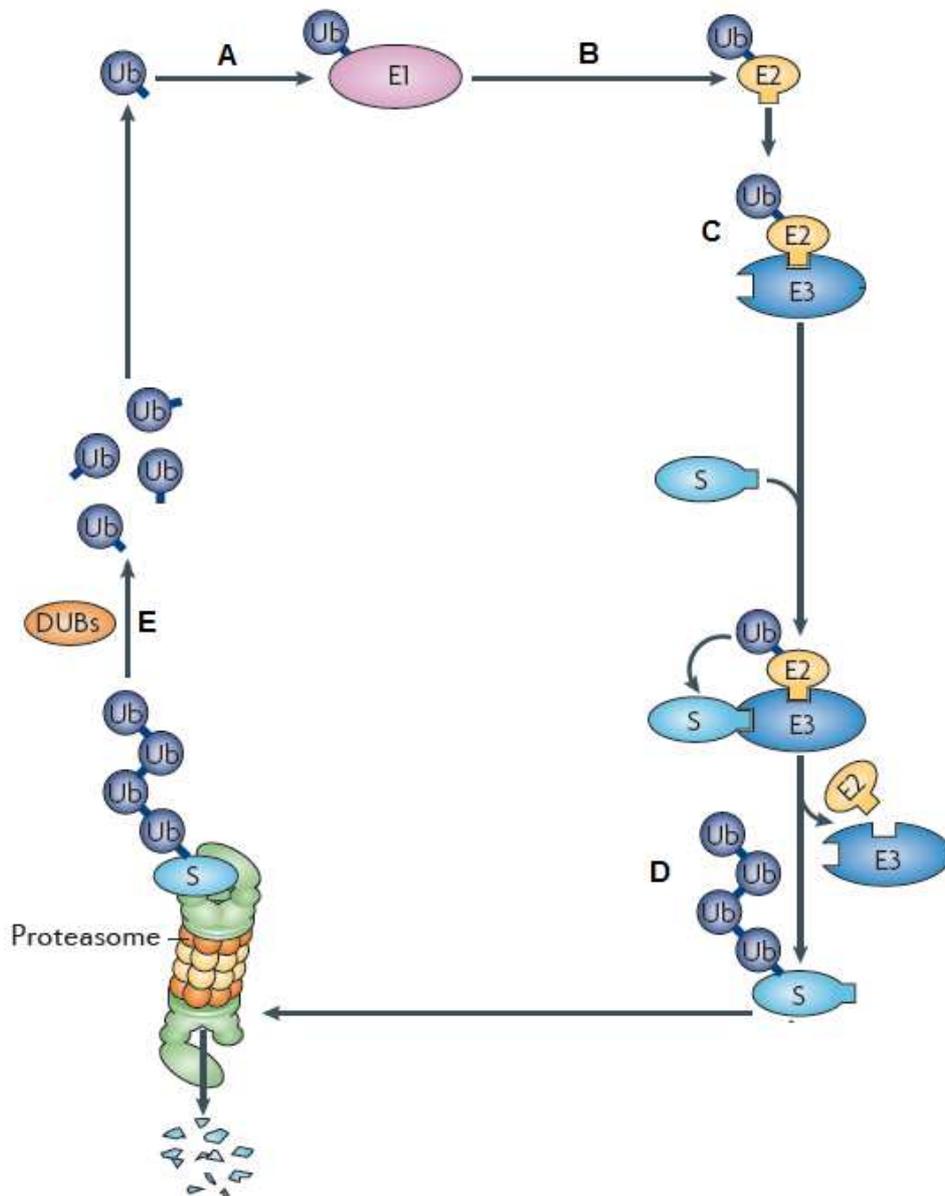


Figura 1: La ubiquitina es activada por la enzima activadora de ubiquitina, E1 (A). Una vez activada, el residuo de ubiquitina es transferido a la enzima conjugadora de ubiquitina, E2 (B) y se produce la interacción con una ubiquitina E3 ligasa (C). El complejo E3-Ubiquitina-E2, cataliza la transferencia de la molécula de ubiquitina a la molécula diana, funcionando la E3 ligasa como un puente entre la proteína diana y la enzima E2. Esta secuencia final se repite un número determinado de veces, generando una cadena de poli- ubiquitina (D), marcando de esta forma a la proteína diana para ser degradada por el proteasoma 26S. Las moléculas de ubiquitina son finalmente recicladas con la colaboración de enzimas desubiquitinantes (E), las cuales pueden volver a ser activadas nuevamente por E1. Ub: Ubiquitina, S: sustrato, E1: enzima activadora de ubiquitina, E2: enzima coconjugante de ubiquitina, E3: enzima ligasa de ubiquitina, DUB: Enzimas desubiquitinantes (Weissman, Shabek et al. 2011).

## 2.- Enzimas ligasas de ubiquitina E3:

Las ligasas de ubiquitina E3 conforman la familia de enzimas del sistema de ubiquitinación más numeroso; hasta la fecha se han descubierto más de 500 ligasas E3 diferentes en humano (Wenzel, Stoll et al. 2011). Se han descrito dos tipos de Enzimas E3, las tipo HECT (homologous to E6-AP carboxy terminus) y las tipo RING (really interesting new gene) finger. También se pueden encontrar ligasas E3 con un dominio U-box (RING-like-U-box) las cuales son funcionalmente similares a las ligasas E3 con dominio RING finger. El mecanismo de transferencia de los dos tipos de ligasas de ubiquitina difiere en los tipos de interacciones que se producen; las ligasas tipo HECT transfieren la ubiquitina a un residuo de cisteína dentro del dominio HECT formando un enlace tiol-éster de alta energía con la ubiquitina, catalizando directamente la transferencia de la ubiquitina a la molécula diana (Kim and Huibregtse 2009). En tanto las ligasas con dominio RING finger poseen un dominio que consiste en una serie de residuos de histidina y cisteína cuya secuencia consenso está dada por Cys-X2-Cys-X9-39-Cys-X1-3-His-X2-3-Cys/His-X2-Cys-X4-48-Cys-X2-Cys, donde X representa cualquier aminoácido (Freemont 2000). Estudios bioquímicos han permitido demostrar que el motivo de tipo RING finger se encuentra en coordinación con dos átomos de Zinc en un “arreglo de abrazadera entrecruzado” (*cross-brace arrangement*). El dominio de tipo RING finger es el responsable de mediar las interacciones proteína-proteína entre la proteína diana y el complejo E2-

ubiquitina funcionando como un andamiaje y catalizando la transferencia de la ubiquitina directamente a la proteína diana sin la generación de un intermediario (Zheng, Wang et al. 2000), de esta forma las ligasas de ubiquitina con dominio RING finger tienen una función de conexión y de aproximación entre la enzima E2 y la proteína diana.

### **3.- Ligasa de ubiquitina E3, Rnf19a:**

Rnf19a es una enzima ligasa de ubiquitina E3 que fue aislada a partir de una genoteca generada desde ovarios de feto de ratón de una edad de 16 días después del coito; para ello se generó una biblioteca de cDNA donde cada clon se llamó como GEG (genes expresados en gametogénesis). GEG-154 se encontró que se expresaba altamente en testículo, encontrándose dos transcritos de aproximadamente 4Kb y 2.5Kb. (Lopez-Alanon and del Mazo 1995). Rnf19a fue inicialmente nombrada por Párraga y del Mazo como XYbp (XY body protein), debido a su localización en el cuerpo XY de espermatozoides en paquitena, mediante técnicas de inmunofluorescencia (Parraga and del Mazo 2000). El cuerpo XY corresponde una región de cromatina heteromórfica, donde ocurre la recombinación entre los cromosomas X e Y durante la meiosis (Kralewski and Benavente 1997), además, en esta región la cromatina se encuentra altamente condensada por lo que la transcripción se encuentra inhibida, en un proceso llamado inactivación de cromosomas sexuales en meiosis, dado principalmente por la fosforilación de la Histona H2A (Fernandez-Capetillo, Mahadevaiah et al. 2003). Además de encontrarse la señal de Rnf19a en el cuerpo XY, se encontró una señal de localización periférica que co-localiza con  $\gamma$ -tubulina, un marcador de centrosoma; ensayos de inmunofluorescencia realizados en células NIH-3T3, de fibroblastos de ratón, confirman estos resultados, donde se puede observar que la señal de  $\gamma$ -tubulina coincide con la de Rnf19a a lo largo de la división celular (Figura 2). También se ha localizado Rnf19a durante la espermatogénesis de rata, con una localización centrosómica, participando en la organización del aparato de acople cabeza-cola, donde interactúa con Psm3, un componente de la caperuza 19S del proteasoma 26S. Además se ha demostrado su co-localización con ubiquitina, membrana acrosómica interna y externa y el aparato de acople cabeza-cola (Rivkin, Kierszenbaum et al. 2009). Rnf19a se

ha caracterizado bien en humano, donde su ortólogo recibe el nombre de DORFIN (Double Ring Finger protein). Se ha encontrado que también tiene una localización centrosómica corroborado en células HEK-293T (Niwa, Ishigaki et al. 2001). Los estudios realizados en DORFIN, se han realizado principalmente en cerebro humano, donde se ha demostrado una posible relación entre una disminución de su actividad E3 ligasa y Parkinson (Niwa and Sobue 2003); esto se explica por los altos niveles de superóxido dismutasa mal plegada encontrados en cerebros de pacientes con Parkinson, la cual es la proteína diana de DORFIN (Niwa, Ishigaki et al. 2002). Otra diana de DORFIN corresponde a Sinfilina 1. Se postula que la ubiquitinación de SOD1 mutante y de Sinfilina 1 es crucial para impedir la formación de inclusiones en los cuerpos de Lewis en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (Ito, Niwa et al. 2003). En ratones transgénicos con esclerosis lateral amiotrófica con SOD1 mutada, se ha demostrado que la sobre-expresión de DORFIN, disminuye la acumulación de SOD1 mutada en la médula espinal de ratas mutantes (Sone, Niwa et al. 2010). DORFIN además interactúa con las enzimas conjugadoras de ubiquitina UbcH7 y UbcH8, a través de su dominio RING finger. (Niwa, Ishigaki et al. 2001). Estudios en preparaciones histológicas de varios tipos de tumores en humano, sugieren un aumento en la expresión de RNF19A en fibroblastos y miofibroblastos asociados al tumor (Bozoky, Savchenko et al. 2013). Por otro lado, RNF19A aparece como un interesante biomarcador en la detección de cáncer de próstata, encontrándose un incremento de ~2 veces de los niveles de mRNA de RNF19A en pacientes con cáncer de próstata (Bai, Hwang et al. 2012).

A nivel de estructura de la proteína Rnf19a, esta se compone de un dominio *In between ring* y dos dominios de tipo *RING finger*, respondiendo a la estructura tipo RBR (*Ring between Ring domain*) donde al dominio N-RING se unen 2 átomos de Zinc y al dominio C-RING en una conformación específica denominada como de abrazaderas cruzadas (*Cross-brace*) (Eisenhaber, Chumak et al. 2007). Recientemente se ha sugerido que el dominio C-RING del ortólogo de Rnf19a en humano, DORFIN, no tendría actividad catalítica, sino que más bien se trataría de un dominio de regulación negativa de la actividad de la enzima. Esta característica funcional ya fue demostrada en Parkin, una enzima ligasa de ubiquitina E3 relacionada estructuralmente a DORFIN

(Chaugule, Burchell et al. 2011) y en ligasas de ubiquitina E3 de la familia Ariadne (Duda, Olszewski et al. 2013). También se han descrito tres señales de localización nuclear adyacentes a los dominios tipo RING finger. Los sustratos de Rnf19a tanto en el cuerpo XY de espermatoцитos en paquitenia como en el centrosoma aún no han sido descritos, tampoco se conocen las enzimas de conjugación de ubiquitina E2 que interactúan con Rnf19a. Por otro lado, en mosquito (*Aedes aegypti*), se caracterizó el producto de un gen putativo altamente expresado en gónadas, MGP, que presenta un 60% de identidad con Rnf19a. La comparación estructural, mediante alineamiento de secuencias *in silico* de las regiones catalíticas de Rnf19a se ha determinado que presentan una homología del 100% entre ratón, rata y humano (Rivkin, Kierszenbaum et al. 2009).

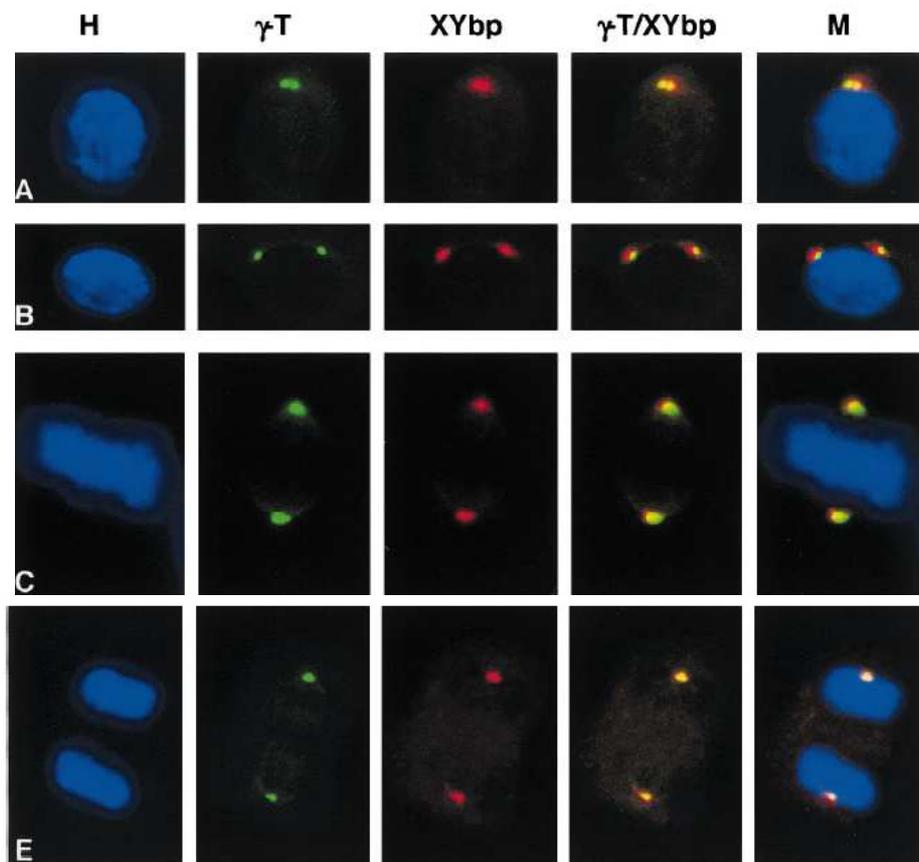


Figura 2: Co-localización de Rnf19a en células NIH3T3 con  $\gamma$ -tubulina (un marcador de centrosoma) a lo largo de las fases de la división celular (A-E). La polarización de los centrosomas va ligada a una interacción con Rnf19a. H: Hoescht,  $\gamma$ -T:  $\gamma$ -tubulina, XYbp: Rnf19a, M: Merge (Parraga and del Mazo 2000).

#### **4.- Localización subcelular de enzimas ligasas de ubiquitina E3:**

La localización subcelular de proteínas en los distintos compartimentos es un fenómeno que se encuentra altamente regulado, ya sea por i) modificaciones post-traduccionales (fosforilación, ubiquitinación) que modifican su destinación o ii) interacción con proteínas accesorias (chaperonas, 14-3-3), que enmascaran señales de localización (NLS, KDL) a los distintos compartimentos subcelulares. Este fenómeno se ha descrito en enzimas ligasas de ubiquitina E3. Una ligasa de ubiquitina E3 de localización centrosómica bien caracterizada es SCF: Skp1, Cullin, F-box (Freed, Lacey et al. 1999). El multicomplejo SCF contiene el componente Cullin 1 (Cul1) que actúa como proteína de andamiaje, interactuando con el extremo amino de la proteína adaptadora Skp1 y el extremo carboxilo de la proteína RING finger Rbx1, además de interactuar con enzimas E2 específicas, tales como Ubc3, Ubc4 o Ubc5. Asimismo interactúa con el componente F-Box del complejo, el cual determina la especificidad por el sustrato (Cardozo and Pagano 2004). Su función es asegurar la progresión a través del ciclo celular controlando las transiciones G1/S y G2/M, principalmente ubiquitinando y marcando para degradación los inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas (CKis) p27 y p21 y específicamente la ciclina E, permitiendo la progresión de G1/S tanto *in vivo* como *in vitro*. (Frescas and Pagano 2008). Interesantemente los componentes de SCF, Skp1 y Cullin, presentan una localización tanto en el centrosoma como en el núcleo (Freed, Lacey et al. 1999), siendo predominantemente centrosómica durante la división celular. Ensayos *in vitro* han demostrado cierta redundancia en proteínas tipo F-Box en su preferencia por sustratos del complejo SCF, pero al analizar su actividad *in vivo*, se puede observar que la especificidad determinada por SCF está estrechamente ligada a la localización subcelular del componente F-Box que determina la especificidad del complejo (Landry, Doyle et al. 2012). La localización diferencial de F-box estaría dada por el complejo exportina 1 (CRM1) el cual media la exportación nuclear de proteínas que contienen secuencias de exportación nuclear (Nelson and Laman 2011). De manera similar a SCF, Rnf19a tiene esta localización subcelular dual bien definida tanto en el centrosoma como en el núcleo, ligada al cuerpo XY, lo cual puede hacer suponer de una regulación similar de la especificidad por sustratos específicos

de Rnf19a de manera diferencial tanto en el compartimento nuclear como el citosólico, y que esta especificidad podría estar dada por proteínas accesorias específicas no determinadas aún.

Otra enzima ubiquitina ligasa de ubiquitina E3 con una localización subcelular dual es Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*). Esta ligasa de ubiquitina E3, a diferencia de Rnf19a pertenece a la familia HECT, este tipo de enzima une de manera covalente la ubiquitina a una cisteína en su dominio HECT, para luego transferirla a la molécula diana, catalizando tanto monoubiquitinación como poliubiquitinación de diversos sustratos. Nedd4 posee señales de localización nuclear (NLS) y una señal de salida del núcleo (NES), siendo su localización preferentemente citoplasmática; se ha demostrado que en células HeLa tratadas con la droga leptomicina B, la cual bloquea el transporte dependiente de CRM1, se induce la acumulación de Nedd4 en el núcleo, lo cual sugiere que su localización es tanto citoplasmática como nuclear, siendo esta última transitoria (Laine and Ronai 2007). Este cambio en su localización además promueve que sustratos nucleares de Nedd4 aumenten su tasa de degradación.

#### **4.1.- Efecto del silenciamiento y la sobre-expresión de BRCA1:**

Finalmente, la ligasa de ubiquitina E3 que presenta un patrón de localización similar a Rnf19a es BRCA1 (*Breast cancer 1*). Esta enzima cuando heterodimeriza con BARD1 (*BRCA1-associated RING domain 1*), genera un complejo con actividad E3 ligasa, pudiendo localizarse en el centrosoma o en el núcleo. Interesantemente BARD1 enmascara la señal NES de BRCA1 (Brzovic, Rajagopal et al. 2001), impidiendo su exportación dependiente de CRM1. Para que BRCA1 vuelva a ser localizada en el citoplasma y reclutada en el centrosoma, este complejo debe disociarse (Fabbro and Henderson 2003; Henderson 2005; Thompson 2010). Se sugiere que cuando BRCA1 se localiza en el centrosoma tiene un rol en la regulación de la duplicación del centrosoma. Ensayos de pérdida de función de BRCA1 han permitido mostrar que el silenciamiento mediado por siRNA de BRCA1 en células Hs578T arrestadas en fase S del ciclo celular presentan una nucleación desregulada de los microtúbulos, con un patrón similar observado a la formación del Áster (Sankaran, Starita et al. 2005); este efecto puede deberse a que células en

fase S presentan centrosomas quiescentes debido a la actividad de BRCA1 que inhibiría la asociación de  $\gamma$ -tubulina al centrosoma. Por otro lado, en las mismas células Hs578T, pero en condiciones que permiten su adecuada proliferación, al silenciar BRCA1 se observa un aumento en el número de centrosomas, posiblemente debido a que la ubiquitinación de  $\gamma$ -tubulina es dependiente de BRCA1 (Starita, Machida et al. 2004); en este mismo trabajo se muestra que células que no son de estirpe mamaria no presentan este aumento en el número de centrosomas.

El efecto de la sobre-expresión de BRCA1 también ha sido estudiado en distintos modelos. Se sabe que la ciclina Cdk1 es requerida para el transporte de BRCA1 al núcleo a sitios de daño en el DNA donde BRCA1 funciona como proteína de andamiaje que inicia una cascada de señalización que conduce al arresto en fase S en respuesta a daño en el DNA y al reclutamiento de otras proteínas relacionadas con reparación del DNA (Johnson, Cai et al. 2009). La sobre-expresión de BRCA1 o Cdk1 produce un efecto no esperado, consistente en un aumento en la densidad de la cubierta de  $\gamma$ -tubulina en microtúbulos aumentando su estabilidad, esto sugiere un nuevo rol para la ubiquitinación de  $\gamma$ -tubulina dependiente de BRCA1, donde  $\gamma$ -tubulina no sería marcada para degradación si no que presentaría una función diferencial en respuesta al daño al DNA dependiendo de sus estado de ubiquitinación (Hubert, Vandekerckhove et al. 2011). En otro trabajo donde se sobre-expresó BRCA1 en células de mama MCF7 se observó una respuesta de una disminución de la proliferación en presencia de Levastatina, medida por incorporación de BrdU (Bromo-deoxyuridina), además de una disminución en la acumulación de proteína Cdk4, ciclina D1 y pRb y un aumento en los niveles de proteína p21 (Yu, Luo et al. 2008). En línea con estos estudios se ha demostrado un aumento en la sensibilidad a drogas usadas en quimioterapia al sobre-expresar BRCA1 en células DU-145, observándose también un incremento en la apoptosis de estas células, debido a la inducción de arresto en la fase G0/G1 (Fan, Wang et al. 1998).

##### **5.- Efecto de la desregulación de E3 ligasas en Cáncer:**

Como se mencionó en el apartado anterior BRCA1 regula el número de centrosomas en células de estirpe mamaria, no observándose este efecto en

células no relacionadas al tejido mamario. Esto explica que mutaciones de BRCA1 que afecten su función son susceptibles a generar un cáncer de mama. Hay un gran número de ligasas de ubiquitina E3 que se encuentran sobre-expresadas en cáncer, a continuación se revisan algunas.

En condiciones normales p53 interactúa con la ligasa de ubiquitina E3 MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog*), la que poliubiquitina a p53 para su degradación vía proteasoma 26S. Frente a daño en el DNA, p53 sufre una serie de modificaciones post-traduccionales que terminan por estabilizar a la proteína, disociarla de MDM2 y destinarla al núcleo (Lavin and Gueven 2006). Se ha observado que células infectadas con las cepas de alto riesgo de HPV (16 y 18) comienzan a sobreexpresar la oncoproteína E6. Ésta puede a su vez formar un complejo con la ligasa de ubiquitina E3 E6-AP y formar un trímero con p53 (E6:E6-AP:p53), el que cataliza rápidamente la transferencia de ubiquitina a p53 siendo este degradado por el proteasoma (Huibregtse, Scheffner et al. 1991; Bernard, Robinson et al. 2011); este ejemplo no constituye directamente una sobreexpresión de la ligasa de ubiquitina, pero sí una ganancia de función.

WWP1 (*WW domain-containing protein 1*), es otro caso interesante de ligasas de ubiquitina E3 sobreexpresadas en cáncer. Se ha encontrado que cerca de un 40% de los tumores primarios de próstata y mama tienen amplificación del gen de WWP1 (Chen, Sun et al. 2007; Chen, Zhou et al. 2007). Se ha demostrado que p53 es sustrato de WWP1 y que esta enzima cataliza la transferencia de ubiquitina generando cadenas de poliubiquitina en enlaces de lys-48. Este tipo de modificación no aumentaría la tasa de degradación de p53 como ocurre con la oncoproteína E6, si no que facilitaría su exporte del núcleo, dejando menos p53 disponible para la activación de genes dependientes de p53 (Laine and Ronai 2007).

Otra ligasa de ubiquitina E3 que se encuentra sobreexpresada en cáncer es Smurfs (*Smad ubiquitylation regulatory factor 1 ó 2*). Esta enzima antagoniza la vía de TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor-  $\beta$* ), mediante la degradación de proteínas tipo Smad. (Izzi and Attisano 2004). La señalización por TGF-  $\beta$  puede fosforilar a los R-Smad (Smads regulados por receptor), entre ellos Smad2 que puede estar involucrado en la inhibición del crecimiento celular. (Feng, Lin et al. 2000). Smad2 es sustrato de Smurfs, por lo que una sobre-regulación de Smurf

afecta a los niveles de proteína de Smad2, causando su disminución, y favoreciendo la señal de proliferación dada por otras Smad dependientes de la señal de TGF- $\beta$ . Esta regulación ha sido documentada en carcinoma escamoso de esófago donde pacientes con altos niveles de Smurf presentan un peor pronóstico.(Fukuchi, Fukai et al. 2002).

## **6.- Motivación:**

Rnf19a presenta una localización dual en la célula, comprobado por ensayos de inmunofluorescencia donde la proteína se ha localizado en el cuerpo XY de espermatozoides en paquitena y en el centrosoma en todas las células. Se ha reportado de numerosas enzimas ligasas E3 de ubiquitina que tienen localización en distintos compartimentos de la célula que regularían diversos procesos celulares. Por otro lado, se ha demostrado que hay E3 ligasas localizadas en los centrosomas que regulan la nucleación y cantidad de los mismos. De esta forma nos preguntamos si una sobre-expresión de Rnf19a tendrá efecto sobre la célula, y cuales son los efectos que podrían observarse. A esto añadimos que poco es sabido acerca de Rnf19a en células somáticas exceptuando los reportes del grupo de Niwa en cerebro humano y en cultivos celulares.

De esta forma, en base a los antecedentes expuestos nos planteamos la hipótesis señalada en la página siguiente.

## **B HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:**

### **1 Hipótesis:**

La sobre-expresión heteróloga de Rnf19a en células MCF-7 altera la proliferación y adhesión celular.

### **2 Objetivos:**

#### **2.1 Objetivo Principal:**

-Determinar los efectos sobre algunos aspectos de la función celular al sobre-expresar Rnf19a en células humanas MCF-7.

#### **2.1 Objetivos Específicos:**

-Generar y caracterizar un modelo de expresión heterólogo estable de expresión de Rnf19a en células MCF-7

-Evaluar diferencias en los parámetros de proliferación celular y adhesión de las células que sobre-expresan Rnf19a.

## C METODOLOGÍA:

### 1 Generación de la construcción para la proteína de fusión Rnf19a/V5:

La región codificante completa del mRNA de *Rnf19a* se amplificó mediante PCR, usando para ello los siguientes oligonucleótidos: ORF\_U:5' – AAGCTTATGCAAGAACAAGAAATAAGTTTT-3' y ORF\_L:5'-GAACCCGCGGAATTTCACTGGACAGCAA-3'. El texto subrayado indica los adaptadores añadidos que contienen las dianas de restricción *Hind*III (*ROCHE, Francia*) y *Sac*II (*NEB, Inglaterra*) respectivamente. En el oligonucleótido antisentido, el codón de STOP (TGA) presente en la secuencia de Rnf19a, fue eliminado. El fragmento amplificado de Rnf19a fue clonado en la región de multiclonaje del vector pCDNA-V5 His B (*Invitrogen, USA*), previa digestión del fragmento de PCR y del plásmido con las enzimas de restricción señaladas arriba. La construcción fue llamada pCDNA-ORF. La transformación se realizó en bacterias *E. Coli* de la cepa DH5- $\alpha$  en medio LB suplementado con 100 $\mu$ g/mL de Ampicilina (*USBiological, USA*). Una vez aisladas las colonias, se extrajo el DNA plasmídico con el Kit EZNA Plasmid Mini Kit II (*Omega Biotek, USA*), de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. La fidelidad de la construcción se verificó por secuenciación con el reactivo BigDye Terminator V1.1 (*Applied Biosystems, USA*). Las muestras de DNA plasmidial obtenidas fueron inyectadas en el equipo de electroforesis capilar ABI Prism 310 (*Applied biosystems*). Los datos fueron analizados con el software Sequencing Analysis software version 5.2 (*Applied Biosystems, USA*).

### 2 Cultivos celulares y Transfecciones:

Células MCF7 (*ATCC: HTB-22*) fueron crecidas en placas de 6 pocillos, sembrándose una densidad de  $2 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (*Biological Industries, Israel*) 100U/mL de penicilina, 100 $\mu$ g/mL de estreptomina (*Biological Industries, Israel*) y 1mM de glutamina por un período de 24 horas hasta un 50-70% de confluencia. Para realizar las transfecciones se utilizó el reactivo TransIT-LT1 (*Mirus, USA*), acorde a las instrucciones sugeridas por el fabricante. Se realizó la transfección de células MCF7 con la construcción

pCDNA-ORF y un control de transfección sólo con TransIT-LT1. A las 48 horas se comenzó a realizar la selección con antibiótico G-418 (*Hyclone, USA*) a una concentración final de 3.0 µg/mL durante 4-5 días. Una vez observada la formación de colonias las placas fueron lavadas rigurosamente con PBS 1X y se aislaron 6 colonias usando anillos de clonación. El área delimitada con el anillo, correspondiente al clon se trató con 100 µL de 0.05% Tripsina-EDTA (*Biological Industries, Israel*) durante 5 minutos a 37°C. Las células fueron despegadas de la placa mediante pipeteo suave y traspasadas a un tubo de microcentrífuga con 800 µL de medio de cultivo. Finalmente las células fueron centrifugadas a 3200 rpm durante 5 minutos y resuspendidas en 500 µL de medio para ser traspasadas a placa de 24 pocillos. Las células se dejaron crecer hasta un 80% de confluencia en medio suplementado con 3 µg/mL de G-418, de las cuales sólo crecieron tres clones nombrados como MCF7-C1, MCF7-C2 y MCF7-C5. Finalmente fueron expandidos en placa de 100 mm y se congelaron varias alícuotas de cada clon.

### **3 Extracción de RNA y Retrotranscripción:**

Se sembraron las células transfectadas y MCF-7 WT en placa de 100mm a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/placa y se dejaron crecer hasta un 80% de confluencia. Antes de extraer el RNA, se lavaron las placas con PBS 1X frío. Luego se añadió 1 mL de TRIzol® Reagent (*Invitrogen, USA*) para extraer el RNA total según las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el RNA, se realizó un tratamiento con DNasa RQ1 (*Promega, USA*) a partir de 4µg de RNA. Se continuó con la síntesis de cDNA separando la reacción anterior en dos tubos con 2 µg de RNA cada uno, para síntesis de cDNA y un control de RT-. La reacción de retrotranscripción se realizó añadiendo por tubo 250ng de Random primers (*Promega, USA*), 500nM de dNTP mix y agua DEPC hasta completar 12 µL. La mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. Luego a cada tubo se le añadieron 4 µL de Buffer de reacción 2 µL de 0.1 M de DTT y 1 µL de RNAsin (40U/µL) (*Promega, USA*) y se incubó durante 37°C por 2 minutos. Luego se añadió a los tubos de síntesis de cDNA 1 µL de enzima M-MLV RT (*Invitrogen, USA*) y se incubó por 10 minutos a 25°C. La síntesis se realizó a 37°C durante 50 minutos. Para inactivar la enzima se incubó por 15 minutos a 70°C.

#### 4 Caracterización de las construcciones por PCR:

Usando como molde el cDNA sintetizado, se realizó PCR con oligonucleótidos internos de la ORF de Rnf19a (Humano y ratón), específicos de la construcción ORF-V5 y con oligonucleótidos específicos para GAPDH humano como housekeeping (Tabla 1). Las condiciones experimentales para los PCR fueron: 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 400nM de oligonucleótidos, 1U de DNA Polimerasa (*GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase 500U, 5U/μL, Promega, USA*), dNTP mix 0,2nM y 1X buffer (*colorless goTaq Flexi buffer pH 8,5*). El programa utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos. La amplificación se realizó en un ciclo de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, seguido de un paso de anillamiento a 57°C para cada pareja de oligonucleótidos durante 30 segundos y un último de extensión a 72°C por 30 segundos; se repitió esta secuencia 35 veces. Finalmente se realizó un ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 2% con 50μg/mL de bromuro de etidio (*Merck, USA*) a una diferencia de potencial de 5V/cm.

Tabla 1:

Secuencia de oligonucleótidos	Diana	Tamaño del producto
Rnf19 U: CTGTCTGTAATCGTGTCTCC Rnf19 L: CATCAGTAGCAGAAGCAAGG	Secuencia interna de Rnf19a (Humano y ratón) Correspondiente a la ORF	231bp
ORF_V5_U: TGGTGGATTTGTGTTTTGGTG ORF_V5_L: GAGGGTTAGGGATAGGCTTAC	Primer ORF_V5_U anilla con secuencia interna de Rnf19a ratón y ORF_V5_L que anilla con la secuencia de V5.	153bp
GAPDH_U: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC GAPDH_L: GAAGATGGTGATGGGATTC	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa Humana	226bp

#### 5 Caracterización por Western Blot

Se sembraron las células MCF-7 WT, y las transfectadas (MCF7 C1, C2 y C5) a una densidad de 5x10<sup>4</sup> células/placa y se dejaron crecer hasta un 60% de confluencia, luego fueron tratadas por 16 horas con 2μM del inhibidor general del proteasoma MG-132 (*Calbiochem, USA*). Las células fueron cosechadas por tripsinización; la tripsina fue neutralizada con medio con 10% de SFB y centrifugadas a 3200 rpm por 5 minutos. Luego fueron resuspendidas

en 300  $\mu$ L de buffer de extracción (50mM Tris pH 8.0; 150mM NaCl; 1.0% NP-40) con 1/100 de mezcla de inhibidor de proteasas (*Calbiochem, USA*) y se lisaron con agitación en hielo durante 30 minutos. Finalmente se aclaró la solución centrifugando a 10.000g por 10 minutos a 4°C, rescatándose el sobrenadante. La cuantificación de los extractos fue realizada mediante el método de Bradford. Se cargaron 100  $\mu$ g de masa total de proteína por carril en un gel de poliacrilamida al 8.0% y se corrió a 70V durante 30 minutos seguido de 150V por 60 minutos. La transferencia se realizó en sistema semiseco (*Biorad, USA*) a una diferencia de potencial de 20V durante 40 minutos. Se comprobó la transferencia tiñendo la membrana de nitrocelulosa con rojo ponceau y el gel de poliacrilamida con azul de coomassie. La membrana se bloqueó con 2% de gelatina (*Sigma, USA*) en TBS con 0.1% de Tween-20 (*Winkler, Chile*) durante 1 hora a 37°C. Se incubaron las membranas con el anticuerpo anti-V5 (*Invitrogen, USA*) a una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST. Luego se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRPO a una dilución de 1:2000. Se lavó 3 veces con TBST y una vez con TBS. Para revelar se usó el kit ECL western blotting substrate (*Thermo, USA*) acorde a las instrucciones del fabricante.

## **6 Caracterización por Inmunofluorescencia:**

Para la inmunofluorescencia se cultivaron las células en cubreobjetos redondos hasta obtener una confluencia de 80% y se trataron durante 16 horas con MG-132. Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron fijadas en Metanol absoluto durante 5 minutos a 20°C y sumergidas rápidamente en Acetona fría, seguido de 3 lavados con PBS. El bloqueo de los sitios inespecíficos se realizó incubando las muestras 1 hora a temperatura ambiente con 40mg/mL de albúmina de suero bovina, fracción V (BSA) (*Winkler, Chile*) y se incubaron con anti-V5 diluido 1/50 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Una vez incubado el anticuerpo primario las preparaciones fueron lavadas 3 veces por 5 minutos cada una con PBS 1X. Luego se incubó con anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G de ratón conjugado con Biotina diluido 1/2000 (*R&D Systems, USA*) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras de la misma manera como se

señala arriba. Finalmente se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina conjugada a Cy3 (Sigma Aldrich, USA) y se lavó 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos, incluyendo en el segundo lavado 5 µg/mL de Hoescht 33342 como tinción nuclear. La captura de las imágenes se realizó con microscopio de epifluorescencia Olympus IX-81.

### **7 Ensayo de adhesión a sustrato:**

Se sembraron  $2.5 \times 10^4$  células por pocillo en triplicado de cada una de las situaciones a analizar: MCF7-WT, MCF7 C1, MCF7-C2 y MCF7 C5. Se dejaron en incubador en condiciones estándar durante 4 horas. Una vez transcurrido este tiempo las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X con la finalidad de eliminar las células que no se hubieran adherido lo suficientemente fuerte a la placa. Luego las células fueron fijadas con metanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos y se tiñeron con 1% de cristal violeta por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Se capturaron 3 fotografías por preparación con objetivo de 10X por pocillo. Los datos se analizaron con el software Graph pad Prism versión 6.0 y se usó la prueba de *t* de student.

### **8 Ensayo de viabilidad con Sulforodamina B (SRB):**

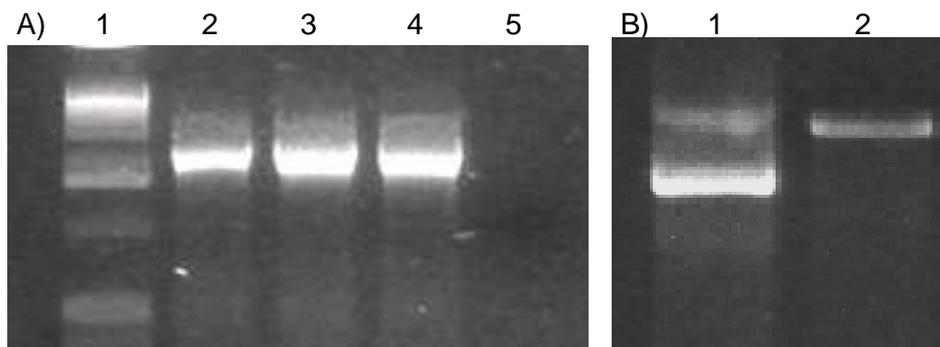
Células correspondientes a cada uno de los clones de MCF-7 transfectadas mencionadas más arriba, se sembraron en placa de 96 pocillos a una densidad de 5000 células/pocillo en 100 µL de medio de cultivo. Para el tiempo 0 horas, se dejaron las células durante 4 horas en la estufa de cultivo a condiciones estándar de temperatura y presión de  $\text{CO}_2$  ( $37^{\circ}\text{C}$  y  $5\%\text{CO}_2$ ) y luego fueron fijadas durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$  con 50% TCA y lavadas 3 veces con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente, considerándose como tiempo cero ( $t=0$ ). Los tiempos analizados fueron los siguientes: 48 horas, 96 horas y 144 horas; una vez completados los periodos de tiempo las células fueron fijadas de la misma forma que se señala arriba. Luego se añadieron 50 µL de 0.1% SRB en 1% de ácido acético y se dejaron incubar todas las placas, incluyendo el tiempo 0, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con 1% de ácido acético para eliminar el exceso de colorante. Finalmente se añadieron 100 µL de 100mM Tris para solubilizar el

colorante. La lectura se realizó en lector de ELISA (*Biotek, USA*) a 540 y los datos se analizaron con el software GraphPad 6.0 (*GraphPad Prism<sup>®</sup>, USA*).

## D RESULTADOS:

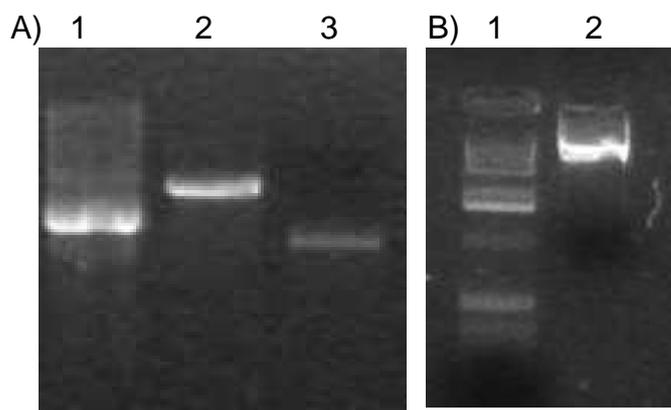
### 1 Construcción de la ORF de Rnf19a en pCDNA V5 His B.

El producto de PCR obtenido usando los oligonucleótidos ORF\_U y ORF\_L (Figura 3a) fue digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Sac*II, al igual que el vector pCDNA V5 His B. 1(Figura 3b).



**Figura 3 Clonamiento de Rnf19a murino en pCDNA-V5 His B:** en **A** Se muestra el producto de PCR amplificado con los primers ORF\_U y ORF\_L. En el carril 1: escalera de peso molecular, carril 2-4: réplicas del producto de PCR de la ORF de Rnf19a murino, y en el carril 5 se muestra el control sin molde. En **B** se muestra el vector pCDNA V5 His B digerido con las enzimas *Hind*III y *Sac*II (carril 2) en tanto que en el carril 1 se encuentra el plásmido sin digerir. En paralelo se digirió también el producto de PCR de la ORF de Rnf19a (imagen no mostrada).

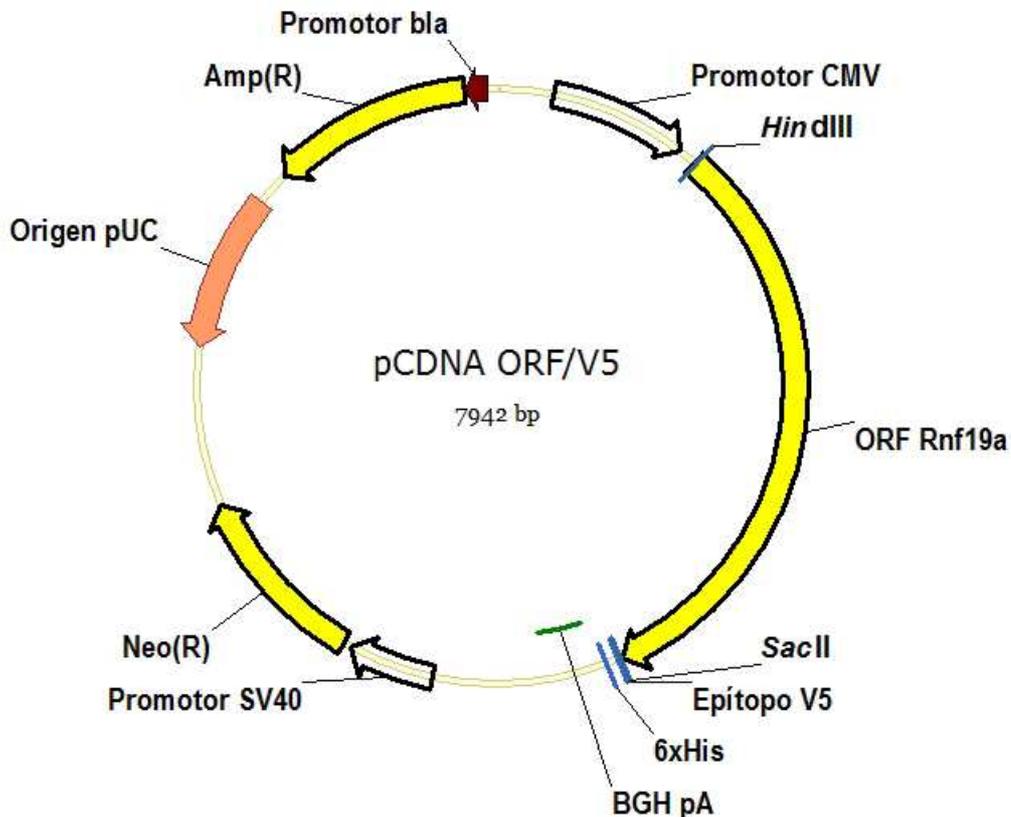
Una vez digeridos el vector y el inserto se realizó un gel para calcular la razón de volumen a añadir de vector:inserto en la reacción de ligación (Figura 4a). Una vez transformada la ligación y extraído el DNA plasmídico, este se digirió con *Hind*III para comprobar el tamaño de la ligación, obteniéndose que correspondía al peso teórico calculado de 8 Kb (Figura 4b).



**Figura 4:** En **A** se observa en el carril 1 el vector sin digerir, en carril 2 el vector digerido y en el carril 3 el inserto (ORF). En **B** se muestra que el vector una vez digerido con *Hind*III, tiene un tamaño correspondiente al esperado de 8 Kb. (Carril 1: Ladder de 1Kb)

## 2 Mapa de la construcción Rnf19a/V5

Con el software Vector NTI (Invitrogen, USA) se dibujó el mapa del plásmido, donde se señalan los sitios de interés (Figura 5).



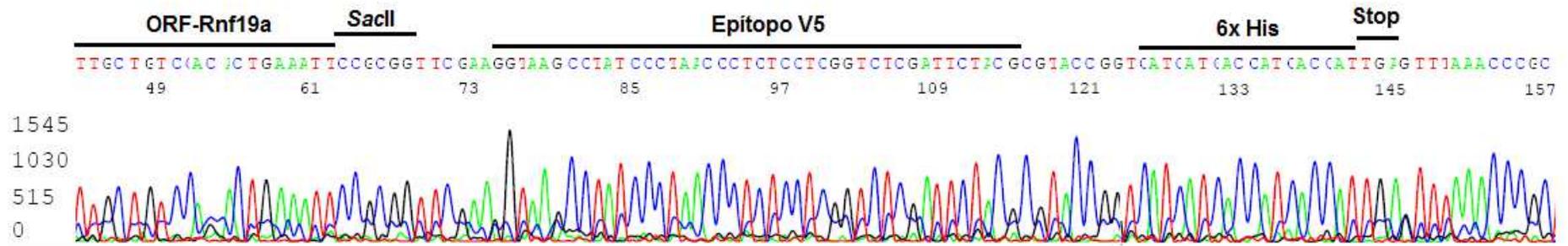
**Figura 5 Mapa de la construcción pCDNA-ORF:** Se muestra el mapa de la construcción pCDNA-ORF. La region codificante de Rnf19a se encuentra flanqueada por las enzimas de restricción *Hind*III (en 5') y *Sac*II (en 3'). La transcripción de Rnf19a está bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Además puede observarse que el epítipo de V5 quedaría fusionado en el extremo C-terminal de Rnf19a. BGH pA: sitio de poliadenilación, Origen pUC: Origen de replicación bacteriano, Amp(R) y Neo (R): *cassettes* de resistencia a ampicilina y G418, respectivamente.

## 3 Secuenciación de la construcción pCDNA ORF/V5:

Para comprobar que la región codificante de Rnf19a se encuentra en el marco de lectura adecuado, esto quiere decir que una vez que se traduzca la proteína, ésta se encuentre fusionada con la región codificante para el epítipo V5 en marco de lectura con la primera metionina del N terminal de Rnf19a, se secuenció el plásmido usando oligonucleótidos específicos para la secuencia

interna del vector, BGH y un oligonucleótido interno de la secuencia correspondiente a la ORF de Rnf19a. El resultado permitió demostrar que la región clonada de RNF19a se encuentra en el marco de lectura adecuado (Figura 6), por lo tanto se continuó transfectando la construcción en células MCF7.

A)



B)

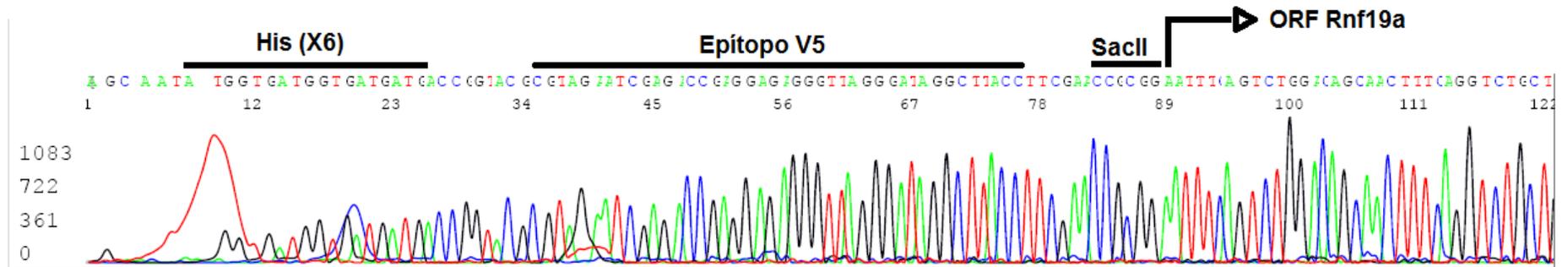
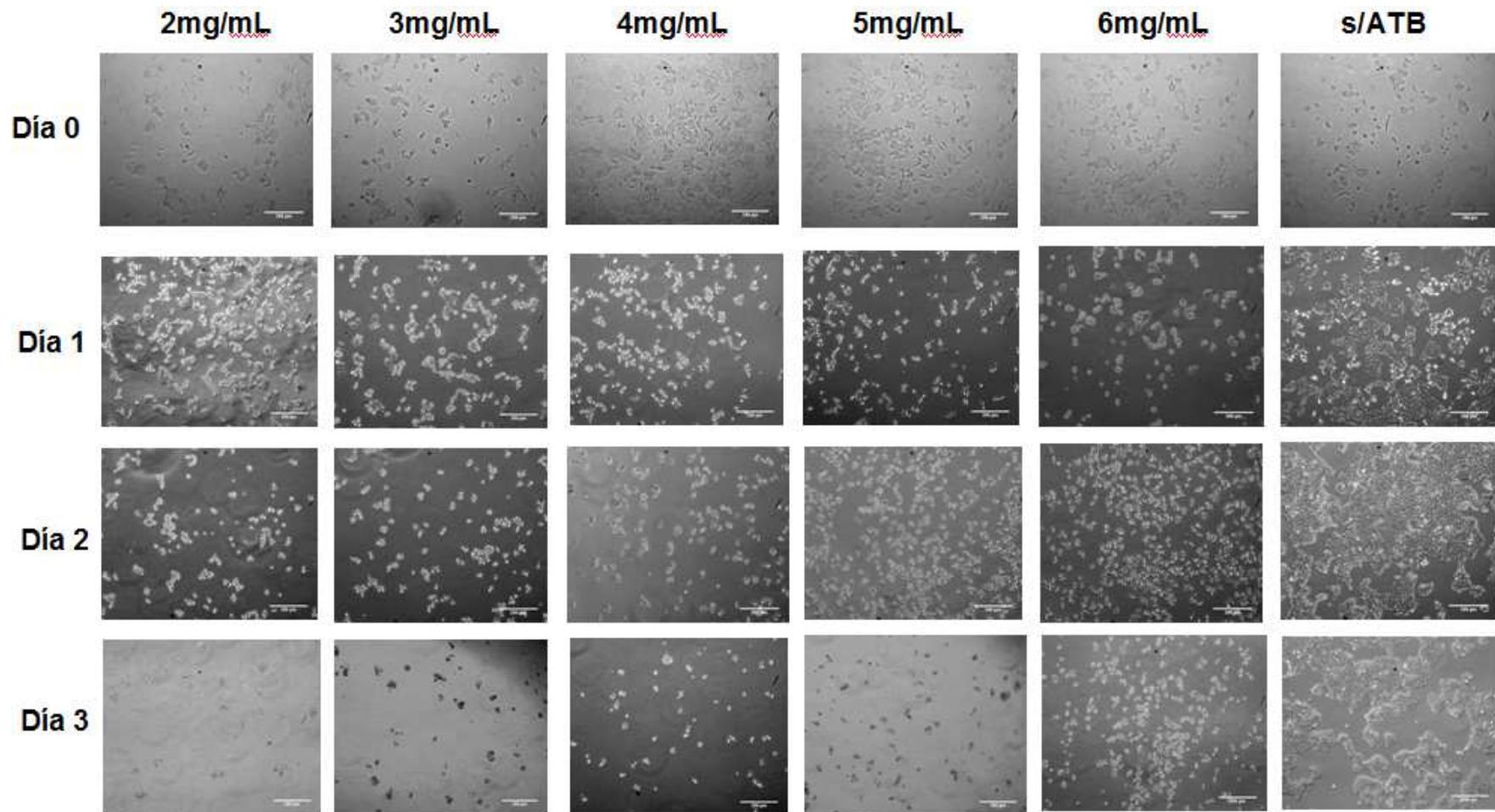


Figura 6: **Secuenciación del vector pcDNA ORF/V5:** Se observan los electroferogramas de las secuencias obtenidas de la construcción pcDNA ORF/V5. En A se muestra la secuencia sentido y en B la secuencia antisentido.

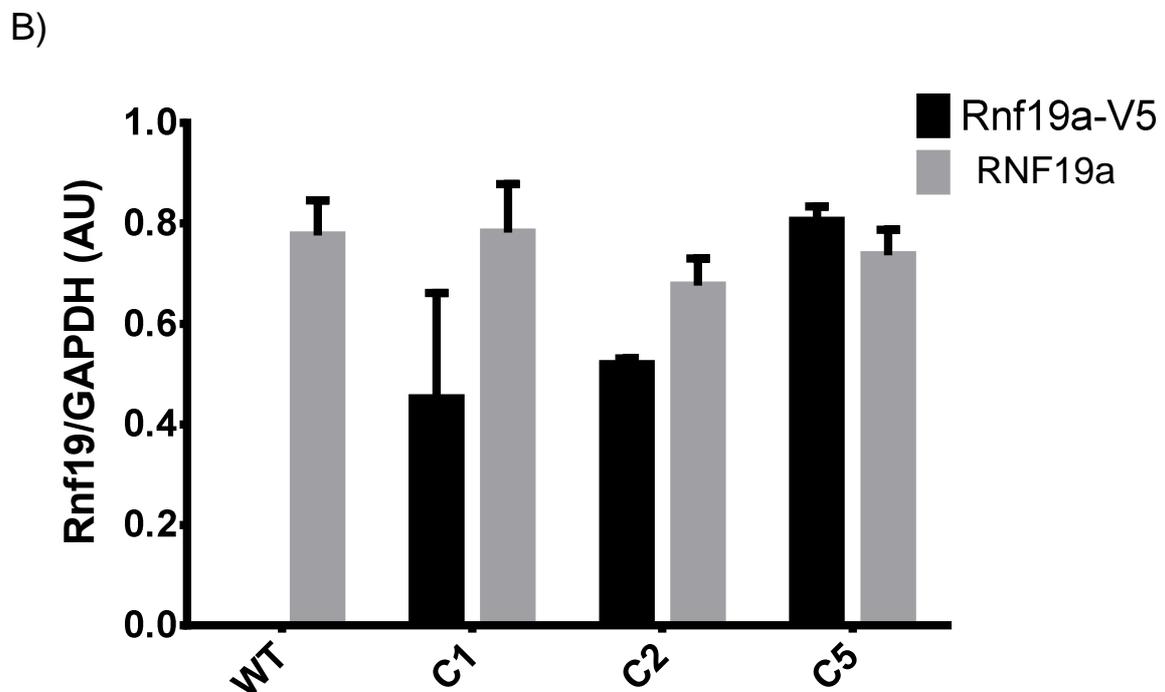
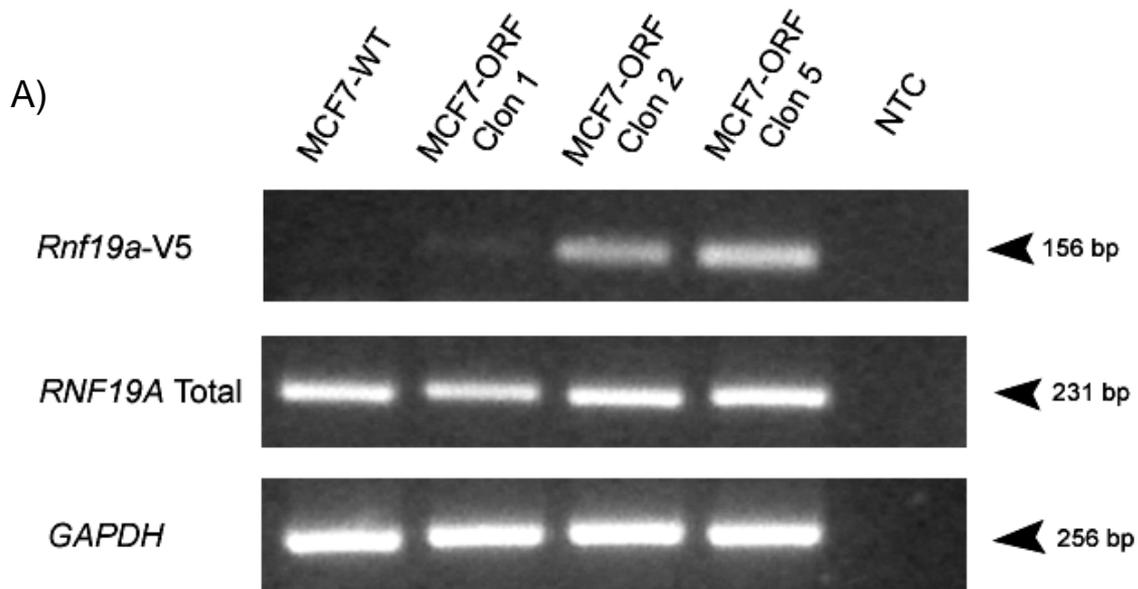


**Fig 7 La citotoxicidad de G418 sobre células MCF7 ocurre a dosis superiores de 3mg/mL.** Se trataron células MCF7 con concentraciones en el rango de 2 a 6 mg/mL de G418 durante 3 días y se observó tanto la morfología de estas células frente al tratamiento como el número de células en la placa una vez tratadas con G418. Se puede observar que al tercer día se muestra citotoxicidad a una concentración mínima de 3 mg/mL, Dado este resultado, se utilizó como concentración de trabajo esta concentración para generar la línea celular estable

El vector de clonación utilizado para la construcción de pCDNA-ORF contiene un gen de resistencia a Neomicina que codifica para la enzima aminoglicósido 3'-fosfatasa (APH 3'). Esta enzima degrada al antibiótico G418, el cual bloquea la traducción en células eucariontes. De esta forma usando este antibiótico se aplicó presión selectiva para permitir la integración del plasmidio de expresión (pCDNA-ORF). El primer paso fue determinar la concentración letal para las células MCF7, para ello se cultivaron durante 3 días con concentraciones desde el rango de 0mg/mL hasta 6mg/mL de G418 (Figura. 7). Se determinó que al tercer día de selección con el antibiótico G418 a una concentración de 3mg/mL no se observaban aparentemente células viables, evaluadas por características morfológicas de encogimiento del volumen celular y desprendimiento de las células de la placa de cultivo. De esta forma la concentración de trabajo usada para selección con antibiótico fue de 3mg/mL para células MCF7.

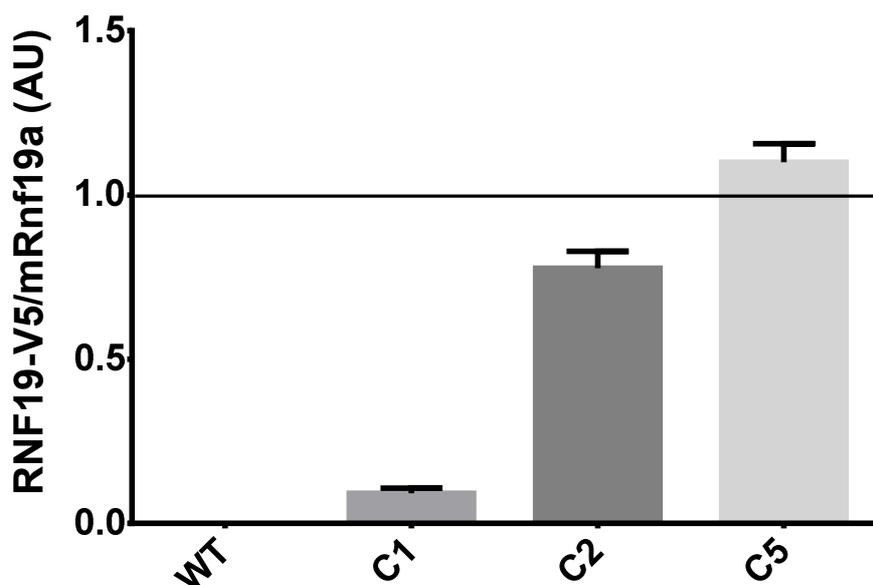
#### **4 Células MCF7 transfectas con pCDNA-ORF sobreexpresan Rnf19.**

Una vez obtenido el plasmidio de expresión de Rnf19a y determinada la concentración letal de G418 para las células MCF-7, se transfectaron células MCF-7 usando el reactivo TransIT-LT1. Una vez transfectadas las células, éstas fueron seleccionadas con 3mg/mL de G418 por tres días. Al día cinco, se observó la formación de colonias y estas fueron aisladas por tripsinización con anillos de clonación y posteriormente expandidas. Se obtuvieron 12 clones en total de los cuales 3 clones fueron viables. Estos clones viables fueron llamados Clon 1, Clon 2 y Clon 5. A partir de estas células se extrajo RNA total y se realizó RT-PCR, a fin de observar los patrones de expresión diferencial de Rnf19a en los distintos clones, siendo apenas perceptible en Clon1 y observándose la mayor intensidad en Clon5 (Figura 8a). Al graficar la relación del gen Housekeeping con RNF19a total endógeno (RNF19a humano) y el específico para Rnf19aV5 (Figura 8b), se puede observar que los valores relativos de RNF19a humano se mantienen constantes en los tres clones, pero se observan patrones de expresión diferenciales del constructo de fusión, donde en el clon 5, hay niveles cercanos al endógeno.



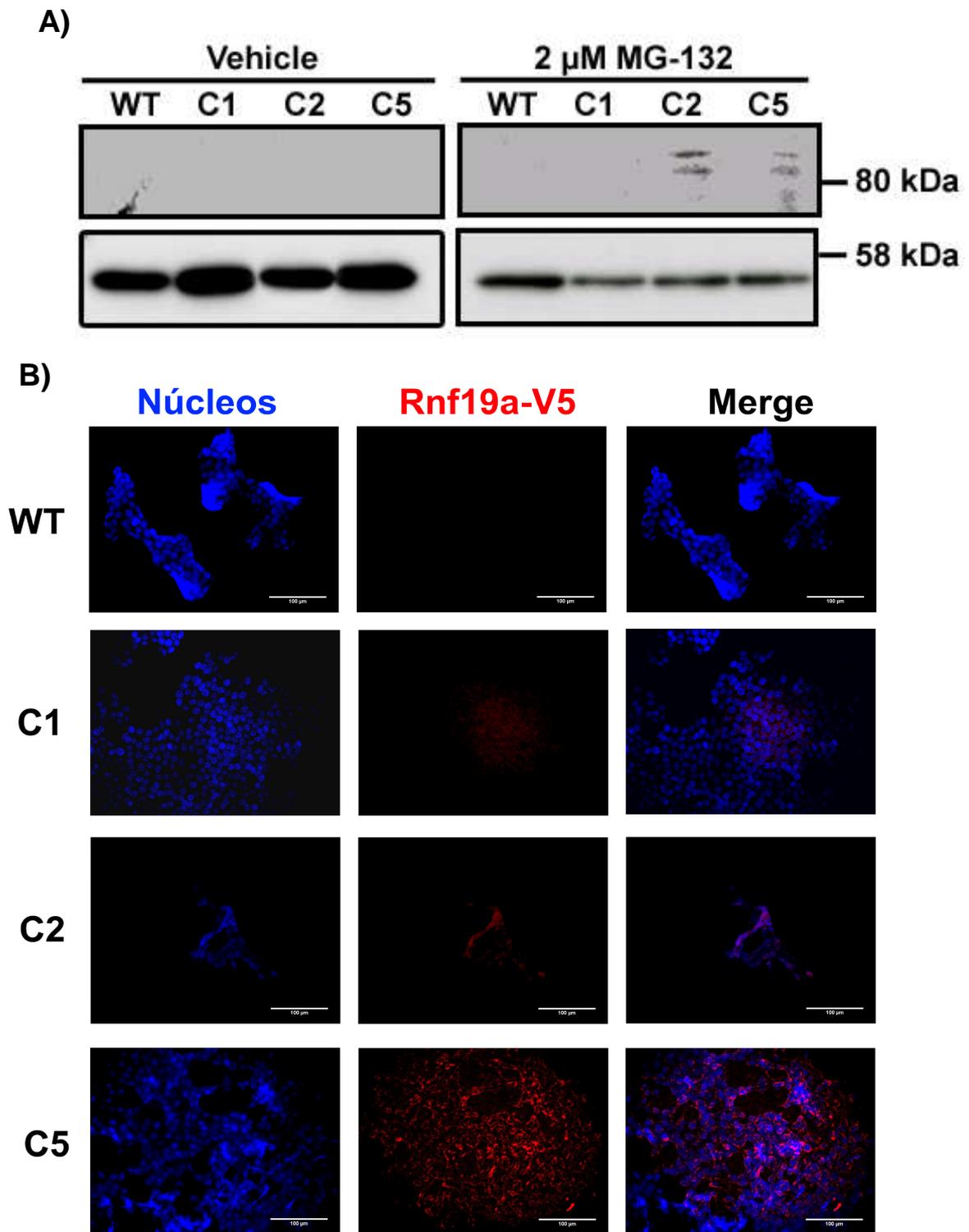
**Figura 8 Niveles de expresión de Rnf19a-V5:** A) Imagen representativa de RT-PCR sobre los clones de células MCF-7 transfectadas con Rnf19a en los distintos clones obtenidos, siendo aparentemente superior en el clon 5 B) Gráfica de valores relativos obtenidos para clon de Rnf19a. Se observa que el clon 5 tiene un patrón de expresión similar al RNF19 endógeno de células MCF7. Es importante destacar que los oligonucleótidos usados para amplificar RNF19a humano, no anillan con Rnf19a murino. Error  $\pm$  SD, tres réplicas.

Por otro lado, si se va a mirar la relación entre RNF19a endógeno y Rnf19a-V5, se puede analizar la cantidad relativa de Rnf19a-V5 por sobre el RNF19a endógeno, representado como una línea (Figura 9). Se observa con mayor claridad que el único clon que sobre-expresa Rnf19a V5 por sobre los niveles de Rnf19a endógeno es el clon 5. En tanto que los clones 1 y 2 representan el 10 y 70% aproximadamente del total de Rnf19a.



**Figura 9:** Rnf19a es sobre-expresado en C5: Se muestra la relación entre Rnf19a-V5 con RNF19a endógeno en células MCF7. Barras de error representan  $\pm$  SD. La línea representa los valores de RNF9a endógeno en células MCF-7.

Además se comprobó mediante *Western blot* (Figura 10a) e Inmunofluorescencia con un anticuerpo anti el epítipo de V5 (Figura 10b), la acumulación y localización de la proteína de fusión Rnf19a-V5. Para lograr acumular Rnf19a se trataron las células con el inhibidor del proteasoma MG-132. Esta estrategia se usó para permitir la acumulación de proteína debido a que se había reportado anteriormente que el homólogo en cerebro de Rnf19a, Dorfin, no se acumula al ser sobre-expresado debido a que es regulado por autoubiquitinación siendo rápidamente degradado vía proteasoma (Niwa, Ishigaki et al. 2002). Se observa mediante inmunoblot la acumulación de la proteína de fusión en los clones 2 y 5, siendo indetectable en el clon 1 (Figura 10a).



**Figura 10 Caracterización de la expresión de la proteína de fusión Rnf19a-V5:** A) Inmunoblot con anticuerpo anti-V5 en clones de células MCF-7. Los dos paneles superiores corresponden a anti-V5, los paneles inferiores es el control de carga,  $\alpha$ -tubulina. En los paneles

de muestran extractos de proteínas tratados con vehículo (DMSO), donde no se alcanza observar señal de Rnf19a-V5. En los paneles de la derecha, las células fueron previamente tratadas por 16 horas con 2 $\mu$ M de MG-132, en estos extractos, Rnf19-V5 se alcanza a acumular a niveles detectables, posiblemente debido a que se ha estabilizado por el tratamiento de inhibición del proteasoma **B)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-V5 en células MCF-7. Se observa una marcación predominantemente citosólica de la proteína de fusión. La especificidad de la marca está controlada por el marcaje negativo en las células sin transfectar (WT), tanto en el inmunoblot como en la inmunofluorescencia.

## **5 La sobre-expresión de Rnf19a induce cambios morfológicos en células MCF-7.**

Una vez demostrada la expresión estable de la proteína de fusión Rnf19a en las células MCF-7, se analizaron algunos aspectos morfológicos de los clones obtenidos. Las células MCF-7 provienen de una estirpe de carcinoma ductal de mama, por lo tanto, se trata de células de origen epitelial. En cultivo tienen forma poligonal y crecen formando colonias bien definidas. Al comparar el clon 1 se puede observar que estas células crecen en forma de colonia, pero su refringencia es casi la misma que la de la placa, lo que hace suponer que posiblemente estas células se encuentran fuertemente adheridas a la placa de cultivo. El clon 2 crece como colonia, pero las células se observan creciendo solamente en una monocapa y se puede notar que además hay proyecciones semejantes a filopodios que se extienden por los bordes de la colonia, lo cual podría indicar algunos problemas de adhesión. Finalmente, el clon 5 se observa que crece como una colonia disgregada, las células han perdido su forma poligonal y se pueden observar un número mayor de proyecciones tipo filopodios que las presentes en la colonia 2 (Figura 11).

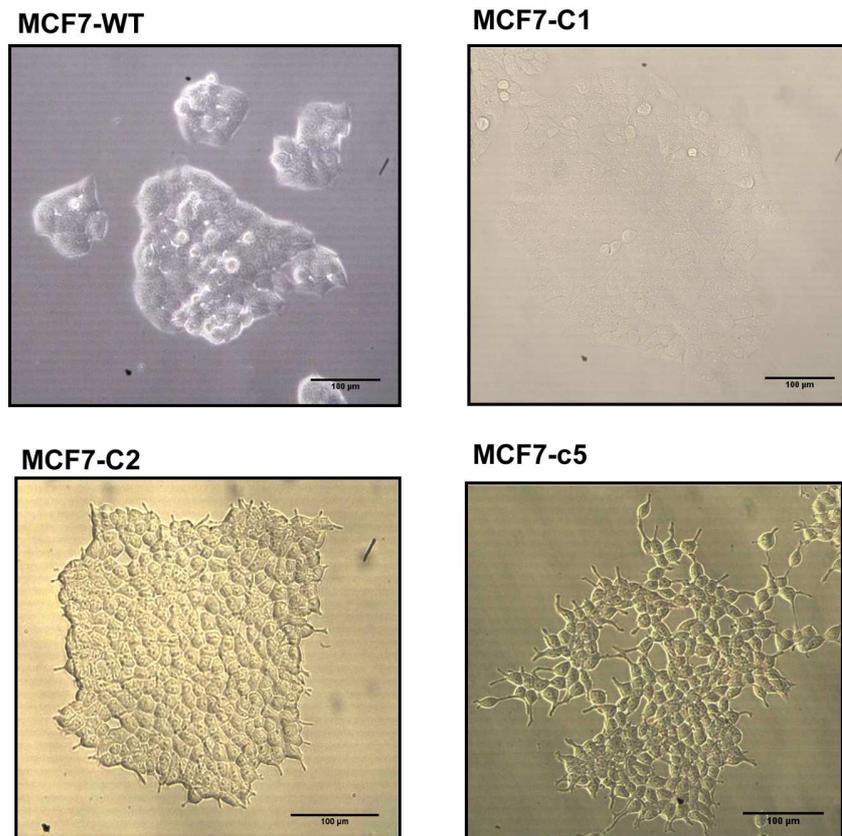


Figura 11: La **sobre-expresión de Rnf19a afecta la morfología de células MCF-7**. Fotomicrografía de células MCF-7 transfectadas con pCDNA-ORF. Se puede observar claramente los efectos sobre la morfología de estas células al compararlas con el control WT. C1 presenta una menor refringencia en la placa. En tanto C2y C5, se observa una mayor disgregación en la células que constituyen la colonia y pueden observarse además proyecciones que se extienden a los largo de todo el borde de la colonia (Aumento de 40X, barra de escala 100µm)

## **6.- La sobre-expresión de Rnf19a afecta la adhesión al sustrato en células MCF7.**

Al sobre-expresar Rnf19a en células MCF7 se observa un efecto en la adhesión celular al sustrato. El ensayo consistió en lavar las células con PBS/EDTA. Usar EDTA afectaría la adhesión de las células al sustrato, dado que el calcio es quelado, catión esencial en la formación de complejos de adhesión. En la figura 12b se muestran imágenes representativas de las células que permanecieron en la placa tras los lavados. La cuantificación de

estas imágenes indica que la adhesión se encuentra significativamente aumentada en el clon 1, lo cual es consecuente con la suposición realizada en el análisis morfológico de las células transfectadas correspondientes al clon-1, donde se observaba una refringencia semejante a las del plato de cultivo, lo que hizo suponer que estas células presentaban una mayor adhesión. En tanto, los clones 2 y 5 se adhieren menos a la placa, tal y como se esperaba debido a que morfológicamente se observaban más disgregadas.

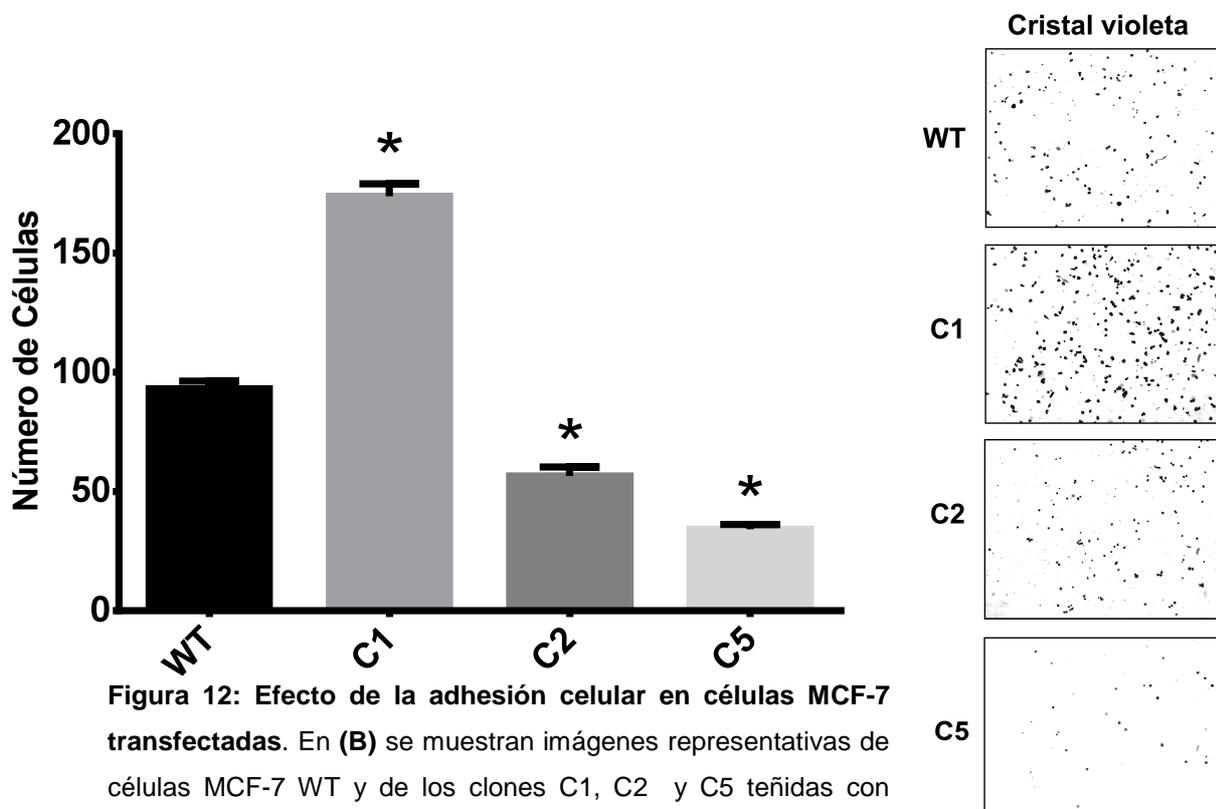
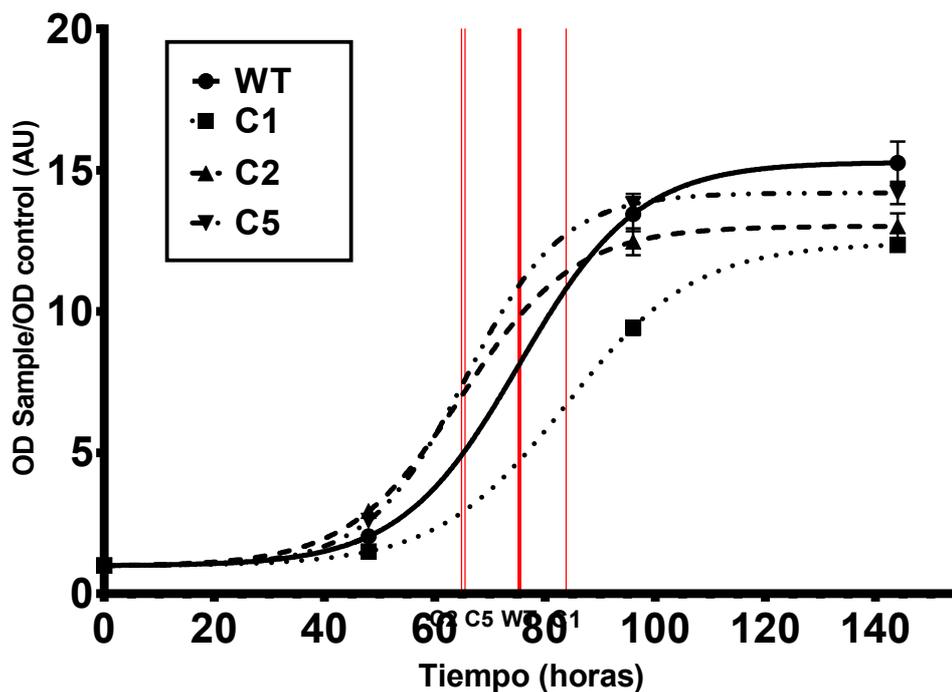


Figura 12: Efecto de la adhesión celular en células MCF-7 transfectadas. En (B) se muestran imágenes representativas de células MCF-7 WT y de los clones C1, C2 y C5 teñidas con cristal violeta. En (A) se observa el promedio de células por campo de células aún adheridas en la placa de cultivo. Barras de error representan  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

## 7.- La sobre-expresión de Rnf19a exógeno afecta la proliferación en células MCF-7

La viabilidad se cuantificó con el ensayo de Sulforrodamina B (SRB), donde se correlacionó un aumento en la masa total de proteínas con un incremento en el número de células en función del tiempo (Zhang, Xu et al. 2013). Esta correlación es posible debido a que la unión de SRB es estequiométrica con las

proteínas, por lo tanto, una vez que se disocia y se solubiliza el valor de densidad óptica es equivalente a la masa total de células presentes en el cultivo. En la figura 13 se muestra en la línea sólida la cinética de proliferación de las células MCF7 WT ( $75.38 \pm 4.07$  horas), los clones 2 y 5 presentan una cinética de crecimiento más rápida respecto a las células WT ( $64.88 \pm 3.71$  horas;  $65.52 \pm 3.53$  horas), mientras que el clon 1, el cual tienen una menor expresión relativa de Rnf19a-V5 tiene retrasada su proliferación ( $83.86 \pm 1.62$  horas). Por otro lado al observar el *plateau* de las curvas, se puede notar que ninguno de los clones alcanza el nivel de las células MCF-7 WT, esto es debido probablemente a que las células transfectadas no llegan a confluencia como las células WT, puede que esta diferencia se deba a que estas células no son capaces de poblar por completo la placa de cultivo. En observaciones que no se muestran en este trabajo, se ve claramente que estas células no llegan a confluencia.



**Figura 13: Ensayo de SRB. Curva de cinética de proliferación de las células MCF-7 WT y transfectadas con Rnf19a-V5.** Las líneas rojas indican los puntos de medición de las cinéticas de crecimiento de las células WT y de los clones transfectados con Rnf29a-V5. Se observa que mientras los clones C2 y C5, los cuales tienen mayores niveles de Rnf19a, presentan una cinética de proliferación más rápida respecto a las células MCF7-WT, el clon 1 aparentemente presenta un crecimiento más lento cuando es comparado con las células control, Barras de error representan  $\pm SD$

## E DISCUSIÓN:

Con este trabajo se consiguió demostrar mediante el análisis de distintos parámetros celulares, el efecto de la sobre-expresión de la ligasa de ubiquitina E3 Rnf19a murino, en células MCF-7

Decidimos trabajar con este tipo celular dado que de entre las líneas en las que se probó transfectar con la construcción pCDNA-ORF (NIH-3T3 y HepG2), las células MCF-7 fueron las únicas en la que se obtuvo una expresión de mRNA de la proteína de fusión en niveles por sobre el basal además de que se pudo detectar la proteína mediante inmunoblot (Figs 8 y 10a). Además, se encuentra reportado que las células MCF-7 son más susceptibles a transcribir genes bajo el promotor de CMV. Por otro lado, en resultados no mostrados en este trabajo, las células MCF-7 fueron las únicas que presentaron una baja citotoxicidad al ser transfectadas con el constructo mencionado anteriormente. Datos no publicados obtenidos en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad de Madrid, España, apuntan a que la sobre-expresión de Rnf19a en Bacterias *E. Coli*, de la cepa BL21 es tóxica para el organismo, evidenciándose muerte al ser transformadas con un constructo de fusión de Rnf19a murino fusionado con GST. En base a estos antecedentes el modelo celular escogido fue el de células MCF-7. Dada a la alta homología entre Rnf19a humano y de ratón (~90%), siendo de un 100% en el dominio catalítico, pensamos que no habría problemas de incompatibilidad funcional al expresar Rnf19a murino en células humanas. Es importante destacar que con la metodología que usamos en este trabajo (sobre-expresar Rnf19a murino en células humanas), los efectos que se obtuvieron al sobre-expresar Rnf19a pueden representar de mejor manera la función de la proteína expresada de manera ectópica que al encontrarse sobre-expresando RNF19A humano. Esto constituye una ventaja al analizar los efectos de la expresión de proteínas de ratón sobre la función de Rnf19a.

Para conseguir niveles detectables de Rnf19a en células MCF-7, las células fueron tratadas con el inhibidor del proteasoma MG-132 a una concentración de 2 $\mu$ M durante 16 horas (fig 10a y 10b). MG-132 inhibe la actividad isopeptidasa y ATPasa en el proteasoma 26S, impidiendo de esta

forma la degradación de proteínas ubiquitinadas. La racional de estabilizar Rnf19a con MG-132 se debe a que varias enzimas E3 ligasas son autoubiquitinadas, tal es el caso de Nedd4-2 (Bruce, Kanelis et al. 2008), Itch (Scialpi, Malatesta et al. 2008), Mdm2 (Wei, Chen et al. 2013) y otras. Este se trata de un mecanismo de regulación fina de la masa de enzima E3 ligasa presente en un momento determinado, ya que la E3 ligasa además de ser el principal elemento de especificidad de sustrato en la cascada de ubiquitinación es un punto de regulación importante para mantener la estabilidad proteica. En trabajos del grupo de Niwa, ellos estabilizaron a DORFIN, el homólogo en humano de Rnf19a con MG-132, obteniendo niveles de expresión que permitieron su detección tanto por inmunoblot como por inmunofluorescencia (Niwa, Ishigaki et al. 2002). En este trabajo replicamos las condiciones usadas por Niwa para estabilizar Rnf19a. Solamente en células tratadas con MG-132, fue posible detectar la proteína de fusión en células MCF-7 mediante inmunoblot usando el anticuerpo anti-V5. Al observar la localización de Rnf19a (la proteína de fusión) mediante inmunofluorescencia se obtuvo un patrón de tinción difuso, de localización eminentemente citoplasmática y perinuclear, lo que podría dar cuenta de que la proteína se encuentra en vías de síntesis. Un marcaje que permita colocalizar alguna proteína del aparato de Golgi (GM130), con la proteína de fusión de Rnf19a-V5 podría confirmar esta hipótesis. Por otro lado, la señal obtenida no fue la esperada, al observar la localización subcelular de Rnf19a en células NIH-3T3 donde se obtuvo señal asociada al centrosoma (confirmada por marcaje con  $\gamma$ -tubulina) y asociada tanto al centrosoma como al cuerpo XY en espermatozoides en paquítena. Este efecto de deslocalización de Rnf19a puede deberse a: i) el procesamiento a través del sistema de endomembranas de Rnf19a murino en células humanas no añade las modificaciones necesarias para su adecuado transporte, ii) modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, ubiquitinación u otras no son añadidas por la células MCF-7 en Rnf19a de ratón, lo cual afectaría su destinación subcelular o iii) la ausencia de alguna proteína que sirva como andamiaje o chaperona para guiar la destinación subcelular de Rnf19a murino. Sea cual sea la razón por la que Rnf19a de ratón no se localiza como se esperaba (centrosoma) debe ser respondida con otro tipo de estrategias experimentales. Por otro lado, en ratón se han descrito dos variantes del mRNA

de Rnf19a, una de las cuales tiene una cola 3'UTR larga, lo que sugiere una regulación por micro-RNAs; estas variantes no han sido descritas en humano. En nuestro laboratorio, además hemos descrito que Rnf19a murino se encuentra localizado tanto en los cromosomas 15 y 9, siendo transcrito y traducido en una proteína funcional la versión localizada en el cromosoma 15, mientras que Rnf19a localizado en el cromosoma 9 es transcrito en un RNA no codificante. Es importante destacar que en humano tampoco han sido descritas estas variantes. Nuestro modelo solamente expresa la proteína Rnf19a en un contexto celular libre de proteínas endógenas de ratón. No exploramos otro tipo de regulación a nivel transcripcional como post-traducciona de Rnf19a.

En cuanto a los ensayos funcionales de la sobre-expresión de Rnf19a, el análisis morfológico de las células MCF-7 transfectadas con Rnf19a murino, mostró una diversa variabilidad dependiendo de los niveles de expresión de Rnf19a. Es notable mencionar las diferencias morfológicas entre el clon 1 y el clon 5 (bajo y altos niveles de expresión de Rnf19a). En el clon 1 (Fig 11), las células se observan con muy poca refringencia, este efecto se debe probablemente a su alta adhesión a la placa de cultivo (comprobado luego por ensayo de adhesión al sustrato), induciendo incluso cambios estructurales en la célula donde se piensa que existe un aumento en los puntos de adhesión focal de estas células, más experimentos deben ser realizados para demostrar los cambios presentes en las moléculas de adhesión en este clon que pueden ser inducidos por una baja expresión de Rnf19a murino. Por otro lado, en el clon número 5, se observa un efecto opuesto al presente en el clon 1 en cuanto a adhesión, estas células no se adhieren fuertemente al sustrato, además presentan una organización más dispersa, no en colonias bien constituidas como es el caso de las células del clon 1 o en las células MCF-7 *wild type*. El efecto más evidente en las células del clon 5 es la presencia de prolongaciones en estas células. Dado que estas células presentan una menor adhesión, suponemos que estas células son propensas a una capacidad de migración superior que las células WT y C1. Este experimento de migración fue realizado en cámaras de tipo *trans-well*, usando como quimioatrayente una concentración superior de SFB, pero el resultado no permitió observar diferencias significativas entre las distintas situaciones, aunque si se pudo observar una tendencia a una mayor migración en las

células correspondientes al clon 5. Este resultado no mostrado en este trabajo, permite suponer que las prolongaciones observadas podrían ser de tipo filopodios, debido a modificaciones en el citoesqueleto de actina de estas células, marcajes con Faloidina de estas células permitiría la descripción morfológica de los filamentos de actina al tener Rnf19a de ratón.

Finalmente se decidió analizar la proliferación de las células que expresan Rnf19a murino, usando para ello una aproximación clásica de la descripción de la viabilidad celular, el ensayo de Sulforodamina B (SRB), como se explica en el texto, este ensayo permite la detección de la masa de proteína en células fijadas en condiciones ácidas, de esta forma luego de disolver el colorante se puede analizar la razón de proteínas totales respecto a número de células; recientemente este ensayo fue utilizado para evaluar proliferación (Zhang, Xu et al. 2013). En nuestra situación experimental, se pudo determinar diferencias en la proliferación de estas células, (Fig 13) se muestra en la línea sólida la cinética de proliferación de las células MCF7 WT ( $75.38 \pm 4.07$  horas), los clones 2 y 5 presentan una cinética de crecimiento más rápida respecto a las células WT ( $64.88 \pm 3.71$  horas;  $65.52 \pm 3.53$  horas), mientras que el clon 1, el cual tienen una menor expresión relativa de Rnf19a-V5 tiene retrasada su proliferación ( $83.86 \pm 1.62$  horas). Estas diferencias en la división celular pueden deberse probablemente a sus diferencias en la adhesión celular, donde estos datos se correlacionan bastante fuerte, esto quiere decir, células con una alta adhesión al sustrato (Clon 1), presenta una baja proliferación, mientras que células que presentan una adhesión menor al sustrato (Clones 2 y 5) tienen una razón de proliferación superior que la de las células MCF-7 WT. Por otro lado, en observaciones no mostradas en este trabajo, las células transfectadas con la proteína de fusión Rnf19a-V5, no llegan a confluencia en la placa, como si ocurre con las células WT, no sabemos si este efecto se debe a una detención del ciclo celular, y por lo tanto la división una vez que se esta llegando a la confluencia o se debe a un efecto de muerte celular al alcanzar la confluencia. Con los experimentos realizados hasta la fecha no es posible determinar la causa de que estas células no lleguen a confluencia en la placa.

Finalmente, respecto a los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión como al observar las diferencias morfológicas de las células MCF-7 transfectadas con la proteína de fusión, existe evidencia de una enzima E3

ligasa que se localiza en el centrosoma, la ligasa de ubiquitina E3 BRCA1. Se demostró que la nucleación de los centrosomas se encuentra regulada por BRCA1, la cual transfiere la molécula de ubiquitina a  $\gamma$ -tubulina (Starita, Machida et al. 2004). Ensayos de pérdida de función con una aproximación de siRNA contra BRCA1 en células Hs578T, demostró finalmente que la cantidad del número de centrosomas está regulada directamente por BRCA1 en este tipo de células (Sankaran, Starita et al. 2005). Por otro lado, la sobre-expresión de esta E3 ligasa en células de cáncer de mama MDA-MB-231, produjo un aumento de la masa de proteína en la cubierta de  $\gamma$ -tubulina en el centro de nucleación de los microtúbulos (Hubert, Vandekerckhove et al. 2011), lo que a su vez constituye una señal de respuesta a daño en el DNA (Giannakakou, Sackett et al. 2000). Estos resultados mostrados por otros grupos de una enzima E3 ligasa de localización tanto centrosómica como nuclear, pueden ayudar a explicar la dinámica en el citoesqueleto que sugieren los resultados obtenidos en este trabajo.

## **F CONCLUSIONES:**

-Demostramos que es posible generar un clon que exprese de manera estable Rnf19a murino en células humanas.

-La sobre-expresión de Rnf19a en células MCF-7 induce cambios morfológicos en estas células, observándose proyecciones de la membrana plasmática y diferencias en la refringencia de estas células, lo cual se puede asociar a diferencias en el patrón de migración y adhesión.

-Al sobre-expresar Rnf19a en células MCF-7, se altera la adhesión celular, de manera diferencial según los niveles de expresión de Rnf19a (menores niveles de Rnf19a aumenta la adhesión, mientras que niveles semejantes al endógeno, disminuyen la adhesión).

-La sobre-expresión de Rnf19a afecta la proliferación de células MCF-7. Niveles bajos de Rnf19a expresado ectópicamente produce un retraso en la proliferación, mientras que niveles de Rnf19a ectópico semejantes al endógeno, producen un aumento en el número de células a tiempos menores.

## G REFERENCIAS:

- Bai, V. U., O. Hwang, et al. (2012). "Averaged differential expression for the discovery of biomarkers in the blood of patients with prostate cancer." PLoS One **7**(4): e34875.
- Bernard, X., P. Robinson, et al. (2011). "Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain." PLoS One **6**(10): e25981.
- Bozoky, B., A. Savchenko, et al. (2013). "Novel signatures of cancer-associated fibroblasts." Int J Cancer **133**(2): 286-293.
- Bruce, M. C., V. Kanelis, et al. (2008). "Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain." Biochem J **415**(1): 155-163.
- Brzovic, P. S., P. Rajagopal, et al. (2001). "Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex." Nat Struct Biol **8**(10): 833-837.
- Cardozo, T. and M. Pagano (2004). "The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(9): 739-751.
- Chaugule, V. K., L. Burchell, et al. (2011). "Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain." EMBO J **30**(14): 2853-2867.
- Chen, C., X. Sun, et al. (2007). "Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer." Oncogene **26**(16): 2386-2394.
- Chen, C., Z. Zhou, et al. (2007). "The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer." Int J Cancer **121**(1): 80-87.
- Dice, J. F. (1987). "Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells." FASEB J **1**(5): 349-357.
- Duda, D. M., J. L. Olszewski, et al. (2013). "Structure of HHARI, a RING-IBR-RING ubiquitin ligase: autoinhibition of an Ariadne-family E3 and insights into ligation mechanism." Structure **21**(6): 1030-1041.
- Eisenhaber, B., N. Chumak, et al. (2007). "The ring between ring fingers (RBR) protein family." Genome Biol **8**(3): 209.
- Fabbro, M. and B. R. Henderson (2003). "Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling." Exp Cell Res **282**(2): 59-69.
- Fan, S., J. A. Wang, et al. (1998). "BRCA1 as a potential human prostate tumor suppressor: modulation of proliferation, damage responses and expression of cell regulatory proteins." Oncogene **16**(23): 3069-3082.
- Feng, X. H., X. Lin, et al. (2000). "Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta." EMBO J **19**(19): 5178-5193.
- Fernandez-Capetillo, O., S. K. Mahadevaiah, et al. (2003). "H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis." Dev Cell **4**(4): 497-508.
- Freed, E., K. R. Lacey, et al. (1999). "Components of an SCF ubiquitin ligase localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle." Genes Dev **13**(17): 2242-2257.
- Freemont, P. S. (2000). "RING for destruction?" Curr Biol **10**(2): R84-87.
- Frescas, D. and M. Pagano (2008). "Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer." Nat Rev Cancer **8**(6): 438-449.

- Fukuchi, M., Y. Fukai, et al. (2002). "High-level expression of the Smad ubiquitin ligase Smurf2 correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Res **62**(24): 7162-7165.
- Giannakakou, P., D. L. Sackett, et al. (2000). "p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein." Nat Cell Biol **2**(10): 709-717.
- Henderson, B. R. (2005). "Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking." Bioessays **27**(9): 884-893.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.
- Hubert, T., J. Vandekerckhove, et al. (2011). "Cdk1 and BRCA1 target gamma-tubulin to microtubule domains." Biochem Biophys Res Commun **414**(1): 240-245.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1991). "A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18." EMBO J **10**(13): 4129-4135.
- Ito, T., J. Niwa, et al. (2003). "Dorfin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1." J Biol Chem **278**(31): 29106-29114.
- Izzi, L. and L. Attisano (2004). "Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation." Oncogene **23**(11): 2071-2078.
- Johnson, N., D. Cai, et al. (2009). "Cdk1 participates in BRCA1-dependent S phase checkpoint control in response to DNA damage." Mol Cell **35**(3): 327-339.
- Kim, H. C. and J. M. Huibregtse (2009). "Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity." Mol Cell Biol **29**(12): 3307-3318.
- Kon, M., R. Kiffin, et al. (2011). "Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth." Sci Transl Med **3**(109): 109ra117.
- Kralewski, M. and R. Benavente (1997). "XY body formation during rat spermatogenesis: an immunocytochemical study using antibodies against XY body-associated proteins." Chromosoma **106**(5): 304-307.
- Laine, A. and Z. Ronai (2007). "Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1." Oncogene **26**(10): 1477-1483.
- Landry, B. D., J. P. Doyle, et al. (2012). "F-box protein specificity for g1 cyclins is dictated by subcellular localization." PLoS Genet **8**(7): e1002851.
- Lavin, M. F. and N. Gueven (2006). "The complexity of p53 stabilization and activation." Cell Death Differ **13**(6): 941-950.
- Lopez-Alanon, D. M. and J. del Mazo (1995). "Cloning and characterization of genes expressed during gametogenesis of female and male mice." J Reprod Fertil **103**(2): 323-329.
- Mabb, A. M. and M. D. Ehlers (2010). "Ubiquitination in postsynaptic function and plasticity." Annu Rev Cell Dev Biol **26**: 179-210.
- Marin, I. (2013). "Evolution of plant HECT ubiquitin ligases." PLoS One **8**(7): e68536.
- Nelson, D. E. and H. Laman (2011). "A Competitive binding mechanism between Skp1 and exportin 1 (CRM1) controls the localization of a subset of F-box proteins." J Biol Chem **286**(22): 19804-19815.
- Niwa, J., S. Ishigaki, et al. (2001). "A novel centrosomal ring-finger protein, dorfin, mediates ubiquitin ligase activity." Biochem Biophys Res Commun **281**(3): 706-713.

- Niwa, J., S. Ishigaki, et al. (2002). "Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity." J Biol Chem **277**(39): 36793-36798.
- Niwa, J. and G. Sobue (2003). "[Neurodegenerative diseases and Dorfin]." No To Shinkei **55**(10): 856-868.
- Parraga, M. and J. del Mazo (2000). "XYbp, a novel RING-finger protein, is a component of the XY body of spermatocytes and centrosomes." Mech Dev **90**(1): 95-101.
- Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem **70**: 503-533.
- Rivkin, E., A. L. Kierszenbaum, et al. (2009). "Rnf19a, a ubiquitin protein ligase, and Psmc3, a component of the 26S proteasome, tether to the acrosome membranes and the head-tail coupling apparatus during rat spermatid development." Dev Dyn **238**(7): 1851-1861.
- Sankaran, S., L. M. Starita, et al. (2005). "Centrosomal microtubule nucleation activity is inhibited by BRCA1-dependent ubiquitination." Mol Cell Biol **25**(19): 8656-8668.
- Scialpi, F., M. Malatesta, et al. (2008). "Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages." Biochem Pharmacol **76**(11): 1515-1521.
- Sone, J., J. Niwa, et al. (2010). "Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." J Neurosci Res **88**(1): 123-135.
- Starita, L. M., Y. Machida, et al. (2004). "BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number." Mol Cell Biol **24**(19): 8457-8466.
- Thompson, M. E. (2010). "BRCA1 16 years later: nuclear import and export processes." FEBS J **277**(15): 3072-3078.
- Wei, S., X. Chen, et al. (2013). "Lenalidomide promotes p53 degradation by inhibiting MDM2 auto-ubiquitination in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion." Oncogene **32**(9): 1110-1120.
- Weissman, A. M., N. Shabek, et al. (2011). "The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(9): 605-620.
- Wenzel, D. M., K. E. Stoll, et al. (2011). "E2s: structurally economical and functionally replete." Biochem J **433**(1): 31-42.
- Yu, X., Y. Luo, et al. (2008). "BRCA1 overexpression sensitizes cancer cells to lovastatin via regulation of cyclin D1-CDK4-p21WAF1/CIP1 pathway: analyses using a breast cancer cell line and tumoral xenograft model." Int J Oncol **33**(3): 555-563.
- Zhang, H., Y. Xu, et al. (2013). "SILAC-based phosphoproteomics reveals an inhibitory role of KSR1 in p53 transcriptional activity via modulation of DBC1." Br J Cancer **109**(10): 2675-2684.
- Zhang, X. and S. B. Qian (2011). "Chaperone-mediated hierarchical control in targeting misfolded proteins to aggresomes." Mol Biol Cell **22**(18): 3277-3288.
- Zheng, N., P. Wang, et al. (2000). "Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases." Cell **102**(4): 533-539.