

Modulación de Ras a través de su interacción con proteínas de la familia de las ubiquitinas

Samuel Sánchez Bello

Grao en Bioloxía, Facultade de Bioloxía

Curso 2019-2020

1. Resumen

La proteína Ras es una pequeña GTPasa cuya activación provoca la transducción de señales que desencadena, entre otros efectos, la proliferación y el crecimiento celular. Se han descrito mutaciones de esta proteína que provocan una activación constitutiva, por lo que el gen pertenece al grupo de los “proto-oncogenes”. Una forma de controlar la actividad de la proteína es a través de modificaciones post-traduccionales. Ras puede sufrir diversas modificaciones post-traduccionales entre las que podemos citar la SUMOilación. SUMOilación consiste en la unión de forma covalente, a través de un proceso enzimático de la proteína SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifieir*) a residuos de lisinas específicos en sus sustratos. Muchos sustratos de SUMO pueden además interactuar con SUMO de forma no covalente a través de un dominio SIM (*SUMO Interaction Motif*) lo que supone otro mecanismo de regulación de las proteínas. Tanto la interacción covalente como la no covalente con SUMO puede modular, entre otros, la localización subcelular o la estabilidad de las proteínas con las que interacciona. Resultados preliminares del laboratorio indican que la proteína Ras interacciona con SUMO de forma no covalente. El objetivo de este trabajo es avanzar en el conocimiento de la relación entre Ras y SUMO. Los resultados obtenidos sugieren que la interacción de Ras con SUMO de forma no covalente tiene lugar en compartimentos celulares específicos diferentes de donde ocurre la interacción entre ambas proteínas de forma covalente. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la presencia de mutaciones en Ras podría impactar en la susceptibilidad de la proteína a ser SUMOilada. Los resultados mostrados en este trabajo son muy preliminares y requieren de su confirmación así como de experimentos adicionales a fin de poder corroborarlos.

2. Introducción

La familia de las proteínas Ras son proteínas que actúan como interruptores moleculares a través de su cambio entre una forma unida a GDP inactiva y una forma unida a GTP activa, de esta forma funcionan como reguladores clave en múltiples funciones celulares como proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Cox y Der, 2010).

Bajo el nombre de Ras se incluyen las tres isoformas presentes en mamíferos H-Ras, K-Ras y N-Ras, que producen cuatro proteínas diferentes (K-Ras sufre *splicing*), aunque con gran homología excepto en el extremo C-terminal (Mo, Coulson y Prior, 2018). La que más frecuentemente se encuentra mutada en los tumores es la isoforma K-Ras, seguida de N-Ras y H-Ras, aunque su frecuencia puede variar según el tipo de cáncer (Muñoz-Maldonado, Zimmer y Medová, 2019), (Stalneck y Der, 2020). Se han descrito más de 40 mutaciones en los genes Ras, aunque las principales afectan a los codones 12, 13 y 61, que provocan una activación constitutiva de las proteínas. Concretamente, para la isoforma H-Ras, la mutación más frecuente es la sustitución de la glicina en posición 12 por una valina (H-RasG12V) (Muñoz-Maldonado, Zimmer y Medová, 2019).

Se ha demostrado que las isoformas de Ras no son redundantes, sino que poseen funciones diferentes en tejidos y tipos celulares específicos, e incluso en diferentes estadios del desarrollo (Johnson *et al.*, 1997).

Aparte de la isoforma de la proteína, también es importante, entre otros, la localización subcelular de las proteínas porque determina la especificidad de la señalización y se piensa que contribuye a la ausencia de redundancia funcional entre las isoformas. Las proteínas Ras se sintetizan en el citosol y necesitan modificarse post-traduccionalmente mediante palmitoilación para poder asociarse a través de su camino por el retículo endoplasmático (ER)/Golgi a las membranas donde ejercen sus funciones. Su depalmitoilación hace que la proteína regrese al Golgi. Pero las proteínas Ras se han detectado también en otros orgánulos como los endosomas o en la mitocondria. Así, se ha demostrado que la proteína K-Ras en respuesta a la fosforilación en serina 181 promueve su acumulación en la mitocondria donde induce apoptosis (Bivona *et al.*, 2006). Otra modificación implicada en la regulación de la localización de Ras es la ubiquitina. Así, se ha visto que la ubiquitinación favorece su endocitosis (Jura *et al.*, 2006). La proteína H-Ras también se ha detectado en el núcleo celular donde se ha propuesto que podría estar asociada con replicación celular (Contente *et al.*, 2011).

La proteína Ras se regula, además, a través de otras modificaciones post-traduccionales como por ejemplo la conjugación a SUMO, modificación que se ha descrito necesaria para la viabilidad y transformación de las células de cáncer con Ras oncogénico (Choi, Chen, *et al.*, 2018).

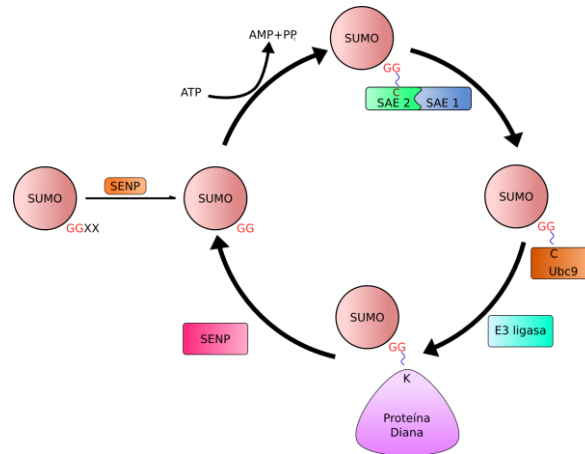


Figura 1: Proceso de SUMOilación. La proteína SUMO inmadura necesita la eliminación de una parte del extremo C-terminal para poder exponer el dominio di-glicina (GG), y este proceso es realizado por una proteasa específica de SUMO de la familia SENP (*sentrin-specific protease*). A continuación se produce la activación de SUMO y su unión al heterodímero SAE1/2 (*SUMO activating enzyme*), proceso que consume energía. A continuación se transloca la proteína SUMO al enzima Ubc9 (la única enzima conjugadora (E2) de SUMO que se conoce en mamíferos). Finalmente, la enzima E3 ligasa permite la unión de SUMO a la proteína diana a través de un residuo de lisina y la glicina C-terminal de SUMO. Este proceso es reversible de forma que la actividad de las proteasas de la familia SENP permiten la deconjugación de SUMO de su sustrato. El SUMO libre queda así disponible para volver a conjugarse. Información extraída de Flotho y Melchior, 2013.

SUMO es una proteína globular, similar a la ubiquitina, que puede conjugarse a residuos lisinas de proteínas sustrato a través de un proceso que requiere ATP y en el que participan tres tipos de enzimas específicas (Flotho y Melchior, 2013) (Figura 1). En mamíferos existen 4 isoformas de SUMO: SUMO1, SUMO2, SUMO3 y SUMO4. Las isoformas 2 y 3 presentan elevada homología entre ellas y se suelen denominar SUMO2/3, mientras que la isoforma SUMO1 solo tiene una homología del 50% con SUMO2/3. SUMO4 se cree que no puede conjugarse a sustratos (Owerbach *et al.*, 2005) (Figura 2).

```

SUMO1_HUMAN   MSDQEAKPSTEDLGDKKEGEYIKLKVIGQDSSEIHFVKVMTTHLKKLKEYCQRQGVPMN 60
SUMO4_HUMAN   MANE--KPT--EEVKTENNNHINLKVAGQDGSVVQFKIKRQTPLSKLMKAYCEPRGLSMK 56
SUMO2_HUMAN   MADE--KPK--EGVKTENNDHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMR 56
SUMO3_HUMAN   MSEE--KPK--EGVKTENNDHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMR 55
               *:::  **  :  ..:  .:::** **,*  :::** *  * *,**  :::**  :::  *,

SUMO1_HUMAN   SLRFLFEGQRIADNHTPKELGMEEDVIEVYQEQTGGHSTV----- 101
SUMO4_HUMAN   QIRFRFGQPISGTDKPAQLEMEDEDTIDVFQQPTGGVY----- 95
SUMO2_HUMAN   QIRFRFDGQPINETDTPAQLEMEDEDTIDVFQQQTGGVY----- 95
SUMO3_HUMAN   QIRFRFDGQPINETDTPAQLEMEDEDTIDVFQQQTGGVPESSLAGHSF 103
               .:** * ** *  ..*  .*  **,** **,*:**  **

```

Figura 2: Homología de las isoformas de SUMO en humanos. Podemos ver la comparación de las secuencias aminoacídicas de las 4 isoformas de SUMO en humanos. SUMO2 y SUMO3 muestran un 97% de homología y suelen denominarse SUMO2/3. SUMO1 muestra una homología de alrededor del 50% con SUMO2/3. Se ha propuesto que la presencia de una prolina en la posición 90 en SUMO4 impediría su maduración y su conjugación a sustratos. Secuencias sacadas de Uniprot y analizadas con Cluster Omega.

Además, en los últimos años se ha observado que muchas de las proteínas que pueden ser modificadas post-traduccionalmente por SUMO poseen un dominio conocido como *SUMO interaction motif* (SIM) que permite la interacción no covalente con SUMO o proteínas no SUMOiladas (Hecker *et al.*, 2006). Los dominios SIM se caracterizan por una secuencia consenso de aminoácidos hidrofóbicos (V/I/L)X (V/I/L)(V/I/L) (Zhao *et al.*, 2014). Dichos dominios pueden promover interacción con proteínas, regular su localización subcelular o favorecer cambios conformacionales o de estabilidad de las proteínas (Minty *et al.*, 2000).

Desde el descubrimiento de la proteína SUMO en 1995 hasta la actualidad, se ha demostrado que las consecuencias de la interacción de SUMO con su sustrato pueden ser diversas y dependen de la proteína sustrato a la que modifican. Entre dichas consecuencias se encuentran la regulación de la localización subcelular, la estabilidad o la actividad. La interacción de SUMO con sus sustratos regula muchos procesos celulares tales como la estabilidad del genoma, la proliferación celular, la localización de moléculas o los procesos de infección (Celen y Sahin, 2020). De esta forma se ha visto que una alteración en los procesos de SUMOilación están ligados a numerosos procesos patológicos entre los que se encuentra el cáncer (Yu *et al.*, 2015).

El número de sustratos de SUMO ha aumentado enormemente en los últimos años e incluye desde supresores de tumores a oncogenes. Como mencionamos anteriormente, uno de los oncogenes que puede ser modificado post-traduccionalmente con SUMO3 es la proteínas Ras (Choi, Chen, *et al.*, 2018). Sin embargo, hasta la actualidad no se ha demostrado si, al igual que ocurre con otros sustratos de SUMO, las proteínas Ras poseen dominios SIM funcionales ni cuales son las consecuencias de dicha interacción no covalente de Ras con SUMO. Resultados previos del laboratorio empleando ensayos de interacción *in vitro* entre GST-SUMO y Ras confirman dicha interacción no covalente (resultados no publicados). Además, el análisis *in silico* de la proteína empleando el programa GP-SUMO apunta a la presencia de varios potenciales dominios SIM en Ras (Figura 3).

ID	Position	Peptide	Score	Cutoff	P-value	Type
Unnamed	6 - 10	**MTEYKLVVVGAGGVGKS	34.267	0	0.075	SUMO Interaction
Unnamed	21 - 25	VGKSALTQLIQNHFVDEY	26.013	0	0.202	SUMO Interaction
Unnamed	44 - 48	EDSVRKQVVIDGETCLLDI	22.651	0	0.457	SUMO Interaction
Unnamed	52 - 56	VIDGETCLLDILDITAGQEE	32.286	0	0.2	SUMO Interaction
Unnamed	112 - 116	DSDDVPMVLVGNKCDLAAR	15.152	0	0.444	SUMO Interaction
Unnamed	159 - 163	VEDAFYTLVREIRQHKLRK	7.825	0	0.73	SUMO Interaction

Figura 3: Identificación de los posibles dominios SIM de H-Ras. Analizando la secuencia aminoacídica de H-Ras podemos observar la presencia de diversos potenciales dominios SIM.

Existen muchas incógnitas en la interacción entre Ras y las distintas isoformas de SUMO. En este trabajo nos hemos planteado avanzar en algunas de ellas.

3. Objetivos

- Visualización de la interacción Ras-SUMO en la célula: diferencias entre unión covalente y no covalente y entre SUMO1 y SUMO2.
- Evaluar si SUMO modula la estabilidad de H-Ras
- Determinar si los mutantes de Ras en el dominio SIM localizado entre los residuos 6-10 o en la lisina K5 tienen afectada la SUMOilación
- Determinar si mutaciones oncogénicas o del potencial dominio SIM localizado entre los residuos 6-10 alteran la capacidad de la proteína de interactuar con SUMO de forma no covalente

4. Material y métodos

Plásmidos

En este trabajo se han empleado una serie de plásmidos generados con anterioridad en el laboratorio: His6-SUMO2, EGFP-C3, pCAGGS-EYC-SUMO1, pCAGGS-EYC-SUMO2ΔGG, pCAGGS-EYC-SUMO2, pcDNA-V5-Ubc9, H-Ras-SIMMut y H-Ras5KR.

Clonaje

Durante el desarrollo de este proyecto hemos realizado técnicas de clonaje para obtener los plásmidos: pCAGGS-EYN-H-Ras61L, pCAGGS-EYN-H-RasG12V y pCAGGS-EYN-H-RasWT. La técnica usada para todos ellos es mediante el empleo de enzimas de restricción específicas y los vector usado ha sido el vector pcAGGS-EYN, que contiene la mitad N-terminal de la proteína YFP (*Yellow Fluorescent Protein*).

Para la obtención de los plásmidos se ha usado el siguiente procedimiento: amplificación de la región codificante para la proteína H-Ras silvestre (WT) o de las formas mutantes H-RasG12V o H-Ras61L mediante PCR con los cebadores específicos que se indican a continuación, la digestión del vector y el producto de amplificación con las enzimas de restricción específicas y la ligación con la enzima T4-DNA ligase empleando una proporción 1:5 entre vector e inserto.

Los cebadores utilizados son:

- Para el clonaje en el vector pcAGGS-EYN (H-RasG12V y H-RasWT)
 - pcAGGS-EYN-Ras-XhoI-*Forward*-5' GGCCCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCT-3'
 - pcAGGS-EYN-Ras-NheI-*Reverse*-5' GCTAGCTCAGGAGAGCACACACTT-3'
- Para el clonaje en el vector pcAGGS-EYN (H-Ras61L)
 - pcAGGS-EYN-Ras-XhoI-*Forward*-5' GGCCCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCT-3'
 - pcAGGS-EYN-Ras-NheI-*Reverse*-5' GCTAGCTCATTATATCACACACTT-3'

Transformación

Todos los vectores tienen como marcador de selección en bacterias el gen de resistencia a ampicilina, por lo que las bacterias transformadas son crecidas en un medio en LB con este

antibiótico. La transformación se realiza mediante el proceso físico de “choque térmico” (42 °C, 40 segundos) en bacterias *Escherichia coli* competentes.

Extracción y purificación de plásmidos

La extracción y purificación de plásmidos se ha realizado con dos kits comerciales: un kit de Miniprep (*genejet plasmid miniprep kit,thermoscientific*) o de Midiprep (*Nucleobond xtra midi, macherey-nagel*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cultivo de células y transfección

Las células empleadas para todos los experimentos son HEK-293 (*Human embryonic kidney 293 cells*), mantenidas a 37°C y 5% CO₂. Las células se cultivaron en medio “*Dulbecco’s modified Eagle’s medium*” (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (10%, FBS), 100U/ml de penicilina/estreptomicina y 20mM de L-Glutamina. Las transfecciones de los diferentes plásmidos se realizaron con polietilenimina (PEI), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Western Blot

El análisis de proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida -SDS (SDS-PAGE). La transferencia de proteínas se realizó empleando membranas de nitrocelulosa en un sistema húmedo durante 1,5 horas a 100 V y con refrigeración. Una vez hecha la transferencia, el bloqueo de las membranas se realiza mediante incubación durante 20 minutos en leche desnatada al 5% preparada en T-TBS (Buffer-tris salino suplementado con Tween 20) en agitación. La incubación con el anticuerpo primario se realiza durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-HA (901503, Biolegend), anti-His (ma1-21315Thermoscientific), anti-actina (sc47778, SantaCruz) y anti-GFP (902601, Biolegend). A la mañana siguiente se realizan 4 lavados de las membranas con T-TBS de 10 minutos cada uno, y se procede a la incubación con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-mouse conjugado a peroxidasa de rábano, anti-mouse-HRP) durante 45 min en agitación, siguiendo con otros 3 lavados con T-TBS de 10 minutos cada uno. Para el revelado se usa el método de la quimioluminiscencia.

Experimentos de estabilidad

Se realiza la transfección con los plásmidos correspondientes y después de 24h se añade cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas, CHX). Como control de eficiencia de transfección las células se co-transfectaron con GFP. Como control de cantidad de proteína cargada se lleva a cabo un Western-blot con el anticuerpo anti-actina.

“GST-pulldown”

El objetivo de este experimento es determinar si existe interacción no covalente entre dos proteínas. Las células transfectadas se recogen de placas p6 y se resuspenden en PBS. Se centrifugan durante 5 minutos a 1000g y se lisan con buffer de lisis (PBS pH=7,4, 1% Triton-X-100, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS), 1mM NaVO₃). El extracto se hace pasar a través de una aguja fina para favorecer la rotura de ADN. A continuación se centrifuga a 15000g a 4°C durante 30 minutos y se realiza una incubación con bolitas de glutation-sefarosa y con GST en noria durante 30 min a 4°C, realizando una centrifugación posterior a 1000g, 4°C y 1min, descartando el pellet (interacciones inespecíficas). Del sobrenadante, un porcentaje se diluye en buffer de carga para el input. El resto, se divide en dos, y uno se incuba con GST y bolitas de sefarosa y el otro con la construcción GST-SUMO1 y bolitas de sefarosa, en noria, a 4°C durante la noche. Por la mañana se realizan 4 lavados con buffer de lisis, y finalmente se resuspenden en buffer de carga para correr en un gel (hirviendo previamente durante 5 minutos).

Purificación de proteínas fusionadas a histidinas en condiciones desnaturalizantes

El objetivo de este experimento es evaluar la interacción covalente entre dos proteínas. Las células se cultivan en placas p60 y se resuspenden en PBS. Se separa un pequeño volumen para el input, que se resuspende con buffer de carga. El resto, se centrifuga y se resuspende en buffer G (clorhidrato de guanidina 6M, fosfato sódico 100mM, Tris-HCl pH=8.0 50mM), procediéndose a la lisis por sonicación (15%, 15 segundos). A continuación, se realiza la incubación en noria con las bolitas de Ni²⁺ (afinidad por las histidinas), y se lavan dichas bolitas con buffer U (urea 8M, fosfato sódico 100mM, Tris-HCl pH=8.0) cuatro veces. Finalmente, se resuspende tras el

último lavado en buffer de carga y se corren en SDS-PAGE (previamente hervidas durante 5 minutos).

Complementación molecular de fluorescencia (BiFC)

La técnica se emplea para visualizar las interacciones proteína-proteína y se basa en la complementación estructural entre dos fragmentos no fluorescentes N-terminal y C-terminal de una proteína fluorescente, en este caso, de la proteína “yellow fluorescent protein” (YFP). Para ello, primero se clonaron las proteínas de interés fusionadas a los extremos N-terminal o C-terminal de YFP. Estas construcciones (una fusionada al fragmento N-terminal y una fusionada al C-terminal de YFP) se co-transfectaron sobre células crecidas sobre cubres de cristal y a las 36 h de la transfección se incubaron a 30 °C durante 3 horas. Por último las células se lavan en PBS y se fijan con paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 minutos. Posteriormente se lleva a cabo la tinción de las proteínas de interés. Para ello primero se realiza la permeabilización incubándolas en una solución de PBS suplementado con Tween 20 al 0,25% durante 20 minutos. Posteriormente se lleva a cabo el bloqueo incubándolas en una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 2% en PBS y a continuación se incuban con la dilución del anticuerpo primario indicada por el fabricante preparada en la misma solución durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizan tres lavados de 5 minutos cada uno en PBS, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario (anti-ratón fusionado al fluorocromo Alexa647 y anti-conejo fusionado al fluorocromo Alexa546) durante una hora a temperatura ambiente. Por último se realizan tres lavados de 5 minutos cada uno en PBS y se finaliza tiñendo los núcleos de las células con DAPI.

5. Resultados

Visualización de la interacción Ras-SUMO en la célula: diferencias entre unión covalente y no covalente y entre SUMO1 y SUMO2

Con el fin de determinar si la interacción covalente y no covalente de Ras con SUMO tiene lugar en una misma localización subcelular y si existen diferencias en la localización subcelular en la que tiene lugar la interacción covalente de Ras con SUMO1 y con SUMO2, decidimos emplear

el sistema BiFC. Para ello, ya disponíamos en el laboratorio de los plásmidos de expresión de SUMO1, SUMO2 y de SUMO2 con una mutación que impide su conjugación a sustrato (SUMO2 Δ GG) fusionados a la mitad C-terminal de la proteína YFP por lo que en este trabajo tuvimos que clonar la secuencia codificante de Ras fusionada a la mitad N-terminal de la proteína YFP. Siguiendo el protocolo y los cebadores descritos en la sección de métodos clonamos la proteína HA-HRas-WT, HA-HRas61L y HA-HRasG12V fusionadas al extremo N-terminal de YFP. En la Figura 4 (panel izquierdo) mostramos una digestión del plásmido pcAGGS-EYN-Ras61L obtenido con XhoI y NheI. En el panel central y derecho de la Figura 4 mostramos los productos de amplificación de las distintas construcciones de Ras previo a la ligación con el vector.

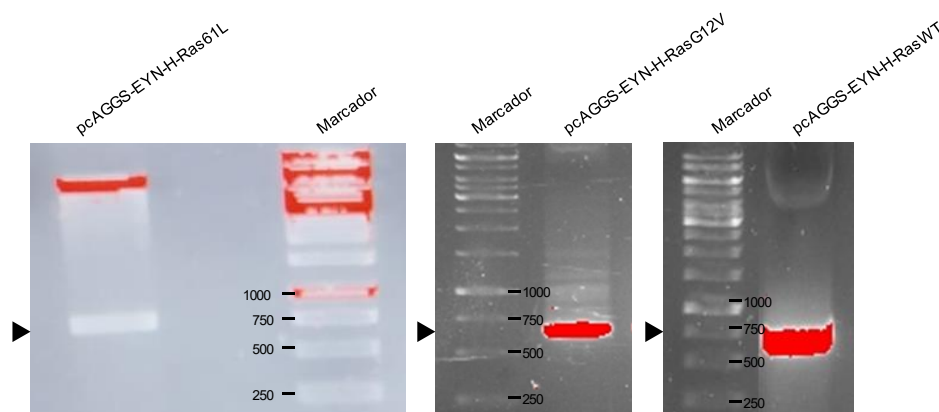


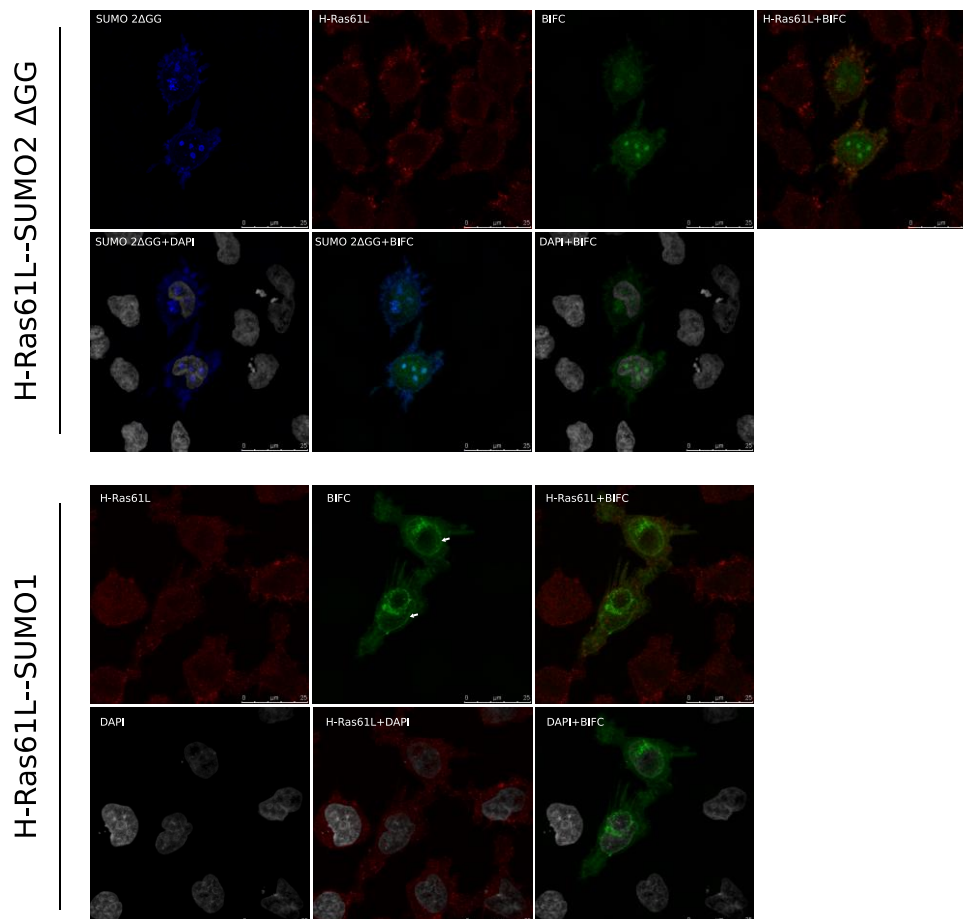
Figura 4: Análisis de distintos pasos del clonaje de Ras en el vector pcAGGS-EYN. Se muestran geles de agarosa al 1% en el que se analiza el producto de digestión de pcAGGS-EYN-Ras61L con XhoI y NheI (panel izquierdo); se muestra también el producto de amplificación por PCR para el mutante G12V y fenotipo salvaje de Ras (panel central y derecho). La punta de flecha indica el tamaño de Ras.

Una vez obtenidos los plásmidos mencionados, co-transfectamos células con pcAGGS-EYN-Ras61L y pcAGGS-EYC-SUMO1; pcAGGS-EYN-Ras61L y pcAGGS-EYC-SUMO2 o pcAGGS-EYN-Ras61L y pcAGGS-EYC-SUMO2 Δ GG y las procesamos siguiendo el protocolo de BiFc y finalmente las células las teñimos con anti-Ras y con anti-SUMO1 o SUMO2 según corresponda.

Tal y como podemos ver en la Figura 5 (flechas blancas), el mutante oncogénico H-Ras61L colocaliza con SUMO1 en la periferia del núcleo siguiendo una disposición similar a la de la membrana nuclear. Se ve también cierta acumulación en ciertas zonas de la periferia nuclear. Se

necesitaría hacer una co-tinción con marcadores de estructuras celulares como el retículo endoplásmico o la membrana nuclear para determinar si es esta su localización.

Detectamos una co-localización similar: rodeando el núcleo y acumulada en determinadas regiones perinucleares entre Ras61L y SUMO2 (flechas rojas). Por el contrario, la co-localización entre Ras61L y el mutante en SUMO incapaz de conjugarse (SUMO2 Δ GG) se detecta como agregados en el interior del núcleo. Estos agregados podrían corresponderse con el nucléolo pero para comprobarlo deberíamos llevar a cabo una co-tinción con un marcador nucleolar. A pesar de que la idea era llevar a cabo un estudio similar con las construcciones Ras-WT y RasG12V, los problemas de tiempo lo hicieron imposible.



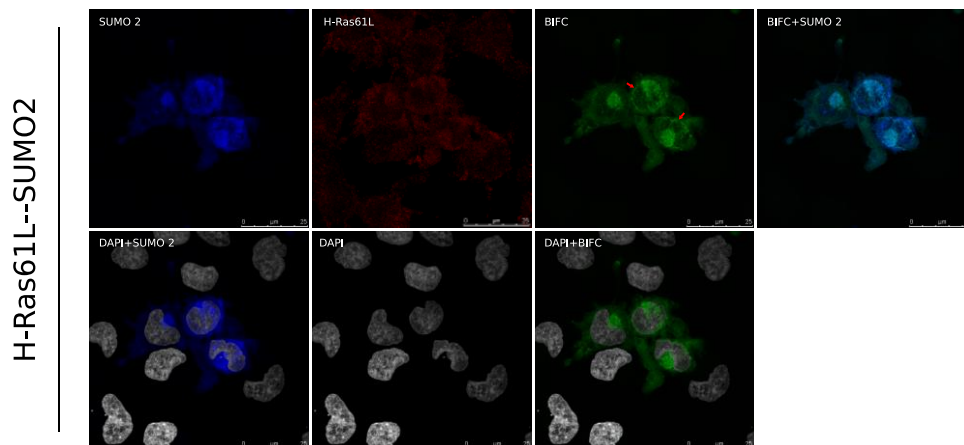


Figura 5: Inmunofluorescencia y BIFC system. Células HEK-293 fueron cotransfectadas con pcAGGS-EYN-H-Ras61L y una isoforma ó mutante de SUMO (pcAGGS-EYC-SUMO1, pcAGGS-EYC-SUMO2 o pcAGGS-EYC-SUMO2ΔGG). Después de 48h de la transfección, se procedió a la tinción con los anticuerpos correspondientes (ver parte superior izquierda de cada fotografía). Las flechas blancas indican la colocalización de SUMO1 y H-Ras61L en el sistema de endomembranas de la célula. Las imágenes fueron obtenidas por un microscopio confocal.

Estudio de la estabilidad de Ras tras alteraciones en los niveles de SUMOilación

Dado que la interacción de SUMO con sus sustratos podría alterar la estabilidad de los mismos, decidimos evaluar si alteraciones en los niveles de SUMOilación tenían algún efecto en la estabilidad de Ras. Para ello usamos dos experimentos independientes. En el primero, se transfectaron las células con HA-HRasWT y se trataron las células con el inhibidor de SUMOilación ML792 o no. En el segundo, se co-transfectaron las células con HA-HRasWT y pcDNA o con HA-HRasWT, Ubc9 y SUMO2, siendo tratadas a las 36h con CHX y recogidas las células a diferentes tiempos tras el tratamiento. Ambos experimentos fueron replicados dos veces, haciendo en la segunda vez una co-transfección en todos los casos con GFP para evaluar la eficiencia de transfección. Finalmente evaluamos los niveles de las proteínas transfectadas mediante Western-blot.

Aunque podemos observar que en general la estabilidad de Ras decae con el tiempo (Figura 6), no podemos concluir nada de este experimento ya que hemos tenido varios problemas tales como: la cantidad de muestra cargada no es similar en todos los casos (como se deduce de ver el Western-

blot frente a la actina), además de algún problema con el Western-blot (como puede verse en el anti-GFP en alguna de las condiciones).

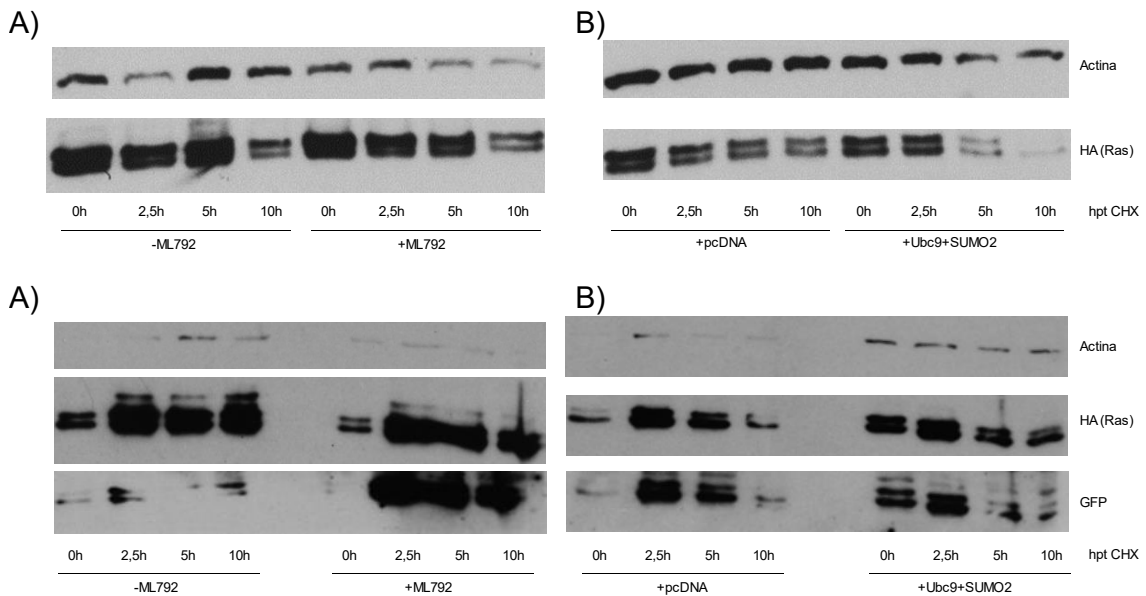


Figura 6: Estabilidad de H-Ras tras la modulación de la SUMOilación. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con H-RasWT y GFP y A) tratadas o no con el inhibidor de SAE ML792 y B) en cotransfección con pCDNA o SUMO2 y Ubc9. A las 36 h se trataron con cicloheximida y se recogieron a los tiempos indicados (hpt, horas post-tratamiento). Como control de cantidad de proteína se usa la actina. Se realizaron dos experimentos independientes, en las mismas condiciones, usando en el segundo la transfección con GFP para evaluar la eficiencia de transfección. El revelado del anti-GFP fue realizado después del HA (en la misma membrana).

La mutación del dominio SIM entre los residuos 6-10 de Ras favorece la conjugación con SUMO

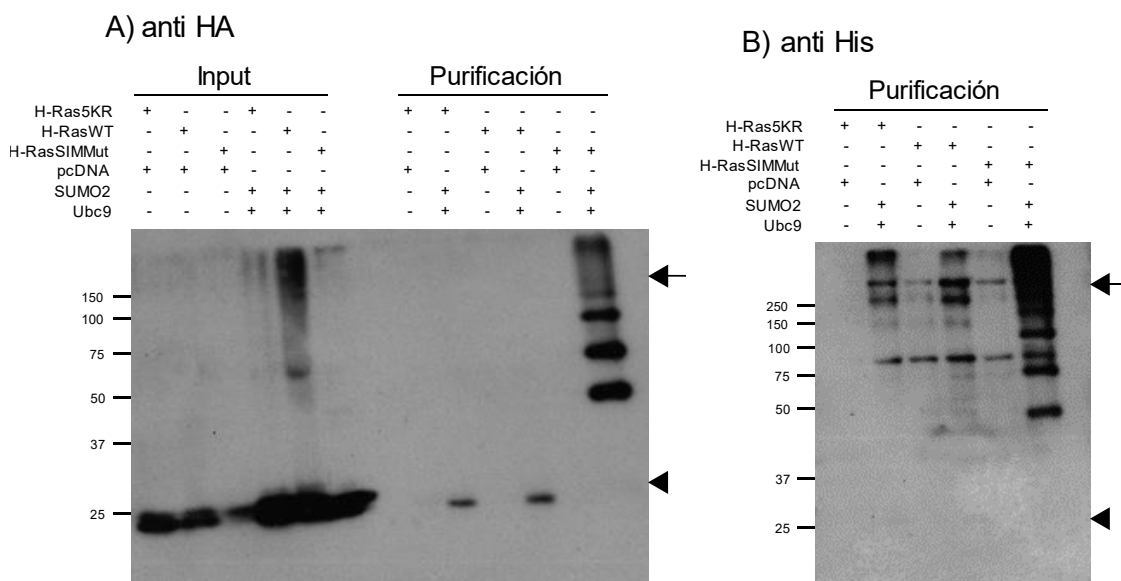


Figura 7: Evaluación de la interacción de tipo covalente entre H-Ras y SUMO2. Células HEK-293 fueron transfectadas con los mutantes 5KR o SIMMut de H-Ras, así como el fenotipo salvaje, junto con His6-SUMO2 y Ubc9. Como control se usa el vector pcDNA vacío. La purificación se realiza con bolitas de Ni²⁺-ácido-nitrilo-acético-agarosa. En los carriles en donde se transfectó SUMO2 y Ubc9 es en donde se esperaría la SUMOilación. La flecha indica la SUMOilación (unión covalente) de SUMO2 a H-Ras y la punta de flecha el peso molecular de H-Ras. Las membranas fueron reveladas primero en B) con anticuerpo anti-His y después en A) con anticuerpo anti-HA.

Con el fin de determinar si la mutación de uno de los posibles sitios SIM de la proteína Ras, el localizado entre los residuos 6-10 o si la lisina K5 podrían afectar a la capacidad de Ras de interaccionar de forma covalente con SUMO realizamos ensayos de SUMOilación *in vivo*. Co-transfectamos células con las distintas construcciones: HA-H-Ras -WT, HA-H-Ras -5KR o HA-H-RasSIMMut) junto con pcDNA o pcDNA-His6-SUMO2 y Ubc9. A las 48h de la transfección, se llevó a cabo la purificación de las proteínas fusionadas a histidina en condiciones desnaturizantes y las proteínas obtenidas se analizaron mediante Western-blot con anticuerpo anti-HA o anti-Histidinas. En el Western-blot anti-HA realizado con el extracto total (input) observamos una banda que se corresponde con la proteína Ras transfectada (Figura 7). En la parte correspondiente a la purificación, esperábamos ver bandas de mayor peso molecular que Ras en aquellos carriles en los que transfectamos His6-SUMO2, correspondientes con la proteína Ras SUMOilada (Figura 7). Sin embargo, solo detectamos dichas bandas en el carril transfectado con el mutante en el dominio SIM (Figura 7). La incubación de la parte purificada con anti-histidinas indica que el plásmido de expresión de His6-SUMO2 sí se expresó aunque los niveles parecen mayores en el carril correspondiente con el mutante SIM (tampoco podemos descartar que parte de esa señal mayor señal del anti-Histidinas no sea señal del anti-HA anterior (Figura 7). Estos resultados sugieren que la mutación del dominio SIM 6-10 podría favorecer la interacción de HRas con SUMO2 de forma covalente, aunque no podemos descartar que las diferencias observadas no se deban a diferencias en los niveles de SUMO2 en las células.

Determinadas mutaciones en Ras alteran la capacidad de la proteína de interactuar con SUMO de forma no covalente

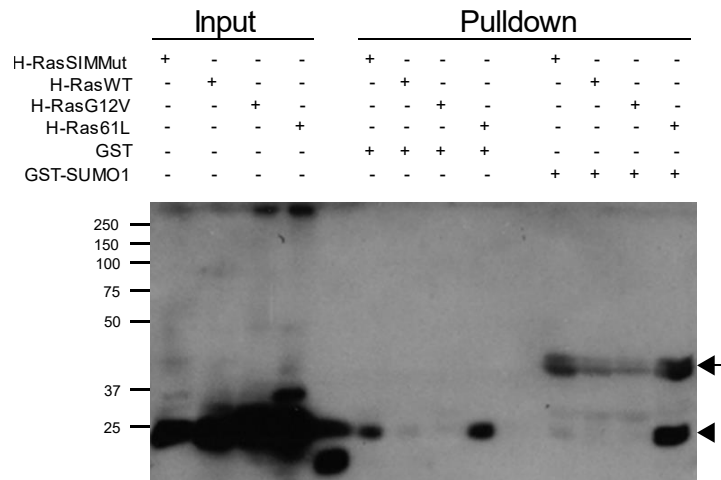


Figura 8: Evaluación de la interacción de tipo no covalente entre distintos mutantes de HRas y SUMO1. Células HEK-293 fueron transfectadas con H-RasSIMMut, H-RasWT, H-RasG12V o H-Ras61L, y a las 48 horas fueron recogidas para la realización del GST-pulldown. La flecha indica una banda inespecífica. La punta de flecha indica el peso molecular de H-Ras. La membrana fue revelada con anticuerpo anti-HA.

El objetivo de este experimento es determinar si la interacción de tipo no covalente entre SUMO1 y la proteína H-Ras se ve alterada por la presencia de mutaciones en la misma. Este ensayo se llevó a cabo como se indica en métodos empleando extractos de células transfectadas con construcciones que expresan Ras-WT o los mutantes en el SIM 6-10 (SIMMut), G12V o 61L. Observamos (Figura 8) una banda correspondiente con interacción con GST-SUMO1 en el carril correspondiente con el mutante 61L y con el SIM 6-10 lo que podría indicar una mayor interacción de estas formas con SUMO1. Sin embargo, también observamos que estas dos proteínas también se ven interaccionando con la proteína GST (unión inespecífica) así que no podemos concluir nada. Necesitaríamos repetir el experimento en condiciones más astringentes para asegurarnos que no hay interacción inespecífica entre la proteína y GST.

6. Discusión

Nuestros resultados empleando el sistema BiFC parecen indicar que la co-localización de Ras61L con SUMO1 o con SUMO2 tiene lugar alrededor del núcleo así como en áreas de la periferia nuclear que podrían ser compatibles con el retículo endoplásmico o Golgi, zonas habituales de

localización de Ras (Chiu *et al.*, 2002). Por el contrario la localización de Ras con la forma de SUMO2 que no puede ser conjugada a sustratos tiene lugar en el núcleo celular. Estos resultados sugieren que la interacción no covalente entre Ras61L y SUMO podría tener lugar en el núcleo celular, a diferencia de la unión covalente, más citoplásmica. No sabemos cuáles son las implicaciones funcionales de esta diferencia en localización, algo que sería importante estudiar. Basándonos en el trabajo descrito por Chiu *et al.*, 2002 en el que demuestra que la localización subcelular de Ras es importante para activar la ruta de las MAPK, podemos hipotetizar que la interacción no covalente de H-Ras61L con SUMO2 provocaría un “secuestro” de Ras que evitaría la activación de las MAPK al evitar su instalación en el sistema de endomembranas. Ha sido publicado que la SUMOilación de Ras en la lisina 42 determina la función y actividad de la proteína Ras y que la inhibición de la enzima SUMO E2 provoca una disminución del carácter oncogénico de células tumorales (Choi, Philips, *et al.*, 2018). Dichos resultados sugieren que la interacción covalente con SUMO favorecería la oncogenicidad de Ras. De ser cierta nuestra hipótesis, la interacción no covalente con SUMO podría modular negativamente dicha actividad. Por otro lado, dado que la localización subcelular tiene una implicación directa en la actividad de la proteína, sería interesante realizar los mismos ensayos con la proteína Ras-WT en lugar de hacerlo con la forma oncogénica 61L y comparar también el resultado con otras formas oncogénicas de Ras. Por otro lado, nuestros resultados de análisis de interacción covalente de mutantes de Ras con SUMO sugieren que una mutación en el putativo dominio SIM 6-10 podría favorecer la interacción covalente de Ras con SUMO. Las razones para esta mayor afinidad del mutante podrían ser varias como por ejemplo que la mutación provoque un cambio conformacional de la proteína que haga más accesibles las lisinas susceptibles a conjugar SUMO. Pero podrían existir otras explicaciones como por ejemplo, que exista un cambio en la localización subcelular del mutante en SIM 6-10 que favorezca la interacción con SUMO. De todas formas, como se mencionó en el apartado de resultados, los resultados de SUMOilación que se presentan en este trabajo deberían de repetirse para ver si se confirma esta hipótesis. De igual forma, los resultados de estabilidad o el ensayo de interacción no covalente con los mutantes necesitan repetirse para poder ser evaluados.

Se ha publicado también que la diferente posición en el aparato de Golgi se debe a estados de palmitoilación desiguales (Lynch *et al.*, 2015). Podría ocurrir que la SUMOilación o interacción no covalente con SUMO alterase dicha palmitoilación, algo que sería necesario evaluar.

Otro aspecto que nos pareció interesante abordar es si SUMO podría tener un impacto en la estabilidad de Ras ya que existen estudios en dónde se ha demostrado que la SUMOilación puede favorecer la estabilidad de ciertas moléculas al impedir la ubiquitinación (Li *et al.*, 2016). Problemas técnicos y de tiempo han imposibilitado poder sacar ninguna conclusión de los experimentos realizados con este objetivo pero considero que en el futuro sería importante evaluar la posibilidad de que un aumento en la estabilidad por SUMOilación pudiera estar detrás del efecto positivo de esta modificación post-traducciona l en la actividad de la proteína.

7. Conclusiones

- La interacción de la forma oncogénica de H-Ras mutada en el residuo 61, H-Ras61L con SUMO de forma covalente y no covalente tiene lugar en localizaciones subcelulares específicas lo cual podría tener implicaciones funcionales sobre Ras.
- La existencia de mutaciones en determinados residuos de la proteína podría tener un impacto en la afinidad de Ras para ser SUMOilado lo que, a su vez, podría tener implicaciones funcionales sobre Ras.

8. Bibliografía

Bivona, T. G. *et al.* (2006) 'PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis', *Molecular Cell*, 21(4), pp. 481–493. doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.012.

Celen, A. B. and Sahin, U. (2020) 'Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts', *The FEBS Journal*, pp. 1–31. doi: 10.1111/febs.15319.

Chiu, V. K. *et al.* (2002) 'Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi', *Nature Cell Biology*, 4(5), pp. 343–350. doi: 10.1038/ncb783.

Choi, B. H., Philips, M. R., *et al.* (2018) 'K-Ras Lys-42 is crucial for its signaling, cell migration, and invasion', *Journal of Biological Chemistry*, 293(45), pp. 17574–17581. doi: 10.1074/jbc.RA118.003723.

Choi, B. H., Chen, C., *et al.* (2018) 'RAS GTPases are modified by SUMOylation', *Oncotarget*, 9(4), pp. 4440–4450. doi: 10.18632/oncotarget.23269.

Contente, S., Yeh, T. J. A. and Friedman, R. M. (2011) 'H-ras localizes to cell nuclei and varies with the cell cycle', *Genes and Cancer*, 2(2), pp. 166–172. doi: 10.1177/1947601911405042.

Cox, A. D. and Der, C. J. (2010) 'Ras history: The saga continues', *Small GTPases*, 1(1), pp. 2–27. doi: 10.4161/sgtp.1.1.12178.

Flotho, A. and Melchior, F. (2013) 'Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease', *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), pp. 357–385. doi: 10.1146/annurev-biochem-061909-093311.

Hecker, C. M. *et al.* (2006) 'Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs', *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), pp. 16117–16127. doi: 10.1074/jbc.M512757200.

Johnson, L. *et al.* (1997) 'K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras', *Genes and Development*, 11(19), pp. 2468–2481. doi: 10.1101/gad.11.19.2468.

Jura, N. *et al.* (2006) 'Differential modification of Ras proteins by ubiquitination', *Molecular Cell*, 21(5), pp. 679–687. doi: 10.1016/j.molcel.2006.02.011.

Li, S. *et al.* (2016) 'SUMOylation of PES1 upregulates its stability and function via inhibiting its ubiquitination', *Oncotarget*, 7(31), pp. 50522–50534. doi: 10.18632/oncotarget.10494.

Lynch, S. J. *et al.* (2015) 'The differential palmitoylation states of N-Ras and H-Ras determine their distinct Golgi sub-compartment localizations', *Journal Cell Physiology*, 230(3), pp. 1–23. doi: 10.1002/jcp.24779.

Minty, A. *et al.* (2000) 'Covalent modification of p73 α by SUMO-1: Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif', *Journal of*

Biological Chemistry, 275(17), pp. 36316–36323. doi: 10.1074/jbc.M004293200.

Mo, S. P., Coulson, J. M. and Prior, I. A. (2018) ‘RAS variant signalling’, *Biochemical Society Transactions*, 46(5), pp. 1325–1332. doi: 10.1042/BST20180173.

Muñoz-Maldonado, C., Zimmer, Y. and Medová, M. (2019) ‘A comparative analysis of individual ras mutations in cancer biology’, *Frontiers in Oncology*, 9(OCT), pp. 1–22. doi: 10.3389/fonc.2019.01088.

Owerbach, D. *et al.* (2005) ‘A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2), pp. 517–520. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.090.

Stalneck, C. A. and Der, C. J. (2020) ‘RAS, wanted dead or alive: Advances in targeting RAS mutant cancers’, *Science signaling*, 13(624), pp. 1–7. doi: 10.1126/scisignal.aay6013.

Yu, B. *et al.* (2015) ‘Oncogenesis driven by the Ras/Raf pathway requires the SUMO E2 ligase Ubc9’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(14), pp. E1724–E1733. doi: 10.1073/pnas.1415569112.

Zhao, Q. *et al.* (2014) ‘GPS-SUMO: A tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs’, *Nucleic Acids Research*, 42(W1), pp. 1–6. doi: 10.1093/nar/gku383.