



Caracterización funcional de la interacción de la proteína p53 con la ubiquitina ligasa HERC2

Mónica Cubillos Rojas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

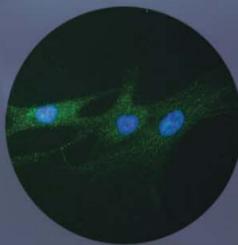
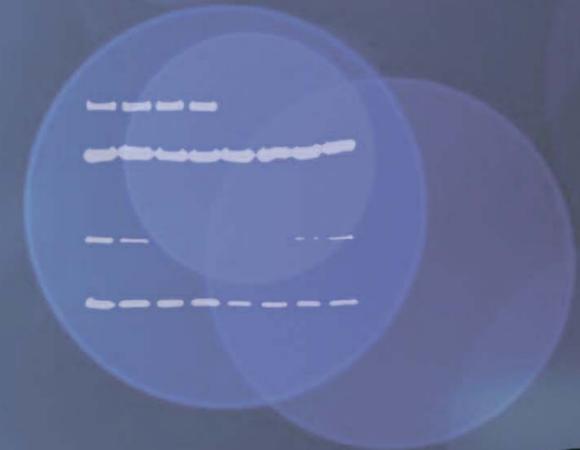
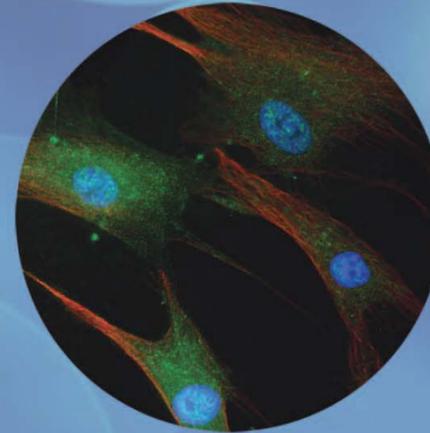


Monica Cubillos Rojas

Tesis Doctoral

2014

Caracterización funcional de la interacción de la proteína p53 con la ubiquitina ligasa HERC2



Mónica Cubillos Rojas
Tesis Doctoral
2014



UNIVERSIDAD DE BARCELONA



UNIVERSIDAD DE BARCELONA



**Caracterización funcional
de la interacción de la proteína p53
con la ubiquitina ligasa HERC2**

Mónica Cubillos Rojas

Tesis Doctoral

2014



Caracterización funcional de la interacción de la proteína p53 con la ubiquitina ligasa HERC2

Memoria presentada por:

Mónica Cubillos Rojas

Para optar por el título de doctor en Biomedicina

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. José Luis Rosa López

en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular

del Departamento de Ciencias Fisiológicas II

de la Universidad de Barcelona

Mónica Cubillos Rojas

Dr. José Luis Rosa López

A mis padres y hermanos

Agradecimientos

Si miro hacia atrás me parece que llevo más de dos vidas haciendo la tesis, pero sin duda ha sido una experiencia inolvidable que ha valido la pena vivirla. En primer lugar, tengo que agradecer a mi director de tesis, José Luis, por haberme dado la oportunidad y confiar en mí para iniciar este viaje por HERC2, una proteína tan grande en tamaño como importante en funciones. Por incentivar me la curiosidad por los más mínimos detalles, por tu exigencia y perfección, porque sin duda han hecho de mí una mejor científica. Pero en especial por tu calidad humana. Ha sido un privilegio haber formado parte de tu grupo.

Y como no agradecer a mi grupo de "LQs "; que sin duda han sido las mejores amigas y compañeras de travesía que pude haber conseguido. A Fabiola, mi mamita querida, por hablar mi mismo idioma, por su humor y el sarcasmo como medicina para vivir mejor, por los siempre bienvenidos cafés y helados, por los viernes musicales, las escapaditas al spa, los regaños oportunos, el trueque de experimentos.

A Cami, por ver siempre el lado cool de la vida, por tus abrazos e inyecciones de cariño en el momento indicado, por las cenas y vinos, por enseñarme la Barcelona nocturna, por nunca estar ausente.

A Mariela, mi hermanita mayor, no por la edad (yo te veo de 15), sino por tu capacidad para ayudarme a mantener la calma ante el pánico y el estrés, por tus consejos para darle más color a mis inmunes y una mejor cara a las células en cultivo. Por compartir tanta sabiduría en repostería, por los domingos de cupcakes y pelis alemanas, por las tardes y mañanas de vestidos de boda, por estrenarme como tía y por estar siempre tan pendiente a mí a pesar que tu nueva faceta te ocupa el día ☺. Te extrañare tanto!!!

A Tai, porque cuando más sola empecé a sentirme en el lab llegaste con tu alegría y tu energía para hacer que el sol volviera a iluminar y que el día a día sea más fácil de llevar. Por estar siempre dispuesta a ayudarme ya sea pasando células, poniendo anticuerpos o haciendo mudanzas. Cariño, te deseo lo mejor en esta etapa que apenas comienza para ti, espero que conquistes HERC1 y podamos celebrarlo juntas. Además, nos queda pendiente nuestro viaje.

A Migue, mi amigo y asesor de softwares, técnicas y cuanto cosa siempre necesité. Porque tu amistad fue vital para contrarrestar los problemas, por las tantas conversaciones (aunque solo hablara yo) y chats (donde solo escribías tú), por los tequilas, las pizzas y un inmenso número de cosas que aún sigo extrañando. Espero verte muy pronto mi PG.

A Tati, porque aunque empezamos juntas y luego por cosas de la vida terminamos haciendo la tesis en sitios distintos, siempre nos hemos apoyado y nunca nos hemos dejado la una a la otra. Eres una tesa y estoy segura que la ciencia recibirá de ti grandes cosas.

Al combo brasileiro que invadió el 4114. En especial a Roberto Christ, porque en las cortas temporadas que estuviste en el laboratorio te ganaste un lugar muy especial que perdura hasta el día de hoy. Espero que con todo el dinero que estás ganando en Santa María vengas a visitar a los amigos pobres que dejaste aquí!!! A Anna Siebel, porque aun cuando era difícil entrar a tu mundo paralelo, pasamos muy buenos momentos, también gracias por tu trabajo que dio frutos en forma de Plos One.

A mis chicos Gilians con quienes compartí las mejores comidas o shawarmas, pero no por el buen sabor de los menús sino por las divertidas y siempre amenas conversaciones. Empezando con Dani, por tus buenos consejos para no querer huir del laboratorio, por hacer divertido ajustar el pH y por tus siempre divertidos comentarios. A Ana María, por tu impecable organización y maravillosa labor como técnico de cultivos cuando lo fuiste que hacen que hasta el día de hoy encontrar todo sea muy fácil, por ser tan buena compañera. A la Cris, que desde el primer momento llegó con tanta energía y entusiasmo que era imposible no contagiarse, te deseo mucha suerte en el tiempo que te queda. A Albi, aunque ya no estás siempre era un placer hablar contigo y por el mutuo ánimo.

Y luego están mis compañeros de cultivos, que aunque en un principio eran bastante tímidos luego no se resistieron, ja ja, los Estévez. Empezando con Xavi, una de las personas más amables y nobles que he conocido, por ser un auténtico caballero y un trabajador incansable. A Tania, porque siempre fuiste muy amable y cordial conmigo. A Sònia y Tanit empezamos al tiempo y casi que acabamos juntas, ánimo chicas!! ya casi, ya casi. A Petra, la otra super compañera de cultivos, por tu amabilidad y disposición para que la sala se mantenga libre de mycoplasma.

También tengo que agradecer a gente que ya no está como Sandra, Laurita, Andy, Roser, Ruth, Eddie que siempre estaban dispuestos a ayudarte si lo necesitabas. A los compañeros de pasillo que siempre tienen una sonrisa o un saludo o la buena actitud para colaborar como Bea, Betta, Eduardo, Natalia, Ana R, Ana V, Anna M, Fina, Joan, Santi. Rubén que tuvo que encargarse de cultivos para hacerlo hablar, ja ja, eres una muy buena persona y espero que consigas todos tus anhelos. A Susana, la última incorporación del laboratorio, te deseo muchos éxitos en tus proyectos.

A Esther por toda su labor llevando los pedidos, OTs y cuantos problemas haya que resolver. A Josep Maria, por su amabilidad y disposición para encargarse de los temas financieros y administrativos. A Alcira porque ha sido una verdadera ayuda que llegara al Departamento, además porque de tus conversaciones siempre se termina aprendiendo o enterándose de curiosidades.

A todos los jefes que hacen de la cuarta planta un sitio acogedor para hacer la tesis.

A Esther Castaño y Benja por su excelente labor en Serveis. Esther siempre con los mejores consejos sobre citometrías y los análisis de Real Time y Benja por querer incentivar me el gusto por las IFs, aunque aún hasta el día de hoy no lo encuentro... pero con tu buena y divertida actitud resultaba siempre más fácil mentalizarse que debía repetirse el experimento.

A Sole, por toda tu colaboración para los ensayos de letalidad embrionaria y tus siempre pertinentes consejos.

A Martha, porque sin tu ayuda sería más difícil hacer el trabajo con los ratones. Es difícil encontrar personas tan comprometidas con su trabajo y tú eres una de ellas. Eres una bacana y espero que finalices tu tesis muy pronto y que tanto esfuerzo lo veas recompensado dentro de muy poco.

A Helena A., por tu colaboración con los ensayos con nude mice, porque aunque no obtuvimos lo esperado, fue un placer trabajar contigo.

A todo el personal del estabulario por su colaboración y buena disposición.

A la familia que conseguí aquí con Jaime, Maye y Jairo. Su cariño y amistad me dieron las fuerzas suficientes para mantenerme en pie cuando decidí iniciar esta aventura. Los quiero muchísimo y siempre les estaré eternamente agradecida por haberme hecho sentir querida y protegida. Espero verlos muy pronto.

A los demás miembros de mi familia que no me olvidan a pesar de los años y siempre sacan un tiempito para un mensaje y saber de mí.

A mis papás y hermanos, el tesoro más preciado que tengo. Papi y mami, nunca podré recompensarlos por todo lo que hacen por mí y por mis hermanos. Porque no ha pasado ni un solo día en los 1825 que llevo aquí en que me haya sentido abandonada por ustedes, porque a tantos kilómetros de distancia estaban pendientes de celebrar que un experimento saliera y me animaban a continuar cuando las cosas se ponían difíciles. Papi eres mi mayor ejemplo de tenacidad, esfuerzo y trabajo, y mami eres mi cómplice y ejemplo de bondad. Son la columna vertebral de mi vida. A Ximena, porque con tu sensatez y tú forma de ver la vida siempre he tenido los mejores consejos. Estoy muy orgullosa de ti por todo lo que tienes y lo mucho que te falta por conseguir, sos grande che!!! A Nestor, por tu cariño y todas nuestras clases virtuales de Photoshop. Más de una vez me salvaste la vida!!! También gracias por la portada de esta tesis, me encantó. Aunque apenas estás empezando tu camino profesional, estoy segura de que llegarás muy lejos por ese gran talento que tienes. Esta tesis es tan mía como de ustedes y todo lo que consiga siempre será por ustedes y para ustedes. Los quiero muuuuucho.

A Alejo, mi buffer perfecto, quién consigue mantener estables mis concentraciones de euforias y tristezas 🌟. Porque llegaste inesperadamente a mi vida para llenarla de amor y alegría. Por querer entrar en mi mundo donde la s y la z suenan igual y la arepa no puede faltar. Por leerte más de 4 veces esta tesis... y porque espero seguir compartiendo mi vida a tu lado para que podamos celebrar nuestros éxitos y apoyarnos en nuestros fracasos. Gracias por ser simplemente quien eres y hacer que seamos lo que somos. Te quiero.

Monica

Tabla de contenido

Introducción	7
1. La familia de proteínas HERC	9
1.1 El dominio RLD	9
1.2 El dominio HECT	12
1.3 Las proteínas HERC gigantes	18
1.3.1 HERC1	18
1.3.2 HERC2	20
1.4 Las proteínas HERC pequeñas	28
1.4.1 HERC3	28
1.4.2 HERC4	29
1.4.3 HERC5	29
1.4.4 HERC6	32
2. El gen supresor de tumores p53	33
2.1 p53 como guardián del genoma	37
2.2 La respuesta de p53 ante bajos niveles de estrés: parada del ciclo celular y reparación del DNA	38
2.3 Inducción de apoptosis por p53 cuando el daño es irreparable	41
2.4 Regulación de p53	43
2.4.1 Estructura de p53	44
2.4.2 Modificaciones post-transduccionales de p53	45
2.4.2.1 Fosforilación	45
2.4.2.2 Acetilación	47
2.4.2.3 Metilación	49

2.5 MDM2, un importante regulador de p53	50
2.6 Otras modificaciones por ubiquitina y moléculas similares a la ubiquitina	54
2.7 Regulación de la oligomerización de p53	55
Objetivos	61
Materiales y métodos	65
1. Plásmidos	67
2. Anticuerpos	69
3. Cultivos celulares	70
4. Transfección de plásmidos y siRNAs	71
5. Tratamientos con drogas o inhibidores	72
6. Curvas de crecimiento y ensayos de clonogenicidad	72
7. Expresión y purificación de proteínas	73
8. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE e inmunoblot	74
9. Ensayos de inmunoprecipitación, pull-down, interacción directa y oligo pull-down	76
10. Fraccionamiento subcelular	77
11. Ensayos de cross-linking	78
12. Inmunofluorescencia	78
13. Ensayos de reporteros luciferasa	79
14. RT-PCR en tiempo real	79
15. Clonación de DNA recombinante	79
16. Mantenimiento de la colonia de ratones y genotipado	80
17. Análisis estadísticos	80

Resultados	81
1. Implementación de un sistema de análisis simultáneo de proteínas de alto y bajo peso molecular	83
2. Caracterización de la interacción HERC2-p53	88
2.1 Caracterización de la proteína HERC2: validación de anticuerpos y RNAs de interferencia para estudios funcionales	88
2.2 Identificación de la interacción HERC2-p53	91
2.3 Regulación de la actividad transcripcional de p53 por HERC2	97
2.4 Efecto de HERC2 en el crecimiento celular	102
2.5 Efecto del proteasoma y de otras ubiquitinas ligasas en la regulación de p53 por HERC2	107
2.6 Análisis de la respuesta de p53 al estrés genotóxico en ausencia de HERC2	110
2.7 Localización celular de la interacción HERC2-p53 y el efecto del estrés genotóxico sobre esta interacción	114
2.8 Regulación de la oligomerización de p53 por HERC2	116
3. Función de HERC2 en modelos <i>in vivo</i>	121
3.1 Caracterización molecular de una mutación de HERC2 que causa una enfermedad similar al síndrome de Angelman	121
3.1.1 Regulación de la vía de señalización de p53 por la proteína HERC2 ^{Pro594Leu}	127
3.2 Caracterización de los ratones <i>Herc2</i> ⁵³⁰ : <i>Herc2</i> es un gen esencial	129
Discusión	135
Conclusiones	153
Bibliografía	157
Listado de abreviaturas	181

Publicaciones

189

Cubillos-Rojas, M *et al.* (2010). *Electrophoresis*, 31(8), 1318–21.

Cubillos-Rojas, M., *et al* (2012). *Methods in Mol. Biol.* 869, 205–13.

Harlalka, G. V, *et al.* A.H. (2013). *J. Med. Genet.* 50(2), 65–73.

Siebel, A.,*et al.* (2013). *PloS One*, 8(9), e75523.

Cubillos-Rojas, M.,*et al.* (2014). *J. of Biol. Chem.* 289(21), 14782-14795.