

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

«The best way to have a good idea is to have lots of ideas»

Linus Pauling (1901-1994)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de moléculas asociadas a HERC1

4.1.1. Interacción entre HERC1 y M2PK

Con el fin de hallar proteínas que interaccionaran con HERC1, se efectuaron varios cribajes de una genoteca de cDNA de células HeLa mediante el sistema de los dos híbridos en *Saccharomyces cerevisiae* (ver Materiales y Métodos). En estos cribajes se utilizaron distintos dominios de HERC1 como cebos, incluyendo los dominios N-terminal (aa 1-281), RLD1 (aa 281-1413), SPRY (aa 1860-2290), WD40 (aa 3410-3835), HECT (aa 4496-4861) y C-terminal (aa 4848-4861) (el dominio RLD2 ya había sido utilizado previamente en este sistema, lo cual permitió encontrar su interacción con la cadena pesada de la clatrina (Rosa y Barbacid (1997))). A pesar de que en todos los casos se analizaron más de un millón de clones, sólo se obtuvieron clones positivos cuando se usó el dominio HECT de HERC1 como cebo. En este caso, la secuenciación de los positivos obtenidos reveló dos cDNAs distintos. En primer lugar, se obtuvo el cDNA de la proteína TopBP1 (*Topoisomerase II-binding protein-1*), una proteína nuclear implicada en procesos de reparación del DNA. Dado que HERC1 no se halla dentro del núcleo de las células (Rosa et al. (1996)), que TopBP1 no es coinmunoprecipitada por anticuerpos anti-HERC1 (datos no mostrados) y que poco después de la identificación de TopBP1 en nuestro laboratorio se describió que esta proteína se une y es ubiquitinada por otra ubiquitina ligasa de tipo HECT llamada hHYD (Honda et al. (2002)), concluimos que la unión en levadura entre el HECT de HERC1 y TopBP1 es probablemente un artefacto de la promiscuidad de TopBP1 para interaccionar con otros dominios HECT además del que participa habitualmente en su regulación fisiológica. No obstante, no se puede descartar que HERC1 y TopBP1 puedan interaccionar durante la mitosis, cuando no existe envoltura nuclear y TopBP1

se halla unida a los centrosomas (Reini et al. (2004)). El segundo cDNA aislado en el cribaje con el dominio HECT de HERC1 fue el correspondiente a la isoforma M2 del enzima glucolítico piruvato quinasa (M2PK) (Figura 14). Este cDNA se halló en aproximadamente un 80% de los clones positivos obtenidos y, a juzgar por el tamaño de dichos clones en un medio selectivo que permite sólo el crecimiento de las levaduras cuando se produce una interacción lo suficientemente fuerte en su interior entre la proteína cebo y la de la genoteca, la unión HECT-M2PK debe ser bastante más fuerte que la unión HECT-TopBP1. Estos datos nos convencieron del potencial interés de la interacción HERC1-M2PK, por lo cual decidimos estudiarla en mayor profundidad.

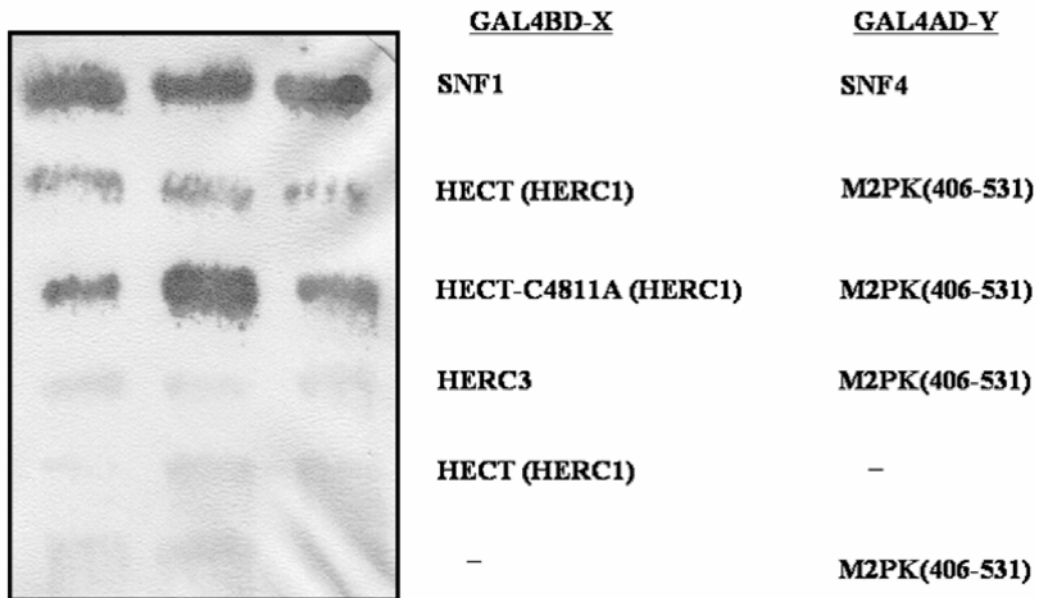


Figura 14. Interacción entre el HECT de HERC1 y M2PK en levadura. En cada hilera se muestran tres clones de levadura independientes que han sido transformados con plásmidos que expresan las proteínas indicadas (X o Y) fusionadas con el dominio de unión al DNA (columna izquierda, GAL4BD-X) o con el dominio de activación transcripcional (columna derecha, GAL4AD-Y) del factor de transcripción GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*. La presencia de interacción entre las proteínas de fusión se manifiesta por el color azul de los clones en un ensayo de actividad β -galactosidasa. De arriba a abajo, control positivo de interacción entre las proteínas SNF1 y SNF4; unión entre el HECT de HERC1(aa 4496-4861) y la piruvato quinasa M2 (M2PK, aa 406-531); unión entre el mutante de la cisteína del centro activo del HECT(Cys4811Ala) y M2PK; ausencia de interacción entre HERC3 y M2PK; control negativo del HECT de HERC1; control negativo de M2PK.

Un primer aspecto a considerar al estudiar una interacción proteína-proteína es el mapeo de los lugares de unión en ambas moléculas. Aunque no llevamos a cabo un estudio sistemático en este sentido, dos hechos aportan información relevante al respecto. Para empezar, los clones secuenciados de M2PK no contenían el cDNA

completo de este enzima, sino solamente un trozo de su zona 3' que codificaba para los últimos 126 residuos aminoacídicos de M2PK (la proteína entera posee 531 aa). Por lo tanto, la unión de M2PK al HECT debe ocurrir por su región C-terminal (aa 406-531), la cual posee los residuos involucrados en la cooperatividad y las propiedades alostéricas de este enzima (Figuras 15 y 16). Por otro lado, para tratar de acotar la zona



Figura 15. Piruvato quinasa tipo M2 (M2PK). Se muestra la secuencia aminoacídica de M2PK. Se han marcado en ella los residuos involucrados en la unión a HERC1 (aa 406-531, en verde) así como los residuos de su centro activo (aa 265-277, en rosa), los de sus dos lugares de fosforilación por proteína tirosina quinasa (naranja) y aquellos que se encuentran en M2PK pero no en M1PK (aa 389-432, subrayados). Dentro de esta última región se hallan residuos clave para la función de M2PK, incluyendo la cisteína-423 implicada en sus propiedades alostéricas (Ikeda y Noguchi (1998)) y la lisina-432, que es imprescindible para la unión a fructosa-1,6-bisfosfato (Ikeda et al. (2000)).

de unión a M2PK dentro del HECT de HERC1, nos basamos en la observación de que dicho HECT posee una secuencia muy similar (4615-LEDLE-4619) a una secuencia en la oncoproteína E7 del papilomavirus humano HPV-16 que es estrictamente necesaria para que E7 pueda interactuar con M2PK (79-LEDLL-83) (Zwerschke et al. (1999)). Dada la similitud entre ambas secuencias, pensamos que quizá los residuos 4615-4618 del HECT de HERC1 serían necesarios para su unión a M2PK. Para comprobar la validez de esta hipótesis, se generó un mutante del HECT en el cual los residuos acídicos Glu4616 y Asp4617 fueron convertidos en sendas alaninas (E4616A+D4617A). A continuación, la capacidad de este mutante para unirse a M2PK fue analizada de nuevo mediante el sistema de los dos híbridos en la levadura. Como puede verse en la Figura 17, el doble mutante E4616A+D4617A interactúa con

M2PK con la misma intensidad con que lo hace el HECT salvaje, lo cual indica que estos dos residuos no son necesarios para la asociación. Sin embargo, para nuestra sorpresa, una mutación adicional generada accidentalmente durante el proceso de mutagénesis y que convierte la leucina-4613 de HERC1 en una arginina (L4613R) sí que destruye por completo la interacción entre el HECT de HERC1 y los últimos 126

	<i>Gen</i>	<i>M_R (kDa)</i>	<i>Cooperatividad</i>	<i>Expresión</i>	<i>Patología</i>
<i>L-PK</i>	PKL	62	SÍ	Hígado, riñón	–
<i>R-PK</i>	PKL	62	SÍ	Hematías	anemia hemolítica no esferocítica hereditaria
<i>M1-PK</i>	PKM	58	NO	Músculo, corazón, cerebro	–
<i>M2-PK</i>	PKM	58	SÍ	Pulmón, embrión, tumores,...	Cáncer

Figura 16. Isoenzimas de piruvato quinasa. En mamíferos existen cuatro isoenzimas distintos que, a pesar de catalizar todos la fosforilación del ADP a partir del fosfoenolpiruvato (PEP), difieren entre sí en su distribución tisular así como en los mecanismos que los regulan. Estos cuatro enzimas son sintetizados a partir de dos genes por uso de promotores distintos en el caso del gen PKL y por procesamiento alternativo del transcrito primario en el caso del gen PKM. Este último proceso da lugar a dos isoenzimas que sólo difieren en 44 residuos aminoacídicos (M1PK y M2PK) y que sin embargo presentan propiedades muy diferentes: mientras M1PK es un enzima michaeliano típico con una K_m muy reducida, M2PK presenta una cinética sigmoidea con una $S_{0.5}$ para PEP similar a las concentraciones fisiológicas habituales de dicho metabolito. Ello, además de otras propiedades de este enzima, contribuye a que M2PK sea el isoenzima elegido por las células proliferantes para afrontar sus concomitantes requerimientos de tipo energético y biosintético (para más información sobre M2PK y su posible papel en células cancerosas ver Mazurek et al. (2001)).

residuos de M2PK (Figura 17). Este hallazgo puede interpretarse de al menos dos modos distintos. Una primera posibilidad es que la leucina-4613 de HERC1 participe directamente en la unión a M2PK y que su conversión a arginina, ya sea por el mayor volumen o la carga positiva de ésta, desestabilice la interacción. La otra alternativa sería que la arginina en posición 4613 impidiese el plegamiento o desestabilizara la estructura del dominio HECT, lo cual también podría eliminar la asociación con M2PK. Aunque desconocemos cuál de estas posibilidades es la correcta, puede ser interesante observar que en la zona de unión a M2PK de la oncoproteína papilomavírica E7 hay justamente una arginina en la posición equivalente a la Leu4613 de HERC1 (Figura 17). Por último, cabe decir que la Leu4613 de HERC1 se halla, si nos basamos en la estructura descrita del HECT de E6AP (Huang et al. (1999), en un lazo (*loop*) accesible al disolvente que se encuentra además relativamente alejado tanto del centro activo como

del lugar de unión al E2 del HECT (Figura 17), lo cual hace pensar que si la interacción HERC1-M2PK tiene lugar por esta región probablemente esto no afectaría a la capacidad ubiquitinadora del HECT e incluso sería compatible con que M2PK pudiese ella misma ser un sustrato de ubiquitinación de aquél (ello también encajaría con el hecho de que el mutante catalíticamente inactivo del HECT, es decir HECT-Cys4811Aa, también interacciona fuertemente con M2PK en la levadura (Figura 14)).

A pesar de la claridad de la unión observada en *Saccharomyces cerevisiae* y de la dependencia de ésta de la leucina-4613 de HERC1, los datos de levadura no permiten concluir que la interacción en cuestión sea directa, puesto que no puede descartarse la posibilidad de que una proteína propia de la levadura haga de puente entre el HECT de HERC1 y M2PK. Para demostrar que la asociación es efectivamente directa, llevamos a cabo experimentos de unión *in vitro* con proteínas purificadas (*in vitro pull-down assays*). En estos experimentos se utilizó una proteína de fusión entre la glutatión-S-transferasa (GST) y los últimos 126 aa de M2PK (GST-M2PK(406-531)) para arrastrar, mediante el uso de cuentas de glutatión-sefaroza (glutathione-sepharose beads), al dominio HECT de HERC1 con una cola de histidinas en su extremo N-terminal (His-HECT). Como puede verse en la Figura 18, His-HECT es en efecto arrastrado por GST-M2PK(406-531) pero no por GST, confirmando pues que la interacción tiene lugar de forma directa y no requiere de ninguna otra proteína adicional.

Hasta ahora, todos los datos presentados demuestran que el dominio HECT de HERC1 (aa 4496-4861) y la región C-terminal de M2PK (aa 406-531) son capaces de unirse directamente. Sin embargo, queda todavía por comprobar si la interacción también se produce con las proteínas enteras y si tiene lugar en células de eucariotas superiores, especialmente mamíferos. Para abordar estas cuestiones se hizo uso en primer lugar de las células Sf9 del insecto coleóptero *Spodoptera fugiperda*, las cuales

permiten expresar proteínas heterólogas a altos niveles al ser infectadas con los baculovirus recombinantes apropiados. Así, se utilizaron baculovirus para expresar en

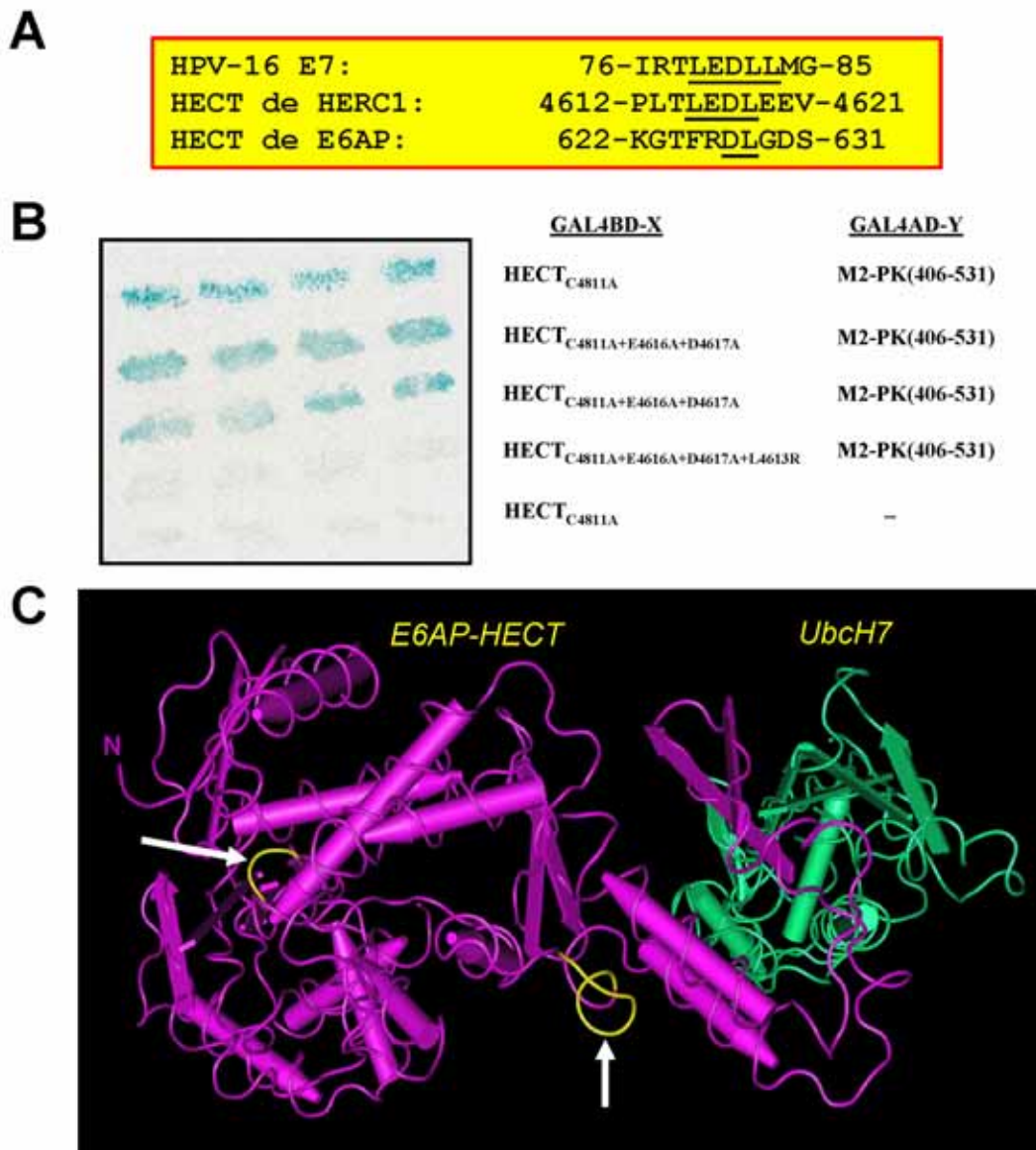


Figura 17. Posible lugar de unión a M2PK en el HECT de HERC1. Puesto que (i) M2PK interactúa con la oncoproteína E7 del papilomavirus humano HPV-16 (Zwerschke et al. (1999)), (ii) dicha interacción desaparece completamente cuando son deletados los residuos 79-83 de E7 (ibid.) y (iii) el HECT de HERC1 posee una secuencia muy similar a la de los residuos 79-83 de E7 (A), pensamos que quizá esta secuencia del HECT podría ser importante para su asociación con M2PK. Para comprobarlo, se elaboró un doble mutante de esta secuencia (E4616A+D4617A), cuya interacción con M2PK en levadura resultó no hallarse afectada (B). Sin embargo, otro mutante generado accidentalmente y situado muy cerca de los residuos mencionados (L4613R) sí ocasionó la pérdida de la unión HECT-M2PK, indicando que la leucina-4613 de HERC1 podría hallarse implicada en la interacción (B). Por último, en (C) se muestra la ubicación de la glicina-623 de E6AP (flecha corta), el residuo equivalente en E6AP a la leucina-4613 de HERC1. La flecha larga indica la posición del centro activo de E6AP. El enzima de tipo E2 UbcH7 se muestra en verde (la imagen mostrada aquí resulta de una rotación de ~ 90° hacia atrás de la imagen mostrada en la Figura 5).

Sf9 la proteína M2PK completa (aa 1-531) y varios fragmentos de HERC1, incluyendo la proteína entera (aa 1-4861), con una cola de histidinas o con GST en sus extremos N-terminales. A continuación, los lisados de estas células se usaron para llevar a cabo

ensayos de unión (pull-down) con cuentas de níquel (Ni-NTA agarose beads) o de glutatión (glutathione-sepharose beads). Como puede observarse en la Figura 19, los resultados de estos experimentos confirman que la proteína M2PK entera (*full length*) baja asociada no sólo al dominio HECT, sino también a otras construcciones de HERC1, incluyendo la proteína entera, siempre y cuando dichas construcciones alberguen el dominio HECT en su interior. Por contra, aquellos fragmentos de HERC1 que carecen del HECT no son capaces de unirse a M2PK, sugiriendo que el HECT es el único lugar de unión de M2PK dentro de la secuencia de HERC1.

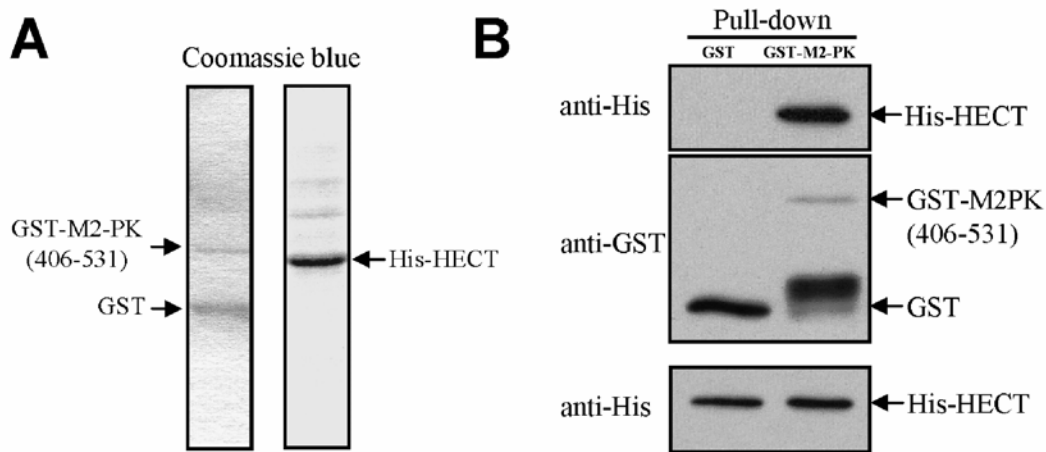


Figura 18. Interacción in vitro entre el HECT de HERC1 y M2PK. (A) los últimos 126 aa de M2PK fusionados con la proteína GST (GST-M2PK(406-531)) y el dominio HECT de HERC1 con una cola de histidinas en su extremo amino terminal (His-HECT) fueron purificados de bacterias y células de insecto, respectivamente, y analizados mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie blue. (B) Ensayos de pull-down con cuentas de glutatión-sefarosa. Como puede verse, His-HECT (panel superior) baja asociado con GST-M2PK(406-531) pero no con GST, lo cual demuestra que existe una interacción directa entre His-HECT y M2PK(406-531). En el panel inferior se muestra un 4% del total de His-HECT usado en los ensayos.

Una vez demostrada claramente la unión entre ambas proteínas, nos propusimos comprobar si dicha interacción también tiene lugar en células de mamífero. Al fin y al cabo, dado que ni HERC1 ni M2PK se encuentran en levadura o insectos, su asociación sólo puede ser fisiológicamente relevante si se produce en mamíferos (los insectos, como se ha visto en la introducción, poseen HERC2, pero no HERC1, y sólo poseen una isoforma de piruvato quinasa, en contraste con las cuatro existentes en vertebrados (Muñoz y Ponce (2003)). Para tratar, pues, de hallar dicha interacción en mamíferos, efectuamos experimentos de coimmunoprecipitación con las proteínas endógenas de

varias líneas celulares de mono (COS) o humanas (HEK-293 y A431). En ninguno de estos casos fuimos capaces de hallar M2PK asociada a los inmunoprecipitados obtenidos con anticuerpos anti-HERC1 (datos no mostrados), mientras que los anticuerpos anti-M2PK comerciales usados no inmunoprecipitan a ésta, por lo cual no pudimos usarlos en este tipo de ensayos. Dichos experimentos se realizaron en distintas

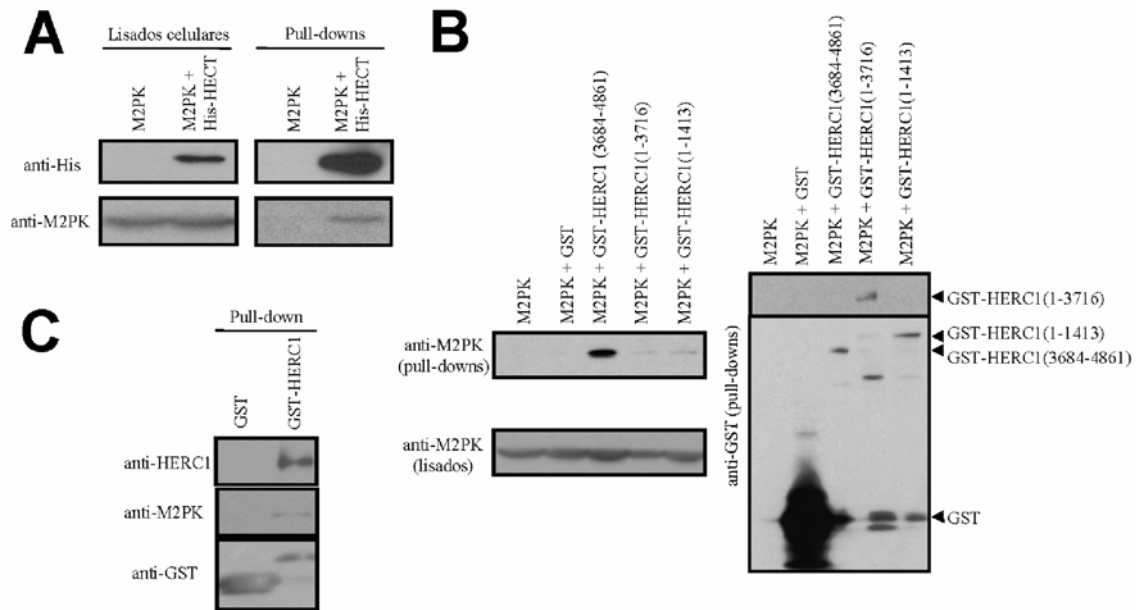


Figura 19. Interacción HERC1-M2PK en células de insecto. (A) las proteínas M2PK (*full length*) y His-HECT fueron expresadas en células Sf9 mediante la infección de éstas con los baculovirus recombinantes apropiados y los lisados celulares se utilizaron para efectuar un experimento de pull-down con una resina de níquel. Puede verse como M2PK baja asociada a His-HECT pero no presenta en cambio afinidad por la resina cuando His-HECT no se halla presente en los extractos. (B) M2PK y varias proteínas de fusión entre GST y distintos fragmentos de HERC1 fueron expresadas en células Sf9 y los lisados usados para hacer pull-downs con glutatión-sepharosa. Como era esperable, M2PK baja asociada en los pull-downs sólo cuando los lisados contienen GST-HERC1(3684-4861) pero no cuando contienen otros fragmentos de HERC1 que no incluyen el dominio HECT. Abajo a la izquierda se muestran los niveles de M2PK en los lisados. (C) Cuentas de glutatión-sepharosa con GST o GST-HERC1(*full-length*) unidas fueron usadas para hacer pull-down de un extracto de células Sf9 infectadas con el baculovirus de M2PK. Puede verse como una cierta cantidad de M2PK baja asociada con GST-HERC1 pero no con GST sola.

condiciones experimentales, tales como en ausencia o presencia de detergente en los lisados celulares, pero en ningún caso se halló la interacción buscada. No sólo no pudimos detectar unión entre las proteínas endógenas en estas células, sino que tampoco la encontramos en experimentos de pull-down con cuentas de níquel que implicaban la sobreexpresión de His-M2PK y Myc-HERC1 (aa 3684-4861) o de His-HECT (datos no mostrados).

El hecho sorprendente de que HERC1 y M2PK no parezcan interactuar en células de primates cuando sí que lo hacen al ser expresadas en células de insecto o de levadura sugiere la posibilidad de que esta interacción esté sujeta a algún mecanismo de regulación dentro de las células de mamífero. En este sentido, puesto que se ha descrito que la M2PK de pollo es fosforilada en tirosinas en células transformadas con el virus del sarcoma de Rous (Presek et al. (1988)), decidimos ver qué le ocurre a la unión HERC1-M2PK cuando se induce la activación celular de Src. Así, ni el tratamiento de

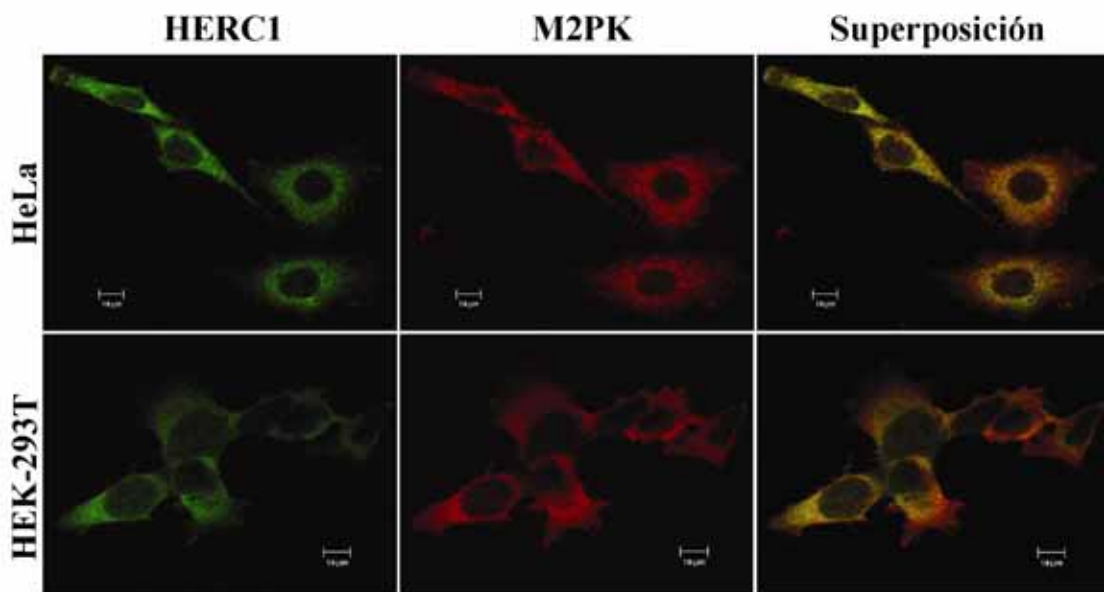


Figura 20. Localización subcelular de M2PK y HERC1. Las distribuciones intracelulares de M2PK y HERC1 se analizaron en células HeLa y HEK293 mediante técnicas inmunocitoquímicas y observación en el microscopio confocal de fluorescencia. Las imágenes mostradas son secciones ópticas y permiten ver como ambas proteínas presentan distribuciones similares e incluso colocalizan en varios puntos del citoplasma (puntos amarillos en las superposiciones).

células A431 con EGF ni la expresión en HEK-293 de las formas constitutivamente activa o inactiva (*kinase dead*) de Src estimularon la formación de un complejo entre HERC1 y M2PK (datos no mostrados). Otra posible explicación de la falta de interacción en células de mamífero sería que en éstas M2PK y HERC1 se encontrasen en compartimentos físicamente separados. Para analizar esta posibilidad llevamos a cabo estudios de la localización subcelular de ambas proteínas en células humanas HEK-293 y HeLa mediante métodos inmunocitoquímicos. Como se ve en la Figura 20, ambas proteínas presentan un marcaje punteado especialmente fuerte en la región

perinuclear e incluso colocalizan en varios de estos puntos, indicando pues que si no hay unión, esto no se debe a una separación física de las proteínas dentro de la célula, sino a la existencia de algún factor que reduce la afinidad mutua que una y otra proteína poseen in vitro. La naturaleza de dicho factor, no obstante, nos es totalmente desconocida, por lo cual sólo nos queda por ahora barajar algunas de las posibilidades, tales como que la unión esté controlada por los niveles de fructosa-1,6-bisfosfato, un metabolito clave en la regulación de la actividad de M2PK (Wooll et al. (2001)), o que lo esté por la asociación previamente descrita de M2PK a membranas (Dabrowska et al. (1998)).

Dada nuestra incapacidad para encontrar en células de mamífero la interacción que previamente habíamos observado en otros modelos, pensamos que acaso la unión entre M2PK y HERC1 en mamíferos fuese demasiado débil para poder ser detectada directamente, pero pudiera en cambio ser revelada por los efectos funcionales de una proteína sobre la otra. En este sentido consideramos básicamente dos posibilidades: (1) que M2PK fuese ubiquitinada por HERC1 y (2) que HERC1 afectara la actividad enzimática de M2PK. En cuanto a la primera opción, antes que nada debía comprobarse si M2PK es un sustrato de ubiquitinación dentro de la célula, y en caso afirmativo entonces debería verse si HERC1 se halla involucrado en este proceso. Como se comenta en la Figura 9, la ubiquitinación de proteínas va a menudo asociada con la degradación proteasomal de las proteínas ubiquitinadas. Por lo tanto, si M2PK fuese degradada en el proteasoma, ello sería fácilmente detectable tratando las células con un inhibidor del mismo, tal como el N-acetil-leucil-leucil-norleucinal (LLnL). Este experimento fue llevado a cabo y, pese a que el tratamiento de células HEK-293 con LLnL indujo la acumulación intracelular de abundantes proteínas poliubiquitinadas, M2PK no experimentó cambio alguno en su movilidad electroforética, indicando así

que esta proteína no es un sustrato del proteasoma, o que en caso de serlo su degradación en el mismo transcurre muy lentamente (Figura 21B). Sin embargo, el hecho de que M2PK probablemente no sea sustrato del proteasoma no implica necesariamente que M2PK no sea ubiquitinada, pues la ubiquitinación no siempre se halla acoplada a la degradación proteasomal (Figura 9). Por este motivo, también

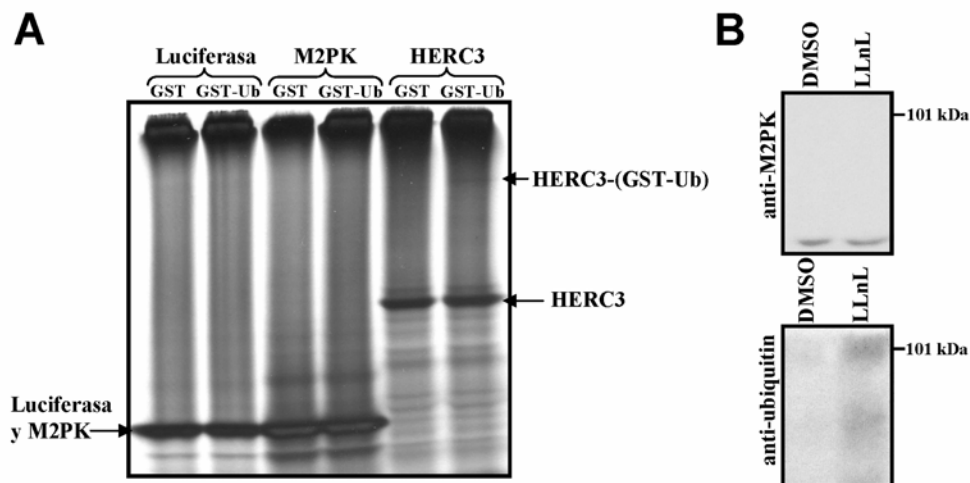


Figura 21. M2PK no parece ser sustrato de ubiquitinación. (A) Ensayo de ubiquitinación en el que las proteínas Luciferasa, M2PK y HERC3 fueron sintetizadas a partir de sus cDNAs en extractos de reticulocitos de conejo en presencia de [³⁵S]-metionina. Dichos extractos fueron a continuación incubados con las proteínas GST o GST-ubiquitina durante una hora a 30°C y luego analizados por SDS-PAGE y autoradiografía. En el caso de HERC3, como ya se había descrito (Cruz et al. (2001)), se observa al menos una banda correspondiente a un aducto con GST-Ub (la misma banda no se observa con GST en lugar de GST-Ub), mientras que no se detectan tales aductos con Luciferasa o M2PK. (B) M2PK no es degradada en el proteasoma o, en caso de serlo, lo es de forma extremadamente lenta, puesto que el tratamiento de células HEK-293 con el inhibidor del proteasoma LLnL durante toda la noche (~14h) no induce ningún aumento en los niveles de M2PK ni tampoco la aparición de formas de elevado peso molecular de ésta (arriba). En cambio, LLnL sí induce la acumulación de formas ubiquitinadas de otras proteínas (abajo).

efectuamos experimentos de ubiquitinación en los cuales la proteína M2PK fue sintetizada y marcada radiactivamente a partir de su cDNA en un lisado de reticulocitos de conejo, para luego ser incubada en presencia de GST o GST-ubiquitina para permitir la formación de aductos entre M2PK y GST-ubiquitina. No obstante, los resultados de estos ensayos no mostraron indicio alguno de que tales aductos se formaran, mientras que sí se observó su formación con otra proteína, HERC3, para la cual ya han sido descritos (Figura 21A). En vista de estos datos, parece razonable concluir que M2PK no es un sustrato de ubiquitinación, con lo cual tampoco lo puede ser de HERC1.

Por lo tanto, la última posibilidad que quedaba por investigar era si HERC1 podía afectar a la actividad enzimática de M2PK, es decir a la capacidad de ésta de acelerar la reacción de transferencia de fosfato desde el fosfoenolpiruvato al ADP, para

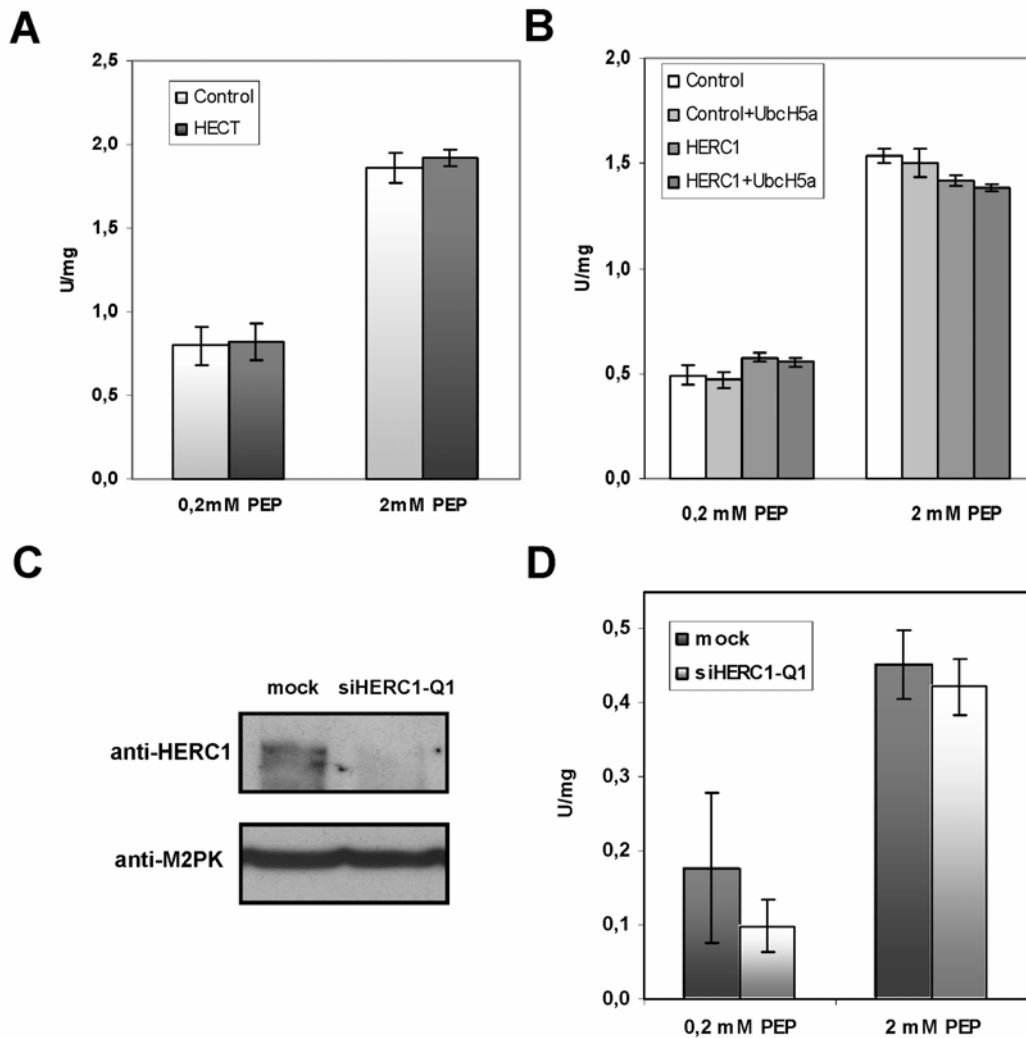


Figura 22. Alteraciones en la expresión de HERC1 no afectan a la actividad enzimática de M2PK. (A) La sobreexpresión del dominio HECT de HERC1 en células humanas HEK-293 no modifica significativamente la actividad de M2PK medida tanto a una concentración subsaturante, cercana a la $S_{0,5}$, de fosfoenolpiruvato (PEP), como a una concentración saturante de PEP (2 mM). (B) La sobreexpresión de la proteína entera HERC1 en las mismas células y/o la adición a los extractos del enzima conjugador de ubiquitina UbcH5 tampoco afectan a la actividad M2PK. (C) la transfección de HEK-293 con un siRNA dirigido a HERC1 (siHERC1-Q1) provoca una disminución en los niveles de la proteína HERC1 endógena pero no afecta a los niveles de M2PK. (D) La transfección de siHERC1-Q1 en HEK-293 tampoco afecta significativamente la actividad M2PK. (todas las actividades se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos cinco mediciones independientes).

dar lugar a piruvato y ATP. Este problema fue abordado de distintas maneras. En primer lugar, se midió la actividad M2PK (éste es el único isoenzima de piruvato quinasa expresado por líneas celulares transformadas como HEK-293 (Yamada y Noguchi (1999)) de lisados de células HEK-293 que previamente habían sido transfectadas con

un plásmido que expresa el dominio HECT de HERC1 o con un plásmido control. Como se ve en la Figura 22, la actividad de ambos lisados no presenta diferencias significativas. Los mismos experimentos se efectuaron sobreexpresando la proteína entera HERC1 y/o añadiendo a los lisados el enzima UbcH5, el cual se ha descrito que es necesario para la actividad ubiquitina ligasa de HERC1 (Schwarz et al. (1998)). En

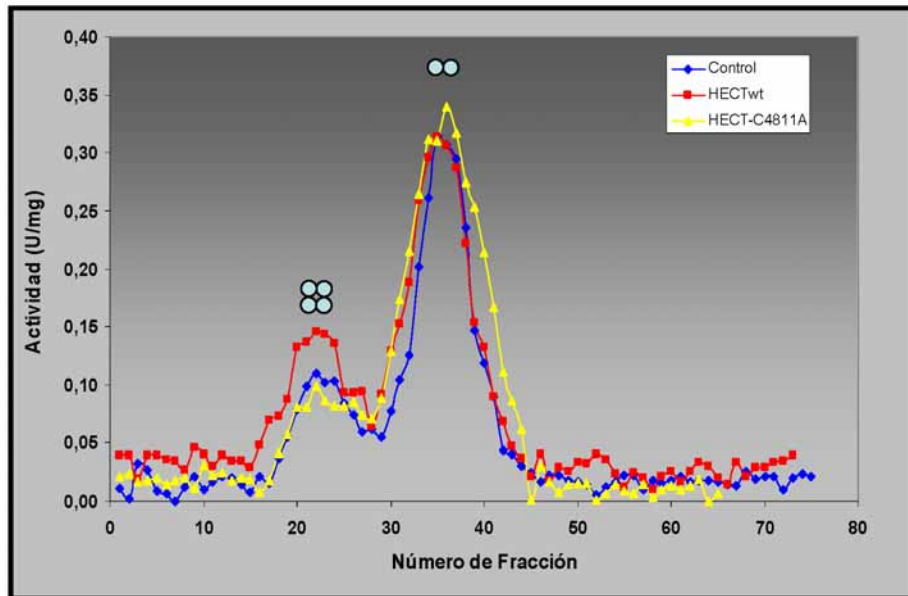


Figura 23. La expresión del HECT de HERC1 no altera la ratio dímero/tetrámero de M2PK. Células HEK-293 fueron transfectadas con un plásmido control o plásmidos que codifican por el dominio HECT de HERC1, tanto en su forma salvaje (wt, *wild type*) como en su forma inactiva (Cys4811Ala). Los extractos de dichas células fueron a continuación cargados en una columna de filtración en gel para separar las formas homodimérica y homotetramérica de M2PK (como en Zwerschke et al. (1999)) y las fracciones fueron analizadas por Western blot y por actividad piruvato quinasa. Como se observa, las actividades enzimáticas correspondientes a la forma dimérica (fracciones 18-28) y tetramérica (fracciones 29-44) de M2PK no se ven significativamente alteradas por la transfección de los HECTs. Por otro lado, los Western blots también permitieron comprobar que los niveles de M2PK en ambos picos no cambian apreciablemente y que los HECTs eluyen a partir de la fracción 50, lo cual indica que no se hallan asociados a ninguna de las formas de M2PK (datos no mostrados).

ninguna de estas condiciones, sin embargo, la actividad de M2PK presentó cambios apreciables con respecto a su estado basal (Figura 22). Otra aproximación realizada consistió en reducir los niveles de HERC1 en HEK-293 mediante la técnica de RNAi y ver qué le sucedía a la actividad M2PK. Tampoco aquí se observaron variaciones relevantes (Figura 22). Finalmente, también estudiamos si la transfección del HECT de HERC1 en HEK-293 afecta, como hace la oncoproteína papilomavírica E7 (Zwerschke et al. (1999)), a la estructura cuaternaria de M2PK. A este respecto, debe comentarse que M2PK se halla en las células en dos formas mayoritarias, a saber, formando

homodímeros poco activos u homotetrámeros con una actividad mayor. La separación de ambas formas oligoméricas de M2PK por cromatografía de filtración en gel nos permitió ver que el HECT de HERC1 no afecta significativamente a la proporción de ambas formas dentro de las células (Figura 23).

En resumen, pues, aunque HERC1 y M2PK presentan afinidad la una por la otra tanto *in vitro* como en células de levadura e insecto, dicha interacción parece no ocurrir o ser regulada por algún factor/es todavía desconocidos en las células de los mamíferos. Asimismo, la relevancia funcional de esta interacción, si existe, es aún un misterio a la espera de ser resuelto.

4.1.2. Interacción entre HERC1 y CLC

Como se ha comentado en la introducción, HERC1 forma un complejo ternario citosólico con la cadena pesada de la clatrina (CHC: *clathrin heavy chain*), la cual interactúa directamente con el RLD2 de HERC1, y la chaperona Hsp70, la cual se disocia del complejo en presencia de ATP. Asimismo, el mapeo de la asociación RLD2-CHC permitió comprobar que la unión en CHC tiene lugar por los residuos 1315-1453 de ésta, los cuales contienen también el lugar de interacción de CHC con la cadena ligera de la clatrina (CLC: *clathrin light chain*) (Rosa y Barbacid (1997)). Esto último plantea la pregunta de si podría existir una competencia entre HERC1 y CLC por unirse a CHC o si, por el contrario, CHC puede unirse simultáneamente a HERC1 y CLC. Para comprobar esto, efectuamos experimentos de inmunoprecipitación de HERC1 y analizamos si los inmunoprecipitados, además de CHC y Hsp70, contenían también CLC. Como se muestra en la Figura 24, CLC también baja asociada a HERC1 junto con CHC y Hsp70. Estos resultados, por lo tanto, indican que HERC1 forma un complejo citosólico cuaternario con CHC, CLC y Hsp70. Dado que se conoce que CLC contiene

un lugar de unión a Hsp70 (DeLuca-Flaherty et al. (1990)) y que, al parecer, CHC contiene lugares de unión independientes para CLC y el RLD2 de HERC1, la estructura más probable de este complejo cuaternario se basaría en la interacción de HERC1 y CLC con dos lugares cercanos entre si de la pierna proximal (*proximal leg*) de CHC y la unión de Hsp70 a un lugar de unión en CLC independiente del sitio de unión de CLC a CHC (Figura 24). Sin embargo, aunque esta es la configuración más probable de dicho complejo en base a la información disponible, no se puede descartar que, por ejemplo, HERC1 pueda interactuar directamente con CLC y/o Hsp70.

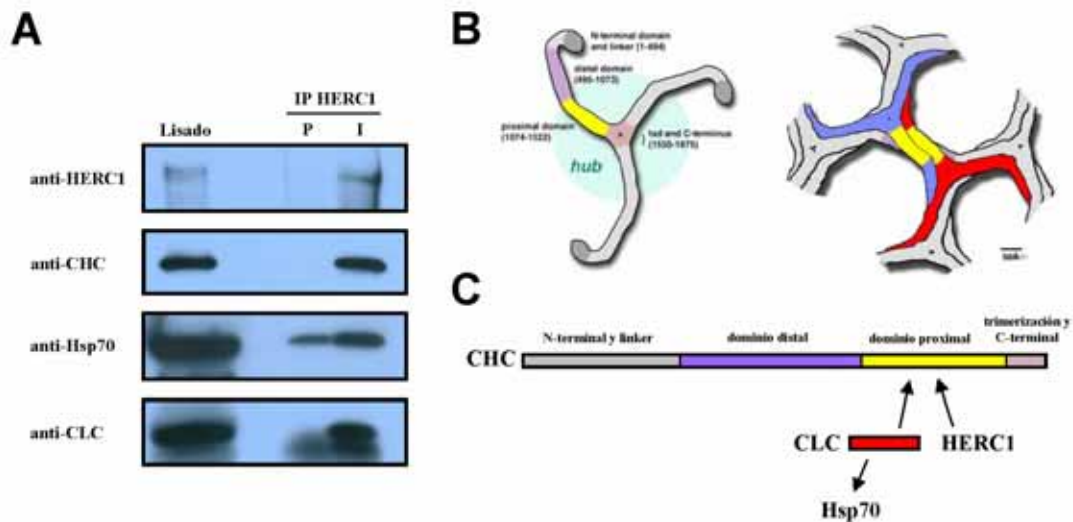


Figura 24. Formación de un complejo cuaternario entre HERC1, las cadenas ligera y pesada de la clatrina y la chaperona Hsp70. (A) la cadena ligera de la clatrina (CLC) baja asociada a los inmunoprecipitados de HERC1 obtenidos a partir de un lisado de células HEK-293. Como ya se había descrito (Rosa y Barbacid (1997)), la cadena pesada de la clatrina (CHC) y Hsp70 también bajan asociadas a los inmunoprecipitados de HERC1 y no a los obtenidos con un suero preinmune. (B) Estructura de los triskelia de clatrina y su ensamblaje en la superficie de las vesículas (imagen obtenida de la página web de la Advanced Light Source del Lawrence Berkeley National Laboratory (www-als.lbl.gov/als/science/sci_archive/clathrin.html)). (C) Estructura probable del complejo cuaternario descrito, teniendo en cuenta los lugares descritos de unión de CHC a CLC (Brodsky et al. (1987)), de CHC a HERC1 (Rosa y Barbacid (1997)) y de CLC a Hsp70 (DeLuca-Flaherty (1990)).

En cuanto a la posible función de este complejo, el hecho de que sólo la fracción citosólica de CHC baja asociada a HERC1 (Rosa y Barbacid (1997)) y que HERC1 no sea un componente constitutivo de las vesículas recubiertas de clatrina (CCVs: *clathrin-coated vesicles*) (datos no mostrados), parecería indicar que HERC1 puede estar jugando un papel en los procesos de formación o desensamblaje (*uncoating*) de la cubierta de clatrina. El hecho, además, de que Hsp70 sea un factor clave para llevar a

cabo el segundo de estos procesos (Fotin et al. (2004) y Heymann et al. (2005)) hace especialmente atractiva la posibilidad de que HERC1 tenga una función en el desensamblaje de las CCVs.

4.1.3. Interacción entre HERC1 y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

El descubrimiento de la interacción entre HERC1 y fosfoinosítidos tuvo lugar de forma inesperada como resultado de experimentos encaminados a caracterizar la actividad de HERC1, descrita inicialmente en Rosa et al. (1996), como factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF: *guanine nucleotide exchange factor*) sobre proteínas G monoméricas de las familias ARF y Rab. En este último trabajo, se asumía que, por analogía con RCC1 y Ran, la capacidad del dominio RLD1 de HERC1 de estimular la disociación de nucleótidos de guanina en las GTPasas ARF1, Rab3a y Rab5 implicaba que dicho dominio posee actividad GEF para dichas GTPasas. Sin embargo, como se ha comentado en la introducción, una demostración rigurosa de actividad GEF debe incluir no sólo ensayos de disociación, sino también experimentos de incorporación de nucleótidos. Por lo tanto, nos propusimos comprobar si HERC1 podía, además de estimular la disociación de GDP, estimular la incorporación de GTP en el centro activo de ARF6, otra GTPasa de la familia ARF sobre la que comprobamos que HERC1 también posee actividad disociadora a través de su dominio RLD1 (Figura 25 y Garcia-Gonzalo et al. (2005)). No obstante, a pesar de lo sugerido inicialmente, los experimentos de intercambio de GDP por GTP en ARF6 mostraron que HERC1, contrariamente a lo que hace ARNO, un GEF previamente descrito de ARF6 (Frank et al. (1998)), no sólo no estimula sino que inhibe la incorporación de GTP al centro activo de ARF6 (Figura 25). Dichos datos, pues, indicaban que HERC1, más que un GEF, es un factor disociador de nucleótidos de guanina (GRF: *guanine nucleotide release*

factor) para ARF6 (lo mismo comprobamos que ocurre con ARF1 (datos no mostrados)).

En el transcurso de estos experimentos efectuamos otra observación que acabaría siendo relevante: mientras que el dominio RLD1 purificado a partir de células de insecto infectadas con baculovirus presentaba actividad como GRF, el mismo dominio RLD1 purificado a partir de cultivos bacterianos era completamente inactivo. Aunque inicialmente pensamos que quizá las células de insecto llevaban a cabo alguna

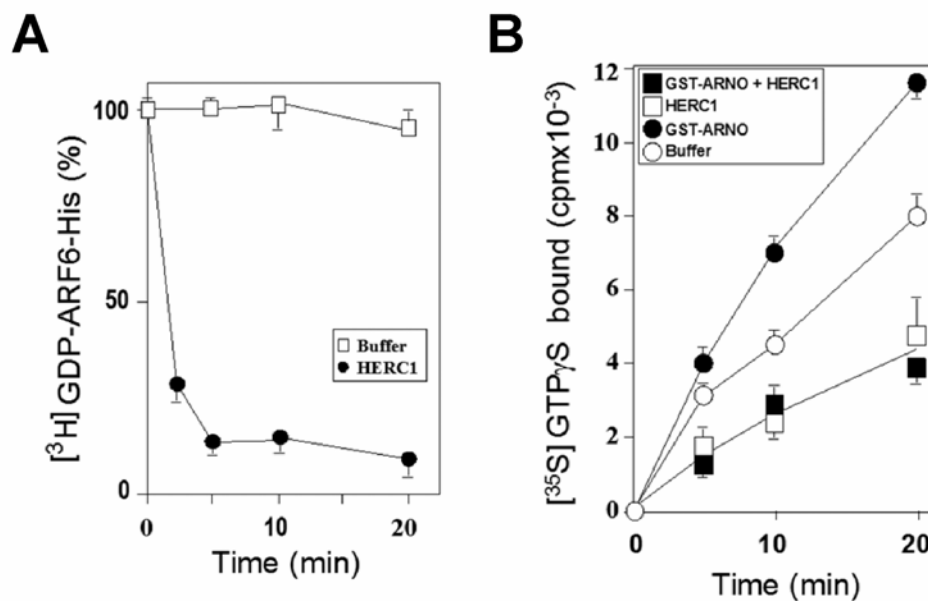


Figura 25. HERC1 es un factor disociador de nucleótidos de guanina para ARF6. (A) HERC1 estimula la disociación de GDP del centro activo de ARF6, del mismo modo en que se ha visto que lo hace el dominio RLD1 aislado de HERC1 (García-Gonzalo et al. (2005)). (B) Sin embargo, HERC1 no estimula el intercambio de GDP por GTP en ARF6, en condiciones en que ARNO, un conocido factor intercambiador para ARF6 (Frank et al. (1998)), sí lo hace. HERC1 no sólo no estimula el intercambio sobre ARF6, sino que lo inhibe, incluso en presencia de ARNO. Ello es probablemente debido a la alta actividad disociadora de HERC1.

modificación post-traduccional de la proteína que no tenía lugar en *Escherichia coli*, el descubrimiento de dos trabajos donde se describía que el fosfoinosítido fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂) puede por sí solo estimular la disociación de GDP de ciertas GTPasas de las familias ARF y Rho nos hizo pensar en otros términos (Terui et al. (1994) y Zheng et al. (1996)). Para comprobar, pues, si la actividad de HERC1 o de su dominio RLD1 purificados de células de insecto podía ser debida a la presencia en dichas preparaciones de PI(4,5)P₂, transferimos estas proteínas (RLD1,

RLD2 y HERC1) a una membrana de PVDF mediante un aparato de *slot-blotting* y utilizamos anticuerpos específicos para ver si estas proteínas llevaban algún fosfoinosítido asociado. Como puede verse en la Figura 26A, mientras que los

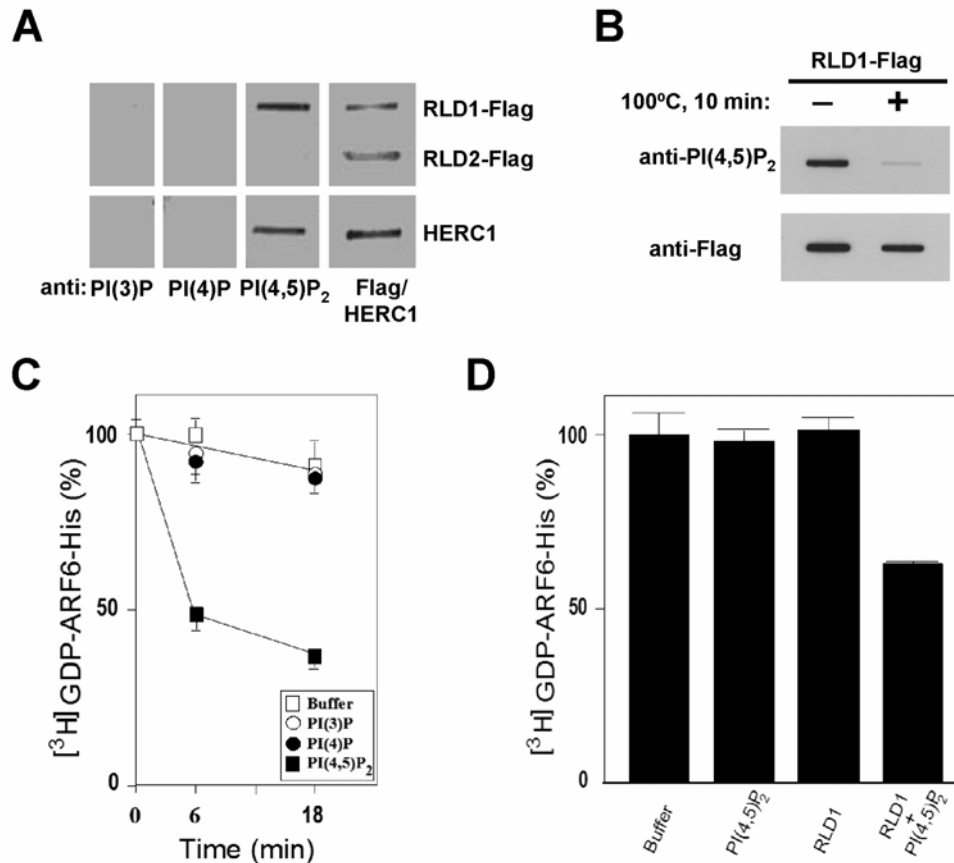


Figura 26. Requerimiento de PI(4,5)P₂ para la actividad GRF de HERC1. (A) HERC1 es purificado de células Sf9 con PI(4,5)P₂ unido en su dominio RLD1. Las proteínas RLD1-Flag, RLD2-Flag y His-HERC1 fueron purificadas a partir de extractos de células de insecto previamente infectadas con los baculovirus recombinantes apropiados y pasadas a membranas mediante un aparato de *slot-blotting*. Las membranas fueron subsiguientemente incubadas con los anticuerpos que se indican para detectar las proteínas (anti-Flag o anti-HERC1) o los fosfoinosítidos unidos a ellas (anti-PI(3)P, anti-PI(4)P y anti-PI(4,5)P₂). (B) RLD1 se halla unido a PI(4,5)P₂ de forma no covalente, pues la unión desaparece tras incubación de RLD1-Flag durante 10 minutos a 100°C. Asimismo, este resultado descarta que la señal obtenida con los anticuerpos anti-PI(4,5)P₂ sea debida a un epítipo proteico en el RLD1. (C) PI(4,5)P₂ por sí solo ya basta para inducir la disociación de GDP de ARF6, cosa que no hacen otros fosfoinosítidos como PI(3)P o PI(4)P. Dicho efecto requiere, no obstante, de concentraciones relativamente elevadas de PI(4,5)P₂ (200 μM). (D) RLD1 y PI(4,5)P₂ actúan sinérgicamente para estimular la disociación de GDP de ARF6. Tras 5 minutos de reacción, ni RLD1 purificado de bacterias (y por tanto sin PI(4,5)P₂ unido) ni una concentración relativamente baja de PI(4,5)P₂ (2 μM) son capaces de inducir una disociación apreciable de GDP del centro activo de ARF6. Sin embargo, la mezcla de ambos (RLD1 de bacterias y 2 μM de PI(4,5)P₂) sí presenta una alta actividad disociadora, indicando que PI(4,5)P₂ es un cofactor necesario para la actividad GRF del RLD1 de HERC1.

anticuerpos contra fosfatidilinositol-3-fosfato (PI(3)P) y fosfatidilinositol-4-fosfato (PI(4)P) no dieron señal alguna con ninguna de las tres preparaciones analizadas, los anticuerpos anti-PI(4,5)P₂ detectaron la presencia de este fosfolípido en las purificaciones de HERC1 y RLD1, pero no en la de RLD2. Para descartar además que la señal de este último anticuerpo no fuese debida a su afinidad por algún epítipo

proteico en RLD1, la purificación de éste fue hervida durante 10 minutos antes de ser transferida a la membrana del *slot blot*. Como era de esperar, este tratamiento provocó la disociación entre RLD1 y PI(4,5)P₂ y, dado que las moléculas de PI(4,5)P₂ libre son demasiado pequeñas para ser retenidas por la membrana, también ocasionó la pérdida del señal procedente del anticuerpo anti- PI(4,5)P₂ (Figura 26B).

Los datos anteriores demuestran que HERC1 y su dominio RLD1 se hallan unidos de forma no covalente a PI(4,5)P₂ cuando son purificados de células de insecto. Puesto que dicho fosfoinosítido parece ser exclusivo de las células eucarióticas y no se encuentra en *Escherichia coli* (Xia y Dowhan (1995)) parece muy probable que su presencia dé cuenta de la actividad GRF observada para RLD1 y HERC1. Para demostrar definitivamente que es esto lo que ocurre, efectuamos los siguientes experimentos: en primer lugar comprobamos que, como se había ya descrito para ARF1 (Terui et al. (1994)), PI(4,5)P₂, a concentraciones relativamente elevadas (200μM), es capaz de estimular por si solo la disociación de GDP de ARF6, cosa que no hacen PI(3)P ni PI(4)P (Figura 26C). Por otro lado, la adición de una pequeña cantidad (2μM) de PI(4,5)P₂ al RLD1 inactivo de bacterias dio lugar a una preparación plenamente activa, cuya actividad GRF era aproximadamente igual a la previamente observada para el RLD1 de células de insecto y mucho mayor a la actividad observada para PI(4,5)P₂ solo (Figura 26D). Esto último demostraba, por tanto, que el dominio RLD1 de HERC1 debe tener PI(4,5)P₂ unido a su centro activo para poseer actividad GRF o, dicho de otro modo, PI(4,5)P₂ es un cofactor necesario para la actividad GRF de HERC1.

El hecho de que el RLD1 de bacterias sea totalmente inactivo mientras que PI(4,5)P₂ por si mismo ya posea una cierta, aunque reducida, actividad GRF, probablemente indica que este fosfoinosítido juega un papel crucial en el mecanismo de catálisis. En este sentido, las cargas negativas de los grupos fosfato del PI(4,5)P₂

podrían hacer las veces del dedo de glutámico (*glutamic finger*) que se sabe que desplaza al GDP del centro activo de ARF en ARF-GEFs con dominios Sec7 como ARNO (Renault et al. (2003)). Según este modelo, el RLD1 tendría como principales funciones el unirse a ARF y el posicionamiento relativo adecuado de PI(4,5)P₂ y ARF para facilitar la extrusión del nucleótido. Hay que remarcar, en cualquier caso, que estas suposiciones todavía carecen de apoyo empírico.

Por otro lado, en lo concerniente al significado fisiológico de estos resultados, todavía se desconoce si HERC1 regula in vivo la actividad de GTPasas de las familias ARF o Rab y de qué manera. Sea como fuere, la interacción de HERC1 con dichas GTPasas así como con PI(4,5)P₂ refuerza la hipótesis de que HERC1, como ya se ha mencionado anteriormente, es un regulador del tráfico intracelular.

4.1.4. Interacción entre HERC1 y otros fosfolípidos

Además del hecho mencionado en el apartado anterior de que HERC1 y su dominio RLD1 contienen PI(4,5)P₂ unido al ser purificados de células de insecto, también observamos que el dominio RLD1 de HERC1 puede unirse a varios otros fosfolípidos. Para analizar la afinidad de RLD1 por fosfolípidos utilizamos membranas comerciales (*PIP strips*) sobre las que se habían previamente depositado distintos fosfolípidos funcionalmente importantes en eucariotas. Tales membranas fueron incubadas independientemente con RLD1 y RLD2 purificados de bacteria y con epítopos Flag en sus extremos C-terminales. Tras la unión de los RLDs a los fosfolípidos, los RLDs unidos fueron detectados con anticuerpos anti-Flag. Los resultados obtenidos (Figura 27C) muestran como RLD1, pero no RLD2, tiene afinidad por varios fosfolípidos, especialmente por las formas monofosforiladas del fosfatidilinositol (PI(4)P, PI(5)P y PI(3)P) y en menor grado las bisfosforiladas

(PI(3,5)P₂ y PI(4,5)P₂) y el ácido fosfatídico. Para determinar las afinidades relativas para cada uno de estos compuestos, se utilizaron membranas con distintas cantidades de los distintos fosfoinosítidos (*PIP arrays*). Dichas membranas fueron incubadas con

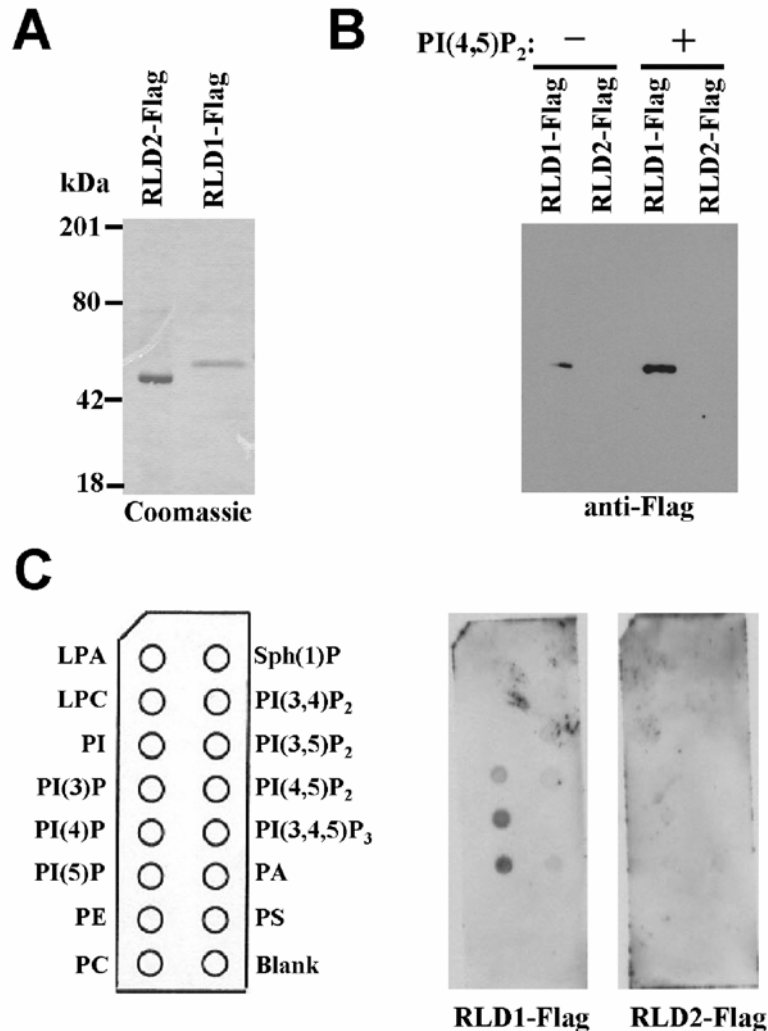


Figura 27. El dominio RLD1 de HERC1 presenta afinidad por varios fosfolípidos. (A) RLD1-Flag y RLD2-Flag fueron purificados a partir de cultivos bacterianos y analizados por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. (B) RLD1-Flag presenta afinidad por liposomas enriquecidos en PI(4,5)P₂, mientras que su afinidad por liposomas control de azolectina es bastante menor. RLD2-Flag no se une a ninguno de ambos tipos de liposomas. (C) RLD1-Flag y RLD2-Flag fueron usados para incubar membranas en las que varios fosfolípidos habían sido depositados en distintos puntos de su superficie (*PIP strips*). Tras la unión con los RLDs, las membranas fueron lavadas y los RLDs unidos fueron detectados con anticuerpos anti-Flag. Puede verse como RLD1-Flag se une a varios fosfolípidos (PI(5)P, PI(4)P, PI(3)P, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ y PA), mientras que RLD2-Flag no se une a ninguno. (LPA: ácido lisofosfatídico, LPC: lisofosfatidilcolina, PI: fosfatidilinositol, PE: fosfatidiletanolamina, PC: fosfatidilcolina, Sph(1)P: esfingosina-1-fosfato, PA: ácido fosfatídico, PS: fosfatidilserina.

RLD1 y con HERC1 y los resultados se muestran en la Figura 28. Como puede verse, la mayor afinidad de ambas parece ser por PI(3)P, seguido, en el caso del RLD1, por PI(5)P, PI(4)P y PI(3,5)P₂. El patrón es similar en el caso de la proteína entera HERC1,

aunque aquí destaca la elevada afinidad por fosfatidilinositol, el cual no parece interactuar con el RLD1.

Resulta hasta cierto punto sorprendente que RLD1 y HERC1, que son purificadas unidas a PI(4,5)P₂ de células Sf9 de insecto, presenten relativamente poca afinidad por éste y bastante más por otros fosfoinosítidos como PI(3)P y PI(4)P, a los

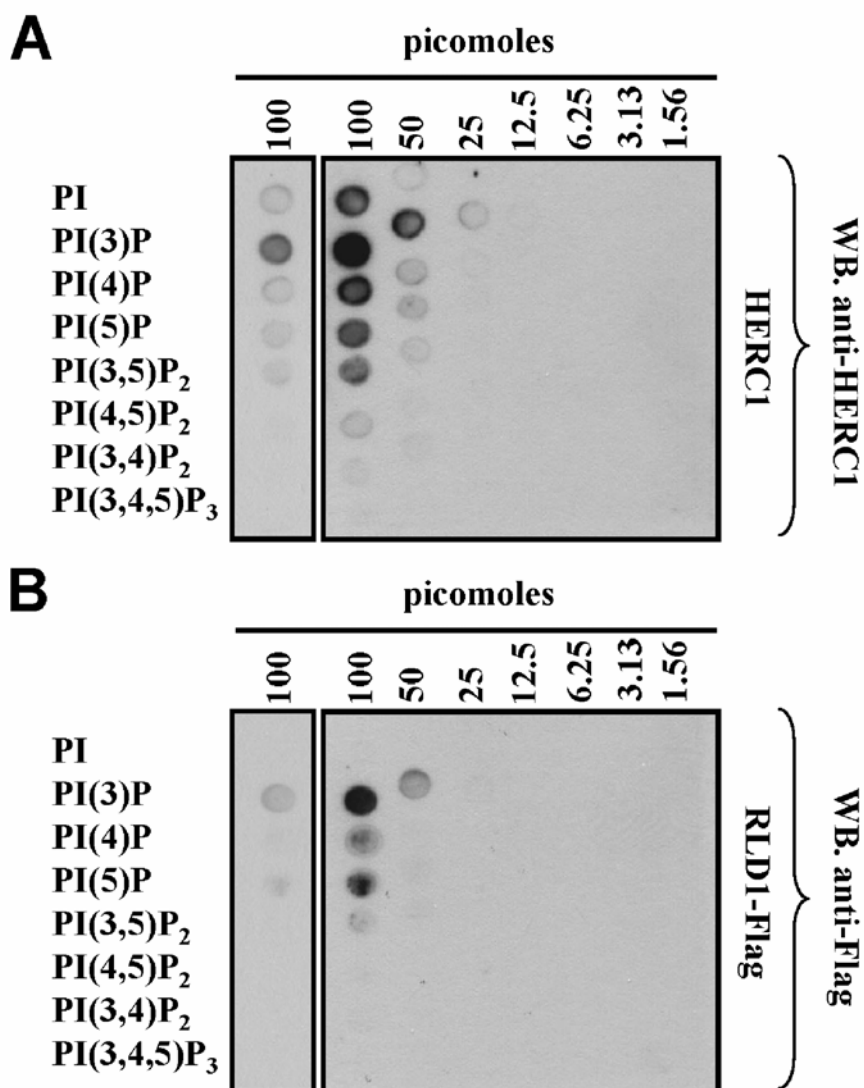


Figura 28. Interacción de HERC1 con fosfoinosítidos. Para evaluar las afinidades de HERC1 (A) y su dominio RLD1 (B) por los distintos fosfoinosítidos existentes se efectuaron experimentos de unión a membranas análogos a los descritos en la Figura 27C (sí, membranas con distintas cantidades de fosfoinosítidos (*PIP arrays*) fueron incubadas con HERC1 o RLD1-Flag y las proteínas unidas detectadas con anticuerpos específicos. (A) HERC1 se une con la mayor afinidad a PI(3)P, seguido por PI(4)P, PI(5)P, PI y PI(3,5)P₂. (B) RLD1-Flag muestra un patrón similar al de HERC1, con la principal diferencia de que RLD1-Flag parece no unirse a PI. En ambos casos, la afinidad por PI(4,5)P₂ parece ser relativamente baja.

que hemos visto antes que HERC1 no se halla constitutivamente asociada en células de insecto (Figura 26). Ello puede deberse a que en células Sf9 los niveles de PI(4,5)P₂ son

mayores que los de PI(3)P y PI(4)P o, alternativamente, a que la única interacción funcionalmente importante es la de HERC1 con PI(4,5)P₂. En cualquier caso, el dominio RLD1 purificado de bacterias presenta afinidad por liposomas enriquecidos en PI(4,5)P₂, mientras que la afinidad es menor por los liposomas control (Figura 27B).

En resumen, el dominio RLD1 de HERC1 tiene afinidad por derivados fosforilados del fosfatidilinositol, es decir por fosfoinosítidos, aunque no queda claro cuales de estos fosfoinosítidos son importantes para la función de HERC1. Mientras que el RLD1 y HERC1 de células Sf9 son purificadas con PI(4,5)P₂ asociado y éste es necesario para su actividad GRF in vitro, el RLD1 purificado de bacterias y HERC1 purificada de Sf9 muestran mayor afinidad por los derivados monofosforilados del fosfatidilinositol, especialmente por PI(3)P, un fosfoinosítido implicado en endocitosis (De Matteis y Godi (2004)).

4.2. Análisis de la localización subcelular de HERC1

4.2.1. Análisis de la localización subcelular de HERC1 por microscopía confocal de fluorescencia

Dado que algunos datos previos indicaban que HERC1 probablemente juega un papel en el tráfico intracelular de proteínas y membranas (unión a clatrina, actividad sobre ARFs y Rabs, unión a fosfolípidos,...), decidimos estudiar si HERC1 colocaliza por microscopía confocal de fluorescencia con marcadores de los distintos compartimentos de las vías celulares de endocitosis y de secreción de proteínas. En estos estudios se usaron células NRK o, sobretudo cuando las células debían ser transfectadas, células HeLa.

4.2.1.1. Análisis de colocalización entre HERC1 y marcadores de vías endocíticas

Para comprobar si HERC1 se halla en algún compartimento endocítico, en primer lugar nos propusimos ver si las estructuras puntiformes obtenidas con los anticuerpos anti-HERC1 podían ser marcadas con trazadores endocíticos de distintas vías de internalización de material extracelular. En particular, usamos un marcador de endocitosis de fase fluida (Dextrano-Texas Red), uno de endocitosis constitutiva mediada por receptor (Transferrina-Alexa Fluor 546) y otro de endocitosis inducida por la unión de ligando a receptor (EGF-TRITC). Como puede observarse en las Figuras 29-31, en los tres casos existe un grado de colocalización muy bajo (en el caso del Dextrano un poco mayor). Estos experimentos se efectuaron a distintos tiempos de

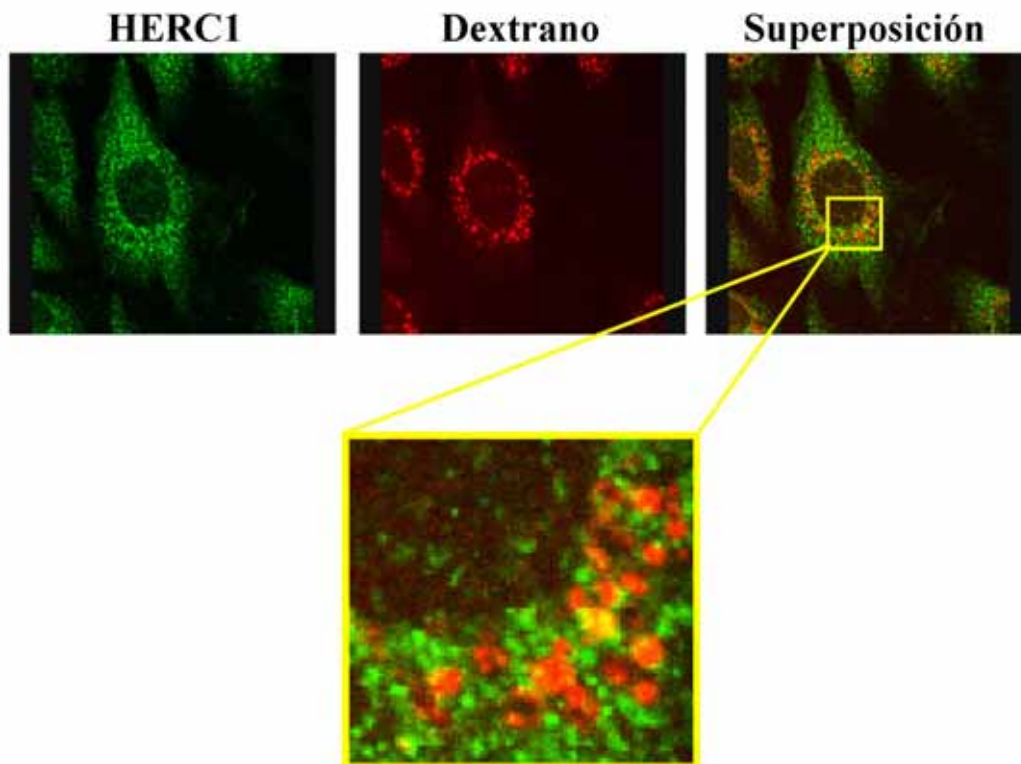


Figura 29. HERC1 colocaliza sólo débilmente con Dextrano. Células NRK fueron incubadas durante 30 minutos con 1,5 mg/ml de Dextrano-Texas Red (pulso). A continuación se lavó el dextrano del medio y las células se incubaron durante 90 minutos más en presencia de cloroquina (caza) antes de ser fijadas y procesadas para la detección inmunofluorescente de HERC1. Como se puede ver en la ampliación, HERC1 colocaliza sólo ocasionalmente con los endosomas que contienen el dextrano internalizado. El mismo experimento se efectuó a tiempos de internalización más cortos (desde 5 minutos hasta 2 horas) con los mismos resultados (datos no mostrados).

internalización (de 2 minutos hasta un máximo de 3 horas, datos no mostrados), pero en ninguno de estos tiempos se observó una colocalización significativa entre HERC1 y las

sustancias de origen extracelular. Estos resultados, pues, parecen indicar que HERC1 no se halla en los compartimentos endocíticos por los que son transportados el Dextrano, la Transferrina y el EGF. No obstante, no se puede descartar que HERC1 se asocie sólo transitoriamente a estos orgánulos, o que regule el transporte entre ellos sin asociarse físicamente a los mismos.

Por otro lado, también nos propusimos estudiar si HERC1 colocaliza con proteínas o lípidos intracelulares cuya implicación en endocitosis ha sido previamente descrita. En este sentido, era especialmente interesante determinar si HERC1 colocaliza

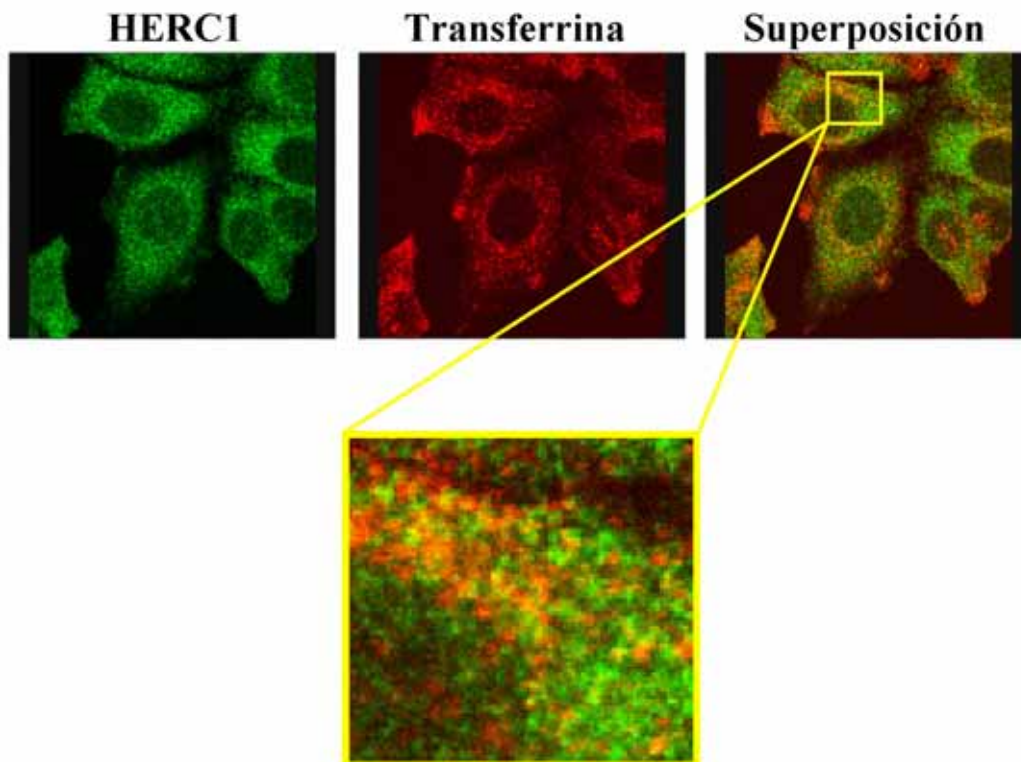


Figura 30. HERC1 no colocaliza con Transferrina. Células HeLa fueron incubadas 60 minutos con 25 $\mu\text{g/ml}$ Transferrina-AlexaFluor-546 antes de ser fijadas y procesadas para la detección inmunofluorescente de HERC1. Como se puede ver en la ampliación, HERC1 no colocaliza significativamente con los endosomas que contienen la transferrina internalizada. El mismo experimento se efectuó a otros tiempos de internalización (desde 2 minutos hasta 3 horas) con los mismos resultados (datos no mostrados).

en el interior de las células con PI(3)P, un fosfoinosítido clave en el transporte vesicular entre distintos compartimentos endosomales (De Matteis y Godi (2004)) y por el que HERC1, como se ha visto en el apartado anterior, posee una elevada afinidad in vitro. Para detectar este fosfolípido en el interior de la célula, transfectamos células HeLa con

una proteína de fusión entre GFP y dos copias consecutivas del dominio FYVE de la proteína Hrs (GFP-2x-FYVE), la cual se ha descrito que sirve para la detección específica de PI(3)P (Gillooly et al. (2000)). Sin embargo, aunque en alguna célula se observa una cierta colocalización, en la mayor parte de las células transfectadas con GFP-2x-FYVE no hay colocalización alguna entre la sonda de PI(3)P y HERC1 (Figura 32). Asimismo, HERC1 tampoco colocaliza con la proteína EEA1 (*Early Endosome Autoantigen-1*), un marcador de los endosomas tempranos (Figura 32) (Dumas et al. (2001)).

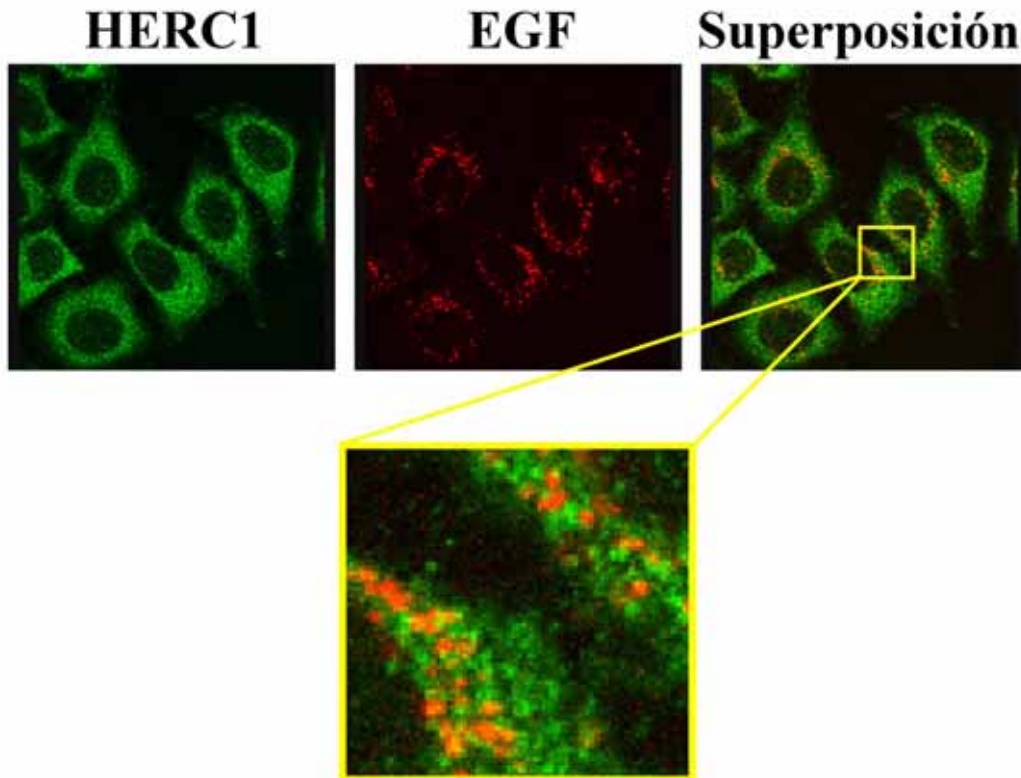


Figura 31. HERC1 no colocaliza con EGF. Después de haber sido cultivadas durante toda la noche en ausencia de suero, las células HeLa fueron incubadas 15 minutos con 40 ng/ml EGF-TRITC antes de ser fijadas y procesadas para la detección inmunofluorescente de HERC1. Como se puede ver en la ampliación, HERC1 no colocaliza significativamente con los endosomas que contienen el EGF-TRITC internalizado. El mismo experimento se efectuó a otros tiempos de internalización (desde 2 minutos hasta 3 horas) con los mismos resultados (datos no mostrados).

Es en cierto modo sorprendente que HERC1 no presente colocalización con la sonda de PI(3)P (Figura 32), dada la interacción entre HERC1 y PI(3)P observada in vitro (Figura 28). Hay varias razones que podrían explicar esta observación. En primer lugar, cabe la posibilidad de que GFP-2x-FYVE compita con HERC1 por unirse a

PI(3)P. Tal posibilidad parece muy razonable si se tiene en cuenta que PI(3)P es una molécula pequeña y cualquier unión específica a la misma debe implicar a su anillo de inositol-3-fosfato. Aun y así, si la ausencia de HERC1 de los endosomas ricos en PI(3)P fuese debida simplemente a la presencia de GFP-2x-FYVE, entonces HERC1 debería hallarse en estos endosomas en ausencia de esta sonda. Sin embargo, los experimentos de entrada de EGF, el cual pasa, tras ser internalizado, por endosomas con PI(3)P (Le Roy y Wrana (2005)), y de colocación con EEA1, una proteína ubicada en endosomas tempranos en virtud de su unión a PI(3)P y a Rab5 (Dumas et al. (2001)),

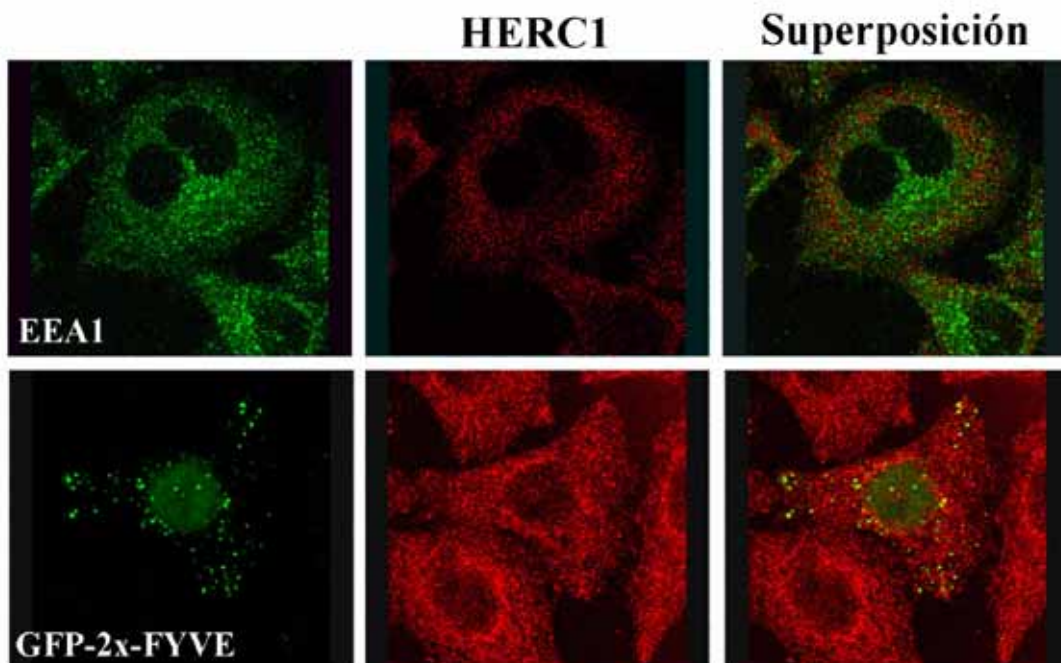


Figura 32. HERC1 no colocaliza con marcadores endosomales. La proteína de endosomas tempranos EEA1 (*Early Endosome Autoantigen-1*) no colocaliza significativamente con HERC1 en células HeLa. Del mismo modo, HERC1 tampoco colocaliza en HeLa con GFP-2x-FYVE, una proteína recombinante diseñada como sonda para la detección específica de PI(3)P, un fosfoinosítido implicado en la dinámica de los endosomas (Gillooly et al. (2000) y De Matteis y Godi (2004)).

parecen indicar que HERC1 no se halla en los endosomas tempranos que contienen PI(3)P independientemente de la presencia en las células de GFP-2x-FYVE. Por lo tanto, una alternativa más plausible para justificar la aparente ausencia de HERC1 de los focos intracelulares de PI(3)P es que la interacción in vivo entre HERC1 y PI(3)P esté regulada de algún modo todavía desconocido y sólo ocurra en respuesta a algún

estímulo. En este sentido, no parece que la unión del EGF a su receptor sea tal estímulo, pues, como se ha visto, HERC1 no se asocia a los endosomas que contienen EGF-TRITC (Figura 31).

Los estudios efectuados en este apartado parecen indicar que HERC1 no se encuentra en varios tipos de endosomas, incluyendo aquellos por los que trafican dextrano, transferrina y EGF tras ser internalizados. Tampoco parece que HERC1 se encuentre en los endosomas tempranos ricos en PI(3)P y EEA1. Aunque estos datos van en contra de que HERC1 tenga un papel relevante en la dinámica de los compartimentos endocíticos, ello todavía no puede ser descartado. En particular, cabe aún la posibilidad de que HERC1 se halle en algún tipo de endosomas no abarcado por nuestros estudios (sería por ejemplo interesante analizar la ruta endocítica regulada por ARF6 y por la que se internalizan proteínas de membrana tales como la β 1-integrina, la placoglobina y el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (Brown et al. (2001)). Finalmente, es posible que HERC1 no se encuentre normalmente asociada a endosomas pero que a pesar de ello pueda regular su funcionamiento. Para resolver este último punto son necesarios experimentos funcionales como los que se describirán en las secciones 4.3 y 4.4 de esta tesis.

4.2.1.2. Análisis de colocalización entre HERC1 y marcadores de la vía secretora

Dado que se ha descrito que HERC1 se halla asociada al aparato de Golgi e interactúa con ARF1, una proteína G monomérica clave en la regulación del transporte a través del Golgi (Rosa et al. (1996) y Altan-Bonnet et al. (2003)), nos propusimos caracterizar más a fondo el posible papel de HERC1 en el tráfico de proteínas a través de dicho orgánulo. Para hacerlo optamos en primer lugar por un modelo bien conocido: el de la secreción de la glucoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular

(VSV-G: *vesicular stomatitis virus glycoprotein*) (Presley et al. (1997)). Concretamente, existe un mutante termosensible de dicha glucoproteína, VSV-G-ts045, cuyo tráfico a través de la vía secretora depende de la temperatura de crecimiento de las células. Así, a la temperatura permisiva (37°C) VSV-G-ts045 se pliega correctamente y es transportada a la membrana plasmática previo paso por el aparato de Golgi. Por contra, cuando las células son crecidas a la temperatura restrictiva (39.5°C) la proteína VSV-G-ts045 no logra plegarse adecuadamente y es por ello retenida en el retículo endoplásmico (ER), donde permanece unida a chaperonas moleculares (Nehls et al. (2000)). Además, si las células en las que VSV-G-ts045 se halla acumulada en el ER son transferidas a 10°C, VSV-G-ts045 consigue plegarse bien y despegarse de las chaperonas que la retenían en el lumen del ER, pero entonces se acumula en los sitios de salida del ER (ERES: *ER exit sites*), debido a que el transporte de vesículas de tipo COP-II desde los ERES está bloqueado a esta temperatura (Mezzacasa y Helenius (2002)). Si, por el contrario, las células son transferidas desde 39.5°C a 15°C (en lugar de a 10°C), entonces VSV-G-ts045 sale del ER y de los ERES pero se queda encallada y se acumula en el compartimento intermedio entre el ER y el Golgi, también llamado ERGIC (*ER-to-Golgi intermediate compartment*) o VTCs (*vesiculo-tubular clusters*) (Mezzacasa y Helenius (2002)). Por último, si las células son pasadas de 39.5°C a 20°C, entonces VSV-G-ts045 es transportada desde el ER al Golgi y a través de las cisternas de éste, pero es detenida en la red trans-Golgi (TGN: *trans-Golgi network*) y tampoco es capaz de llegar a la membrana plasmática (Mezzacasa y Helenius (2002)). Con el objetivo de beneficiarnos de estos conocimientos, diseñamos un experimento en el que células HeLa fueron transfectadas con una proteína de fusión entre VSV-G-ts045 y GFP (VSV-G-GFP). Dichas células fueron a continuación sometidas a varios tratamientos térmicos: 18 horas a 37°C (control), 16 h. a 39.5°C + 2h. a 10°C (ERES), 16h. a 39.5°C + 2h. a

15°C (ERGIC) y 16h. a 39.5°C + 2h. a 20°C (TGN). Tras estos regímenes térmicos las células fueron fijadas y procesadas para la detección inmunocitoquímica de HERC1

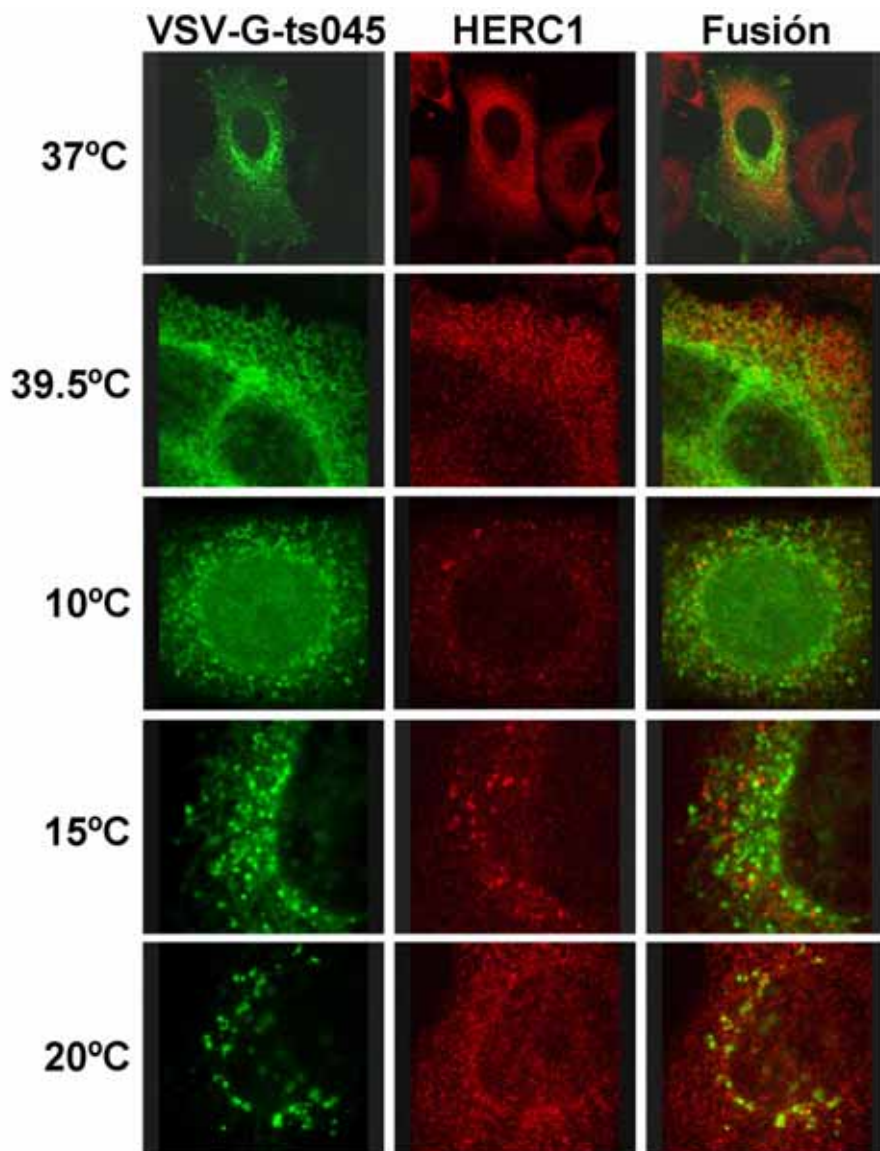


Figura 33. HERC1 no colocaliza con el mutante termosensible ts045 de la glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G-ts045) en ninguno de los compartimentos por los que ésta pasa en su trayecto hacia la membrana plasmática. Células HeLa fueron transfectadas con una proteína de fusión entre VSV-G-ts045 y GFP (VSV-G-GFP) y luego incubadas toda la noche a 37°C o 39.5°C (filas 1 y 2). Mientras que a la temperatura permisiva (37°C) VSV-G-GFP se pliega correctamente y es transportada a la membrana plasmática, a la temperatura restrictiva (39.5°C) VSV-G-GFP es incapaz de plegarse y es retenida en el retículo endoplásmico (Mezzacasa y Helenius (2002)). A continuación, las células en las que VSV-G-GFP se hallaba acumulada en el retículo fueron incubadas durante 2 horas más a 10°C (fila 3), 15°C (fila 4) o 20°C (fila 5). En estas condiciones, VSV-G-GFP se pliega sin problemas pero su transporte a la superficie se halla impedido en distintos puntos de la vía secretora. En particular, se ha descrito que a 10°C la proteína se acumula en los lugares de salida del retículo (ERES: *ER exit sites*), a 15°C en el compartimento intermedio entre retículo y Golgi (ERGIC: *ER-to-Golgi intermediate compartment*) y a 20°C en la red trans-Golgi (TGN: *trans-Golgi network*) (Mezzacasa y Helenius (2002)). En ninguno de estos compartimentos parece haber colocalización entre HERC1 y VSV-G-GFP.

antes de ser analizadas en el microscopio confocal. Como queda reflejado en la Figura 33, HERC1 no colocaliza apreciablemente con VSV-G-GFP en ninguno de los compartimentos en los que ésta se ha descrito que se acumula, es decir ER, ERES,

ERGIC o TGN. Ello sugiere, pues, que HERC1 no se halla en ninguno de estos compartimentos implicados en el tráfico anterógrado de VSV-G-GFP.

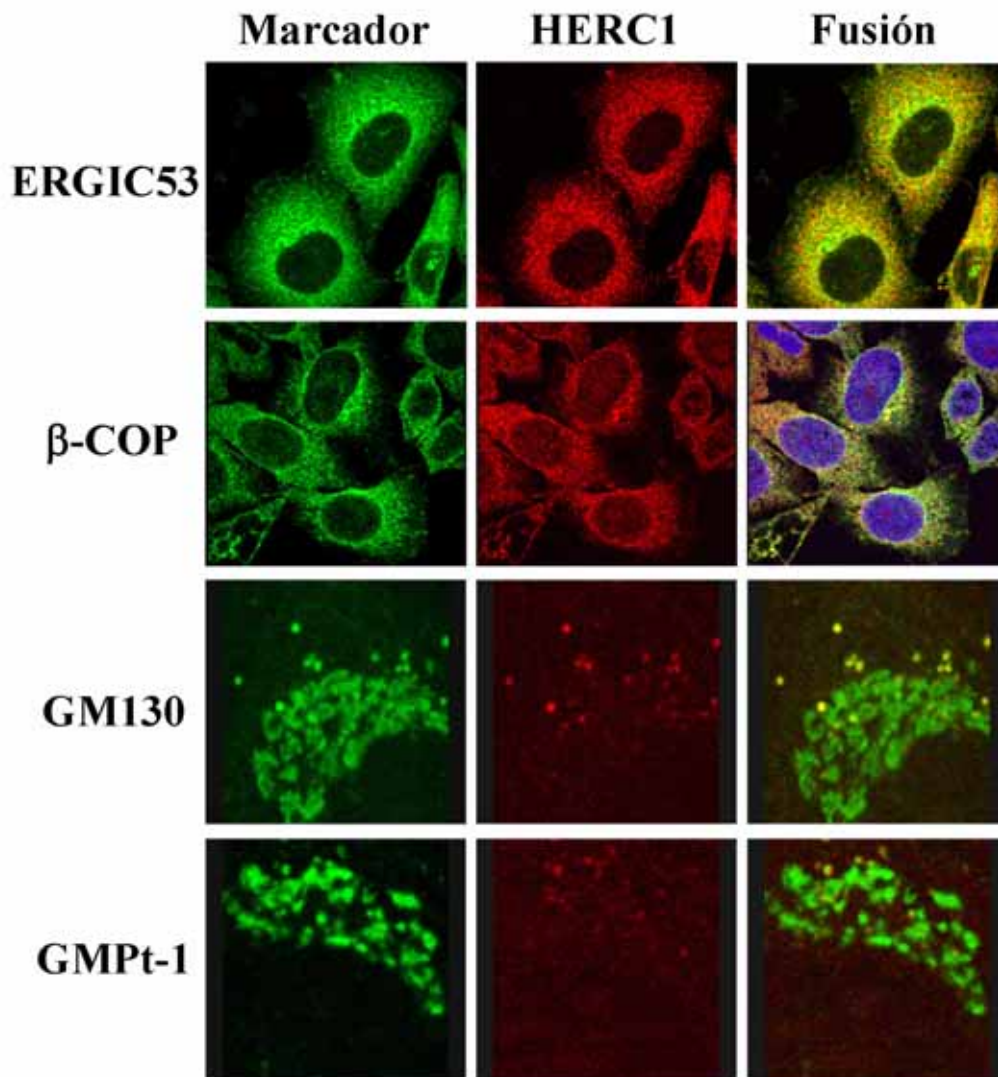


Figura 34. HERC1 se halla en estructuras vesiculares asociadas al Golgi pero no en las cisternas de éste. Se analizó la colocalización entre HERC1 y varias proteínas asociadas al aparato de Golgi en células HeLa (ERGIC53 y β -COP) o NRK (GM130 y GMPT-1). En todos los casos se observa HERC1 asociada a estructuras puntiformes (presumiblemente vesículas) en las que también se hallan las susodichas proteínas del Golgi. La colocalización más clara se encuentra con GM130, una proteína de las cisternas del cis-Golgi pero que también se ubica en las estaciones tardías del compartimento intermedio (*late IC stations*, Marra et al. (2001)), donde parece hallarse HERC1. Por otro lado, HERC1 también se encuentra en algunas estructuras vesiculares asociadas al trans-Golgi, en las que colocaliza con GMPT-1 (en las imágenes de GM130 y GMPT-1 se ha ampliado la zona del Golgi. En la fusión de los marcajes de β -COP y HERC1 se ha añadido también en azul el marcaje nuclear obtenido con TO-PRO3).

Al margen del experimento anterior, efectuamos también estudios de colocalización entre HERC1 y proteínas del aparato de Golgi. En concreto, se estudiaron las proteínas ERGIC53, una proteína involucrada en el tráfico de glucoproteínas desde el ER hacia el Golgi y que se localiza, como su nombre indica, en

el ERGIC (Murshid y Presley (2004) y Velloso et al. (2002)), β -COP, un componente del coatómero, el complejo proteico heptamérico que reviste las vesículas de tipo COP-I implicadas en el transporte retrógrado desde el Golgi al ER (y quizá también en el anterógrado del ERGIC al Golgi (Shima et al. (1999)) y en el tráfico retrógrado entre las distintas cisternas del Golgi (Duden (2003) y Bonifacino y Glick (2004)) y las proteínas de la matriz del Golgi GM130, que se halla en el cis-Golgi y en las llamadas estaciones tardías del ERGIC (Marra et al. (2001)) y GMPt-1, una proteína situada en el trans-Golgi (Alcalde et al. (1992)). Los resultados de los análisis de colocalización entre HERC1 y estas cuatro proteínas se muestran en la Figura 34. Como puede verse, las distribuciones subcelulares de HERC1 y las cuatro proteínas mencionadas coinciden en algunos puntos, aunque sin lugar a dudas la mejor colocalización tiene lugar entre HERC1 y GM130. En ningún caso HERC1 es observada en las cisternas del Golgi, pero en cambio sí se la encuentra en estructuras vesiculares asociadas al mismo, en donde colocaliza en mayor o menor grado con todas las proteínas susodichas (ERGIC53, β -COP, GM130 y GMPt-1). Como viene dicho, existe una colocalización muy clara entre HERC1 y GM130 en lo que son presuntamente las estaciones tardías del ERGIC (*late IC stations* (Marra et al. (2001)). Si esto último es cierto, entonces ello significaría que HERC1 se encuentra en tales estaciones. A pesar de que se ignora si las estaciones tardías del ERGIC en que se halla GM130 (y también GRASP65 (Marra et al. (2001)) están involucradas en el transporte anterógrado hacia el cis-Golgi o en el retrógrado desde el cis-Golgi hacia el ER, es probable que β -COP y ERGIC53 también se hallen en este compartimento, lo cual justificaría que estas proteínas colocalicen moderadamente con HERC1. Lo mismo no ocurre con GMPt-1, la cual se encuentra exclusivamente en la región trans del Golgi. En este caso, la colocalización observada con HERC1

probablemente indica que HERC1 también juega un papel en el trans-Golgi, aunque nada se sabe de cuál podría ser éste.

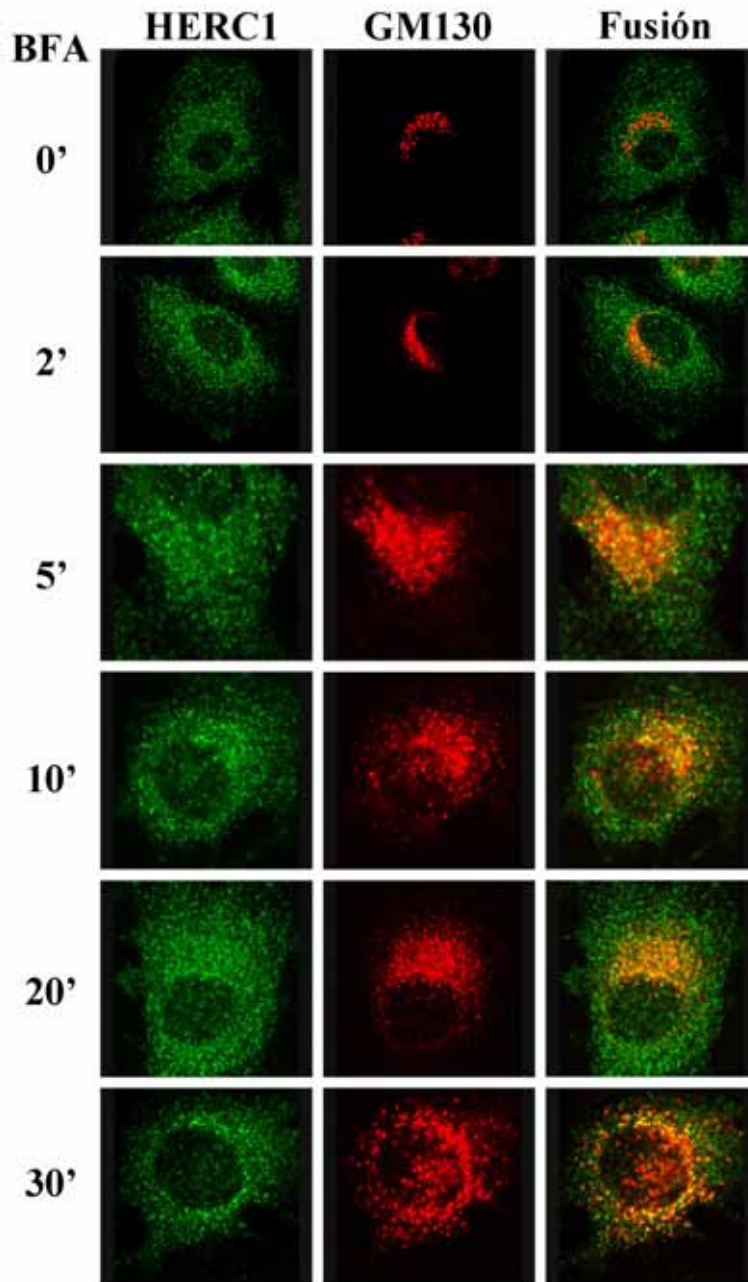


Figura 35. Efecto de BFA sobre la colocalización entre HERC1 y GM130. Células NRK fueron tratadas durante los tiempos indicados con 5 μ g/ml del metabolito fúngico Brefeldina A (BFA) y a continuación fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. Obsérvese como la colocalización entre ambas proteínas aumenta a medida que BFA induce la reabsorción del Golgi por el retículo endoplásmico.

En cualquier caso, la colocalización HERC1-GM130 en las estaciones tardías del ERGIC sugiere que HERC1 puede estar jugando un papel importante en los procesos de transporte que ocurren en la interfase entre el ER y el Golgi. Para tratar de

confirmarlo, efectuamos dos tipos de experimentos. Para empezar, hicimos uso del metabolito fúngico brefeldina A (BFA), el cual se ha descrito que, merced a su capacidad para inhibir un GEF de ARF1 (Chardin y McCormick (1999)), provoca la reabsorción de todo el complejo de Golgi con todos sus componentes por parte del ER (Sciaky et al. (1997) y Tang et al. (1995)). Nuestra idea fue que, si HERC1 realmente opera en el ERGIC, entonces el tratamiento de células NRK con BFA debería inducir el transporte de GM130 a través del ERGIC hacia el ER y, a lo largo de este camino, GM130 debería encontrarse con HERC1, lo cual debería reflejarse en un aumento en la colocalización entre ambas proteínas. Para comprobar si esto es cierto, llevamos a cabo este experimento, cuyos resultados se muestran en la Figura 35. En efecto, la presencia de BFA ocasiona el rápido desmantelamiento de las cisternas del Golgi, tal como se ha descrito (Sciaky et al. (1997) y Tang et al. (1995)), y GM130 pasa de observarse asociada a dichas cisternas a presentar un marcaje cada vez más punteado, hasta que, al cabo de aproximadamente media hora después de la adición de BFA al medio, GM130 empieza a mostrar un marcaje perinuclear, lo cual probablemente señala su llegada al ER. Como se había esperado, la colocalización entre HERC1 y GM130 aumenta a medida que BFA ejerce sus efectos perturbadores, lo cual apoya nuestra hipótesis de que una subpoblación de HERC1 se encuentra en el ERGIC. Además de este experimento, intentamos llevar a cabo otro cuyo objetivo era ver si la proteína HERC1 es necesaria para el transporte retrógrado desde el Golgi hacia el ER. Concretamente, quisimos ver si un siRNA dirigido al mRNA de HERC1 es capaz de impedir la redistribución sufrida por el receptor de KDEL (KDELr), una proteína involucrada en evitar que las proteínas luminales del ER se escapen de éste a través del Golgi (Munro y Pelham (1987), Semenza et al. (1990) y Tang et al. (1993)), cuando las células, HeLa en nuestro caso, son cultivadas a 15°C de temperatura. A pesar de que se ha descrito que

dicho tratamiento provoca un cambio en la localización de KDELR (Tang et al. (1993) y Valderrama et al. (2001)), que pasa de hallarse mayoritariamente en el Golgi a presentar un marcaje punteado propio del ERGIC, nosotros no fuimos capaces de observar tal translocación tras 2 o 3 horas de incubación a 15°C y por tanto no pudimos evaluar el efecto de HERC1 sobre la misma.

Los resultados mostrados en el presente apartado, pues, parecen indicar que HERC1 se halla en las estaciones tardías del ERGIC, donde colocaliza con GM130 y posiblemente también con ERGIC53 y β -COP. Esta conclusión parece contradecirse con el hecho de que HERC1 no colocalice con VSV-G-GFP a 15°C, cuando ésta se halla acumulada en el ERGIC. Sin embargo, esta aparente contradicción podría deberse a la complejidad del compartimento que denominamos ERGIC, el cual contiene varios subcompartimentos o estaciones y, por tanto, el subcompartimento del ERGIC en el que se acumula VSV-G-GFP a 15°C probablemente no es el mismo que el subcompartimento donde se halla HERC1. En este sentido, una comprensión más profunda del ERGIC y de sus distintas estaciones y los marcadores de cada una de ellas (así como contrastar si existen estaciones separadas para el transporte anterógrado y retrógrado a lo largo del ERGIC), debería facilitar mucho la labor de definir con precisión la ubicación y la función de HERC1 en este compartimento.

4.2.2. Efecto del fluoruro de aluminio sobre la localización subcelular de HERC1

4.2.2.1. HERC1 se halla en protrusiones de membrana ricas en actina

A la vista de la actividad de HERC1 como factor disociador de nucleótidos para la proteína G monomérica ARF6, nos preguntamos si HERC1 podía hallarse implicada en alguno de los procesos fisiológicos en los que se sabe que participa ARF6. Así, dado que se ha descrito que la activación de ARF6 es necesaria para la reorganización del

citoesqueleto cortical de actina que tiene lugar en respuesta al tratamiento de células HeLa con fluoruro de aluminio (Radhakrishna et al. (1996)), nos propusimos investigar el posible papel de HERC1 en este proceso. Para ello, se trataron células HeLa previamente transfectadas con ARF6 durante 30 minutos con fluoruro de aluminio (AlF_4^-) y a continuación dichas células fueron fijadas y tratadas para la detección fluorescente de actina, ARF6 y HERC1. Tal y como se había descrito con anterioridad (Radhakrishna et al. (1996)), la adición de AlF_4^- a estas células dio lugar a la formación en la superficie de las células de protrusiones ricas en actina filamentosa (F-actina) y ARF6. Además, como se muestra en la Figura 36A, estas protrusiones también

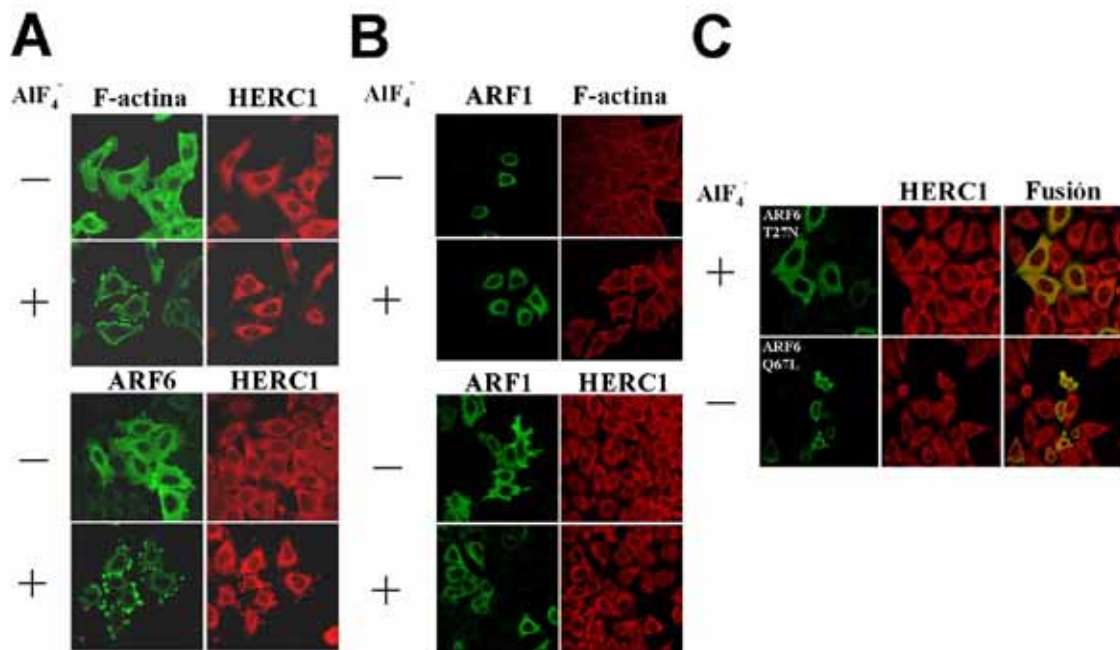


Figura 36. HERC1 es reclutada a protrusiones de membrana enriquecidas en F-actina inducidas por la activación de ARF6. (A) Células HeLa fueron transfectadas con un plásmido que codifica por la proteína ARF6 con un epítipo hemaglutinina en su C-terminal (ARF6-HA). Dichas células fueron a continuación tratadas con una solución de fluoruro de aluminio (AlF_4^-) para inducir la activación de ARF6. Tras media hora de tratamiento las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. Obsérvese como en estas condiciones AlF_4^- induce la formación de protrusiones de F-actina en las que ARF6 y HERC1 se hallan enriquecidas. (B) El mismo experimento fue realizado con ARF1-HA en lugar de ARF6-HA. En este caso el fluoruro de aluminio no es suficiente para generar las protrusiones. (C) La transfección de un mutante dominante negativo de ARF6 (T27N) impide la formación de protrusiones en respuesta a fluoruro de aluminio, indicando que éstas son el resultado de la activación de ARF6. Por otro lado, la transfección de un mutante constitutivamente activo de ARF6 (Q67L) da lugar a un fenotipo parecido al del tratamiento con AlF_4^- , aun cuando éste se encuentra ausente.

contienen HERC1, indicando que esta proteína podría jugar algún papel en la formación o el funcionamiento de tales estructuras. Se ha descrito que estas protrusiones se forman como consecuencia de la activación de ARF6 por parte del AlF_4^- . Para comprobar que

éste es realmente el caso las células HeLa fueron transfectadas con ARF1 en lugar de ARF6 antes de ser tratadas con AlF_4^- . Como se esperaba (dado que los niveles de ARF6 endógeno no son suficientes para inducir la aparición de protrusiones (Radhakrishna et al. (1996)), el AlF_4^- es incapaz de inducir la formación de protrusiones en las células transfectadas con ARF1 (Figura 36B), indicando de este modo que dicho proceso requiere específicamente de ARF6. Además, la transfección en HeLa de un mutante dominante negativo de ARF6 que es incapaz de unir GTP (ARF6-T27N) inhibe la aparición de las protrusiones en presencia de AlF_4^- (Figura 36C), mientras que un mutante constitutivamente activado de ARF6 (ARF6-Q67L) da lugar a ellas incluso en ausencia de dicho ion (Figura 36C). Por lo tanto, la activación de ARF6 es requerida para la formación de las protrusiones de actina. Sin embargo, es todavía desconocido de qué manera el AlF_4^- induce la activación de ARF6. A este respecto, se ha publicado que AlF_4^- activa directamente a la subunidad α de una proteína G heterotrimérica de tipo Gq (Al-Awar et al. (2000)), la cual, mediante un mecanismo aún desconocido, causa la activación de ARF6. En el siguiente apartado se intentará averiguar si HERC1 está implicada en este proceso.

4.2.2.2. La sobreexpresión de HERC1 no afecta a la formación de protrusiones de actina

Con el objetivo de comprobar si HERC1 está implicada en el proceso de activación de ARF6, se transfectaron células HeLa simultáneamente con ARF6 y una proteína de fusión entre GFP y HERC1 (GFP-HERC1). En principio, si HERC1 estuviese activando ARF6 in vivo, la sobreexpresión de aquella debería aumentar el grado de activación de ésta y dar lugar a la formación de protrusiones incluso en ausencia de AlF_4^- . Sin embargo, como puede observarse en la Figura 37, la expresión de

GFP-HERC1 no provoca la formación de protrusiones en ausencia de AlF_4^- , mientras que la sobreexpresión de ARNO, una proteína con un dominio Sec7 capaz de estimular el intercambio de nucleótidos de guanina sobre ARF6 (Frank et al. (1998a y b)), sí

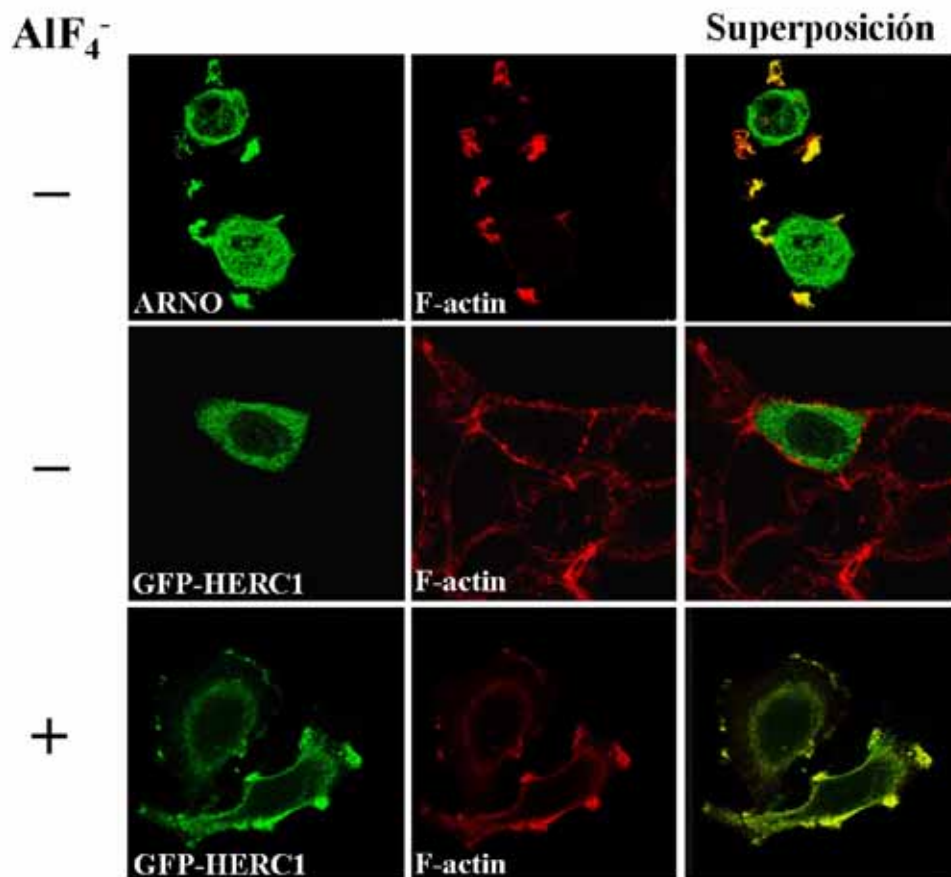


Figura 37. HERC1 no afecta a la activación de ARF6. La transfección de células HeLa con ARNO, un conocido factor intercambiador de nucleótidos de guanina sobre ARF6 (Frank et al. (1998), da lugar a protrusiones de actina en ausencia de fluoruro de aluminio (fila superior). Sin embargo, la transfección de GFP-HERC1 no provoca la aparición de tales protrusiones en las mismas condiciones (fila central) ni tampoco impide la formación de las mismas cuando AlF_4^- si está presente (fila inferior).

induce la formación de protrusiones de actina sin necesidad de tratar las células con AlF_4^- . Por otro lado, dado que in vitro HERC1 sólo estimula la disociación de nucleótido sobre ARF6 sin acelerar concomitantemente el intercambio (ver sección 4.1.3.), podría también esperarse que HERC1 tuviese el efecto de impedir la activación de ARF6. No obstante, esto no parece ocurrir en el caso que nos ocupa, puesto que la expresión de GFP-HERC1 en HeLa no inhibe la formación de protrusiones cuando las células son tratadas con AlF_4^- (Figura 37).

Los resultados mostrados hasta ahora parecen indicar que HERC1 no está regulando, ni positiva ni negativamente, la actividad de ARF6 en las células HeLa. Aunque cabe la posibilidad de que la ausencia de efecto de GFP-HERC1 sobre ARF6 se deba a que los niveles totales de HERC1 en las células transfectadas con GFP-HERC1 no estén demasiado por encima de los niveles de HERC1 endógena de las células HeLa no transfectadas (debe recordarse que HERC1 es una proteína de 532 kDa y su sobreexpresión no es una tarea fácil), lo más probable en vista de los datos obtenidos es que HERC1 no esté situada por encima de ARF6 en la ruta de transducción de señales que culmina en la formación de las protrusiones, sino que, al contrario, el reclutamiento de HERC1 a las protrusiones sea un evento posterior a la activación de ARF6.

4.2.2.3. HERC1 colocaliza con PI(4,5)P₂ en las protrusiones de actina

La hipótesis de que HERC1 sea reclutada a las protrusiones con posterioridad a la activación de ARF6 resulta especialmente atractiva cuando se la considera a la luz de la capacidad descrita de ARF6 para activar directamente a PI(4)P 5-quinasa, el enzima encargado de la síntesis de PI(4,5)P₂ (Honda et al. (1999) y Skippen et al. (2002)). Puesto que, como se ha visto (Figuras 26-28), este fosfoinosítido interactúa con HERC1, parece lógico que el reclutamiento de HERC1 a las protrusiones sea una consecuencia de la formación localizada de PI(4,5)P₂ en estas estructuras, siendo éste sintetizado por PI(4)P 5-quinasa tras haber ésta sido activada por ARF6. Para determinar si es esto lo que está ocurriendo, efectuamos experimentos en los que células HeLa fueron transfectadas con PI(4)P 5-quinasa- α (PIPK α) e, independientemente, con el dominio de homología a pleckstrina (PH: *pleckstrin homology*) de la fosfolipasa C δ 1 fusionado a GFP (PH-PLC δ 1-GFP), una construcción que ha sido descrita como una sonda específica para la detección del PI(4,5)P₂ intracelular (Brown et al. (2001)).

Después de ser transfectadas, estas células fueron tratadas con AlF_4^- durante 30 minutos, fijadas y procesadas para la detección de HERC1 (los resultados se muestran en la Figura 38). Puede verse como la transfección de estas dos proteínas (Myc-PIP α y PH-PLC δ 1-GFP) no impide la formación de las protrusiones y no sólo esto sino que además ambas proteínas se hallan enriquecidas en las protrusiones, donde colocalizan con HERC1 (Figura 38). Estos resultados indican que las protrusiones son lugares de

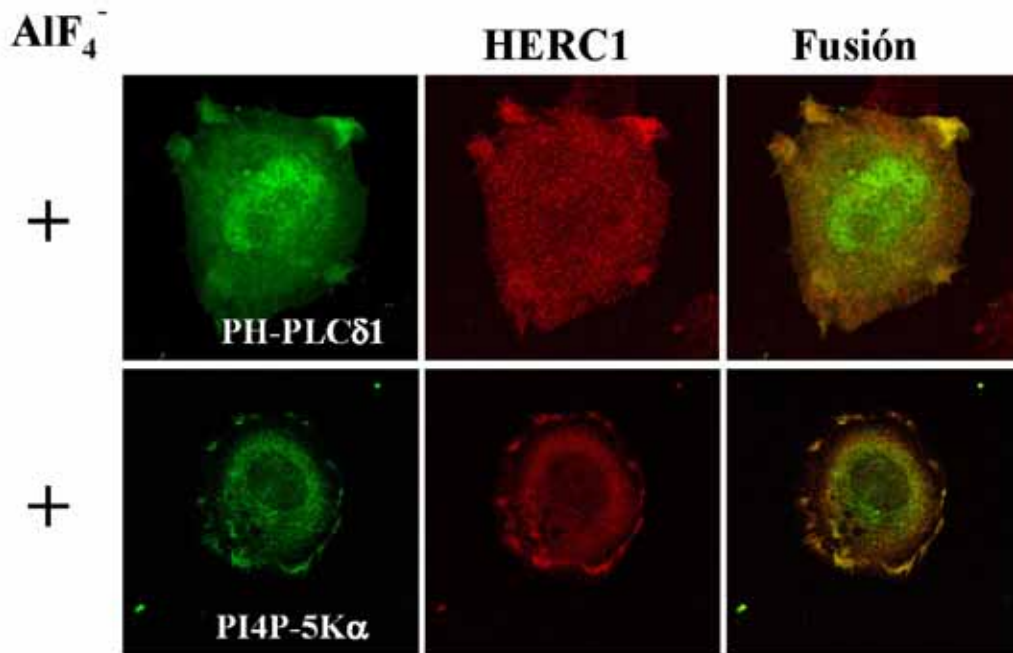


Figura 38. HERC1 colocaliza con PI(4,5)P₂ y PI4P-5-quinasa- α en protrusiones de actina. Células HeLa fueron transfectadas con ARF6-HA y PH-PLC δ 1-GFP o Myc-PI(4)P-5-quinasa- α y tratadas con fluoruro de aluminio para inducir la formación de protrusiones. El dominio de homología a pleckstrina de la fosfolipasa δ 1 (PH-PLC δ 1) se une a PI(4,5)P₂ y su fusión con la proteína fluorescente verde (GFP) ha sido descrita como una sonda útil para la detección específica de dicho fosfolípido (Varnai et al. (2002)). Obsérvese como HERC1 colocaliza en las protrusiones con PI(4,5)P₂ y el enzima que lo sintetiza, es decir fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa- α .

elevada producción de PI(4,5)P₂ y, por tanto, hacen más verosímil, aunque no demuestran, la posibilidad de que HERC1 sea reclutada a ellas por este fosfolípido. A pesar de que la síntesis de PI(4,5)P₂ tiene lugar en las protrusiones, ello no parece ser por si mismo suficiente para la formación de éstas, dado que las células HeLa transfectadas con PIPK α no presentan protrusiones en ausencia de fluoruro de aluminio (datos no mostrados). Esta observación indica probablemente que la vía de transducción de señales que lleva a la formación de las protrusiones se bifurca (o se “multifurca”) a

nivel de ARF6, lo cual hace que sea necesaria la activación de más de un efector de ARF6 para que se generen las protrusiones. En este sentido, se sabe que ARF6, además de activar a PIPK, también induce la activación del enzima fosfolipasa D (PLD) (Brown et al. (1993), Santy y Casanova (2001) y Hiroyama y Exton (2005)), la actividad del cual también podría ser necesaria para la formación de las protrusiones. De hecho, PLD estimula la síntesis de ácido fosfatídico (PA), otro fosfolípido por el cual el dominio RLD1 de HERC1 presenta una cierta afinidad (Figura 27). Por consiguiente, existen otros mecanismos además de la unión a PI(4,5)P₂ que podrían explicar la translocación de HERC1 a las protrusiones, tales como la unión a PA o a alguna de las proteínas que a su vez son reclutadas a la membrana por estos fosfolípidos.

Al margen de los mecanismos que dan lugar a las protrusiones de actina y al reclutamiento de HERC1 a las mismas, una cuestión interesante es la relativa a la función que HERC1 desempeña en estas estructuras. Aunque nada se sabe todavía acerca de este asunto, una posibilidad interesante es la de que HERC1 pueda tener algún papel en la macropinocitosis que se ha descrito que se halla estimulada en las protrusiones plasmalemales inducidas por ARF6 (Radhakrishna et al. (1996)). Alternativamente, no puede tampoco descartarse que HERC1 afecte de alguna manera a la formación de los filamentos de actina corticales, aunque ello parece improbable si se tiene en cuenta que dicho proceso es ya bastante conocido (DeMali y Burridge (2003) y Pollard y Borisy (2003)) y no hay indicio alguno de que HERC1 pueda estar regulándolo. Pese a que no se ha llevado a cabo el experimento, sería interesante para responder a esta última pregunta comprobar si las protrusiones de actina pueden formarse normalmente en células cuyos niveles de HERC1 han sido reducidos mediante la técnica de RNAi.

4.3. Estudio de los efectos de la silenciación de HERC1 por RNAi

Una forma bastante útil de elucidar la función de una proteína consiste en caracterizar qué le sucede a las células u organismos que carecen de la misma. Para lograr este objetivo, hicimos uso de la técnica de interferencia por RNA, más comúnmente denominada RNAi (*RNA interference*) (Dykxhoorn et al. (2003) y Mello y Conte Jr. (2004)). Esta técnica, basada en descubrimientos relativamente recientes sobre la capacidad del RNA de doble hebra (dsRNA: *double-stranded RNA*) de inducir una silenciación génica potente y específica de secuencia (Fire et al. (1998)) y la subsiguiente caracterización de los mecanismos implicados en esta silenciación (Meister y Tuschl (2004)), consiste en la transfección de células con dsRNAs de pequeño tamaño (21-22 nt) (siRNAs: *small interfering RNAs*), los cuales, una vez en el interior celular, inducen la degradación específica de aquellos mRNAs cuyas secuencias presentan complementariedad con la de los mencionados siRNAs.

Con el fin, pues, de reducir los niveles de expresión de la proteína HERC1 en células humanas (el fenómeno de RNAi ocurre aparentemente en la mayoría de organismos eucariotas, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la excepción más notable a esta norma) diseñamos un siRNA complementario al mRNA de HERC1 y que no es complementario a ningún otro mRNA conocido. Este siRNA, al que se denominará en adelante HERC1-siRNA, fue transfectado en células HeLa y los niveles de la proteína HERC1 en células control y transfectadas fueron analizados por Western blot (Figura 39). Como habíamos esperado, la expresión de la proteína HERC1 disminuye considerablemente (más de un 90%) en las células HeLa que han sido transfectadas con HERC1-siRNA. Esta reducción es, además, específica para HERC1, pues no tiene lugar en ninguna de las otras proteínas que analizamos (Figura 39). De hecho, la ausencia de cambios en los niveles de expresión de estas proteínas no sólo indica que HERC1-

siRNA es específico para HERC1 y no causa un descenso general de la transcripción de otros mRNAs, sino que también implica que la reducción en los niveles de la proteína HERC1 no causa ninguna alteración en los niveles de estas otras proteínas, entre las que

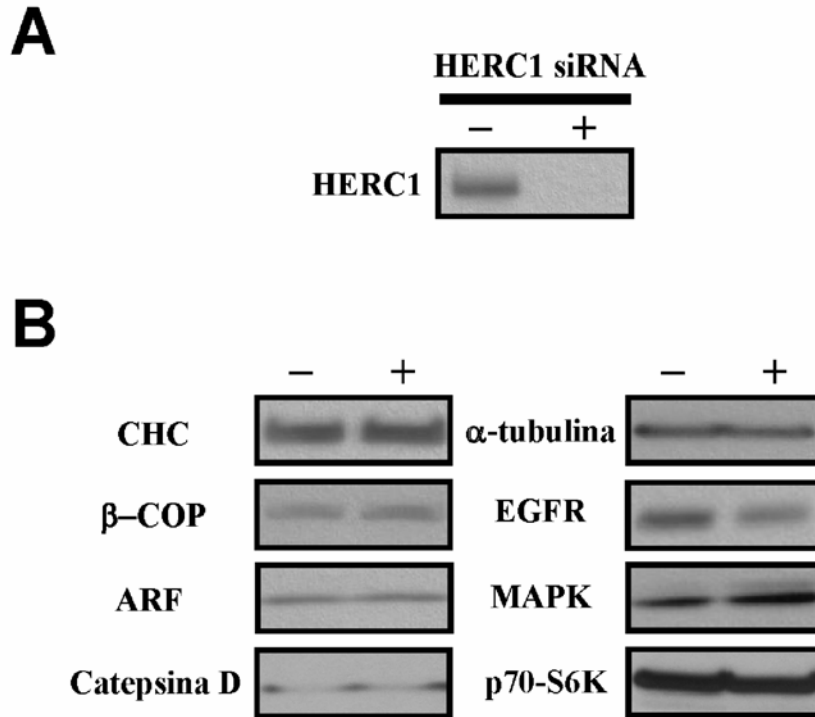


Figura 39. RNAi de HERC1. Células HeLa fueron transfectadas con 30nM de un siRNA dirigido específicamente al mRNA de HERC1 (HERC1-siRNA). 72 horas después de ser transfectadas, (A) las células transfectadas con HERC1-siRNA muestran una reducción de más de un 90% en sus niveles de proteína HERC1 respecto a las células HeLa control. (B) La disminución de los niveles de HERC1 no afecta a los niveles de varias otras proteínas en estas células, incluyendo proteínas involucradas en tráfico vesicular (CHC, β -COP, ARF), en la transducción de señales (EGFR, MAPK, p70-S6K), en la formación del citoesqueleto de microtúbulos (α -tubulina) o en la función lisosomal (Catepsina D). Los extractos celulares de las células control o transfectadas con HERC1-siRNA fueron resueltos por SDS-PAGE y las distintas proteínas fueron detectadas por Western blot con anticuerpos específicos. La misma cantidad de proteína fue cargada en el gel en ambas condiciones.

se cuentan proteínas con funciones en el tráfico de membranas y la transducción de señales (Figura 39).

Así pues, una vez puesta a punto la técnica que nos permitía reducir considerablemente los niveles de HERC1 en células humanas (todos los experimentos que se mostrarán se efectuaron en células HeLa, donde comprobamos que la silenciamiento de la expresión de HERC1 es especialmente eficaz), nos propusimos analizar si dicha reducción tiene algún efecto en aquellos procesos en los que HERC1 podría estar jugando un papel. En los siguientes dos apartados se estudian los efectos

del RNAi de HERC1 sobre el funcionamiento de las vías endocítica y secretora, respectivamente.

4.3.1. Efecto del RNAi de HERC1 sobre endocitosis

Además de comprobar los niveles de algunas proteínas implicadas en procesos endocíticos mediante Western blot (Figura 39), tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR: *Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor*) o la

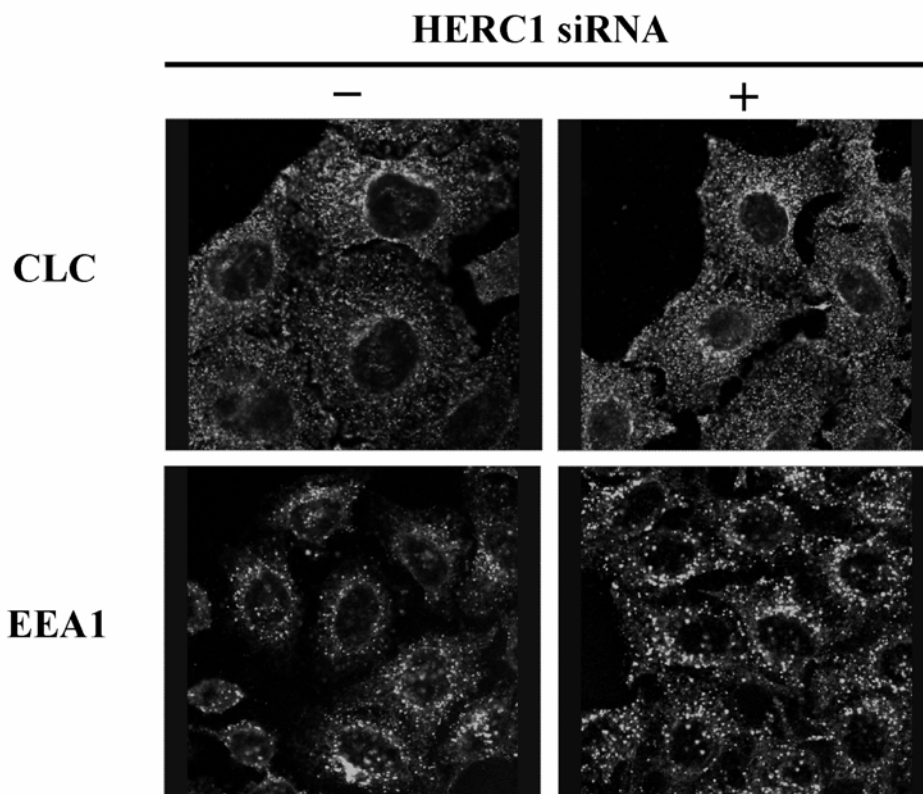


Figura 40. El RNAi de HERC1 no afecta la localización de proteínas involucradas en endocitosis. La distribución subcelular de EEA1, una proteína ubicada en endosomas tempranos (Simonsen et al. (1998)) y de la cadena ligera de la clatrina (CLC), una proteína implicada en la formación de cubiertas vesiculares en la vía endocítica y también en la secretora (Bonifacino y Glick (2004)), fueron analizadas por inmunofluorescencia en células HeLa transfectadas o no con HERC1-siRNA. No se observan diferencias sustanciales entre ambas condiciones.

cadena pesada de la clatrina (CHC), también decidimos estudiar si la transfección de HERC1-siRNA en células HeLa causa alteraciones en la distribución subcelular de proteínas implicadas en endocitosis. Para ello utilizamos métodos inmunocitoquímicos para visualizar la localización en células control y transfectadas con HERC1-siRNA de

TRITC en células HeLa. No obstante, dado que el resultado anterior sólo descartaba que HERC1 estuviese afectando directamente la internalización del complejo EGF-EGFR, decidimos comprobar si HERC1-siRNA podía estar afectando el tráfico intracelular de EGFR. En este sentido, se ha descrito que la activación del EGFR por su ligando, el

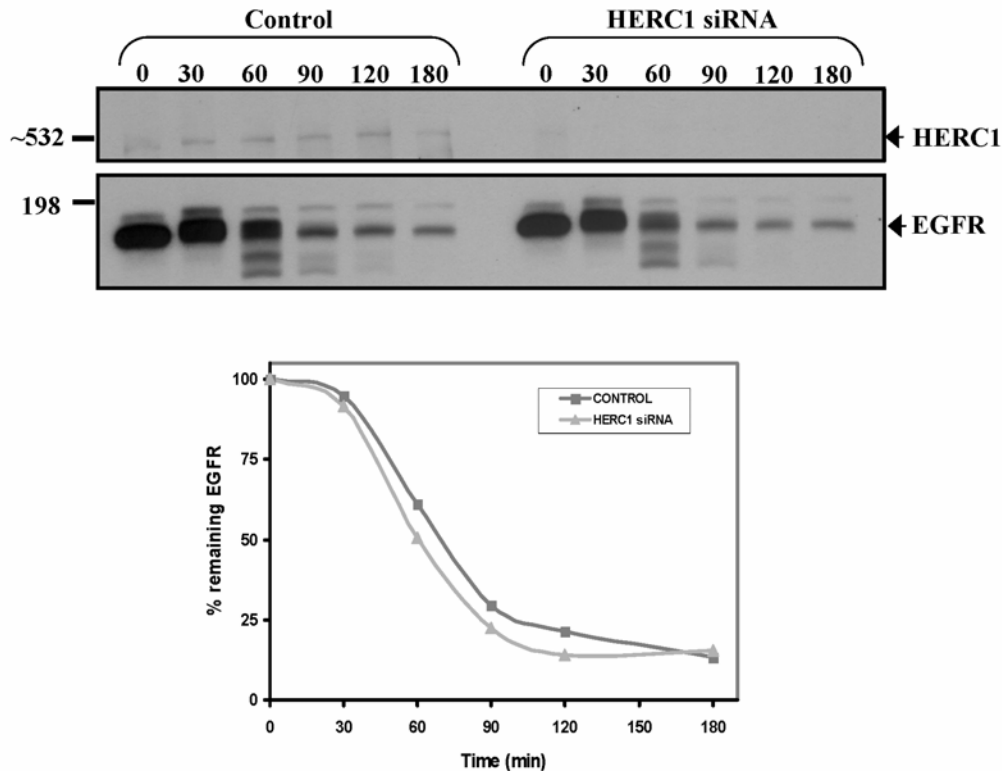


Figura 42. La disminución de los niveles de HERC1 por RNAi no afecta a la degradación de EGFR inducida por EGF. Células HeLa control o transfectadas con un siRNA de HERC1 fueron tratadas durante 30 minutos con 30 ng/ml de EGF. A continuación, el EGF fue eliminado del medio de cultivo y las células fueron retornadas a 37°C hasta un máximo de 3 horas desde la adición inicial de EGF, cuando las células fueron lisadas y los niveles de HERC1 y EGFR en las mismas analizadas por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos específicos. Como puede verse arriba y como se ha descrito con anterioridad (Choi et al. (2004)), el tratamiento de células HeLa con EGF induce la degradación de su receptor de forma dependiente del tiempo. Dicha degradación se halla fundamentalmente inalterada en las células transfectadas con el siRNA de HERC1, lo cual parece indicar que HERC1 no es un regulador del tráfico intracelular del EGFR. Abajo se muestra la cuantificación de los niveles de EGFR en función del tiempo en ambos casos.

EGF, reduce la vida media del receptor desde las aproximadamente 10 horas en ausencia de EGF, a menos de una hora en su presencia (Pollard y Earnshaw (2004)). Esto es debido a que el EGF induce la internalización de EGFR y su posterior transporte, en un proceso mediado por ubiquitina y PI(3)P, a las vesículas intraluminales de los endosomas multivesiculares (MVBs: *multivesicular bodies*), los cuales se fusionan directamente con los lisosomas, causando así la degradación de

EGFR (Katzmann et al. (2002) y Longva et al. (2002)). Para ver, pues, si HERC1 afecta al transporte de EGFR a los MVBs y su subsiguiente degradación lisosomal, realizamos cinéticas de degradación de EGFR inducida por EGF en células HeLa control y transfectadas con HERC1-siRNA. Los resultados, visibles en la Figura 42, muestran que este no es el caso, pues la cinética de degradación del EGFR es virtualmente idéntica en las células HeLa control y las transfectadas con HERC1-siRNA, siendo en ambos casos la vida media del receptor de aproximadamente una hora, como ya se había descrito.

En síntesis, los resultados de los experimentos de RNAi de HERC1 ratifican los previamente obtenidos al estudiar la colocalización de HERC1 con marcadores de varias vías endocíticas en tanto que ambos estudios apuntan a que HERC1, pese a interactuar con clatrina y PI(3)P, no tiene un papel importante en los procesos de transporte desde la membrana plasmática hacia el interior de la célula.

4.3.2. Efecto del RNAi de HERC1 sobre la vía secretora

De modo análogo a lo hecho para estudiar la vía endocítica, nuestro estudio de los efectos de HERC1-siRNA sobre la vía secretora consistió en primer lugar en el análisis de la distribución subcelular de varias proteínas implicadas en esta vía. Más concretamente, dada la observación previa (sección 4.2.1.2) de que HERC1 colocaliza con algunas proteínas del ERGIC y el complejo de Golgi, nos centramos principalmente en estudiar si existen modificaciones en la localización intracelular de proteínas pertenecientes a estos dos compartimentos de la vía secretora entre células control y células transfectadas con HERC1-siRNA. Así, del ERGIC se analizó la distribución de ERGIC53 y KDELR, del cis-Golgi la de GM130, del trans-Golgi la del receptor de manosa-6-fosfato (CI-M6PR: *cation-independent mannose-6-phosphate receptor*), una

proteína clave en el transporte de hidrolasas desde la red trans-Golgi (TGN) a su destino final en los lisosomas (Olson et al. (2004)) y, por último, se observó también la localización de la subunidad β del coatómero, β -COP. Como se ve en la Figura 43,

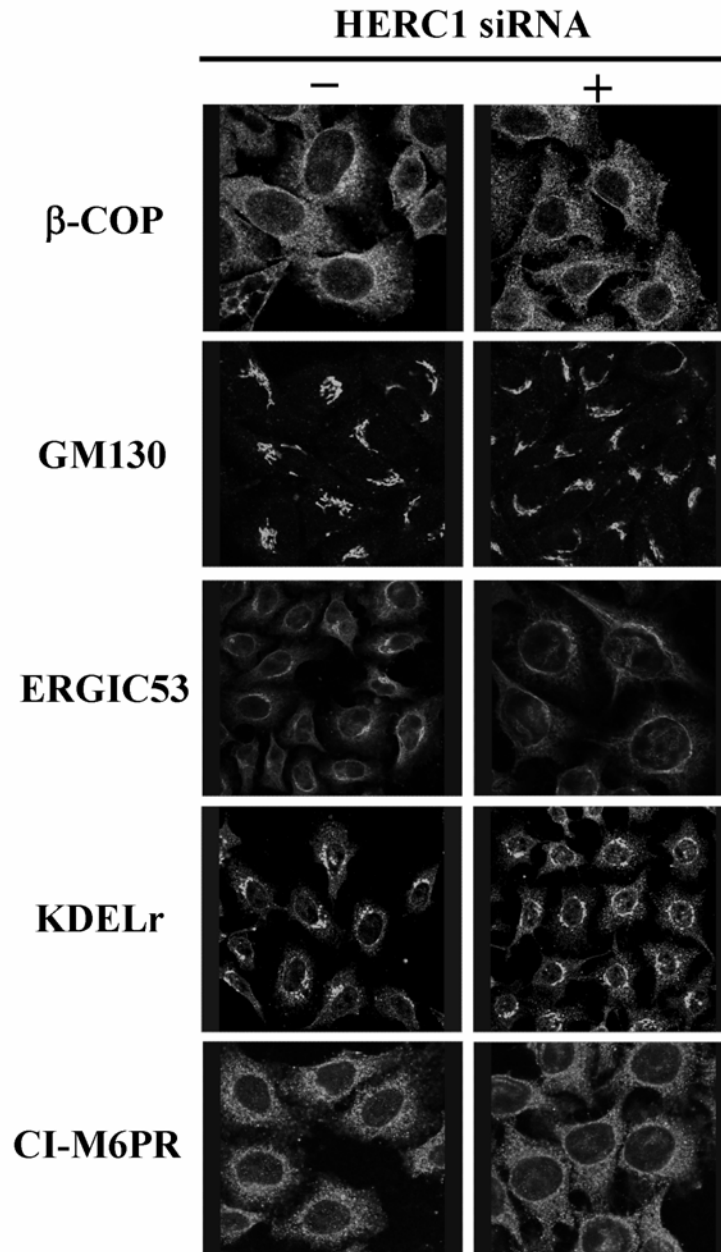


Figura 43. El RNAi de HERC1 no afecta la localización de proteínas involucradas en la vía secretora. La distribución subcelular de varias proteínas implicadas en el transporte del ER al Golgi (β -COP, ERGIC53, KDELr), el transporte intragolgi (β -COP, GM130) o el tráfico desde la red trans-Golgi a los lisosomas (CI-M6PR) no se ve significativamente afectada por la disminución de los niveles de HERC1 ocasionada por la transfección de células HeLa con un siRNA de HERC1. Las células control o transfectadas con HERC1 siRNA fueron fijadas y las proteínas indicadas detectadas por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos.

ninguna de estas proteínas presenta cambios significativos en su marcaje cuando las

células HeLa son transfectadas con HERC1-siRNA, indicando que la proteína HERC1 no es necesaria para determinar la localización de estas proteínas dentro de las células.

Una segunda aproximación para determinar si la vía secretora funciona normalmente en las células HeLa transfectadas con HERC1-siRNA consistió en comprobar si el EGFR y VSV-G, dos proteínas de membrana que son sintetizadas en el ER y son transportadas

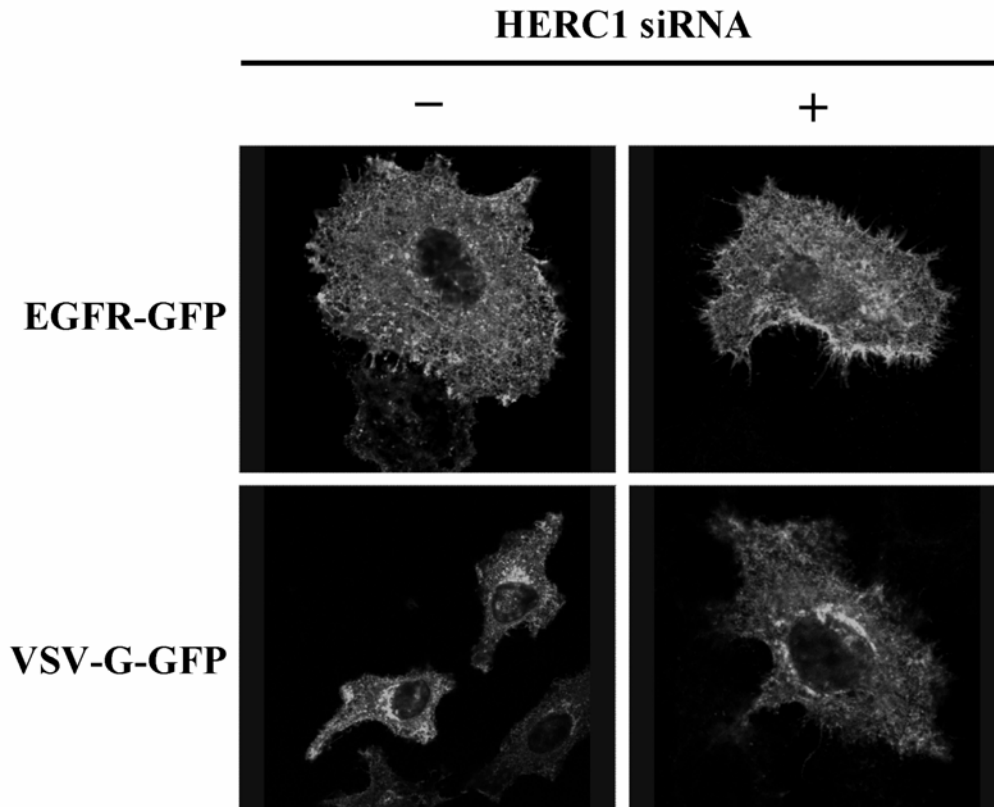


Figura 44. El RNAi de HERC1 no afecta al transporte de EGFR-GFP y VSV-G-GFP a la membrana plasmática. Células HeLa transfectadas o no con HERC1-siRNA fueron transfectadas nuevamente, al cabo de 24 horas, con EGFR-GFP o VSV-G-GFP, dos proteínas que son transportadas al plasmalema previo paso por el ER y el Golgi. Después de 72 horas desde la transfección de HERC1-siRNA, las células fueron fijadas y montadas en portaobjetos para su análisis en el microscopio confocal. Como se puede observar, la distribución de ambas proteínas permanece inalterada en las células transfectadas con HERC1-siRNA, lo cual parece indicar que HERC1 no es requerida para su transporte desde el ER hacia la membrana.

desde éste, vía Golgi, hacia la membrana plasmática, llegan a su destino final o son, por el contrario, retenidas en el ER o el Golgi cuando HERC1 está ausente. Para lograr este objetivo, se efectuó una doble transfección, de modo que las células HeLa fueron primero transfectadas con HERC1-siRNA y el día siguiente retransfectadas con EGFR-GFP o, en otro experimento independiente, con VSV-G-GFP. Como se aprecia en la Figura 44, ambas proteínas presentan exactamente el mismo patrón de marcaje en

presencia y en ausencia de HERC1, indicando así que ésta no es requerida para la síntesis y el transporte de aquéllas a la membrana plasmática.

Parece, pues, que a pesar de los indicios previos de que HERC1 podría hallarse en las estaciones tardías del ERGIC (sección 4.2.1.2) y quizá en algún otro compartimento de las vías de secreción de proteínas, ello no significa que HERC1 sea un componente esencial de dichas vías, pues éstas se hallan aparentemente inalteradas cuando HERC1 es eliminada de las células por RNAi.

4.4. Estudio de los efectos de mutaciones en HERC1

4.4.1. Estudio de proteínas de fusión entre GFP y múltiples formas delecionadas de HERC1

Con el objetivo de recaudar información de interés en cuanto a la función de HERC1, se elaboraron una serie de plásmidos en los que el cDNA completo de HERC1 o varios fragmentos del mismo fueron clonados, manteniendo la pauta de lectura, inmediatamente después del cDNA de la proteína fluorescente verde (GFP) de la medusa *Aequoria victoria*. Dichos plásmidos permiten expresar en células de mamífero y bajo el control del promotor CMV (citomegalovirus) varias proteínas de fusión entre GFP y HERC1, tal y como se muestra en la Figura 45. Para comprobar la expresión de estas proteínas de fusión, los plásmidos fueron transfectados en células HEK-293 y los lisados de éstas analizados por Western blot con anticuerpos anti-GFP. Dichos anticuerpos reconocieron en todos los casos las bandas del tamaño esperado, indicando que los plásmidos efectivamente codifican por las proteínas de fusión predichas (Figura 46 y datos no mostrados). Un dato interesante derivado de este último experimento es el hecho de que las dos proteínas de fusión de mayor tamaño, es decir GFP-HERC1(aa 1-4745) y GFP-HERC1(aa 1-4861, *full-length*), codificadas por los plásmidos pFG43 y

pJLR155, respectivamente, parecen ser objeto de proteólisis dentro de las células. Prueba de ello es el hecho de que los anticuerpos anti-GFP detectan solamente cantidades ínfimas de las mencionadas proteínas de fusión (menores de lo esperado incluso teniendo en cuenta el enorme tamaño de éstas), a la vez que detectan cantidades

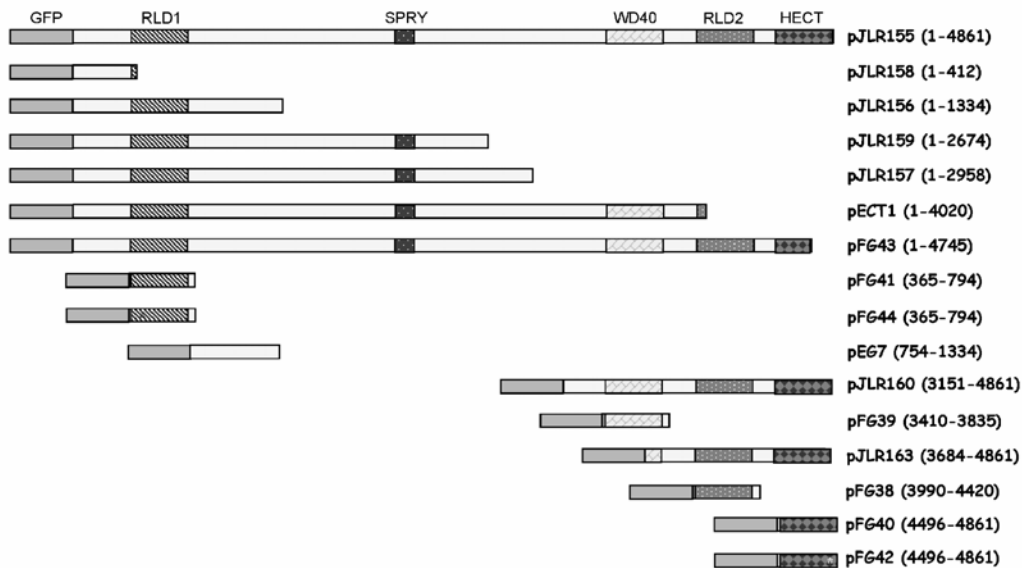


Figura 45. Proteínas de fusión entre GFP y distintos fragmentos de HERC1. Para estudiar la función de HERC1 se elaboraron una serie de plásmidos que expresan proteínas de fusión entre GFP (en el N-terminal) y HERC1 (pJLR155) o entre GFP y varios fragmentos de HERC1, como se muestra en la imagen (pFG42 contiene además la mutación Cys481Ala que impide que el HECT pueda ubiquitinarse mientras que pFG44 contiene la mutación tbl (ver Figura 53)).

relativamente elevadas de GFP sola (Figura 46 y datos no mostrados). Concomitantemente, los anticuerpos anti-HERC1 revelan en ambos casos que la proteína HERC1, o su fragmento HERC1(aa 1-4745), se hallan normalmente sobreexpresados (datos no mostrados y Figura 46), lo cual probablemente significa que estamos frente a un caso de proteólisis limitada, en virtud de la cual las proteínas son cortadas únicamente por el punto de fusión entre GFP y HERC1. Por lo que concierne al agente inductor de dicha proteólisis, parece que se podría tratar de una mera cuestión de tamaño de las proteínas de fusión (550-560 kDa), ya que ninguna de las otras fusiones generadas sufre el mismo destino. Alternativamente, los datos expuestos son compatibles con un modelo según el cual la ruptura sólo se produciría cuando en la

proteína HERC1 se hallaran presentes simultáneamente dos secuencias aminoacídicas, situadas una en la región N-terminal y la otra en la C-terminal. Más concretamente, la primera secuencia debería estar presente en los residuos 1-3150 (ya que la proteína GFP-HERC1(aa 3151-4861) no se proteoliza) y la segunda en los residuos 4020-4745

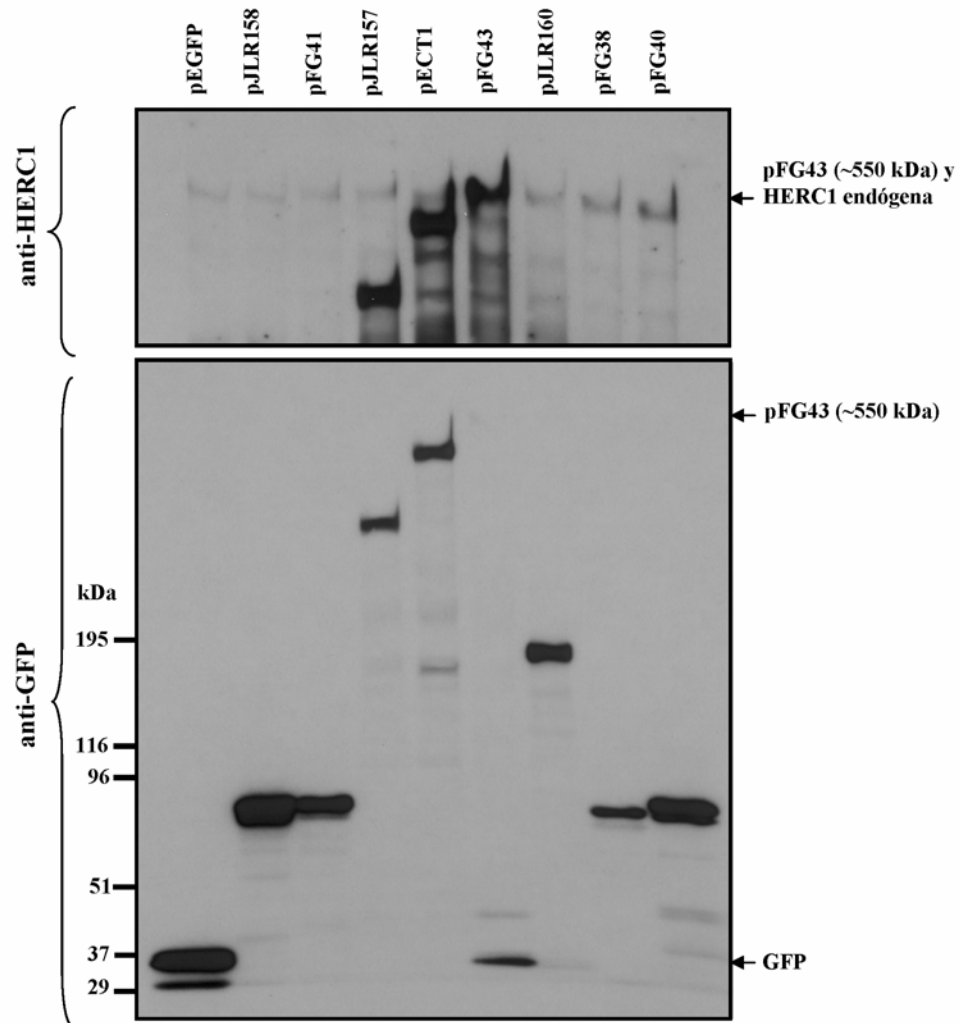


Figura 46. Análisis de las proteínas de fusión entre GFP y HERC1 por Western blot. Células HEK-293 fueron transfectadas con los plásmidos que se indican arriba (ver Figura 45) y, tras 72 horas de expresión, lisadas y los extractos celulares analizados por Western blot con anticuerpos anti-HERC1 y anti-GFP. Todos los plásmidos dan lugar a la expresión de proteínas del tamaño esperado que son reconocidas por los anticuerpos anti-GFP (panel inferior). En el caso de pFG43 (y de pJLR155, datos no mostrados), los niveles de expresión de la proteína de fusión son relativamente bajos porque la proteína sufre proteólisis por la juntura entre la GFP y HERC1 (ver la banda de GFP en el carril de pFG43). Sin embargo, el Western blot anti-HERC1 que se muestra en el panel superior demuestra que pFG43 se expresa y sus niveles son bastante superiores a los de la proteína HERC1 endógena (el panel superior se corresponde con la zona superior del panel inferior).

(ya que GFP-HERC1(aa 1-4020) no se corta pero GFP-HERC1(aa 1-4745) sí lo hace).

Una forma de distinguir entre las dos hipótesis propuestas para explicar la proteólisis de GFP-HERC1 consistiría en comprobar si una proteína de fusión de 550 o más kilodaltons entre GFP y otra proteína distinta de HERC1 también se proteoliza del

mismo modo. Una vez la expresión de las proteínas de fusión fue comprobada por Western blot, el siguiente paso fue estudiar su localización subcelular mediante

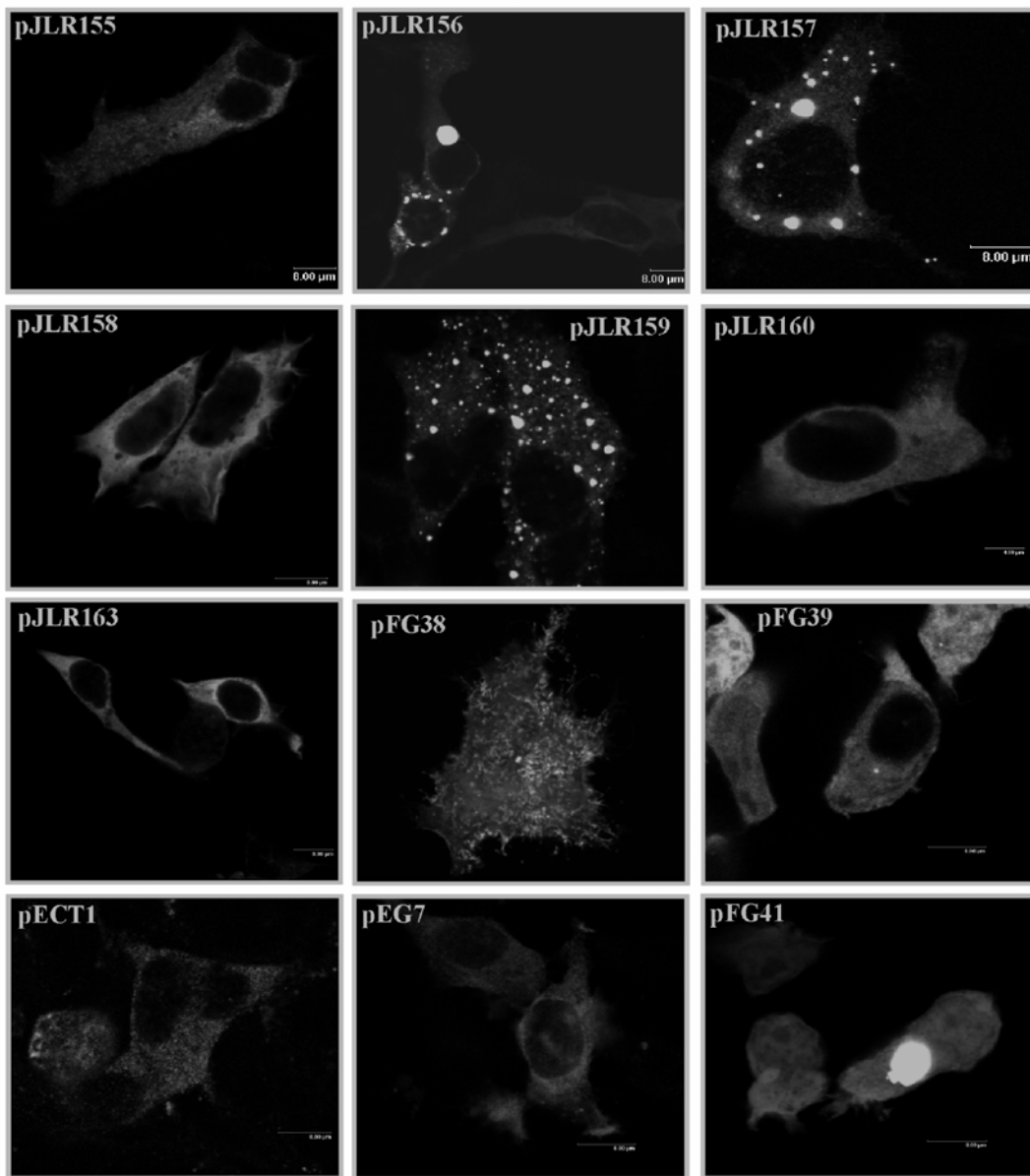


Figura 47. Análisis de las proteínas de fusión entre GFP y HERC1 por microscopía de fluorescencia. Células HEK-293 fueron transfectadas con los plásmidos que se indican (ver Figura 45) y, tras 72 horas de expresión, fueron fijadas y montadas para su observación en el microscopio confocal. Obsérvense sobretodo las acumulaciones de proteína fluorescente que se forman con algunos de los plásmidos así como los filopodios generados por transfección con pFG38.

microscopía confocal de fluorescencia. Para ello se utilizaron tanto células HEK-293 como HeLa, siendo los resultados que se detallan a continuación básicamente idénticos en ambas líneas celulares. Las distribuciones subcelulares de varias de las proteínas de fusión generadas se muestran en la Figura 47. En primer lugar, la proteína GFP-HERC1 entera (pJLR155) presenta (en las pocas células en que no se ve marcaje nuclear, el cual

es probablemente debido a la proteólisis antes discutida) un marcaje citoplásmico similar al obtenido con anticuerpos anti-HERC1. Por otra parte, la mayoría de las construcciones estudiadas también muestran un marcaje citoplásmico similar al de pJLR155, aunque algunas de ellas (básicamente GFP-RLD1 (pFG41), GFP-RLD2 (pFG38) y GFP-HECT (pFG40)) también aparecen en el interior del núcleo. En cualquier caso, dos observaciones destacan por encima de las demás en estos estudios: en primer lugar, la inducción de estructuras semejantes a filopodios en el plasmalema de las células transfectadas con pFG38 y, en segundo lugar, la formación de grandes acumulaciones de proteína en las células transfectadas con pJLR157, pJLR159, pJLR156 y pFG41. En cuanto al efecto de pFG38 (ver Figura 47), un porcentaje muy elevado de las células transfectadas con este plásmido (70-80%) inducen la formación en la membrana plasmática de estructuras que, a juzgar por su apariencia, deben ser filopodios (Pellegrin y Mellor (2005)). Si suponemos que lo son y que por tanto surgen por reorganización del citoesqueleto cortical de actina, entonces estos filopodios aparecen de novo en las células que expresan GFP-RLD2, pues tinción con faloidina-TRITC, un fluorocromo que marca específicamente la actina filamentosa de las células, muestra que no existen dichas estructuras en células no transfectadas o transfectadas con otras construcciones de HERC1 (datos no mostrados). Por consiguiente, parece que el dominio RLD2 de HERC1 induce la formación de filopodios en células HeLa y HEK-293 y él mismo se encuentra asociado a éstos. Futuros análisis serán requeridos para comprobar si GFP-RLD2 colocaliza con F-actina en los supuestos filopodios y si GFP-RLD2 es asimismo capaz de activar a la GTPasa Cdc42, un regulador clave de la génesis de filopodios (Pellegrin y Mellor (2005)). Más a fondo se han estudiado las estructuras en las que se acumulan grandes cantidades de las proteínas codificadas por los plásmidos pJLR157, pJLR159, pJLR156 y pFG41. Como se muestra en la Figura

48, el común denominador de estas cuatro proteínas es, además de la GFP la cual no induce acumulaciones per se, la presencia en las mismas del dominio RLD1 de HERC1. Sin embargo, a pesar de que el RLD1 (aa 365-794) parece efectivamente el principal causante de la aparición de acumulaciones (ver Figura 47), la formación eficiente de las mismas parece requerir de la presencia de secuencias aminoacídicas situadas

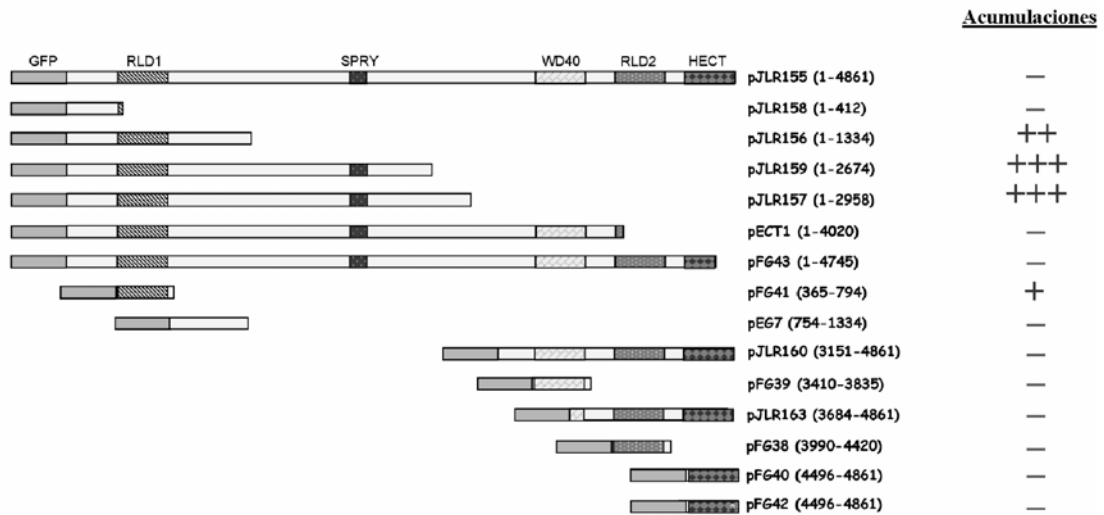


Figura 48. Mapeo de la secuencia de HERC1 que da lugar a la formación de acumulaciones. El dominio RLD1 por si solo (aa 365-794) ya da lugar a la aparición de acumulaciones, aunque estas aparecen con una frecuencia relativamente baja (2-5% de las células transfectadas con pFG41). Dicha frecuencia aumenta, sin embargo, cuando la proteína expresada posee secuencias situadas después del RLD1 en la secuencia de HERC1. Así, un 20-30% de las células transfectadas con pJLR156 (aa 1-1334) y virtualmente un 100% de las células transfectadas con pJLR159 (aa 1-2674) o pJLR157 (aa 1-2958) presentan acumulaciones. Curiosamente, las células transfectadas con pFG41 y pJLR156 suelen contener una o pocas acumulaciones de gran tamaño (~5 μm de diámetro), mientras que las células transfectadas con pJLR157 y 159 poseen abundantes acumulaciones de tamaño pequeño o mediano (raramente mayores de 2 μm de diámetro) (ver Figura 47). Además, por razones desconocidas, la presencia de la región C-terminal de HERC1 elimina la formación de acumulaciones. Así, las células transfectadas con pECT1 (aa 1-4020) ya no muestran acumulaciones. Parece, pues, que las acumulaciones son inducidas por la región de HERC1 que abarca los residuos 365-2958, mientras que la presencia de los residuos 2959-4020 es suficiente para impedir su aparición.

posteriormente al RLD1 dentro de la secuencia de HERC1. Así, la práctica totalidad de las células que expresan las proteínas GFP-HERC1(aa 1-2674) (pJLR159) y GFP-HERC1(aa 1-2958) (pJLR157) presentan abundantes acumulaciones de estas proteínas, acumulaciones que por regla general no superan los 2 micrómetros de diámetro. En cambio, las células transfectadas con pJLR156 (GFP-HERC1(aa 1-1334)) presentan acumulaciones en un 20-30% de los casos y estas acumulaciones suelen ser menos abundantes y de mayor tamaño (a menudo llegan a los 4-5 micrómetros de diámetro) que las observadas con pJLR157 y pJLR159. Por último, la expresión de GFP-RLD1

(pFG41) da lugar a acumulaciones sólo ocasionalmente (2-5% de las células) y éstas suelen ser de gran tamaño (~ 4-5 μm de diámetro). Parece, pues, que los residuos 795-2674 de HERC1 potencian la capacidad del RLD1 (aa 365-794) de inducir la aparición de acumulaciones y además hacen que las acumulaciones generadas sean de menor tamaño. Si bien el porqué de estas observaciones todavía nos elude, lo que sí parece claro es que la presencia de ciertos residuos de la región C-terminal de HERC1 tiene un efecto inhibitor de la formación de dichas estructuras. En efecto, mientras que pJLR157, como se ha comentado, da lugar a acumulaciones, la construcción pECT1 (GFP-HERC1(aa 1-4020)) no lo hace, indicando pues que entre los residuos 2959 y 4020 de HERC1 existe alguna secuencia que impide la aparición de las acumulaciones. En refuerzo de esta hipótesis están además los hechos de que la transfección de pFG43 y pJLR155 (ambas contienen la región susodicha) tampoco da lugar a protrusiones (Figura 47 y datos no mostrados) y que la cotransfección de pJLR157 (aa 1-2958) y pJLR160 (aa 3151-4861) da lugar a un número de acumulaciones considerablemente menor que el número observado cuando se transfecta pJLR157 solamente (datos no mostrados).

La siguiente pregunta que nos formulamos fue acerca de la naturaleza de las acumulaciones observadas. Para intentar solventar este asunto optamos por varias aproximaciones. En primer lugar, intentamos visualizar estas estructuras por microscopía electrónica de transmisión en células HEK-293 transfectadas con pJLR157 o con pEGFP como control negativo. Para ello se efectuaron criocortes ultrafinos de las células sobre los cuales se realizó inmunomarcaje con anticuerpos monoclonales anti-GFP seguidos de un anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal de 10 nanómetros de diámetro. Sin embargo, la observación microscópica de estos cortes no nos permitió identificar ninguna estructura que los anticuerpos anti-GFP reconocieran en las células

transfectadas con pJLR157 y no en las transfectadas con pEGFP (datos no mostrados). El uso de la microscopía electrónica sin inmunomarcaje, lo cual permite lograr un mayor contraste en la imagen, tampoco dio lugar a resultados satisfactorios (datos no

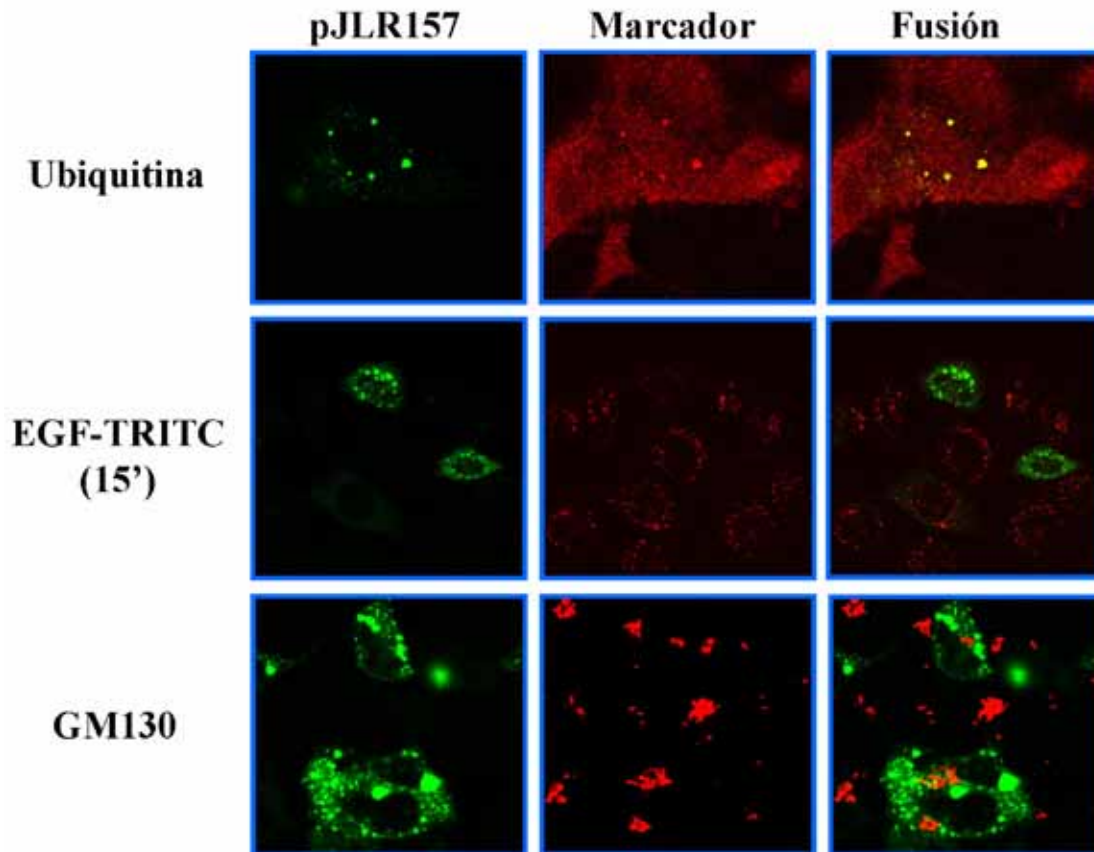


Figura 49. Las acumulaciones de HERC1 contienen ubiquitina. El anticuerpo monoclonal anti-ubiquitina (FK2), que reconoce tanto mono- como poliubiquitina, marca claramente las estructuras en las que se acumula GFP-HERC1 (aa 1-2958), es decir, la proteína codificada por el plásmido pJLR157. En cambio, dichas acumulaciones no son marcadas por EGF-TRITC (40 ng/ml) tras 15 minutos de internalización ni tampoco colocalizan con el marcador del aparato de Golgi GM130. Nótese que las células transfectadas con pJLR157 internalizan menos EGF-TRITC que sus células vecinas sin transfectar. Las células tratadas con EGF-TRITC son HeLa mientras que el resto son HEK-293.

mostrados). Una manera de superar estos problemas sería el uso de técnicas de correlación entre microscopía confocal de fluorescencia y microscopía electrónica, pero estos experimentos todavía no han sido realizados. Una segunda aproximación consistió en llevar a cabo experimentos de colocalización entre las acumulaciones y otras proteínas celulares. Así, como se muestra en la Figura 49, mientras que las acumulaciones no parecen ser estructuras endosomales (no colocalizan con EGF-TRITC tras 15 minutos de internalización) ni tampoco tener nada que ver con el aparato de

Golgi (no colocalizan con GM130), cuya estructura se halla además inalterada por la transfección de pJLR157 (Figura 49), sí en cambio resulta evidente que las acumulaciones se hallan enriquecidas en ubiquitina, puesto que son fuertemente marcadas por el anticuerpo monoclonal FK2, el cual reconoce tanto ubiquitina libre como mono- o poliubiquitina conjugada a proteínas. Las acumulaciones contienen, por lo tanto, ubiquitina, pero todavía quedaba por definir qué son exactamente a nivel estructural. En particular, nos preguntamos si las acumulaciones eran orgánulos con una bicapa lipídica delimitante o si, por el contrario, se trataba de agregados proteicos fruto de la inestabilidad de ciertos fragmentos de HERC1. En este sentido, el hecho de que en el microscopio confocal dichas acumulaciones, especialmente las de mayor tamaño, no aparezcan vacías en su interior (tal y como ocurre, por ejemplo, con los endosomas gigantes de similar tamaño generados por el mutante constitutivamente activo de Rab5, Rab5-Q79L (datos no mostrados y Pollard y Earnshaw (2002))) parece indicar que, o bien las acumulaciones de HERC1 son agregados de proteínas ubiquitinadas, o bien son compartimentos membranosos en cuyo interior, y no solamente asociadas a la membrana circundante, se encuentran las proteínas que dan lugar a las acumulaciones. Para tratar de arrojar más luz a esta cuestión, nos propusimos determinar la densidad de estas estructuras mediante centrifugación de las mismas en un gradiente discontinuo de sacarosa. En principio, si las acumulaciones fuesen estructuras con su propia membrana, la presencia de lípidos debería reflejarse en una menor densidad de las acumulaciones en comparación con la que tendrían si estuviesen compuestas exclusivamente por proteínas. Así, como se indica en la Figura 50, los componentes de los pellets obtenidos tras centrifugar a 150,000g lisados de células HEK-293 transfectadas con pJLR157 fueron separados en un gradiente de flotación discontinuo de sacarosa (desde el 8% de sacarosa en la parte superior del tubo hasta el 50% en el fondo). El análisis subsiguiente

por Western blot de las fracciones correspondientes a las distintas densidades reveló que la gran mayoría de la proteína GFP-HERC1(aa 1-2958) (pJLR157) se encuentra asociada a las fracciones de alta densidad (50% de sacarosa), mientras que la proteína endosomal Rab5 se halla solamente en fracciones de menor densidad (20-45% de sacarosa). Estos resultados sugieren, pues, que las acumulaciones son estructuras más

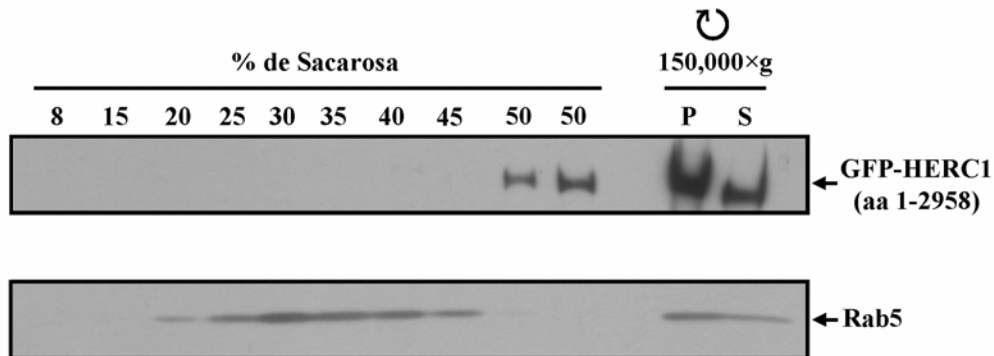


Figura 50. Las acumulaciones de HERC1 son probablemente agregados proteicos. Con el fin de tratar de distinguir si las estructuras en las que se acumula GFP-HERC1(aa 1-2958) (pJLR157) son agregados de proteína o, por el contrario, se trata de algún orgánulo delimitado por una bicapa lipídica, llevamos a cabo experimentos de centrifugación en gradiente de sacarosa. Extractos de células HEK-293 transfectadas durante 72 horas con pJLR157 fueron centrifugados a 150,000×g, tras lo cual los componentes del pellet fueron separados en un gradiente de flotación discontinuo de sacarosa (los porcentajes de las distintas capas de sacarosa se indican en la figura) por centrifugación durante 3 horas a 167,000×g. Seguidamente, las distintas fracciones fueron recolectadas y cargadas en un gel de SDS-PAGE para su posterior análisis por Western blot con anticuerpos anti-GFP y anti-Rab5. Obsérvese como Rab5, un marcador de endosomas, se halla sólo en las fracciones de baja densidad (20-45% de sacarosa), mientras que GFP-HERC1(aa 1-2958) se encuentra sólo en las fracciones más densas, indicando probablemente que las acumulaciones son agregados proteicos y no estructuras delimitadas por membrana como los endosomas (P: pellet; S: sobrenadante).

densas que los endosomas y, por lo tanto, que probablemente se trata del resultado de la precipitación intracelular de las proteínas en cuestión. Ello, además, encajaría con observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio que indican que el dominio RLD1 de HERC1 es bastante insoluble cuando se lo expresa en *Escherichia coli* (datos no mostrados). No obstante, aunque parece poco probable (más aún dado que las acumulaciones de pJLR157, al ser pequeñas, poseen una ratio superficie/volumen relativamente alta), no puede descartarse que las acumulaciones sean estructuras membranosas con una gran cantidad de proteínas en su interior.

Otro aspecto interesante derivado de nuestros estudios con las distintas formas delecionadas de GFP-HERC1 y que puede apreciarse ya en la Figura 49 es que algunas

de ellas inhiben la entrada a las células de EGF-TRITC (y también de transferrina conjugada al fluoróforo Alexa Fluor 546 (datos no mostrados)). El efecto inhibitor más claro es sin duda el observado con pFG41, es decir, con GFP-RLD1 (Figura 51).

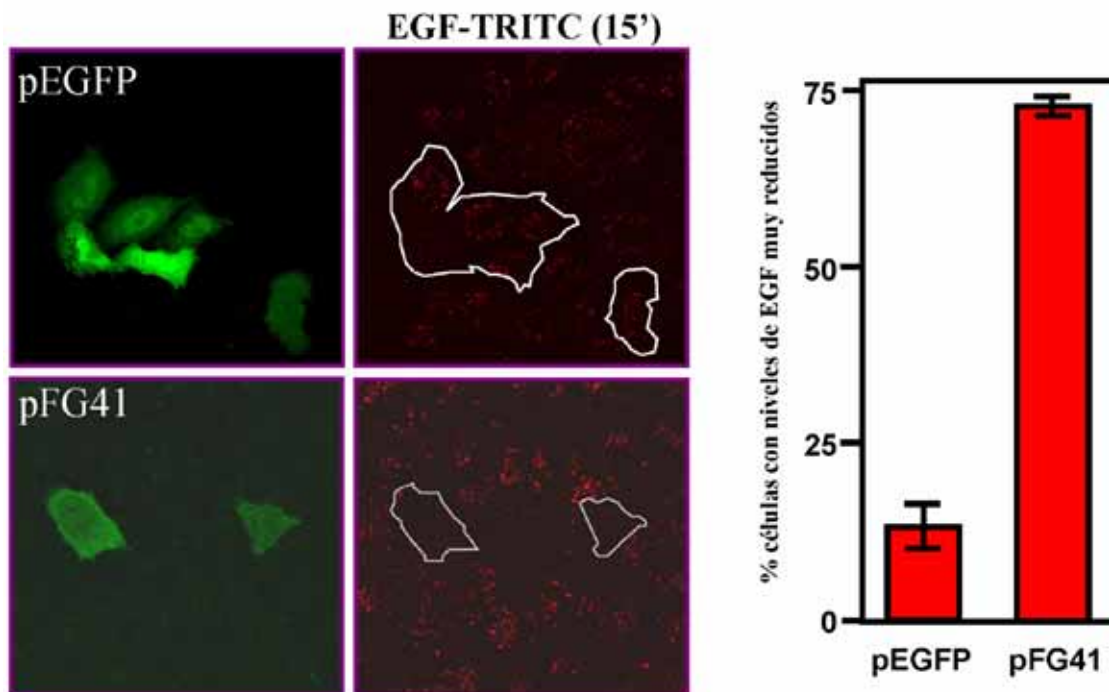


Figura 51. La endocitosis de EGF-TRITC en células HeLa es inhibida por la expresión del dominio RLD1 de HERC1. Las células HeLa transfectadas con pFG41 (GFP-RLD1) internalizan mucho menos EGF-TRITC que las células HeLa no transfectadas o las transfectadas con pEGFP (GFP). Este efecto no sólo es observable con pFG41 sino también con otras construcciones de HERC1 (ver Figuras 49 y 52). A la derecha se muestra la cuantificación de los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia (se muestran las medias y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes).

Efectivamente, mientras que menos de un 15% de las células transfectadas con pEGFP presentan niveles claramente disminuidos de EGF-TRITC con respecto a sus vecinas no transfectadas, más de un 70% de las células que expresan GFP-RLD1 muestran tal disminución (dado que las células HEK-293 expresan niveles bajos de EGFR (Jones et al. (2002) y datos no mostrados), todos los experimentos de internalización de EGF-TRITC que se presentan se hicieron en células HeLa). Sin embargo, el dominio RLD1 de HERC1 no es el único que impide la entrada a las células de EGF-TRITC. De hecho, tal efecto es observado con varios fragmentos de HERC1, no todos los cuales poseen el dominio RLD1 en su interior. Concretamente, de todos los plásmidos analizados de HERC1, sólo dos carecen de esta actividad, siendo los demás activos en mayor o menor

grado. Así, como se explica en la Figura 52, todos los plásmidos que codifican por

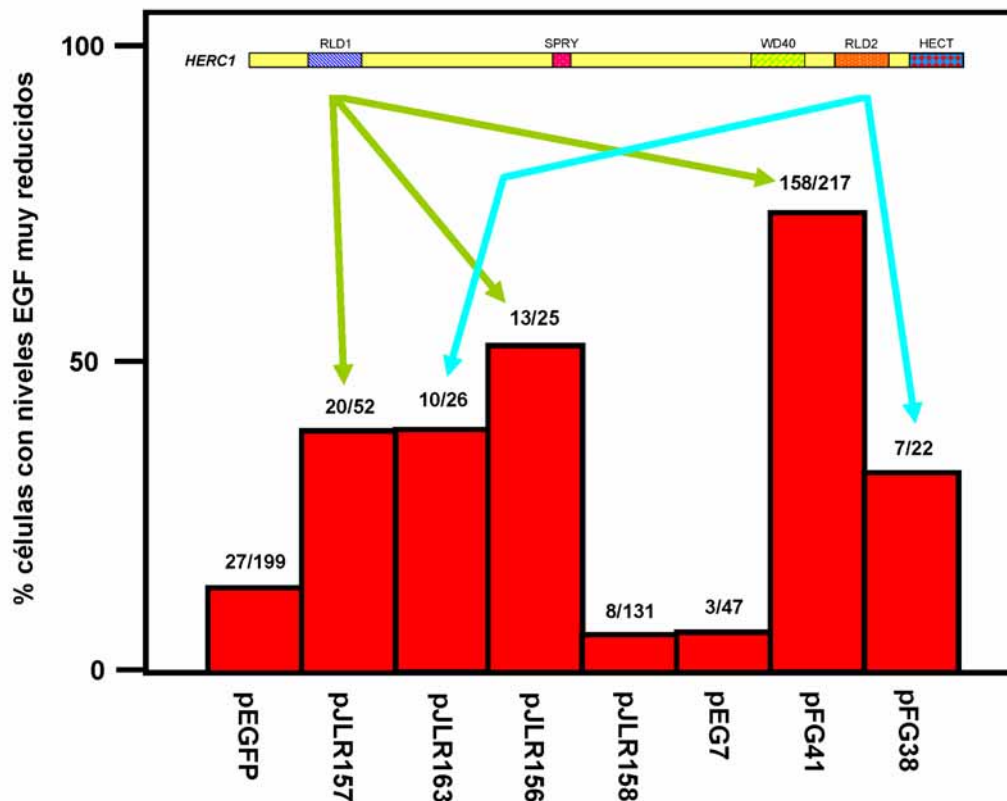


Figura 52. Los dominios RLD1 y RLD2 de HERC1 bloquean la internalización de EGF-TRITC en células HeLa. Como en la Figura 51, células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos que se indican para ser posteriormente tratadas con EGF-TRITC durante 15 minutos, fijadas y analizadas por microscopía de fluorescencia. Se muestra para cada plásmido el porcentaje de células transfectadas dentro de las cuales los niveles de EGF-TRITC eran claramente menores que los niveles en las células no transfectadas circundantes. Todas las construcciones testadas que codifican el dominio RLD1 (flechas verdes) o el dominio RLD2 (flechas azules) de HERC1 causan una inhibición de la entrada de EGF-TRITC en comparación con la observada con pEGFP (encima de cada columna se muestra para cada plásmido: (número de células transfectadas con claramente menos EGF-TRITC en su interior) / (número de células transfectadas contabilizadas)).

proteínas que contienen el dominio RLD1 o el dominio RLD2 de HERC1 bloquean la entrada de EGF-TRITC a las células, mientras que las construcciones que no poseen ninguno de ambos dominios no tienen ningún efecto apreciable sobre la internalización. Los motivos subyacentes a estos efectos inhibidores todavía no han sido clarificados. En el caso del RLD1, estudios inmunocitoquímicos parecen indicar que la inhibición de la endocitosis no es debida a una menor cantidad de EGFR en la superficie de las células (datos no mostrados), por lo cual parece razonable que el defecto se halle en algún componente de la maquinaria endocítica, más que en el propio receptor. A este respecto, es atractivo especular con la posibilidad de que la inhibición sea causada en el caso del

RLD1 por su afinidad con ciertos fosfoinosítidos, tales como PI(3)P, y en el caso del RLD2 por su afinidad con clatrina. No obstante, tales hipótesis deben todavía ser contrastadas. Por último, resulta en cierto modo sorprendente que los efectos aquí presentados sobre la internalización de EGF no tengan lugar cuando los niveles de la proteína HERC1 endógena son reducidos por RNAi (ver Figuras 41 y 42). Ello podría ser debido a que la expresión de altos niveles de GFP-RLD1 o GFP-RLD2 tiene efectos dominantes negativos, por ejemplo secuestrando alguna proteína o lípido esencial para la endocitosis, mientras que la proteína HERC1 endógena no tendría un papel crucial en el proceso, tal como parecen indicar varios de los resultados de esta tesis. Esto último, a su vez, podría también ser explicado por la presencia de alguna otra proteína, quizá HERC2, que sea capaz de suplir a HERC1 cuando ésta no se halla presente.

En suma, el estudio de las distintas proteínas de fusión entre GFP y HERC1 ha aportado hasta el momento muchos datos interesantes relativos a la estabilidad, agregabilidad y a potenciales efectos sobre el citoesqueleto de actina y sobre la endocitosis que, si bien todavía no han sido caracterizados en gran detalle, pueden en el futuro ser importantes para elucidar la función o funciones de la proteína HERC1.

4.4.2. Estudio de la mutación tambaleante (tbl)

La mutación tambaleante del ratón fue identificada por primera vez hace más de veinte años en el centro de crianza de Orléans-La Source (Wassef et al. (1987)). Dicha mutación, a la que se denominará en adelante tbl, apareció de forma espontánea en la cepa DW/J-Pas del ratón de laboratorio, *Mus musculus* (Wassef et al. (1987)). Se trata de una mutación recesiva (siendo por tanto los ratones heterocigotos (+/tbl) fenotípicamente indistinguibles de los homocigotos salvajes (+/+)) que da lugar a la aparición de problemas de coordinación motora que se acentúan a medida que los

ratones envejecen. Estas carencias hacen que los ratones pierdan a menudo el equilibrio mientras andan, razón por la cual fueron denominados “tambaleantes”. Posteriormente,

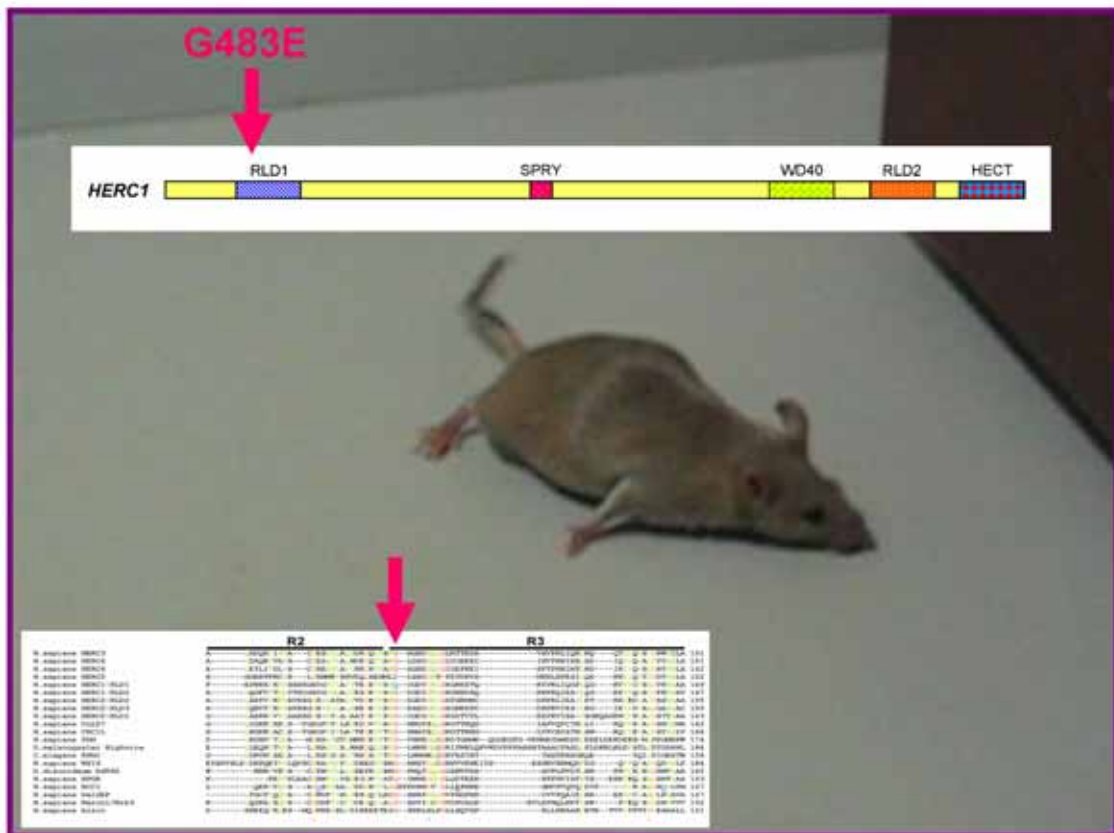


Figura 53. Los ratones tambaleante (tbl). La mutación tambaleante fue descubierta hace más de veinte años tras aparecer espontáneamente en la cepa DW/J-Pas del ratón de laboratorio *Mus musculus* (Wassef et al. (1987)). Su nombre se debe a las carencias en la coordinación de la locomoción manifestadas por estos animales, que los hacen caminar de modo semejante a como lo hacen los humanos bajo los efectos tóxicos del etanol. De hecho, dicha similitud no es coincidente, pues la característica más notoria de estos ratones a nivel histopatológico es la degeneración progresiva de sus células de Purkinje en el cerebelo (Wassef et al. (1987) y Rossi et al. (1995)). Recientemente, la mutación subyacente a este fenotipo ha sido identificada como una mutación en el gen *HERC1* murino (J. L. Guénet, comunicación personal). Más concretamente, se trata de la mutación G1448A en el exón 5 de este gen, la cual provoca en la proteína la sustitución de la glicina-483, un residuo altamente conservado dentro del dominio RLD1 de *HERC1*, por un ácido glutámico (G483E). En la imagen se muestra uno de estos ratones inmediatamente después de haber caído como consecuencia de su mala coordinación motriz.

análisis histopatológicos de estos ratones permitieron establecer la causa de la disfunción motriz en una degeneración progresiva de las neuronas de Purkinje de la corteza cerebelosa (Wassef et al. (1987) y Rossi et al. (1995)), aunque no está claro aún el motivo por el cual dichas células acaban muriéndose. En cualquier caso, investigaciones recientes llevadas a cabo en el laboratorio del Dr. Jean Louis Guénet en el Instituto Pasteur de Paris permitieron identificar el gen mutado en estos ratones, resultando no ser otro que el ortólogo murino del gen *HERC1* humano (J.L. Guénet,

comunicación personal). Más concretamente, los ratones *tbl* poseen una mutación

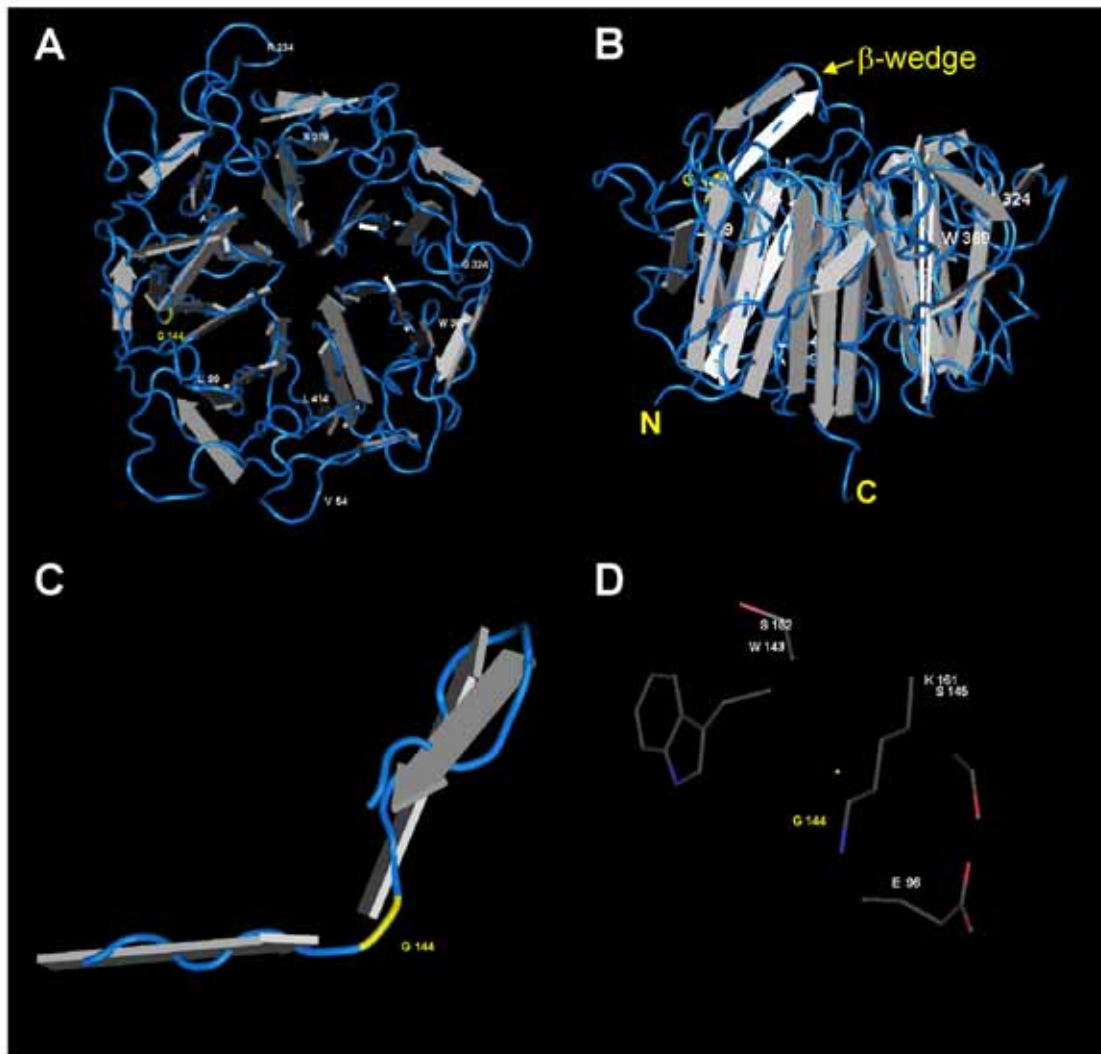


Figura 54. Ubicación y posible papel de la glicina-144 de RCC1, el residuo equivalente a la glicina-483 de HERC1 cuya mutación a ácido glutámico da lugar al fenotipo tambaleante (*tbl*) en *Mus musculus*. (A) Vista de RCC1 que permite, como ya se ha visto en la Figura 1, apreciar la simetría heptagonal del propulsor- β (B) Vista lateral de RCC1 en la que se observa la cuña- β (β -wedge) esencial para la actividad GEF de RCC1 sobre Ran, como ya se ha contado en la Figura 1. La glicina-144 de RCC1 está situada justo en la base de dicha cuña y ha sido marcada en amarillo en todas las figuras. (C) La glicina-144 es probablemente importante para generar la curvatura necesaria para que la cuña- β pueda penetrar lo suficiente en el lugar de unión a nucleótido de Ran. (D) Cadenas laterales de los residuos situados a menos de 3.5Å de la glicina-144, la cual es representada por un punto amarillo en el centro de la figura. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que solamente el triptófano-143 y la glicina-144 están conservados en HERC1, mientras que la serina-145 es en HERC1 un aspártico, la lisina-161 una glutamina y la serina-162 y el glutámico-96 son en HERC1 sendas tirosinas.

puntual en el exón número 5 del gen HERC1 murino que convierte la guanina-1448 (la numeración corresponde al cDNA murino) en una adenina (G1448A), lo cual supone en términos de la proteína HERC1 que el residuo glicina-483 es en los ratones *tbl* un ácido glutámico (G483E). La glicina-483 de la proteína HERC1 (tanto de la murina como de la humana) se encuentra en el inicio de la tercera repetición de las siete que posee el

dominio RLD1 y se encuentra extraordinariamente conservada en prácticamente todos los dominios RLD conocidos (Figura 53), indicando que se trata probablemente de un residuo muy importante para la estructura y/o función de este dominio. En el caso de

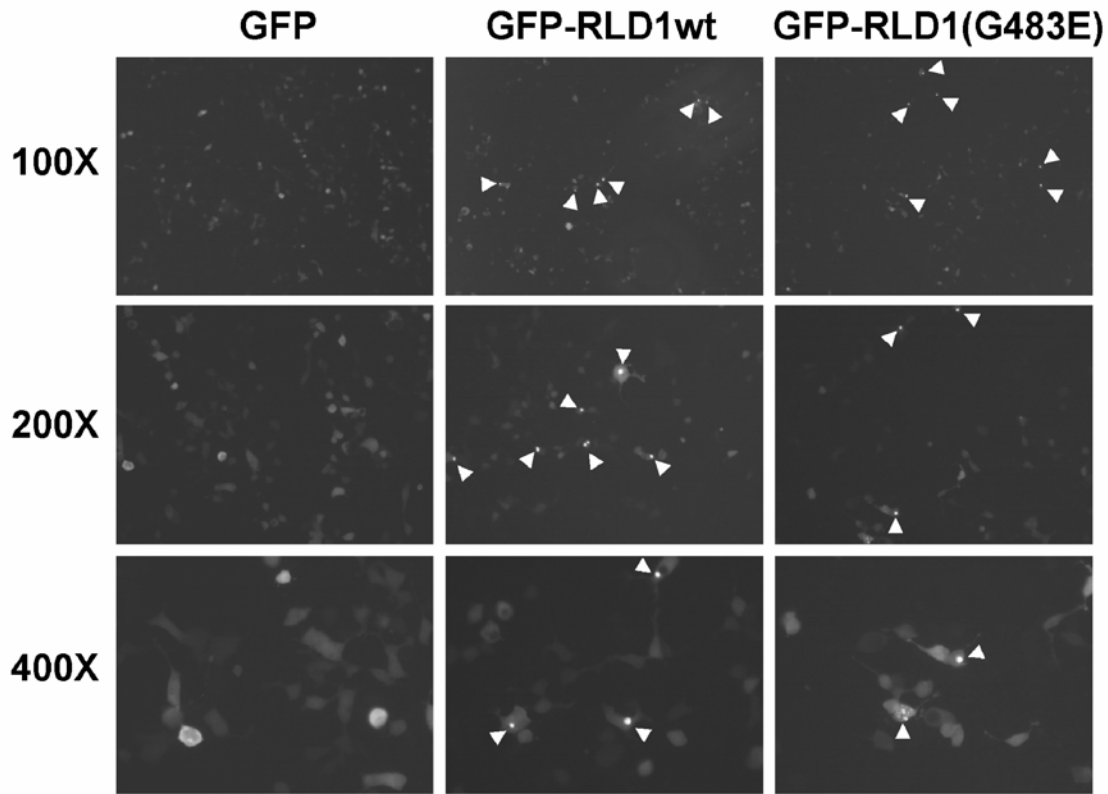


Figura 55. Efecto de la mutación *tbl* en la localización subcelular del RLD1 de HERC1. Células HEK-293 fueron transfectadas con pEGFP (GFP), pFG41 (GFP-RLD1wt) o pFG44 (GFP-RLD1-G483E) y, tras 72 horas de expresión, visualizadas por microscopía de fluorescencia. Se muestran tres aumentos distintos por condición (100, 200 y 400X). Véase como la mutación *tbl* (G483E) no altera ni la localización subcelular ni la formación de acumulaciones (flechas blancas) por parte del RLD1 de HERC1.

RCC1, cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (Renault et al. (1998)), la glicina equivalente a la glicina-483 de HERC1, es decir la glicina-144 de RCC1, se encuentra en la base de la cuña- β (*β -wedge*) que tan importante papel desempeña en la catálisis por parte de RCC1 del intercambio de nucleótidos sobre Ran (Figura 54, ver también la Figura 1). En el caso de HERC1, sin embargo, no está claro qué relevancia podría tener la glicina-483. Por este motivo, nos propusimos estudiar a nivel bioquímico y celular los efectos que la mutación G483E tiene sobre el dominio RLD1 de HERC1. Para ello se utilizaron técnicas de mutagénesis dirigida para, a partir de pFG41, generar un plásmido

(pFG44, ver Figura 45) que codifica por GFP-RLD1-tbl (es decir, una proteína de fusión entre GFP y el RLD1 humano con la mutación tbl). Una vez obtenido y secuenciado este plásmido y comprobado que la proteína codificada se expresa y tiene el tamaño esperado (datos no mostrados), empezamos a estudiar si las propiedades de

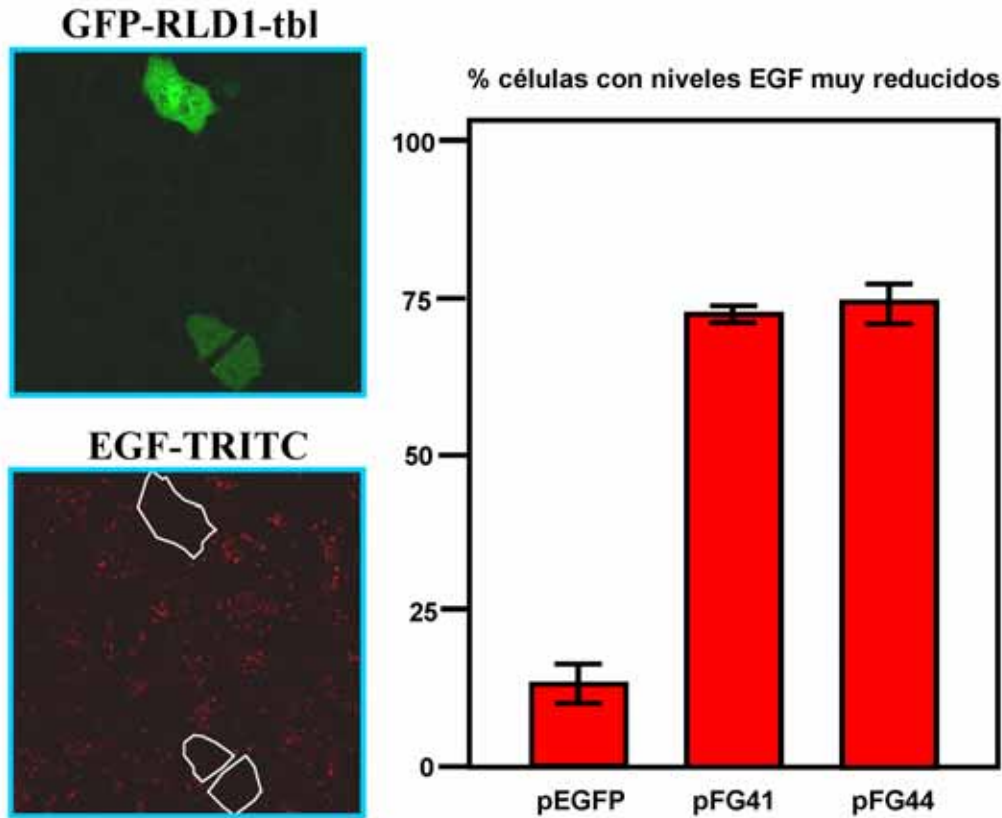


Figura 56. Efecto de la mutación tbl sobre la internalización de EGF-TRITC. Puede observarse como la mutación tbl (pFG44) no altera en absoluto el efecto inhibitor de la endocitosis de EGF-TRITC previamente observado con pFG41 (GFP-RLD1-wt). Los experimentos se realizaron como ya se ha descrito en las Figuras 51 y 52.

GFP-RLD1-tbl coinciden con las previamente descritas para GFP-RLD1. Así, en primer lugar se analizó la localización subcelular de GFP-RLD1-tbl en células HEK-293. Como se muestra en la Figura 55, dicha localización es virtualmente indistinguible de la obtenida con GFP-RLD1wt. No sólo eso, sino que GFP-RLD1-tbl también conserva intacta la capacidad de GFP-RLD1wt, descrita en la sección previa, de formar acumulaciones (Figura 55). Por otro lado, dado que habíamos observado con anterioridad que GFP-RLD1wt inhibe la internalización de EGF en células HeLa (Figura 51), también efectuamos este tipo de experimentos con el mutante tbl. Como se

puede apreciar en la Figura 56, también GFP-RLD1-tbl ejerce un efecto inhibitor sobre la endocitosis de EGF-TRITC, efecto que es además cuantitativamente idéntico al del RLD1 salvaje. Existen aún algunas otras propiedades del RLD1 de HERC1 que podrían hallarse modificadas en el mutante tbl, tales como su unión a fosfoinosítidos y su actividad disociadora de nucleótidos de guanina sobre proteínas ARF y Rab. Sin embargo, estos experimentos, que requieren de la previa expresión y purificación del mutante en bacterias, todavía no han sido realizados.

Por último, nuestro laboratorio se ha propuesto recientemente el estudio a fondo de los ratones tambaleante, para lo cual precisaba antes que nada de un método eficaz y sencillo para determinar el genotipo de los ratones obtenidos de los cruces entre ratones heterocigotos o entre heterocigotos y homocigotos recesivos. Para solucionar este asunto, se diseñó un método de genotipaje basado en la ejecución de dos reacciones de PCR por cada muestra de DNA genómico (aislado previamente de las colas de los ratones). En concreto, el par de oligonucleótidos (oligos) usados en la primera de las PCRs (PCR-1) amplifica un fragmento de DNA de 193 bp solamente a partir de los alelos salvajes de HERC1 (por tanto sólo aparecerá la banda correspondiente en el gel de agarosa cuando los genotipos de los ratones sean +/+ ó +/-). Por su parte, el par de oligos usados en la segunda PCR (PCR-2) sólo amplifican el mismo fragmento de 193 bp cuando disponen de alelos tbl como moldes (sólo habrá banda, pues, en las muestras de los ratones +/- ó tbl/tbl). Así pues, existen tres posibilidades: si aparece banda tanto en la PCR-1 como en la PCR-2, entonces el ratón es heterocigoto, si sólo hay banda en la PCR-1, el ratón es +/+ y si sólo la hay en la PCR-2, el ratón es tbl/tbl. A pesar de algunas dificultades en la puesta a punto del método, éste pudo finalmente ser aplicado con éxito, tal como se muestra en la Figura 57.

En resumen, se han efectuado estudios preliminares para tratar de ver si la mutación *tbl* provoca algún cambio en las propiedades previamente descritas del

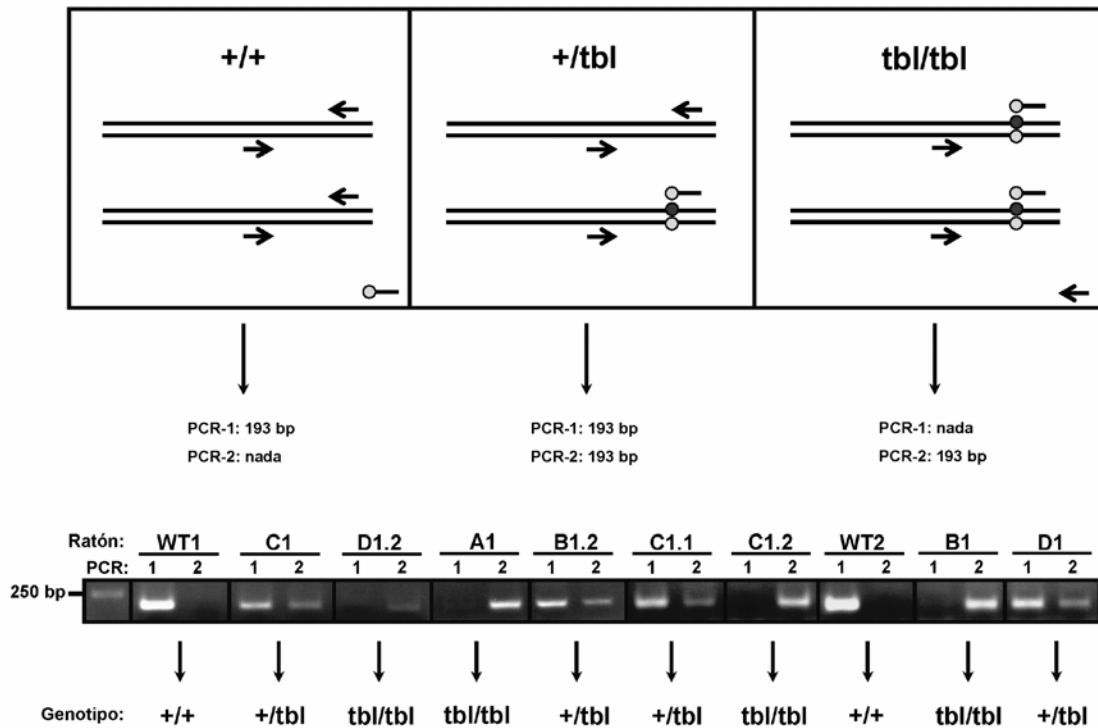


Figura 57. Genotipaje de los ratones tambaleante. El DNA genómico aislado a partir de la cola de los ratones fue utilizado para efectuar dos reacciones de PCR. En la primera (PCR-1), uno de los dos oligonucleótidos usados hibrida solamente con el alelo salvaje del gen *HERC1* murino, por lo cual sólo los DNAs de los ratones salvajes (+/+) y de los heterocigotos (+/*tbl*) dan lugar a una banda de 193 bp. Por el contrario, en la segunda PCR (PCR-2), uno de los dos oligonucleótidos sólo hibrida con los alelos mutantes (*tbl*) y por tanto sólo aparece la banda de 193 bp cuando se usan los DNAs de los ratones *tbl/tbl* y +/*tbl*. La información de ambas PCRs, pues, permite conocer el genotipo del animal de partida. Dado que la especificidad de los oligonucleótidos por los alelos mencionados depende de la formación de un solo par de bases, la temperatura de hibridación debe ser lo suficientemente alta para evitar inespecificidades pero no demasiado para no superar la T_m de los oligonucleótidos. En este caso la temperatura adecuada resulta ser de 62°C.

dominio RLD1 de *HERC1*. En este sentido, se ha visto que la mutación *tbl* no afecta a la localización ni a la capacidad de RLD1 de acumularse en puntos concretos de la célula, ni tampoco a su capacidad de inhibir la endocitosis de EGF. Futuros estudios deberán determinar si la actividad GRF o la unión a fosfolípidos del RLD1 se hallan afectadas. Por último, se ha puesto a punto un método de genotipaje de los ratones tambaleante que permitirá a partir de ahora llevar a cabo estudios sistemáticos con los mismos.