



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

Mónica Cubillos Rojas

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

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

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



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

Mónica Cubillos Rojas

Tesis Doctoral

2014

Discusión

Este trabajo identifica a HERC2 como una proteína que se une a p53 y modula su actividad transcripcional mediante la regulación de su oligomerización. En una primera etapa, implementamos un sistema de geles en gradiente Tris-acetato que permitió el análisis de una proteína gigante como HERC2 y otras de menor tamaño en un solo gel de electroforesis. Después, estudiamos el papel de HERC2 en la regulación de p53, mapeando los dominios involucrados en la interacción, evaluando los niveles de expresión, la actividad transcripcional, la localización subcelular y el estado de oligomerización de p53 en ausencia de HERC2, para demostrar finalmente que la expresión ectópica del dominio CPH de HERC2 es suficiente para promover la oligomerización de p53 y aumentar su actividad. También se demostró que una mutación patológica de *HERC2*, que origina un cambio de aminoácido en la posición 594, causa la inestabilidad de la proteína, reduciendo casi por completo su expresión. Esta mutación causa una enfermedad con un fenotipo similar al síndrome de Angelman. Con fibroblastos de individuos afectados por la mutación en *HERC2* realizamos ensayos para estudiar la actividad transcripcional de p53, encontrándola reducida. Finalmente, demostramos que los ratones *knockout* para *Herc2* son letales en homocigosis, demostrando que *Herc2* es un gen esencial en el desarrollo embrionario de los ratones.

El sistema de geles en gradiente Tris acetato: una solución para el análisis simultáneo de proteínas gigantes y pequeñas

HERC2 es una proteína inusualmente grande, consta de 4.834 aminoácidos con un peso molecular de 528 kDa, lo cual dificultaba su análisis y limitaba la realización de determinados tipos de experimentos. Por ello, lo primero que debía realizarse era la implementación de un sistema de electroforesis que permitiera el análisis simultáneo de HERC2 y de otras proteínas más pequeñas para ser detectadas en un mismo *western blot*. Durante todo este trabajo se ha demostrado la alta reproducibilidad y la gran resolución que se obtiene utilizando el sistema de geles de poliacrilamida en gradiente Tris-acetato. Este tipo de geles se encuentran disponibles comercialmente, pero su composición es desconocida y se producen a concentraciones del gradiente determinadas por el fabricante. Por ello, resultaba indispensable implementar un sistema que pudiera realizarse con las herramientas disponibles en el laboratorio y a un bajo coste.

Este sistema de electroforesis utiliza un sistema de tampón discontinuo que resulta en un ambiente con el pH neutro durante la electroforesis, estabilizando tanto la matriz del gel como las proteínas, obteniendo bandas con mejor resolución. A pH básico, la posibilidad de que las proteínas se modifiquen por alquilación de los grupos sulfhidrilos de las cisteínas es muy alto, debido a que el pKa de la cisteína está entre 8 y 9 y el agente reductor del tampón de carga no puede competir con las proteínas. El uso de un gel con un pH casi neutro y tampones de electroforesis a un pH más bajo que el pKa de las cisteínas y agentes reductores como el bisulfito de sodio que se mantienen durante toda la electroforesis, garantizan un ambiente reductor que reduce significativamente este riesgo (Hachmann and Amshey, 2005).

Adicionalmente, la utilización de un buffer de carga distinto al tradicional tampón Laemmli como el tampón LDS y de las condiciones de desnaturalización para cargar las muestras impedía la rotura de enlaces Aspartato-Prolina, lo cual ocurre cuando las muestras se calientan a 100°C por 5 minutos en tampón Laemmli (Kubo, 1995). Todas estas ventajas se complementaron con la alta sensibilidad que se logra obtener con este tipo de geles, llegando a detectar proteínas poco abundantes en extractos de hasta 10 µg. Sin duda, el sistema de geles en gradiente Tris-acetato representa una herramienta que facilita el análisis de proteínas que no pueden analizarse por los métodos estándar de electroforesis.

Una nueva interacción, un nuevo regulador: HERC2 y p53

Nuestros resultados describen por primera vez que la ubiquitina ligasa HERC2 y la proteína p53 interactúan, y que esta asociación puede darse tanto en células como utilizando proteínas purificadas, indicando que esta interacción es directa. Se delimitaron como dominios suficientes para la interacción el dominio CPH de HERC2 y el extremo carboxilo-terminal de p53 con un dominio de tetramerización intacto. Estos datos son consistentes con lo observado para las proteínas CUL7 y PARC, que también presentan en su estructura un dominio CPH que interactúa con p53. PARC presenta una actividad ubiquitina ligasa intrínseca y puede autoubiquitinarse eficientemente (Nikolaev et al., 2003), CUL7 es una ubiquitina ligasa del tipo RING que forma un complejo ligasa junto a las proteínas SKP1 y F-box que degrada diversos sustratos (Kasper et al., 2006). Sin embargo, ambas proteínas no pueden ubiquitinar p53 y afectar significativamente sus niveles,

coincidiendo con lo observado para HERC2, donde p53 tampoco es su sustrato directo de ubiquitinación.

El dominio CPH de HERC2 no había sido caracterizado, como tampoco estaba descrita la interacción entre HERC2 y p53, por lo cual resultaba interesante determinar si HERC2 regulaba a p53 de una manera similar a como lo hacen PARC y CUL7. PARC se describió como una proteína de anclaje de p53 citoplasmático, capaz de retener a p53 en el citoplasma en ausencia de estrés enmascarando la señal NES. Sin embargo, en respuesta al daño al DNA o de otros tipos de estrés, p53 se estabiliza rápidamente y se transloca al núcleo sin observar un efecto significativo de PARC que afecte a su localización subcelular (Nikolaev et al., 2003). Estos datos difieren de lo observado con HERC2 que, tanto en situaciones de no estrés como de estrés, afecta la actividad transcripcional de p53, determinada por la disminución significativa de los niveles de la expresión de *p21*, inhibición que se extiende a otros genes regulados por p53 como *p53R2* o *p53AIP1*.

Por otro lado, el dominio CPH de CUL7 se había descrito como el responsable de la localización citoplasmática de la proteína entera, que solo era estable en presencia de p53 (Kasper et al., 2006). La sobreexpresión de CUL7 no afectaba la distribución subcelular de p53, pero sí ejercía un efecto inhibitorio sobre su actividad transcripcional, incrementando la proliferación celular y la acumulación en la fase G2 del ciclo celular ante el daño inducido por radiación UV (Andrews et al., 2006). En el caso de HERC2, era su inhibición lo que causaba la disminución de la actividad transcripcional de p53. Todos estos datos indican que proteínas con dominio CPH se unen y regulan a p53, aunque difieren en los mecanismos moleculares de activación sobre p53.

HERC2 y la regulación de la actividad de p53

Una de las primeras ideas que se tuvo en mente al detectar la interacción HERC2-p53 era que HERC2 fuera una ubiquitina ligasa de p53. Al descartarse esta posibilidad mediante ensayos de RNA de interferencia, debimos analizar otras situaciones para entender cuál sería la función de la interacción entre ambas proteínas.

Durante todo este trabajo la actividad transcripcional de p53 fue evaluada principalmente por la expresión de p21. p21 es el efector más importante inducido por p53, capaz de bloquear el progreso

del ciclo celular. La inducción de p21 es extremadamente sensible aun cuando los niveles de p53 son bajos, un mecanismo que le permite a la célula sobrevivir de manera segura hasta que el daño se haya resuelto o el estrés eliminado del microambiente celular (Vousden and Prives, 2009). En ausencia de HERC2, los niveles de p21 se reducían hasta en un 90%, situación similar a cuando p53 se anulaba, demostrando que los efectos sobre p21 eran dependientes de p53 y no debidos a un problema de estabilidad, como fue demostrado por los experimentos con cicloheximida. Estos efectos correlacionaban con el aumento de la proliferación celular, evaluada por curvas de crecimiento y ensayos de clonogenicidad, en varias líneas celulares humanas con diferentes niveles de p53 y p21. Las células H1299, que no expresan p53 y no pueden transactivar p21, no se veían afectadas por la ausencia de HERC2 a nivel de proliferación celular, lo cual indicaba una vez más que el efecto de HERC2 sobre estos procesos está mediado principalmente por p53.

En un principio, nos planteamos que HERC2 actuara como un factor de transcripción unido a p53 regulando la expresión de p21. Por ello, realizamos ensayos de *oligo pull-down* utilizando como oligonucleótido un elemento de respuesta de p53 que se encuentra dentro del gen *p21* (Jeon et al., 2009). Así, esperábamos que p53 como factor transcripcional se uniera a este oligonucleótido como efectivamente ocurrió. Sin embargo, en estas mismas condiciones HERC2 no se une. Tampoco ocurrió cuando las células se trataron con las drogas bleomicina y doxorubicina que favorecen la activación de p53 al ser fosforilado y acetilado y unirse también dentro del gen de *p21*. Estos datos, junto a la no asociación entre HERC2 y p21 por ensayos de co-inmunoprecipitación, indicarían que HERC2 no forma parte del complejo para la activación transcripcional de *p21*. La gran disminución de los niveles p21 en ausencia de HERC2 correlaciona con una reducida actividad transcripcional de p21 y es comparable a la que se obtiene cuando p53 es inhibido, demostrando un claro efecto de HERC2 sobre p21 mediado por p53. Por el contrario, la actividad de los promotores de otros genes como *p53R2* o *p53AIP1* no se inhibía en la misma extensión que cuando los niveles de HERC2 o p53 estaban disminuidos por la transfección de siRNAs, indicando que mecanismos adicionales podrían estar involucrados en la regulación de estos genes.

La formación de tumores mediada por p53 se acepta que está mediada en gran parte por la inhibición del ciclo celular (el-Deiry, 1998). El control del ciclo celular se regula principalmente por p21 (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993). La pérdida de p21 compromete el control del *checkpoint* G1 por p53; sin embargo, ratones *knockout* para *p21* son resistentes al desarrollo

temprano de tumores (Brugarolas et al., 1998; Choudhury et al., 2007; Franklin et al., 2000; Lebel et al., 2001). Así mismo, la depleción de *Gadd45*, un gen diana de p53 importante en el progreso del ciclo celular de la fase G2 a M, tampoco aumenta el riesgo de los ratones a presentar tumores (Hollander et al., 1999). La ausencia de genes apoptóticos como *PUMA* también falla para el desarrollo espontáneo de tumores, aun cuando hay un claro defecto de la apoptosis de p53 (Michalak et al., 2008). De manera interesante, la disrupción genética simultánea de *p21*, *PUMA* y *Noxa* no sensibiliza más a los ratones al desarrollo espontáneo de tumores, sugiriendo que la supresión de tumores mediada por p53 requiere más de una respuesta en su función como supresor de tumores (Valente et al., 2013). Nuestros datos indican que la disminución de los niveles de HERC2 en células humanas es suficiente para disminuir la actividad transcripcional de p53 y la expresión de *p21*, sugiriendo que HERC2 es importante para controlar la proliferación celular y así ser importante en la supresión de tumores mediada por p53.

Por ello, quisimos evaluar el efecto tumorigénico de HERC2 en un modelo *in vivo*, inyectando células U2OS transfectadas con siRNA de HERC2 en ratones inmunológicamente suprimidos y observar si la ausencia de HERC2 era suficiente para inducir tumores en este tipo de ratones. En estas condiciones, las células U2OS inyectadas no produjeron tumores (datos no mostrados). Los datos en la literatura son contradictorios con respecto a si estas células podían o no formar tumores (Taniguchi et al., 2012; Zhang et al., 2010). Así que probamos diferentes condiciones, como la densidad celular o la inclusión de las células dentro de una matriz que soportara mejor el crecimiento, pero las células eran igualmente reabsorbidas. Además, ante la imposibilidad de tener ratones *knockout* para HERC2 y contar únicamente con ratones heterocigotos para HERC2, que no son más sensibles al desarrollo espontáneo de tumores con respecto a los animales *wild-type* por un posible efecto de compensación, no pudimos concluir el papel que podría tener la ausencia de HERC2 sobre la respuesta de p53 en el progreso de tumores en este tipo de modelos. Aunque no podemos descartar que ocurra como con los ratones *knockout* de *p21*, *PUMA* o *Gadd45* que no son más sensibles a desarrollar tumores.

No obstante, la función de andamiaje de HERC2 descrita durante la cascada de reparación que ocurre en los sitios de ruptura de la doble cadena del DNA (Bekker-Jensen et al., 2010), junto a su papel en la regulación de p53 descrita en este trabajo, permite proponer que HERC2 tendría una doble función que prevendría la acumulación de células que han escapado del control para inducir

parada del ciclo celular o apoptosis ante situaciones adversas o de estrés que deberá ser demostrada *in vivo*. Los datos obtenidos con la disminución de *foci* de γ H2AX y 53BP1 en células sin HERC2 y tratadas con bleomicina, respaldarían esta idea. En este contexto, Bekker-Jensen *et al.* (2010) habían observado el requerimiento de HERC2 para el reclutamiento de 53BP1, pero no para la histona γ H2AX. Una posible explicación para esta discrepancia entre sus datos y los que hemos observado podría ser explicada por el agente utilizado para inducir daño sobre el DNA: estos autores utilizaron radiación ionizante y no bleomicina como lo hicimos nosotros. Aunque la bleomicina y la radiación ionizante inducen ruptura de doble cadena de DNA, el daño que causan ambos es principalmente reparado por las maquinarias de recombinación homóloga y no homóloga (Helleday *et al.*, 2008). Estos datos sugerirían que HERC2 también es importante en la regulación de la histona γ H2AX, un elemento clave en el reclutamiento de factores de reparación cuando el DNA sufre daño (Bassing *et al.*, 2003; Celeste *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2001).

Adicionalmente, el hecho que HERC2 sea importante tanto en la reparación del DNA por ruptura de doble cadena, como en la reparación por escisión de nucleótidos, daño que puede ser producido por otro agente quimioterapéutico como la cisplatina (Kang *et al.*, 2010), plantea la posibilidad que inhibidores específicos de la proteína podrían incrementar la acción citotóxica de la cisplatina o de la bleomicina. La cisplatina es uno de los componentes principales de la terapia para el tratamiento de cáncer testicular y de ovario, y también se utiliza en otros tipos de cáncer como los de cabeza y cuello, pulmón, gástrico y colorectal (Jung and Lippard, 2007). Por su parte, la bleomicina es terapia para el cáncer testicular, linfomas y cáncer de cabeza y cuello (Engert *et al.*, 2007; Kawai and Akaza, 2010; Linnert and Gehl, 2009). En este contexto, la utilización de péptidos análogos a dominios de la proteína HERC2 que son importantes en la respuesta al daño y reparación al DNA podrían ser utilizados como agentes terapéuticos que favorecerían la actividad de la bleomicina o cisplatina.

En los últimos años la regulación metabólica ha sido implicada en la función supresora de tumores de p53 (Li *et al.*, 2012; Valente *et al.*, 2013). *TIGAR* y *GLS2*, genes activados por la actividad transcripcional de p53, parecen modular la respiración mitocondrial, limitando la glicólisis y los niveles de especies reactivas de oxígeno. Estas funciones de p53 ayudarían a contrarrestar el efecto Warburg y proteger las células del daño oxidativo, por lo cual se ha sugerido que a través de estos procesos p53 limitaría la progresión del cáncer (Li *et al.*, 2012). Las especies reactivas de

oxígeno son importantes reguladores de la vía de mTOR (Budanov, 2011), un complejo proteico que actúa como un regulador central del crecimiento celular y la homeóstasis y sensor de la disponibilidad de nutrientes para promover el crecimiento en condiciones favorables (Russell et al., 2011). La implicación de HERC1 en la vía de mTOR fue descrita anteriormente por nuestro grupo (Mashimo et al., 2009). Describimos que ratones con el fenotipo *tambaleante*, debido a una mutación puntual en HERC1, presentan una disminución en la actividad de mTOR. Aunque la relación entre HERC2 y mTOR no se ha descrito, que HERC2 y p53 interaccionen y que una mutación en HERC1 disminuya la actividad de mTOR, sugiere que las proteínas HERC podrían ser un *link* entre la vía de p53 y mTOR. Adicionalmente, el hecho que el fenotipo del ratón *tambaleante* sea similar en varios aspectos al de los ratones *rjs* que presentan mutaciones en HERC2, hacen posible plantear que ambas proteínas regularían algunos procesos de manera similar.

MDM2 ¿un espectador de HERC2 y p53?

MDM2 es considerada la principal ubiquitina ligasa de p53 (Haupt et al., 1997; Honda et al., 1997; Kubbutat et al., 1997) y contribuye a regular los niveles y la actividad de p53. Nuestras observaciones parecen indicar que la regulación de HERC2 sobre p53 es independiente de MDM2. Sin embargo, no podemos descartar que exista algún tipo de regulación entre las tres proteínas. Por ejemplo, es posible que HERC2 estimulara la oligomerización de otras proteínas diferentes a p53. MDM2 podría ser un candidato atractivo. La oligomerización de MDM2 es crucial para su función sobre p53, menores niveles de oligomerización están asociados con menor actividad inhibitoria sobre p53 (Cheng and Chen, 2010; Tanimura et al., 1999). Además, MDM2 actúa formando un complejo con MDMX (Wade et al., 2010). Los datos obtenidos con los siRNAs de HERC2 y MDM2, solos o en combinación, indicaron que los efectos de HERC2 están por encima de los de MDM2 sobre p53. La inhibición de MDM2 con siRNAs aumenta los niveles de p53 y p21, resultados similares se obtuvieron con el tratamiento con nutlinas. Sin embargo, cuando HERC2 y MDM2 están anulados conjuntamente, los niveles de p53 no aumentan y p21 disminuye en la misma extensión que se observa cuando HERC2 no está. Por lo cual, la inhibición de HERC2 no solamente afectaría a la actividad transcripcional de p53 por disminuir su oligomerización, sino el *feedback* positivo/negativo que regula los niveles entre MDM2 y p53 (Wade et al., 2010). Por lo cual, es

posible que existan situaciones donde HERC2 regule a MDM2, afectando a p53 directa o indirectamente.

El estado oligomérico de p53 también está asociado con la eficiente ubiquitinación por MDM2. Cuando p53 no oligomeriza es menos accesible a la degradación por MDM2 (Maki, 1999), esto indicaría que en ausencia de HERC2, p53 no sería tan eficientemente degradado por MDM2. Aunque nuestros datos indican que los efectos de HERC2 sobre p53 son independientes de la degradación por la actividad del proteasoma, no puede descartarse que existan situaciones en donde sí pueda ocurrir. Experimentos *in vitro* con las proteínas purificadas nos permitirán analizar si HERC2 protege a p53 de la degradación mediada por MDM2, así como determinar si la actividad ubiquitina ligasa de HERC2 está implicada en este proceso. La limitación de estos experimentos es el gran tamaño de HERC2, que dificulta la posibilidad de obtener la proteína purificada. Actualmente, se está trabajando en la expresión de HERC2 en un sistema de baculovirus que permita la expresión y purificación de la proteína completa en cantidad suficiente.

HERC2 interactúa con p53 tanto en el citoplasma como en el núcleo

Un aspecto que resulta muy importante en la función de HERC2 es su localización subcelular. Tanto para HERC1 como para las proteínas HERC pequeñas se había descrito que presentaban una localización citoplasmática en estructuras similares a vesículas (Hochrainer et al., 2005). Esos datos junto a la interacción de HERC1 con proteínas como ARF1, ARF6 y clatrina habían llevado a sugerir un papel de las proteínas HERC en el tráfico vesicular (Garcia-Gonzalo and Rosa, 2005). A diferencia de las otras proteínas, HERC2 se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde se puede encontrar asociada a la cromatina (Kang et al., 2011), indicando la posibilidad de tener funciones distintas dependiendo de la localización subcelular.

HERC2 no afecta de manera significativa la localización subcelular de p53, pero es capaz de interaccionar con el p53 citoplasmático y nuclear. Esta interacción depende de que p53 pueda oligomerizar. Un aspecto que siempre llamó nuestra atención era la gran cantidad de p53 que estaba asociada a HERC2 en los ensayos de inmunoprecipitación. Una explicación podría ser que por cada molécula de HERC2 inmunoprecipitada, cuatro moléculas de p53 estarían asociadas, lo cual

aumentaría la sinergia de la interacción, la estabilización del tetrámero y la activación transcripcional de p53.

Los experimentos de fraccionamiento subcelular en condiciones de ausencia o presencia de daño inducido por la bleomicina, indicaron que el principal mecanismo regulatorio de HERC2 sobre p53 no implica un cambio en la localización subcelular de p53 (aunque no lo excluye), como se ha observado para otras proteínas que interaccionan con el dominio de tetramerización de p53, como es el caso de ARC, un importante inhibidor de la apoptosis en miocitos y neuronas (Koseki et al., 1998). La interacción entre ARC y p53 se restringe al núcleo e involucra el dominio de tetramerización de p53. Sin embargo, la presencia de ARC impide la oligomerización de p53 y estimula un gran aumento de la exportación nuclear, inhibiendo la expresión de varios genes dependientes de p53 (Foo et al., 2007).

Nuestros datos demuestran la importancia de HERC2 para la actividad transcripcional de p53, por lo cual se podría pensar que el efecto regulador de HERC2 sobre la oligomerización de p53 ocurriera en el núcleo. Las funciones descritas hasta el momento asocian a HERC2 en la respuesta a la reparación al DNA (Bekker-Jensen et al., 2010; Kang et al., 2010), replicación de la horquilla (Izawa et al., 2011) o ensamblaje del centrosoma (Al-Hakim et al., 2012), procesos que ocurren en el núcleo. Sin embargo, no se puede descartar la importancia de la interacción HERC2-p53 en el citoplasma y se ha de tener presente la idea de que la oligomerización de p53 puede ser importante para regular otras funciones diferentes a su actividad como factor transcripcional. En este contexto, HERC2 podría tener un efecto diferente sobre la regulación de la oligomerización de p53 en cada compartimento celular.

Por otra parte, p53 es una proteína con transporte activo a través del complejo del poro nuclear, mediada por las señales de localización y exportación nuclear presentes en su estructura (Liang and Clarke, 2001). Los efectos citoplasmáticos *versus* nucleares de p53 están determinados por las diversas modificaciones post-transcripcionales que afectan a su interacción con otras proteínas, su localización entre citoplasma y núcleo, y su actividad biológica (Green and Kroemer, 2009). En general, se asocia al p53 nuclear con la función de factor de transcripción, mientras que al p53 citoplasmático se le relaciona con la degradación por MDM2 (O'Keefe et al., 2003), inducción de apoptosis través de los efectos sobre la mitocondria (Chipuk et al., 2005) e inhibición de la autofagia (You et al., 2006). En procesos como la apoptosis la actividad transcripcional de p53 en el núcleo es

requerida para que el p53 citoplasmático active directamente factores proapoptóticos en la mitocondria, indicando la importancia y coordinación de la localización de p53 (Green and Kroemer, 2009). Esto indica la existencia de una compleja regulación sobre p53, modulada tanto por modificaciones post-transcripcionales como por las interacciones con otras proteínas, así como por sí misma, lo cual afecta a su localización subcelular y función. En este contexto, HERC2 es un nuevo factor de esta compleja regulación.

Otro aspecto interesante de la regulación de HERC2 sobre p53 es el hecho de que no impida la estabilidad y fosforilación de p53 ante el daño con bleomicina o doxorrubicina. Se ha demostrado que la oligomerización de p53 es necesaria para su acetilación (Itahana et al., 2009; Ono et al., 2014). Nuestros datos indican que la oligomerización no es requerida para su fosforilación en el residuo Ser15.

HERC2 y la oligomerización de p53

Nuestros resultados demuestran que mutaciones en el dominio de tetramerización de p53 impiden la interacción de HERC2 y p53, y que la ausencia de HERC2 reduce la oligomerización de p53, lo cual explicaría la disminución de su actividad transcripcional. La expresión ectópica de un fragmento de HERC2 (aminoácidos 2292-2923) que contiene el dominio CPH fue suficiente para promover la oligomerización de p53 y la actividad transcripcional, demostrando que HERC2 es un regulador de la oligomerización de p53.

Los datos obtenidos con los diferentes mutantes de p53 mostraron que la oligomerización de p53 se correlaciona con la activación de p21 y con la interacción con HERC2. La importancia de la oligomerización de p53 en la función supresora de tumores fue determinada por el hallazgo de mutaciones que afectaban el dominio de tetramerización en pacientes con síndrome de Li-Fraumeni (Davison et al., 1998). En este trabajo hemos utilizado mutantes con dos de las mutaciones descritas, R337C y L344P. Modelos estructurales de las mutaciones en el dominio de tetramerización han demostrado que varias mutaciones generan interacciones hidrofóbicas muy débiles entre los dímeros, por lo cual el tetrámero es inestable (Jeffrey et al., 1995). No podemos descartar que la no interacción de estos p53 mutados con HERC2 podría favorecer el estado dimérico respecto al tetrámero.

Existen muchas proteínas en la célula que oligomerizan, se ha estimado que más del 35% de proteínas en la célula pueden oligomerizar (Ali and Imperiali, 2005). Sin embargo, esta estimación no se correlaciona con los datos de estructuras oligoméricas disponibles en el banco de datos de proteínas, probablemente por la dificultad metodológica para cuantificar la oligomerización (Ali and Imperiali, 2005) y porque la mayoría de aproximaciones se consiguen *in vitro*, pero no *in vivo*. Recientemente, Gaglia y col. (2013) han utilizado espectroscopía de correlación fluorescente para cuantificar la fracción de monómeros, dímeros y tetrámeros de p53 en células vivas en estado basal y después del daño al DNA. Estos autores demostraron que la oligomerización se incrementa más rápidamente que la expresión de p53 después del daño, probablemente porque las moléculas de p53 existentes pueden ensamblarse en tetrámeros. Aunque tal vez lo más interesante es que demuestran que la oligomerización de p53 es suficiente para activar la transcripción de genes como *MDM2*, *PUMA*, *Noxa* y *DDB2* en ausencia de un incremento de los niveles totales de la proteína. Estos datos respaldan nuestros hallazgos de que la ausencia de HERC2 es suficiente para alterar la actividad transcripcional de p53 al disminuir su oligomerización, y cómo la expresión de un dominio de HERC2 incrementa la oligomerización de p53 y por consiguiente su transcripción. Estos resultados permiten plantear una posible utilidad de péptidos análogos al dominio CPH de HERC2, para incrementar la actividad de p53 en aquellos tumores con p53 *wild-type*. Un modelo resumido del papel de HERC2 en la oligomerización de p53 se muestra en la figura D1.

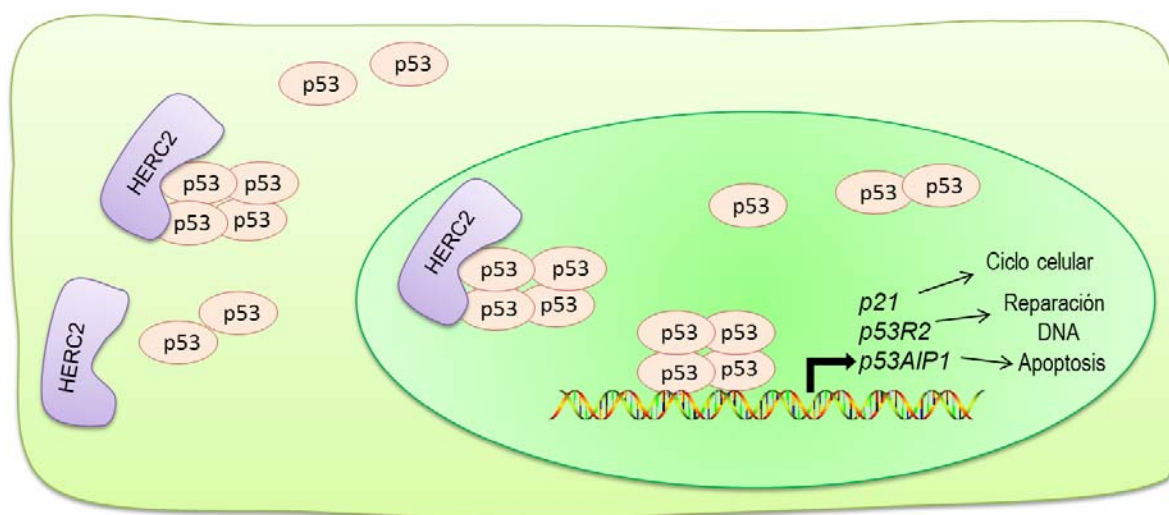


Figura D1. Modelo para la regulación de la oligomerización de p53 por HERC2. HERC2 interactúa físicamente con el tetrámero de p53 en el citoplasma y en el núcleo. Mutantes de p53 que no oligomerizan no se unen a HERC2. HERC2 promueve la oligomerización de p53 incrementando su actividad transcripcional sobre genes como *p21*, *p53R2*, *p53AIP1* pero sin unirse al DNA.

La importancia de la oligomerización de p53 también ha sido demostrada muy recientemente en respuesta al estrés nucleolar (Ono et al., 2014). Estos autores identifican a la proteína nucleolar MYBBP1A como responsable de la oligomerización de p53. MYBBP1A se une a p53 y estimula su oligomerización favoreciendo la acetilación del tetrámero por p300. Este proceso es necesario para la inducción de apoptosis en respuesta al estrés nucleolar producido por el tratamiento con actinomicina D (Ono et al., 2014). Estos últimos trabajos y nuestros resultados mostrados demuestran que la oligomerización de p53 regula su actividad transcripcional.

Otro escenario para HERC2: El síndrome similar al síndrome de Angelman

En colaboración con el grupo del Dr. Andrew Crosby, hemos demostrado que una mutación en *HERC2* que resulta en un cambio de prolina por leucina en la posición 594, es la causante de un desorden neurológico similar al síndrome de Angelman. Esta enfermedad se identificó en un grupo de individuos de una comunidad Amish de Estados Unidos (Harlalka et al., 2013). Estos hallazgos implican por primera vez a *HERC2* en una enfermedad humana. Un estudio realizado por otro grupo confirmó estos resultados (Puffenberger et al., 2012).

La prolina situada en la posición 594 de *HERC2* es un aminoácido muy conservado, que se localiza dentro del dominio RLD1 de *HERC2*, más específicamente en la cuarta aspa de la hélice. La mutación observada resulta en un cambio conformacional de la proteína que afecta a su estabilidad. Durante la caracterización bioquímica de la mutación intentamos demostrar un posible vínculo entre la inestabilidad de *HERC2* y la función de la proteína E6AP, debido a la fuerte correlación que existe entre el síndrome de Angelman y la pérdida de función del gen *UBE3A* que codifica para la proteína E6AP (Laan et al., 1999). En fibroblastos de pacientes observamos que los niveles bajos de *HERC2* no causan alteraciones en la estabilidad de E6AP. Para analizar si la actividad ubiquitina ligasa de E6AP pudiera estar alterada por la mutación en *HERC2*, intentamos detectar sus posibles substratos de ubiquitinación, pero los niveles fueron tan bajos que no logramos conseguirlo en los fibroblastos de los pacientes. Como alternativa se midió la actividad *in vitro* usando células HEK-293, trabajo realizado por el grupo del Dr. Martin Scheffner. En estas condiciones, la actividad ubiquitina ligasa de E6AP se observó ligeramente disminuida en presencia de *HERC2* mutado. Estudios previos han demostrado que *HERC2* actúa alostéricamente sobre la actividad de E6AP incrementando su

actividad (Kühnle et al., 2011). Así, la mutación y disminución de *HERC2* en los individuos afectados sugiere que la actividad de E6AP podría estar disminuida.

El síndrome de Angelman y enfermedades similares como el síndrome de Prader-Willi están causados por la pérdida de genes sometidos a *imprinting* en ciertas regiones del cerebro (Kishino et al., 1997), de ahí las similitudes en el fenotipo de distintas enfermedades donde hay pérdida o inactivación de genes. Curiosamente, el gen *HERC2* está situado muy próximo al gen *UBE3A*, pero no está sometido a *imprinting* como *UBE3A* (Ji et al., 1999; Nicholls and Knepper, 2001). En el caso de los individuos con la mutación en *HERC2* no se identificaron deleciones génicas en esta región, ni mutación en el gen *UBE3A*, sugiriendo que la proteína E6AP es funcional, por lo cual si su actividad está disminuida sería por alteraciones de reguladores como *HERC2*. De manera interesante, los datos que tenemos hasta el momento indican que la inestabilidad de *HERC2* afectaría la actividad de p53, al observar menores niveles de p21 en los fibroblastos de pacientes con la mutación. Sin duda, este modelo de enfermedad resulta atractivo para ser analizado en el contexto de la función de *HERC2*. *HERC2* es una ubiquitina ligasa (Al-Hakim et al., 2012; Chan et al., 2014; Kang et al., 2010; Wu et al., 2010) implicada en procesos de reparación del DNA (Bekker-Jensen et al., 2010; Danielsen et al., 2012; Lee et al., 2014), en la regulación de la actividad de E6AP (Kühnle et al., 2011) y la oligomerización de p53 (Cubillos-Rojas et al., 2014). Estas funciones aparentemente diversas podrían estar relacionadas con la causa del síndrome similar a Angelman.

La mutación de *HERC2* se encuentra en el dominio RLD1 en una prolina altamente conservada entre varias especies, así como en varias proteínas con dominios similares a RCC1 (Harlalka et al., 2013; Puffenberger et al., 2012). Esto indica que este aminoácido, además de estar muy conservado, es funcionalmente importante. De manera interesante, la mutación descrita por nuestro grupo como la causa del fenotipo *tambaleante* de ratón también está en el dominio RLD1 de *HERC1*, en el aminoácido 483. Este aminoácido corresponde a una glicina que está mutada por una glutamina en los ratones *tambaleantes*. Esta glicina está conservada entre todas las proteínas *HERC*, así como en la proteína RCC1 (Mashimo et al., 2009). Estos datos muestran la importancia fisiológica de estos dominios. Curiosamente, su alteración produce algunas características similares. Así, mientras que los individuos afectados por la mutación *HERC2*^{Pro594Leu} presentan movimientos descoordinados, los ratones *tambaleantes* son atáxicos. Un modelo de ratón introduciendo la

mutación *HERC2*^{Pro594Leu} nos permitiría analizar con más detalle las consecuencias patológicas de este síndrome.

HERC2 es esencial durante el desarrollo embrionario: ratones *Herc2*⁵³⁰

Nuestros datos demuestran que la expresión de *Herc2* es necesaria durante el desarrollo embrionario del ratón. Usamos la línea de ratones denominada *Herc2*⁵³⁰, que contiene un *cassette* que corresponde al gen β -*geo* insertado entre el segundo y el tercer exón, no llegándose a expresar ningún dominio de la proteína. Observamos que los animales heterocigotos se desarrollan normalmente y que la ausencia de *Herc2* causa letalidad embrionaria temprana.

Previamente, se habían descrito los fenotipos *rjs* y *jdf2* en ratones con mutaciones inducidas por radiación sobre el gen *Herc2* (Lehman et al., 1998; Walkowicz et al., 1999). Estos ratones se caracterizan por un reducido crecimiento, movimiento atáxico, machos estériles, hembras semiestériles y defectos en el comportamiento materno (Lehman et al., 1998). Estos efectos no fueron observados en los animales heterocigotos *Herc2*^{WT/530}, tal vez por un mecanismo de compensación del alelo *wild-type*. Una situación similar ocurre en humanos, donde los individuos heterocigotos para *HERC2*^{Pro594Leu} no presentan el fenotipo de enfermedad similar al síndrome de Angelman, que solo se manifiesta en individuos homocigotos para la mutación.

Un aspecto diferencial observado entre los animales *wild-type* y heterocigotos fue el tiempo del primer parto después del apareamiento entre machos y hembras. Para los animales *wild-type* este tiempo estaba entre 21 y 24 días, mientras para los animales heterocigotos se extendía a 38 días e incluso en algunas parejas hasta 50 días (datos no mostrados). Cuando la hembra heterocigota se apareaba con un macho *wild-type* o de otra línea, las crías nacían 21 días después del apareamiento, por lo cual parecía que el defecto estaba en los machos heterocigotos y no en las hembras.

En los ratones *rjs* la causa de la esterilidad ha sido atribuida a la ausencia de espermatozoides maduros (Lehman et al., 1998). Esta misma característica ha sido observada en ratones deficientes de la proteína *HERC4* (Rodríguez and Stewart, 2007). Adicionalmente, los mayores niveles de expresión del alelo *rjs* se localizan en testículos y cerebro (Lehman et al., 1998). Todos estos datos

sugieren un papel importante de las proteínas HERC en la espermatogénesis, que afecta la esterilidad; sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados son desconocidos.

Los análisis de letalidad embrionaria indicaron que los embriones mueren antes del día 7.5 post-coital. Al día 7.5, que fue el día más temprano que se logró analizar, las placentas que probablemente correspondían a los animales homocigotos estaban vacías y en algunas casos se observó un coágulo, indicando que el embrión ya se había reabsorbido. Existen diversas causas de letalidad embrionaria durante el periodo temprano de post-implantación. Las causas más comunes son el fallo en la placenta o la insuficiencia cardiovascular. La insuficiencia cardiovascular resulta de los defectos en el desarrollo de la sangre, el corazón o los vasos sanguíneos (Papaioannou and Behringer, 2012), las primeras células precursoras del corazón se identifican al día embrionario 6.5 (Tam et al., 1997). Al haber observado placentas, parece muy poco probable que el defecto se produzca por fallos en la placenta, por lo que probablemente alteraciones en el desarrollo del corazón podrían explicar la letalidad embrionaria en los animales homocigotos. Ni el fenotipo *rjs* o *jdf2* (Lehman et al., 1998; Walkowicz et al., 1999) se asoció con letalidad embrionaria, una diferencia con nuestra línea *HERC2⁵³⁰*. Una explicación podría ser que en ninguno de estos mutantes las deleciones causaban la pérdida total de todos los dominios de la proteína.

Por otra parte, la mayoría de genes implicados en la reparación del DNA son expresados en los embriones post-implantados (Jaroudi & SenGupta 2007), así como durante la organogénesis (Vinson and Hales, 2002). Deleciones de genes de reparación del DNA como *ATR*, *Chk1*, *NSB1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *Rad50*, *Rad51* y *Mre11* causan letalidad embrionaria temprana, principalmente por un exceso de apoptosis (Jaroudi & SenGupta 2007), lo cual sugiere que la función de HERC2 demostrada en la reparación del DNA por daño genotóxico en células (Bekker-Jensen and Mailand, 2010; Kang et al., 2010), también pueda ser importante en los primeros estadios del desarrollo embrionario. Más recientemente, se ha descrito a *FBXL5* como un nuevo sustrato de ubiquitinación de HERC2 (Moroishi et al., 2014). *FBXL5* es una subunidad del complejo ubiquitina ligasa *SCF^{FBXL5}*, que regula los niveles de las proteínas reguladas por el hierro *IRP1* y *IRP2*. De manera interesante, los ratones *knockout* de *FBXL5* mueren en fases muy tempranas del desarrollo por acumulación de hierro y la letalidad es rescatada por la eliminación de *IRP2* (Moroishi et al., 2011). Por lo cual, la ausencia de *Herc2* en los ratones *HERC2⁵³⁰* podría causar alteraciones en los niveles de hierro y en su metabolismo que pudieran originar a la letalidad embrionaria que hemos observado.

Adicionalmente, observamos que la letalidad embrionaria causada por la falta de HERC2 no pudo ser rescatada por la ausencia de p53, situación contraria ocurre con otros reguladores de p53 como MDM2 y MDMX. Los animales *knockout* para *MDM2* mueren al día embrionario 3.5 por un exceso de apoptosis (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995), mientras que los de *MDMX* lo hacen al día 7.5 porque dejan de proliferar (Parant et al., 2001), pero en ambos casos la ausencia de *p53* permite el desarrollo normal de los animales. Estos datos indican la importancia de la regulación de *MDM2* y *MDMX* sobre las funciones de *p53* en la inducción de la apoptosis y proliferación celular. Por nuestros datos, esta situación no ocurre con *HERC2* en los primeros estadios del desarrollo, sugiriendo que *HERC2* y el complejo *MDM2-MDMX* tienen vías de regulación diferentes sobre *p53*. Experimentos futuros utilizando *knockouts* condicionales para *HERC2* podrían ayudar a elucidar la función exacta *in vivo*.

Actualmente, en colaboración con los Dres. José Angel Armengol y Rocío Ruiz de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, estamos realizando distintos análisis del comportamiento con animales *wild-type*, heterocigotos *HERC2*⁵³⁰ y *knockout* de *p53*. Hasta el momento hemos observado que la coordinación y memoria motora en ensayos de *rotarod* es mayor en los animales *wild-type*. Para los animales *knockout* de *p53* se ha descrito anteriormente la pérdida de coordinación motora sin ataxia (Campana et al., 2003), por lo cual si los animales heterocigotos *HERC2*⁵³⁰ tienen una menor actividad de *p53* (extrapolando los datos observados en líneas celulares con siRNAs para *HERC2* y en los fibroblastos de individuos con la mutación *HERC2*^{Pro594Leu}), es posible relacionar el fenotipo de los animales *knockout* de *p53* con los heterocigotos *HERC2*⁵³⁰. Esto además podría relacionarse con la enfermedad similar al síndrome de Angelman que se observa en los individuos afectados con la mutación *HERC2*^{Pro594Leu} y que presentan alteraciones en el movimiento.

En resumen, nuestros datos indican la importancia de *HERC2* en la regulación de *p53*, así como en una patología humana y en el desarrollo embrionario de ratones. Futuros estudios permitirán entender la relación entre todos estos eventos.