

# 5. DISCUSIÓN FINAL

*«It is not birth, marriage or death, but gastrulation, which is truly the most important time in your life.»*

*Lewis Wolpert (1986)*



## 5. DISCUSIÓN FINAL

Los experimentos presentados en esta tesis aportan datos interesantes acerca de la posible implicación de HERC1 en varios procesos celulares, si bien todavía no permiten conocer detalladamente en qué consiste el papel de esta proteína en dichos procesos. Entre los procesos para los cuales existen evidencias, más o menos sólidas, de una posible participación de HERC1 en su regulación, se encuentran la endocitosis, la secreción de proteínas a través del aparato de Golgi, la remodelación del citoesqueleto de actina, la ubiquitinación de proteínas y el metabolismo de los carbohidratos.

En cuanto a la endocitosis, varios hechos sugieren la implicación de HERC1 en la misma. Entre éstos se incluyen su unión a clatrina, PI(4,5)P<sub>2</sub> y PI(3)P, su capacidad de disociar GDP de ARF6, el efecto inhibitorio que sobre la internalización de EGF y transferrina tiene la sobreexpresión de algunos de sus dominios y el hecho de que pequeñas cantidades de HERC1 son copurificadas junto con endosomas de células HeLa (datos no mostrados). No obstante, algunos de los datos obtenidos parecen ir en contra de que HERC1 esté implicada en endocitosis. Así, como se ha visto, HERC1 no colocaliza con trazadores endocíticos tales como dextrano, EGF o transferrina, ni tampoco parece hallarse junto con marcadores de endosomas tempranos como son EEA1 o GFP-2x-FYVE. Asimismo, HERC1-siRNA no afecta la localización subcelular de clatrina y EEA1 ni tampoco la internalización y el tráfico intracelular de EGFR. Por último, la sobreexpresión de HERC1 en HeLa no parece afectar a la actividad de ARF6.

La aparente contradictoriedad de los datos relativos a endocitosis puede ser explicada de distintas maneras. Por ejemplo, la falta de colocalización con las proteínas indicadas no necesariamente indica que HERC1 no participe en la regulación de la endocitosis, pues dicha regulación podría efectuarse a distancia a través de algún intermediario o bien podría entrañar solamente una interacción muy transitoria de

HERC1 con los endosomas, la cual sería difícilmente detectable por microscopía. Más inquietante resulta el hecho de que HERC1-siRNA no afecte a la endocitosis, lo cual acaso podría deberse a la existencia en las células de alguna otra proteína capaz de suplir la deficiencia de HERC1 (HERC2, dado su parecido con HERC1, podría ser una buena candidata para ello). Por otro lado, el hecho de que la cantidad de ARF6·GTP en células HeLa transfectadas con GFP-HERC1 no varíe, mientras sí lo hace en células transfectadas con ARNO-Myc, podría ser debido a que la ratio ((proteína endógena + proteína exógena) / proteína endógena) no es lo suficientemente alta en el caso de HERC1 para afectar apreciablemente los niveles de ARF6·GTP, mientras que sí lo es para ARNO, una proteína de 47 kDa y por tanto más de 10 veces menor en tamaño que HERC1 (el muy bajo porcentaje de células transfectadas con GFP-HERC1 nos impidió determinar esta ratio experimentalmente por Western blot).

Por lo que respecta a la vía secretora, evidencias a favor de un papel de HERC1 en su funcionamiento son las interacciones de HERC1 con clatrina, PI(4)P y, de acuerdo con datos preliminares de nuestro laboratorio,  $\beta$ -COP, así como la colocalización observada entre HERC1 y GM130 en lo que creemos que son estaciones tardías del ERGIC o la marca de HERC1 en el Golgi vista en el microscopio electrónico (datos no mostrados). Por contra, el hecho de que HERC1-siRNA no afecte los niveles y localización de varias proteínas implicadas en la vía secretora y que no impida el transporte hacia el plasmalema de VSV-G ni de EGFR indica que HERC1 es un factor dispensable para la secreción proteica. De nuevo, cabe la posibilidad de que exista redundancia funcional entre HERC1 y alguna otra proteína hasta ahora desconocida.

Dos son los datos que sugieren que HERC1 puede estar involucrada en la dinámica de los filamentos de actina. En primer lugar, hemos visto que HERC1 es reclutada a protrusiones de actina formadas en el plasmalema de células HeLa por

activación de ARF6. Por otro lado, la sobreexpresión del dominio RLD2 de HERC1 en células HEK-293 o HeLa da lugar a la formación de abundantes filopodios en la superficie celular, lo cual parece indicar que HERC1, a través de su RLD2, podría tener un papel en el control de la formación de estas estructuras derivadas del citoesqueleto cortical de actina. La claridad del fenotipo inducido por transfección de GFP-RLD2 hace que éste sea un buen modelo experimental para profundizar en los mecanismos moleculares de la inducción de filopodios por este dominio de HERC1.

La presencia de un dominio HECT en HERC1 capaz de formar un enlace tioéster con ubiquitina parece una indicación clara de que HERC1 debe ser una ubiquitina ligasa. Sin embargo, todavía no ha sido descubierto ningún sustrato de ubiquitinación de HERC1, con lo cual la implicación de ésta en procesos dependientes de ubiquitina carece todavía de una base sólida. Quizá una indicación indirecta de tal implicación venga dada por la observación de que los agregados en los que se acumulan ciertas formas delecionadas de HERC1 se hallan enriquecidos en mono- y/o poliubiquitina. No obstante, las proteínas ubiquitinadas de dichas acumulaciones difícilmente pueden ser sustratos de ubiquitinación de HERC1, pues las formas de ésta que dan lugar a las acumulaciones carecen del dominio HECT. Cabe, pero, la posibilidad de que las formas delecionadas de HERC1 secuestren a los sustratos de ésta en las acumulaciones y que sea entonces la proteína HERC1 endógena la que los ubiquitine. Alternativamente, los fragmentos de HERC1 en cuestión podrían tener afinidad por proteínas ubiquitinadas y arrastrarlas a los agregados, o bien las propias formas inestables de HERC1 podrían ser ellas mismas sustratos de ubiquitinación, aunque en este último caso deberíamos haber observado cambios en la migración electroforética de las proteínas y no lo hemos hecho, cosa que hace improbable esta

opción. Queda, por lo tanto, abierta la cuestión relativa a la conexión de HERC1 con los procesos celulares regulados por ubiquitina.

Aunque, como se ha dicho, no hemos hallado los sustratos de ubiquitinación del HECT de HERC1, sí hemos identificado una proteína capaz de unirse al mismo, a saber, la isoforma M2 del enzima glicolítico piruvato quinasa (M2PK). Desdichadamente, sin embargo, no hemos sido capaces de detectar tal interacción en células de mamífero ni tampoco de encontrar ningún efecto funcional de HERC1 sobre M2PK. Ante tales resultados existen dos interpretaciones posibles: (1) la interacción se halla finamente regulada en células de mamífero (pero no en células de insecto o in vitro) y sirve una función que no hemos sido capaces de hallar y (2) la interacción observada in vitro, en levadura y en células de insecto carece de relevancia funcional en mamíferos.

Finalmente, algunos de los resultados obtenidos sugieren que distintas partes dentro de la proteína HERC1 interaccionan, si no física, al menos sí funcionalmente. Ello se deduce de hechos como los siguientes: (1) las acumulaciones de HERC1 se forman cuando se transfecta GFP-HERC1(aa 1-2958) pero no cuando se transfecta GFP-HERC1(aa 1-4020), o (2) se forman filopodios por transfección de GFP-HERC1(aa 3990-4420) pero no, por ejemplo, por transfección de GFP-HERC1(aa 3684-4861). Estos datos son intrigantes y parecen indicar que varias de las zonas de unión entre HERC1 y sus efectores se hallan enmascaradas en la proteína HERC1 endógena, lo cual a su vez sugiere que, sea cual sea la función o funciones de HERC1, éstas están probablemente muy finamente reguladas y precisan de señales específicos para ser puestas en marcha. En este sentido, datos preliminares de nuestro laboratorio parecen indicar que podría existir una interacción física entre la zona N-terminal de HERC1 y algunos de sus dominios de la zona C-terminal. Sin embargo, estos resultados deben todavía ser confirmados y, por tanto, queda para el futuro elucidar el papel que

las interacciones intramoleculares tienen en la regulación del funcionamiento de HERC1.