



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Dpto. de Anatomía y Biología Celular

**Importancia de la metilación y sumoilación de la coilina
y del factor de supervivencia de las motoneuronas
en el ensamblaje del cuerpo nuclear de Cajal**

**Tesis doctoral presentada por Olga Tapia Martínez
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria
Santander, Julio 2009**

4.2 PARTICIPACION DE SUMO1 EN EL ENSAMBLAJE MOLECULAR DEL CUERPO NUCLEAR DE CAJAL (CB)

Otra modificación postraduccional de proteínas que, con carácter general, ha cobrado gran importancia en la última década es la conjugación con SUMO1. La unión covalente de SUMO1 confiere al sustrato la capacidad de modificar su interacción con otras proteínas y favorecer su reclutamiento o relocalización en compartimentos nucleares concretos (Hay, 2005). Alternativamente, la conjugación con SUMO1 (sumoilación) podría prevenir interacciones entre proteínas o provocar cambios conformacionales de su estructura y función (Ulrich, 2009). De hecho, estudios previos realizados en diferentes laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado que la agregación específica de proteínas estructurales en determinadas organelas nucleares, como en los cuerpos PML (Zhong y cols., 2000; Villagra y cols., 2004), las inclusiones nucleares PML (PML-NIs, Villagra y cols., 2006) y los cuerpos SUMO1 (SUMO1-NBs, Navascues y cols., 2007) depende de la modificación por SUMO1.

El requisito para que las proteínas establezcan la unión covalente con SUMO1 es que tengan una secuencia consenso de reconocimiento por SUMO1. Este dominio consiste en varios aminoácidos (aa) alrededor de una lisina que es la que se conjuga con SUMO1. La secuencia consenso es Ψ KXE/D, donde Ψ es un aa hidrofóbico grande, K es la lisina modificada por SUMO1, X es un aa cualquiera y E/D pueden ser, alternativamente, el ácido glutámico o el aspártico (Sampson y cols., 2001). La probabilidad de sumoilación de una proteína está en relación directa con la presencia de la secuencia consenso en una región desordenada o en un bucle del sustrato (Ulrich, 2009).

Como se representa en la Figura 22, la sumoilación de proteínas sigue una vía parecida al de la ubiquitilación, aunque con diferentes enzimas. SUMO1 es inactivo y para su maduración requiere de la eliminación de una secuencia de cuatro aa del extremo C-terminal, proceso mediado por una SUMO1 proteasa, y de su ulterior activación por la enzima E1. El enlace entre SUMO1 y la E1 es energético-dependiente. Una vez activado, el SUMO1 se transfiere a una segunda enzima E2 (Ubc9) que reconoce directamente la secuencia consenso en el sustrato. Ubc9 es la única enzima de conjugación conocida hasta el momento, por lo que representa un elemento esencial en la maquinaria de sumoilación (Desterro y cols., 1997). Ubc9 cataliza la unión isopeptídica entre el grupo amino de la lisina de la secuencia consenso del

sustrato con el C-terminal de la glicina 97 del SUMO1 humano (Desterro y cols., 1997; Hay 2005). Aunque, al menos in vitro, es suficiente la conjugasa Ubc9 para la sumoilación de proteínas, la eficiencia del proceso de sumoilación in vivo se incrementa mediante la participación de una tercera enzima E3 (SUMO1-ligasa). Hasta la fecha se han identificado varias SUMO1-ligasas que participan en la sumoilación de distintos sustratos (Jonhson y Gupta 2001; Kahyo y cols., 2001; Sachedev y cols., 2001; Ulrich, 2009). La sumoilación es un proceso reversible y la disociación de SUMO1 del sustrato es llevada a cabo por SUMO1-proteasas específicas (SENP1-5).

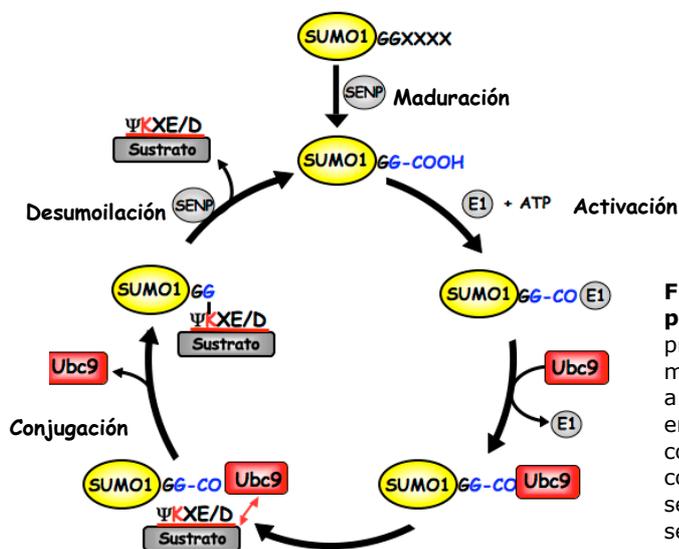


Figura 22. Ciclo de sumoilación de proteínas. Se representan las etapas principales del proceso de sumoilación: tras la maduración, SUMO1 se activa mediante la unión a la enzima E1; a continuación se transfiere a la enzima E2 Ubc9 que reconoce la secuencia consenso del sustrato y favorece su conjugación con SUMO1. Dado que el proceso es reversible, se indica la etapa de desumoilación por la que se libera SUMO1 de la proteína sustrato.

Actualmente se desconoce si SUMO1 tiene alguna implicación en la formación del CB pero es muy importante investigarlo ya que las modificaciones que imprime SUMO1 al sustrato, de producirse en proteínas fundamentales del CB, podrían ser determinantes en el ciclo de ensamblaje/desensamblaje y en la regulación de las interacciones moleculares y actividad funcional del CB. Por esta razón, en el presente trabajo nos proponemos investigar si el CB recluta SUMO1 en alguna fase de su ciclo de ensamblaje/desensamblaje y, de ser así, buscar posibles sustratos de SUMO1 entre las proteínas canónicas del CB. Como posibles candidatos hemos seleccionado dos proteínas fundamentales para la integridad estructural y funcional del CB, la coilina y el factor SMN. El interés por la posible sumoilación de la coilina se fundamenta en que recientemente se ha demostrado bioquímicamente que la coilina interacciona con PIASy, una SUMO1-E3 ligasa, lo que sugiere una posible participación de SUMO1 en su regulación funcional de la coilina (Sun y cols., 2005). Además, como la coilina es la

proteína estructural del CB, análogamente a lo ocurre con la proteína estructural PML de los cuerpos PML (Zhong y cols., 2000), su oligomerización y estabilización en el CB podría ser parcialmente dependiente de su interacción con SUMO1. Como segundo sustrato, hemos considerado a la proteína SMN dado que su sumoilación podría modificar su interacción molecular con las snRNPs y/o con la coilina (Shaw y cols., 2008; Ulrich, 2009). Para demostrar la posible participación de SUMO1 en el ensamblaje de los CB hemos utilizado tres modelos celulares en los que conocemos, por anteriores estudios de nuestro laboratorio, que se produce una profunda reorganización molecular y estructural de los CBs: i) la diferenciación neurona-like de células UR61 (Navascues y cols., 2004, 2007), ii) la respuesta neuronal al estrés osmótico en las neuronas osmosensitivas del núcleo supraóptico de la rata (SON) (Berciano y cols., 2002; Villagra y cols., 2008) y iii) la respuesta de las neuronas sensoriales primarias del GT al estrés metabólico inducido mediante el tratamiento con el inhibidor de las metiltransferasas AdOx.

4.2.1 Las células neurona-like UR61 poseen un subtipo de CBs enriquecidos en SUMO1

Estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado que durante el proceso de diferenciación neurona-like de las células UR61 inducido por dexametasona (Dex) los CBs sufren variaciones en su número y composición molecular (Navascués y cols., 2004). Para profundizar en la mecánica de estos procesos, hemos investigado si SUMO1 estaba implicado en la reorganización molecular de los CBs que acompaña a la diferenciación de las células UR61.

Experimentos de doble marcaje inmunofluorescente para detectar SUMO1 y coilina revelaron la presencia, tanto en células UR61 indiferenciadas como diferenciadas, de un subtipo de CBs inmunorreactivos para ambas proteínas (Fig. 23A-F). Dada la heterogeneidad molecular de los CBs en las células UR61 (Navascues y cols., 2004), que incluye i) CBs enriquecidos sólo en coilina, ii) cuerpos SMN-positivos y coilina-negativos (géminis) y iii) CBs coilina- y SMN-positivos, nos pareció importante investigar si los CBs positivos para SUMO1 eran canónicos. Para este fin, detectamos por inmunofluorescencia componentes de las snRNPs espliceosomales, tales como la caperuza hipermetilada del extremo 5' de los snRNAs espliceosomales (TMG-cap) y el complejo espliceosomal Sm. Dobles inmunomarcajes para SUMO1 y TMG-cap o Sm claramente demuestran que los CBs enriquecidos en SUMO1 también

concentran factores de "splicing", indicando que son CBs funcionales (Fig. 23G-L). La presencia de CBs con SUMO1 fue también observada en otras líneas celulares, como la N2A, procedente de neuroblastoma de ratón, y la MCF7, derivada de cáncer de mama humano. Este hallazgo sugiere que el reclutamiento de SUMO1 en el CB no es exclusivo de la diferenciación de las células UR61 y puede ser un mecanismo común a varios tipos celulares (Fig. 23M-R).

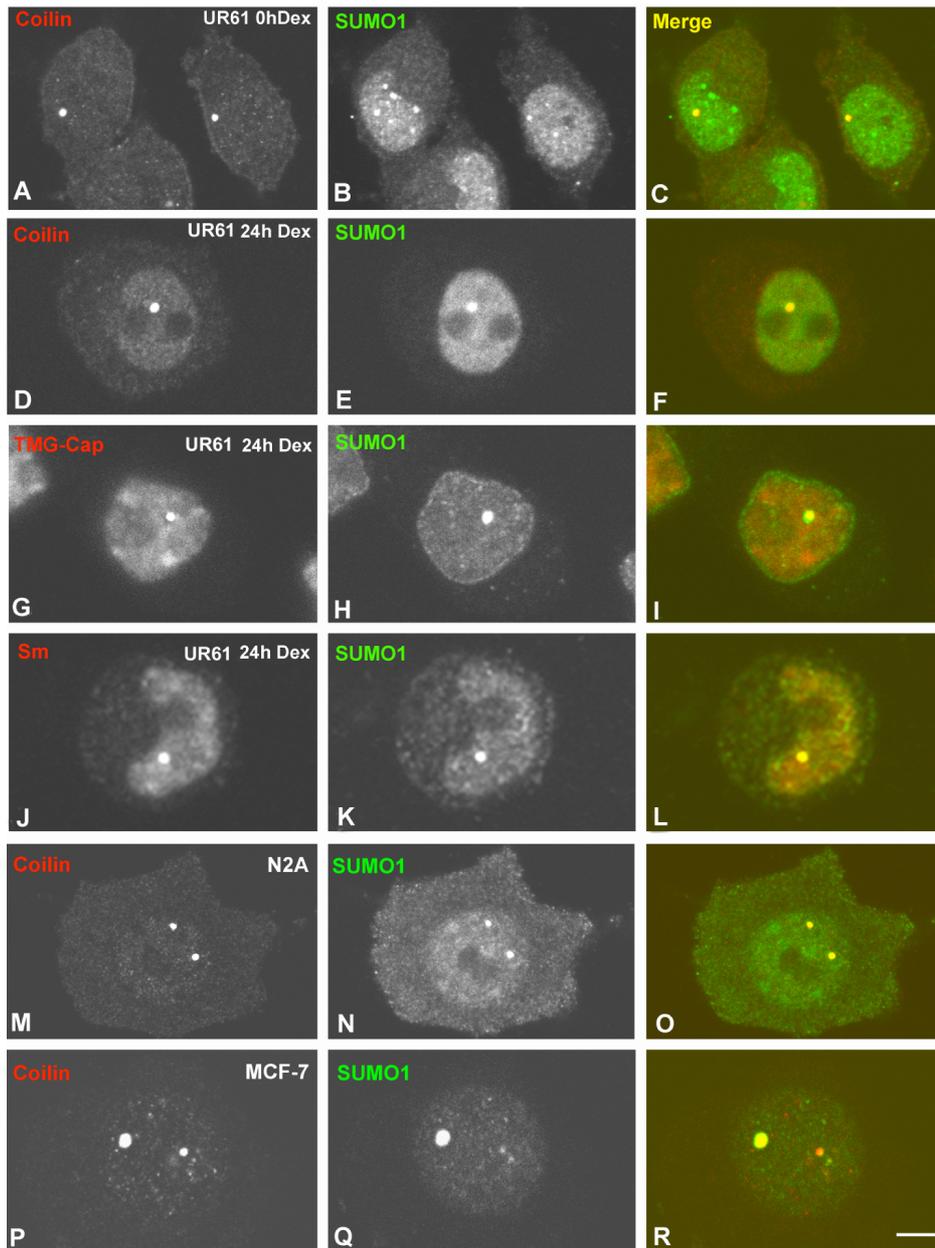


Figura 23. CBs con SUMO1 en células UR61 indiferenciadas (A-C) y diferenciadas con Dex (D-F). En **A-F** doble inmunomarcaje de coilina y SUMO1 que muestra la colocalización de ambos componentes moleculares en los CBs. En **G-L** Los CBs con SUMO1 también concentran snRNPs espliceosomales. En **M-R** colocalización de SUMO1 y coilina en CBs de una célula N2A de neuroblastoma y de otra MCF7 de cáncer de mama. Barra de medida 5µm.

La localización de SUMO1 en determinados CBs fue confirmada en secciones ultrafinas mediante inmunoelectrónica. Las partículas de oro coloidal de inmunorreactividad para SUMO1 decoraban específicamente las típicas hebras densas enrolladas del CB, mientras que la matriz amorfa intercalada carecía de marcaje (Fig. 24).

Nuestro siguiente paso fue determinar cuantitativamente si la diferenciación neuronal-like de las células UR61 inducida con Dex provoca cambios en el número de CBs SUMO1-positivos. El estudio cuantitativo reveló que la diferenciación de las células UR61 (tratadas 24 horas con Dex) provocaba un incremento significativo del número medio de CBs por célula. Sin embargo, tanto la proporción de células con CBs SUMO1-positivos como el número medio por célula de este subtipo de CBs disminuyeron significativamente (Fig. 25A y B). Estos resultados indican que en las células UR61 la presencia de SUMO1 en los CBs está preferentemente asociada a un estado indiferenciado.

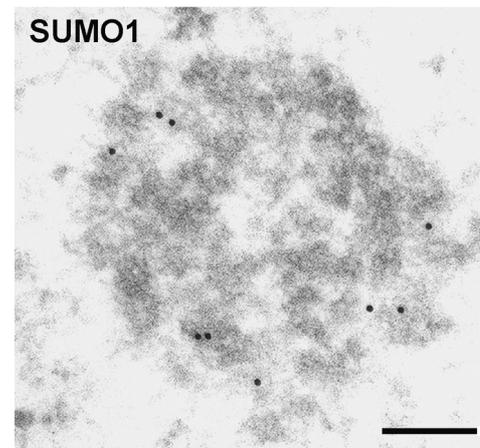


Figura 24. Detección de SUMO1 a nivel ultraestructural en el CB. Imágen de inmunoelectrónica que ilustra la presencia de SUMO1 en las hebras densas arrolladas de un CB. Barra de medida 150nm.

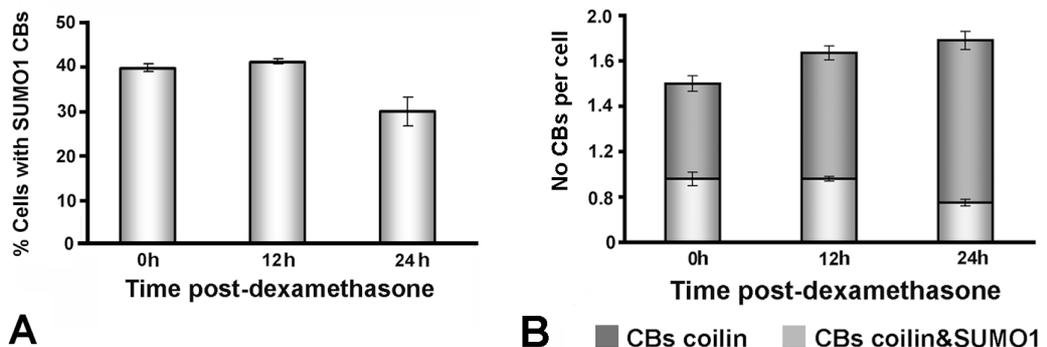


Figura 25. En **A** análisis cuantitativo de la proporción (%) de células UR61 con CBs que contienen SUMO1 en la diferenciación de las con Dex. **B** Distribución de CBs negativos a SUMO1 (gris oscuro) y CBs con SUMO1 (gris claro) en la diferenciación de las células UR61 con Dex. Nº de células estudiadas 300; los valores son media \pm SDM.

La tendencia de SUMO1 para reclutarse en los CBs fue confirmada en células UR61 que expresaban ectópicamente GFP-SUMO1 y dos potenciales sustratos de SUMO1, coilina y SMN, etiquetados con GFP (GFP-coilin y GFP-SMN). La transfección transitoria de SUMO1 inducía la formación de cuerpos PML. Además, en algunas

células transfectadas, SUMO1-GFP era reclutado en típicos CBs donde colocalizaba con la coilina endógena detectada con inmunofluorescencia (Fig. 26A-C). Por otro lado, la expresión transitoria de coilina inducía la formación de CBs ectópicos, algunos de los cuales reclutaban SUMO1 endógeno (Fig. 26D-F). Resultados similares se obtuvieron cuando transfectamos un vector de expresión para GFP-SMN. La proteína de fusión aparecía distribuída por el citoplasma y concentrada en cuerpos nucleares y citoplasmáticos, como ya había sido descrito previamente (Navascués y cols., 2004). El inmunomarcaje para SUMO1 también colocalizaba con GFP-SMN en algunos cuerpos nucleares que pueden corresponder a CBs o a géminis ("gems", Fig. 26G-I). Finalmente, la sobreexpresión de la enzima Ubc9, la única SUMO1 E2 conjugasa que opera en la vía de sumoilación (Desterro y cols., 1997; Hay, 2005), demostró su colocalización con la coilina en algunos CBs (Fig. 26J-L). Estos resultados tienen mucho interés porque confirman el reclutamiento de SUMO1 en los CBs y sugieren que estos cuerpos nucleares pueden ser sitios activos de sumoilación.

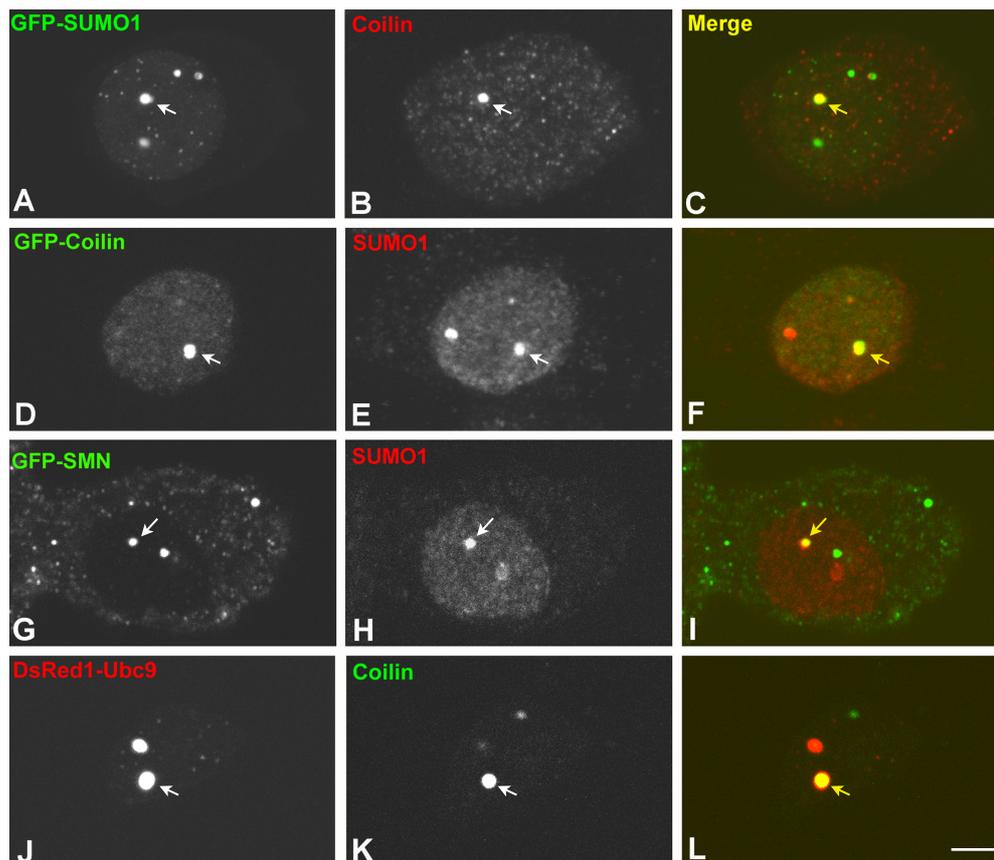


Figura 26. Células UR61 que reclutan GFP-SUMO1, GFP-Coilin, GFP-SMN y DsRed1-Ubc9 en los CBs. En **A-C** célula que expresa GFP-SUMO1 en varios focos nucleares. La flecha señala un CB que concentra coilina y SUMO1. **D-F** Sobreexpresión de GFP-coilin que ilustra la colocalización coilina ectópica y SUMO1 endógeno en un CB (flecha). **G-I.** GFP-SMN muestra una señal citoplasmática difusa y concentrada en cuerpos nucleares. Nótese como uno de los cuerpos nucleares recluta SUMO1 (flecha). **J-L** Sobreexpresión de DsRed1-Ubc9 que muestra la concentración de la proteína de fusión en un CB. Barra de medida 5µm.

4.2.2 El estrés osmótico induce en los CBs de las neuronas del núcleo supraóptico el reclutamiento transitorio de SUMO1

Una vez establecida la existencia de CBs con SUMO1 en líneas celulares neuronales (UR61 y N2A) y no neuronales (MCF7), nos planteamos investigar si este subtipo de CBs que concentraban SUMO1 estaba presente en neuronas del tejido nervioso central de los mamíferos.

Como modelo celular hemos utilizado neuronas del SON de la rata, células neurosecretoras que producen y liberan la hormona antidiurética vasopresina, funcionalmente implicada en la regulación hídrica y electrolítica del medio interno (para revisión, ver Burbach y cols., 2001). Estudios previos de nuestro laboratorio en este modelo neuronal han demostrado que los CBs sufren ciclos de ensamblaje/desensamblaje, dependientes de la actividad transcripcional, en respuesta al estrés osmótico inducido por la inyección intraperitoneal de una solución salina hipertónica (Lafarga y cols., 1998). Este ciclo de ensamblaje/desensamblaje de los CBs proporcionan un excelente modelo para analizar la posible participación de SUMO1 en la reorganización molecular de los CBs asociada al estrés neuronal. Para desarrollar este objetivo hemos realizado experimentos de doble inmunomarcage para detectar SUMO1 y coilina en las neuronas del SON control y en respuesta al estrés osmótico, a los 30 minutos y 2, 6 y 24 horas post-inyección de la solución hipertónica (1,5M NaCl). Las neuronas control exhibían la típica señal difusa nucleoplasmática de SUMO1, pero no se detectó colocalización de SUMO1 y coilina en los CBs (Fig. 27A-C). Después de 30 minutos de tratamiento con solución hipertónica, los CBs tendían a desaparecer y la coilina se relocalizaba en pequeños casquetes ("caps") perinucleolares que carecían de marcaje para SUMO1 (Fig. 27D-F). Tras 2 y 6 horas de tratamiento, coincidiendo con la reaparición de CBs, se observó colocalización de SUMO1 y coilina en una fracción de CBs libres en el nucleoplasma o, con mayor frecuencia, en pequeños CBs asociados al nucleolo (Fig. 27G-L). Pasadas 24 horas de la inducción del estrés osmótico, se detectaron CBs muy prominentes, pero la mayoría carecía de inmunorreactividad para SUMO1 (Fig. 27M-O). Estos resultados demuestran que SUMO1 se localiza transitoriamente en los CBs neuronales durante la respuesta al estrés osmótico.

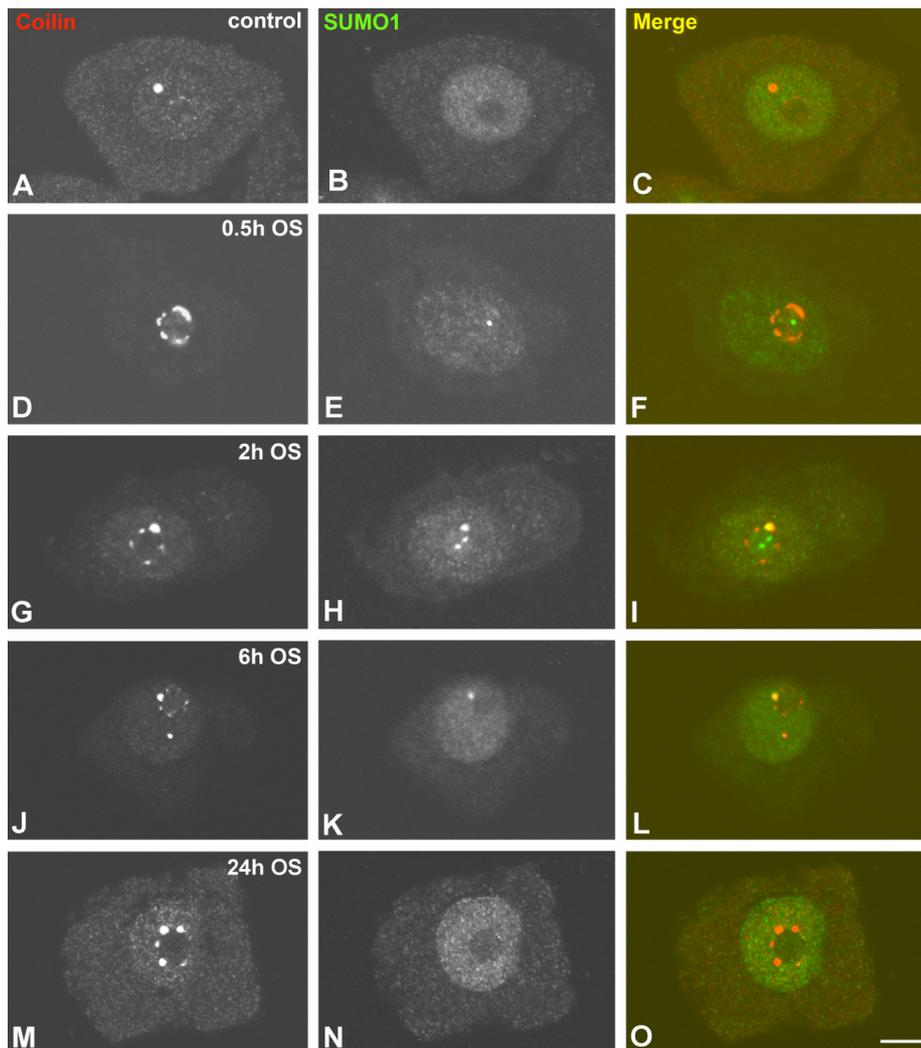


Figura 27. Distribución de SUMO1 y coilina en neuronas del SON control y activadas osmóticamente. **A-C** Neurona control que exhibe un patrón de SUMO1 nucleoplasmático, excluyendo el nucleolo, pero no se concentra en el CB. **D-F** 30 minutos posttratamiento con solución hipertónica, la coilina aparece en caps perinucleolares. En **G-L** después de 2 y 6 horas de inducción del estrés osmótico, SUMO1 se encontraba en el nucleoplasma y concentrado en CBs perinucleolares. En **M-O** tras 24 horas del tratamiento se observaban numerosos CBs carentes de señal de SUMO1. Barra de medida 5µm.

Para estimar la proporción de CBs que reclutaban SUMO1 realizamos un análisis cuantitativo de CBs con y sin SUMO1 en preparaciones de disociados de neuronas de SON co-inmunomarcadas para la coilina y SUMO1 (Fig. 28A y B). La Figura 28 (C y D) ilustra como, tras 2 horas de tratamiento con la solución hipertónica, se registraba un incremento inicial en la proporción de células que contenían CBs con SUMO1 que aumentaba progresivamente hasta alcanzar un valor máximo a las 6 horas. Sin embargo, la presencia de SUMO1 fue transitoria, la proporción de células con CBs SUMO1-positivos disminuyó a las 12 y a las 24 horas post-tratamiento. Con el fin de correlacionar el periodo de reclutamiento de SUMO1 en los CBs con el comportamiento global de los CBs, particularmente con el ciclo de ensamblaje/

desensamblaje, realizamos la cuantificación del número medio de CBs por neurona en las diferentes etapas de la respuesta neuronal al estrés hiperosmótico. Así, como se representa en la Figura 28D, el número medio de CBs por neurona disminuyó drásticamente en la fase temprana de la respuesta al estrés (0,5 horas), pero seguidamente se producía un efecto rebote de formación progresiva de CBs, a las 6, 12 y 24 horas del tratamiento hiperosmótico, con valores medios de CBs por neurona incluso superiores a los valores control (Fig. 28D). En este ciclo de ensamblaje/desensamblaje, el mayor número de CBs SUMO1-positivos por neurona se detectó a las 6h de la inducción del estrés osmótico, precisamente en un periodo de rápida reformación de CBs (Fig. 28D).

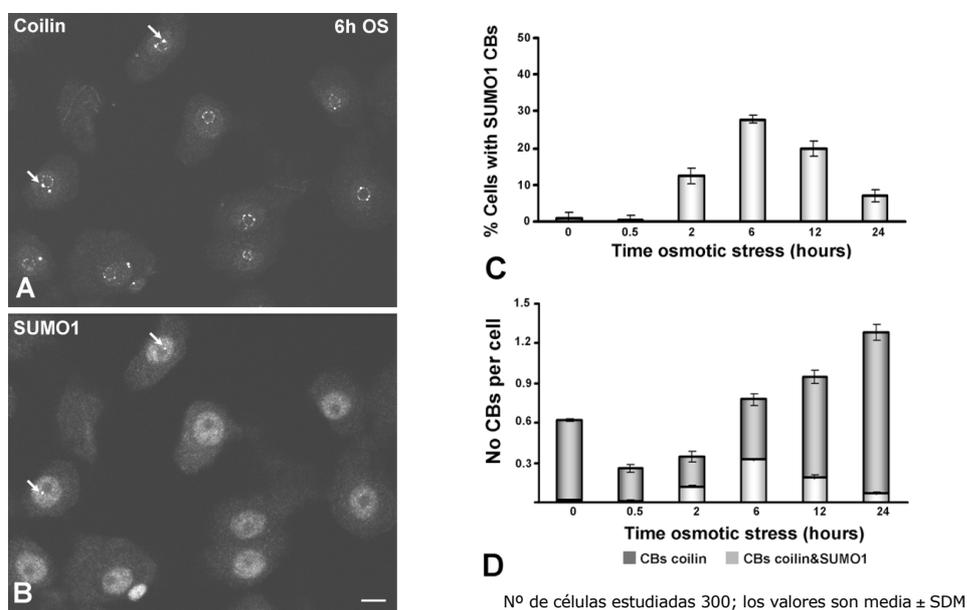


Figura 28. Análisis cuantitativo de la distribución de CBs con SUMO1 en neuronas del SON en respuesta al estrés osmótico. En **A** y **B** Imágen panorámica representativa de disociados neuronales inmunomarcados con anti-coilina (**A**) y anti-SUMO1 (**B**) utilizadas para el análisis cuantitativo. Las flechas indican la colocalización de SUMO1 y coilina en CBs tras 6 horas del estrés osmótico. Escala de medida 10 μ m. (**C**) Histograma que representa la proporción de neuronas que contienen CBs con SUMO1 y (**D**) Nº medio de CBs con y sin de SUMO1 por neurona a diferentes tiempos post-tratamiento.

4.2.3 La reducción de la actividad metiltransferasa induce localización transitoria de SUMO1 en los CBs de las neuronas del ganglio trigémino

Sobre la base de los resultados obtenidos en el apartado 4.1, en el que hemos demostrado en células MCF7 *MTAP*^{-/-} la importancia de la metilación de la coilina en la formación de CBs (la metilación favorece el ensamblaje y la hipometilación endógena provoca su desensamblaje), nos pareció importante conocer si en el tejido nervioso se reproducía la mecánica mediada por metilación en el ensamblaje de CBs y, de ser así, si en este proceso participaba SUMO1. Como modelo biológico hemos utilizado el

comportamiento de los CBs en las neuronas sensitivas del GT de animales controles y tratados con el inhibidor de la metilación AdOx. Para este estudio hemos utilizado neuronas del sistema nervioso periférico porque la ausencia de barrera hematoencefálica en los ganglios nerviosos permite el acceso directo de las drogas a las neuronas.

En primer lugar, realizamos experimentos de doble inmunomarcaje para detectar SUMO1 y coilina. Como se muestra en la Figura 29, los CBs de las neuronas del GT control, al igual que los CBs de las neuronas control del SON, carecen de inmunorreactividad para SUMO1 (Fig. 29A-C). El efecto del tratamiento con AdOx fue rápido e incidió especialmente sobre los CBs. La respuesta más temprana, detectada a los 30 minutos de la administración de AdOx, consistió en el desensamblaje de los CBs y la relocalización de la coilina en casquetes perinucleolares (Fig. 29B). Estos agregados perinucleolares de coilina carecían de SUMO1 (dato no mostrado). A las 4 horas de tratamiento con el inhibidor de las metiltransferasas, el proceso revierte observándose la reformación de numerosos CBs. En esta fase de ensamblaje de nuevos CBs, una fracción de los mismos mostraba colocación de SUMO1 y coilina (Fig. 29D-F). El proceso de reclutamiento de SUMO1 en los CBs fue transitorio, revertiendo a las 24 horas de tratamiento (Fig. 29G-I).

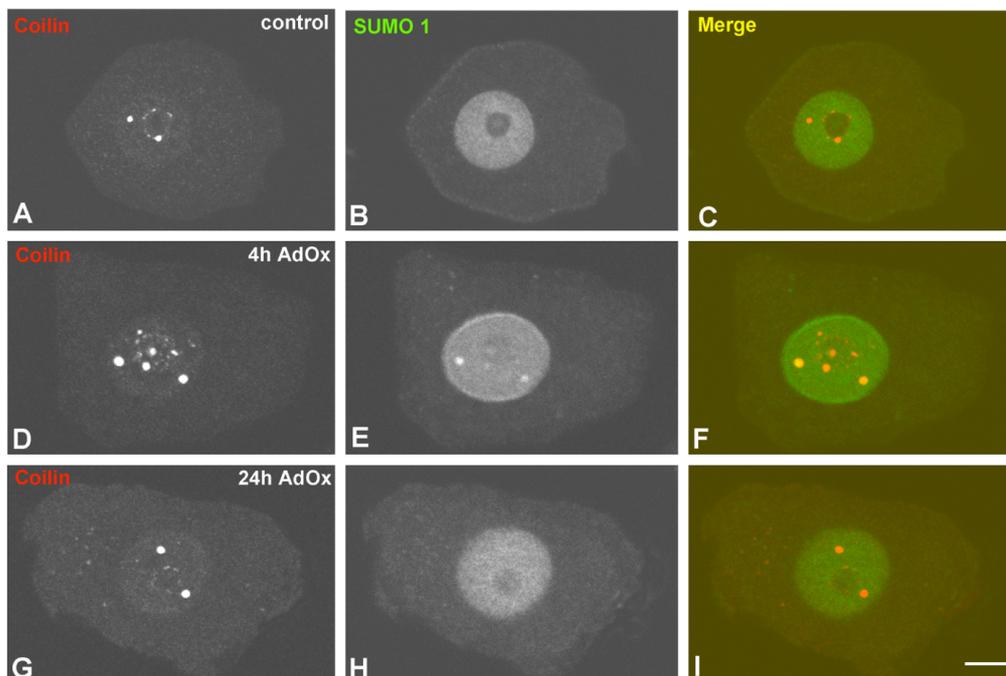


Figura 29. Marcaje de coilina y SUMO1 en disociados neuronales control y tratados con AdOx. El coimmunomarcaje de coilina y SUMO1 reveló la ausencia de colocación de ambas moléculas en los CBs de neuronas control (A-C) y tratadas con AdOx 24 horas (G-I). El tratamiento con AdOx durante 4 horas indujo la proliferación de CBs y algunos concentraban SUMO1 (D-F). Barra de medida 10µm.

Para poder situar el reclutamiento en los CBs de SUMO1, en el contexto general de las variaciones en el número de CBs que acompañan al estrés inducido por la hipometilación, realizamos un estudio cuantitativo en experimentos de doble marcaje para SUMO1 y coilina. Respecto al número medio de CBs (totales), en la Figura 30 (A-D) se muestra como 30 minutos de tratamiento con AdOx son suficientes para producir una disminución significativa de CBs que se acompaña de la relocalización de la coilina en rosetas o casquetes perinucleolares. Curiosamente, a las 4 horas de tratamiento con AdOx se detecta un incremento dramático y transitorio del número medio de CBs que retorna a valores control a las 24 horas de tratamiento (los valores numéricos aparecen en la gráfica, Fig. 30E). El análisis cuantitativo de los CBs SUMO1-positivos revela la presencia transitoria de SUMO1 en los CBs a las 4 horas de tratamiento, coincidiendo justamente con el período de ensamblaje de numerosos CBs neoformados. En su conjunto, estos resultados apoyan, de nuevo, la idea de que la sumoilación de determinadas proteínas del CB, particularmente coilina y/o SMN, participa en el ensamblaje molecular de los CBs, especialmente cuando se produce su reformación después de su desaparición.

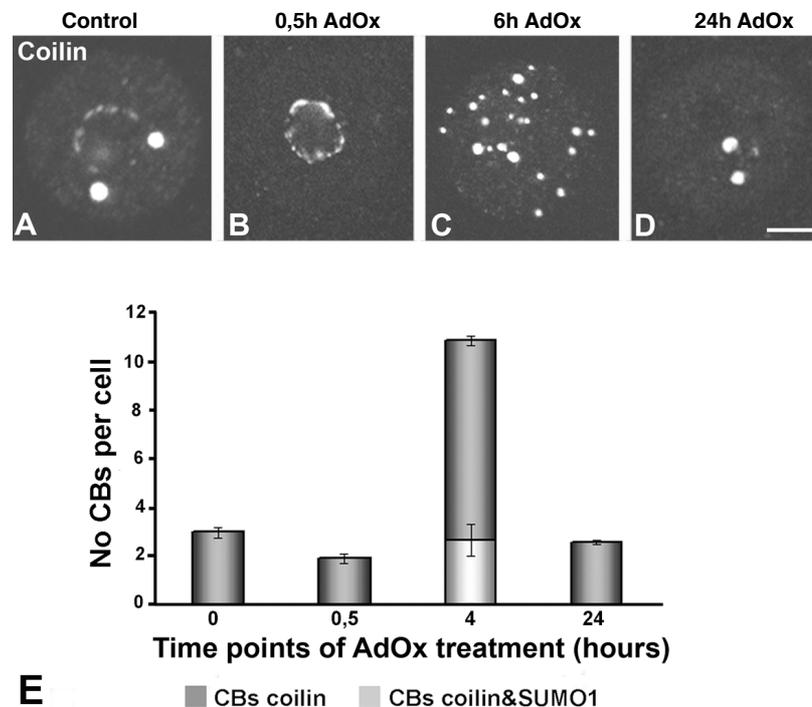


Figura 30. Cambios en el nº de CBs en neuronas del GT inducidos con AdOx.(A-D) Patrón de distribución de la coilina en neuronas control y tratadas con AdOx. La neuronas control (A) y tratadas con AdOx 24 horas (D) exhiben típicos CBs. En B tras 30 minutos con AdOx la coilina se relocaliza alrededor del nucleolo. C. A las 4 horas de tratamiento se detecta una eclosión de CBs. E. Histograma de la distribución de CBs. Nótese la presencia de CBs con SUMO1 a las 4 horas. Los valores son media \pm SDM. Barra de medida 5 μ m.

Finalmente investigamos si los CBs inducidos por el tratamiento con AdOx y enriquecidos en SUMO1 eran CBs canónicos que, además de coilina, contienen snRNPs espliciosomales y SMN (Gall, 2000; Cioce y Lamond, 2005). Experimentos de doble inmunomarcaje mostraron la colocalización de SUMO1 con SMN o con snRNPs espliciosomales en una fracción de CBs (Fig. 31A-F). Es interesante destacar que en las neuronas sensitivas la hipometilación inducida con AdOx, como ocurre en los experimentos de hipometilación inducida con MTA en líneas celulares *MTAP+/+*, producía la relocalización de la coilina en casquetes o rosetas perinucleolares, pero nunca se detectó coilina en el nucleolo. Por otra parte, aunque estudios previos en líneas celulares habían demostrado que AdOx provoca la formación de géminis enriquecidos en SMN (Hebert y cols., 2002; Boisvert y cols., 2002) dicho efecto no se produjo en neuronas del GT.

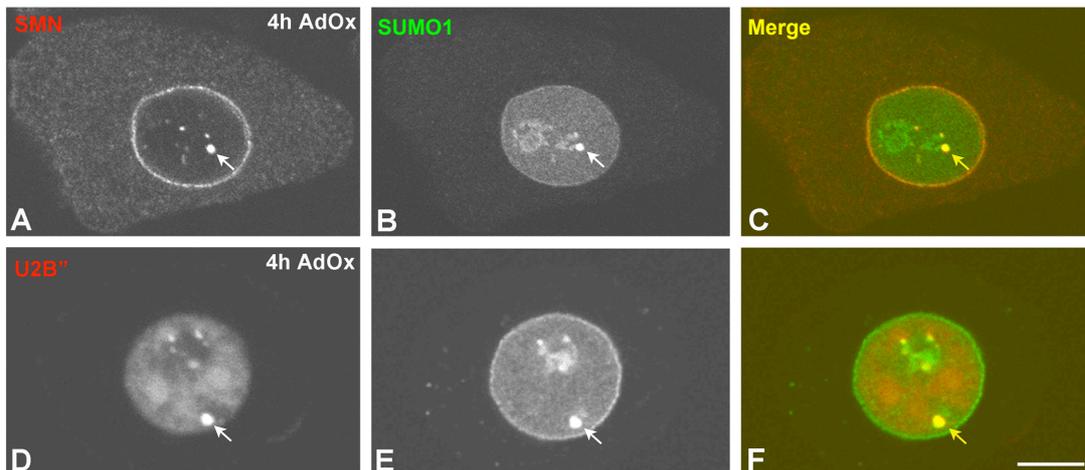


Figura 31. Análisis de la presencia de snRNPs en los CBs que concentran SUMO1 en respuesta al tratamiento con AdOx durante 4 horas en neuronas del GT. En **A-C** coimmunodetección de SMN y SUMO1 que muestra la concentración de ambos componentes moleculares en un CB (flecha). Notese el marcaje de SMN y SUMO1 en la envoltura nuclear así como la localización intranucleolar de SUMO1 (**A, B y E**). En **D-E** doble marcaje de snRNPs espliciosomales con el anticuerpo anti-U2B'' en un CB que también concentra SUMO1 (flecha) en una neurona tratada con AdOx (4 h). Barra de medida 10µm.

4.2.4 Las proteínas coilina y SMN son sustratos de SUMO1

Nuestros resultados demuestran, tanto en líneas celulares como en neuronas del SON y del GT de rata, la presencia de SUMO1 y de Ubc9 en algunos CBs durante el proceso de reformación de estas estructuras, sugiriendo que el ensamblaje del CB puede estar regulado por la sumoilación de proteínas específicas del CB. Para iniciar el estudio de los posibles sustratos del CB que pueden interactuar con SUMO1 hemos seleccionado dos proteínas fundamentales para la organización estructural y funcional del CB, coilina y SMN. Dado que estas proteínas no son sustratos conocidos de

SUMO1, procedimos a investigar mediante el análisis bioinformático con el software SUMOplot (<http://www.abgent.com/tools/SUMO1plot>) si poseían secuencias consenso de sumoilación (Ψ KXE/D). El rastreo bioinformático mostró que la SMN tiene una secuencia consenso alrededor de la lisina K119 y tres secuencias de alta probabilidad en las lisinas K55 (73%), K209 (50%) y K93 (47%). Por su parte, la coilina también posee una secuencia consenso en torno a la lisina K84 y cuatro secuencias de alta probabilidad que incluyen las lisinas K297 (77%), K198 (69%), K526 (67%) y K458 (61%).

Análisis bioinformático "SUMOplot™ Prediction" de las proteínas SMN y coilina humanas.

SMN (humana)			Coilina (humana)		
Posición	Secuencia	Probabilidad	Posición	Secuencia	Probabilidad
K119	IASID FKRE TCVVV	0,85	K84	NDCLR VKLE ERGVA	0,93
K55	SFKHA LKNG DICET	0,73	K297	ADKLA IKLG FSLTP	0,77
K209	PRLGP GKPG LKFNG	0,50	K198	EYKKK AKNP KSPKV	0,69
K93	ASLQQ WKVG DKCSA	0,47	K526	ALREP GKFD LVYHN	0,67
			K458	NPVET PKKD YSLLP	0,61

■ Motivos de alta probabilidad ■ Motivos de baja probabilidad

Una vez establecido que la coilina y la SMN pueden ser dianas de SUMO1, quisimos precisar con microscopia confocal si las dos, o una de ellas, colocalizaban con cuerpos nucleares enriquecidos en la maquinaria de sumoilación. Para este propósito, hemos utilizado las células UR61 indiferenciadas que, como ya hemos comentado anteriormente, poseen de modo natural tres clases diferentes de cuerpos nucleares (Navascués y cols., 2004): coilina-positivos y SMN-negativos, SMN-positivos y coilina-negativos (géminis) y coilina- y SMN-positivos (CBs canónicos). Estas tres modalidades de cuerpos nucleares nos dan la oportunidad de explorar si es la coilina, la SMN o ambas proteínas las que colocalizan con SUMO1 y/o con la enzima de sumoilación Ubc9.

Para detectar simultáneamente coilina, SMN y SUMO1 o Ubc9 hemos realizado experimentos de triple marcaje con anticuerpos que reconocen las proteínas endógenas coilina y SMN en células UR61 que expresaban ectópicamente SUMO1 o Ubc9 con una etiqueta fluorescente (GFP-SUMO1 o DsRed-Ubc9).

Nuestros resultados muestran que algunos CBs positivos para la coilina y SMN (canónicos) concentraban SUMO1 (Fig. 32A-D). Sin embargo, cuando analizamos el comportamiento de los cuerpos géminis y de los cuerpos coilina-positivos y SMN-

negativos (Fig. 32E-L), verificamos que SUMO1 y la enzima Ubc9 se localizaban en los cuerpos géminis, pero no en los cuerpos coilina-positivos que carecían de SMN. Este hallazgo sugiere que la presencia de SMN es requerida para el reclutamiento de SUMO1 en los cuerpos nucleares estudiados y apoya la idea de que SMN es el sustrato principal de SUMO1 en los CBs.

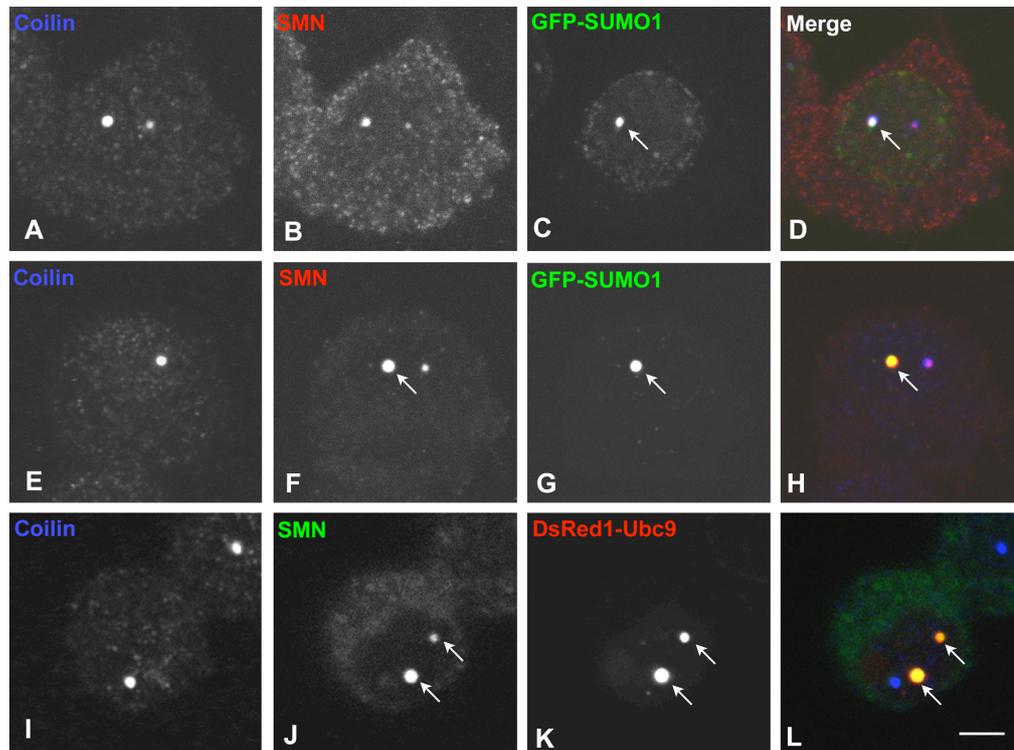


Figura 32. Los cuerpos nucleares GFP-SUMO1 y DsRed1-Ubc9 concentran SMN. A-D. Célula con dos CBs (A y B) uno de los cuales concentra GFP-SUMO1 (C, flecha). **E-H.** Muestra una célula con un CB que concentra coilina y SMN (E y F). Se señala con una flecha un cuerpo que concentra sólo SMN (F) que también concentra GFP-SUMO1. **I-L.** Célula que exhibe un cuerpo de coilina (I) y dos cuerpos SMN-positivos (J, flechas) que concentran la enzima de conjugación DsRed1-Ubc9 (K). Barra de medida 10µm.

La identificación del factor SMN como sustrato de SUMO1 fue reforzada en experimentos de co-expresión de SUMO1 activo y Ubc9 y detección de SMN endógeno por inmunofluorescencia. Como se muestra en la Figura 33 (A-D), los dos componentes de la maquinaria de sumoilación colocalizaban con cuerpos nucleares enriquecidos en SMN.

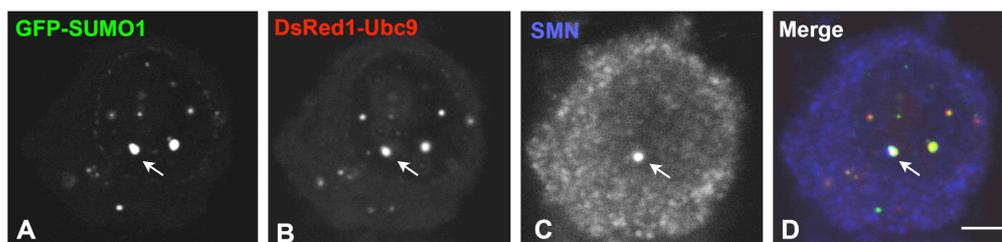


Figura 33. (A-D) Célula que muestra una estricta colocalización de las moléculas ectópicas GFP-SUMO1, DsRed1-Ubc9 en el cuerpo nuclear enriquecido en la proteína SMN (flecha). Barra de medida 10µm.

Estos resultados tienen gran interés porque demuestran, por vez primera, que la proteína SMN y la maquinaria de sumoilación se concentran en CBs canónicos y géminis a la vez que sugiere que SMN es una diana molecular de alta probabilidad de interacción con SUMO1. Por esta razón, en el presente trabajo decimos centrar nuestra investigación en demostrar si SMN interaccionaba con SUMO1 y en el papel que esta interacción puede jugar en la organización estructural y funcional del CB. Dejamos para futuros estudios la posible interacción de SUMO1 con la coilina. Para demostrar si SMN interaccionaba con SUMO1 hemos utilizado células UR61 y MCF7, cuyos extractos nucleares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-SMN, seguido de SDS-PAGE y western blotting (Fig. 34, calles 1-4). En las calles 1 y 3 de la figura 34 se muestra como el anticuerpo anti-SUMO1 reconoce una banda de peso molecular correspondiente al complejo SMN-SUMO1. La misma membrana fue reincubada con un anticuerpo anti-SMN para mostrar los inmunocomplejos precipitados (calles 1 y 3, inferiores). Este resultado demuestra que una fracción de la proteína SMN está interaccionando con SUMO1. La especificidad del ensayo queda verificada al no detectarse ni SUMO1 ni SMN en las coimmunoprecipitaciones controles (Fig. 34, calles 2 y 4).

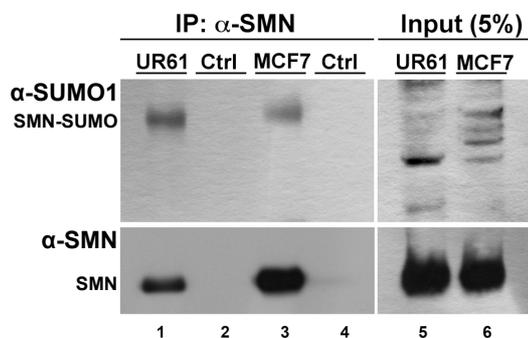


Figura 34. Interacción endógena de SMN con SUMO1 en células UR61 y MCF7. Las calles 1-4 muestran la coIP de SMN en lisados nucleares con anti-SMN. Nótese la presencia de SUMO1 en las bandas correspondientes al complejo SMN-SUMO1 calles 1 y 3 superiores. En las calles 1 y 3 inferiores muestran la proteína SMN endógena IP. El input representa el 5% del lisado utilizado para la coIP (calles 5 y 6).

4.2.5 Mutaciones puntuales en la SMN de las K119 y K55AK119A modifican su comportamiento en el CB

Una vez establecido que la proteína SMN endógena interaccionaba con SUMO1 en las células UR61 y MCF7, concretamos nuestra atención en conocer la repercusión que tendría sobre la organización de los CBs la mutación puntual de las lisinas que tienen mayor probabilidad de ser dianas de SUMO1. Con la finalidad de simplificar nuestro estudio hemos seleccionado las células MCF7, donde la proteína SMN se concentra exclusivamente en CBs. Para modificar la interacción molecular entre SMN y

SUMO1 hemos realizado mutagénesis puntuales del plásmido humano GFP-SMNwt dirigidas a sustituir las lisinas K55 y K119 por un aa que no se modifica postraduccionalmente, la alanina. Con estas mutaciones obtuvimos las construcciones que codificaban GFP-SMN K55A, GFP-SMN K119A y GFP-SMN K55AK119A que se expresaron en las células MCF7.

Antes de proceder a la expresión ectópica de los plásmidos GFP-SMNwt y de sus variantes mutadas quisimos descartar que la proteína GFP que etiquetaba las proteínas de fusión, pudiera interactuar con SUMO1, por sí misma, y enmascarar las posibles interacciones específicas de SUMO1 con las proteínas SMN silvestre y mutadas. El análisis bioinformático con SUMO1plot (<http://www.abgent.com/tools/SUMO1plot>) mostró que, efectivamente, GFP dispone de una secuencia consenso. Era obligado, por tanto, conocer por inmunoprecipitación si GFP interactuaba con SUMO1. Para lo cual, lisados nucleares de células MCF7 que expresaban los plásmidos GFPwt o GFP-SMNwt fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-GFP seguido de SDS-PAGE y western blotting (Fig. 35, calles 1-6). En la calle 1 se muestra como el anticuerpo anti-SUMO1 no reconoce ninguna banda correspondiente al teórico complejo GFP-SUMO1, sin embargo, reconoce específicamente la banda del complejo GFP-SMN-SUMO1 (Fig. 35, calle 2), indicando que GFP-SMN interactúa con SUMO1, al menos en nuestro modelo experimental. La misma membrana fue reincubada con anti-GFP para mostrar los inmunocomplejos precipitados (Fig. 35, calles 4-6).

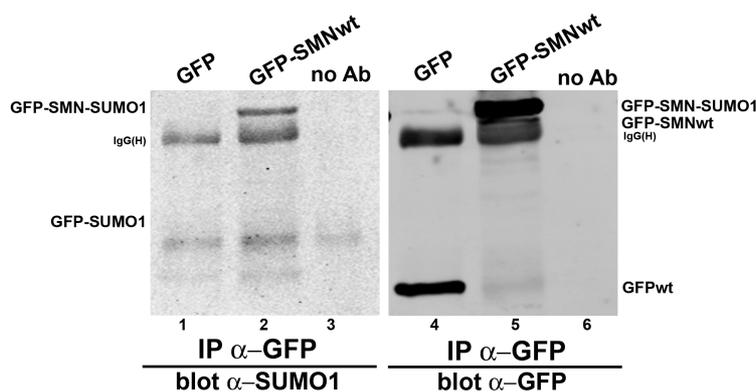


Figura 35. Ensayos de coIP de GFP, GFP-SMNwt con SUMO1. En la calle 1 el complejo GFP-SUMO1 es indetectable mientras que en la calle 2 aparece una banda correspondiente al peso molecular del complejo GFP-SMN-SUMO1. Los complejos coIP se detectaron con anti-GFP (calles 4-5). Las calles 3 y 6 corresponden al control de coIP sin anticuerpo.

Una vez descartado que GFP interactuaba con SUMO1, procedimos a estudiar con microscopía confocal, el patrón de distribución nuclear de las proteínas GFP-

SMNwt y sus variantes mutadas K55A, K119A y K55AK119A. Con este fin realizamos estudios de inmunofluorescencia para la coilina en células transfectadas con los diferentes plásmidos. Como se muestra en la Figura 36, el patrón de distribución de las proteínas de fusión GFP-SMNwt y GFP-SMN K55A es muy similar. Ambas proteínas ectópicas, además de distribuirse de forma difusa en el citoplasma se visualizan en el núcleo en CBs típicos que concentran coilina endógena (Fig. 36A-F). Sin embargo, cuando se sobre-expresa el plásmido GFP-SMN K119A, aunque a nivel citoplasmático no se detectan cambios aparentes, a nivel nuclear se observó la formación de numerosos CBs de pequeño tamaño ($<0,5\mu\text{m}$) y microCBs ($<0,2\mu\text{m}$), todos ellos coilina-positivos (Fig. 36G-I). Por su parte, la expresión del plásmido doblemente mutado GFP-SMN K55AK119A provocó el mismo efecto observado con la expresión de GFP-SMN K119A: formación de CBs pequeños y microCBs enriquecidos en coilina (Fig. 36J-L).

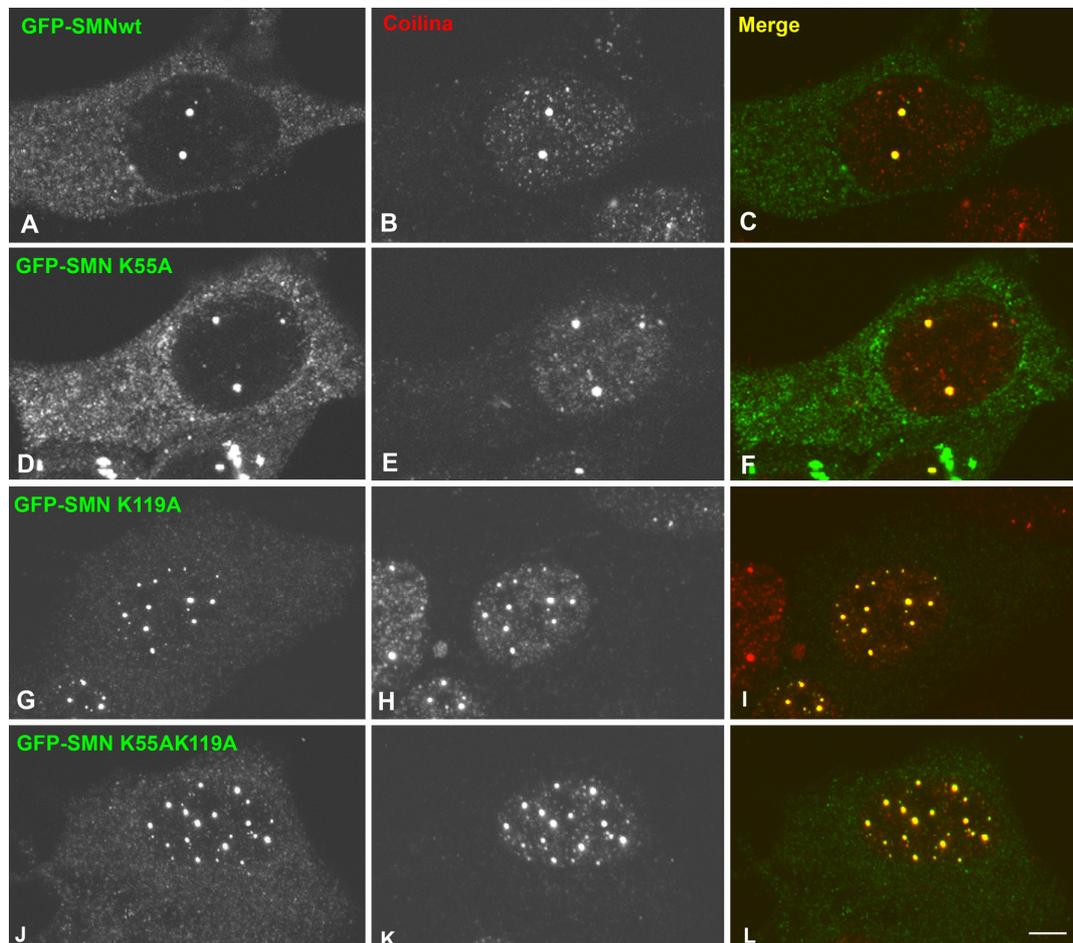


Figura 36. Células MCF7 que sobreexpresan GFP-SMNwt, GFP-SMN K55A, GFP-SMN K119A o GFP-SMN K55AK119A. En **A-C**, la proteína GFP-SMNwt se distribuye difusamente por el citoplasma y forma típicos CBs nucleares que concentran coilina. **D-F** Nótese que el patrón de expresión de GFP-SMN K55A nuclear y citoplasmático es similar a la forma silvestre. En **G-L**, las proteína GFP-SMN K119 induce la formación de numerosos microCBs que concentran coilina. En **J-L** la doble mutación K55AK119A induce mayor eclosión de microCBs que la GFP-SMN K119A. Barra de medida $5\mu\text{m}$

Aunque la colocalización de la coilina con las diferentes proteínas ectópicas de la GFP-SMN indicaba que los cuerpos nucleares eran típicos CBs o microCBs, quisimos conocer si estas estructuras eran capaces de reclutar snRNPs espiiceosomales. Con esta finalidad, combinamos la sobreexpresión de GFP-SMNwt y sus variantes mutadas con inmunofluorescencia para la coilina y el complejo Sm (Fig. 37A-H). Nuestros resultados muestran que los cuerpos inducidos por la expresión de GFP-SMNwt y de sus formas mutadas concentran coilina y el complejo Sm, indicando que la SMN ectópica se ensambla, conjuntamente con las snRNPs espiiceosomales, en cuerpos nucleares.

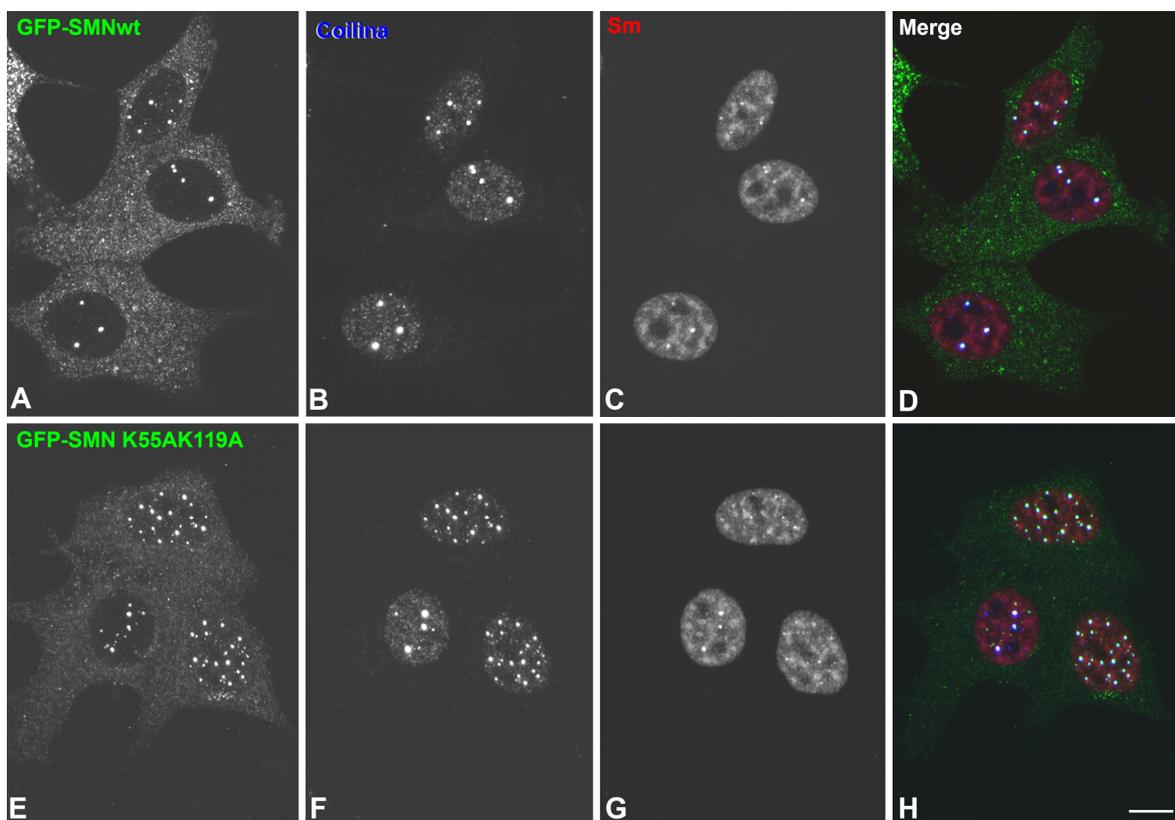


Figura 37. Los CBs inducidos por GFP-SMNwt y GFP-SMN K55AK119A reclutan snRNPs espiiceosomales. En **A-D** la expresión ectópica de la SMN silvestre forma CBs canónicos que reclutan coilina y Sm. En **E-H** la forma doblemente mutada genera la eclosión de microCB enriquecidos en coilina y Sm. Barra de medida 10 μ m.

Otro punto muy importante era investigar el comportamiento de SUMO1 en el proceso de formación de CBs ectópicos inducidos por la expresión de GFP-SMN silvestre o GFP-SMN K55A, así como en la dinámica de los microCBs formados en respuesta a la expresión de GFP-SMN K119A y GFP-SMN K55AK119A. En primer lugar, realizamos experimentos de transfección con los cuatro plásmidos y detectamos

SUMO1 endógeno. La expresión de GFPwt-SMN o GFP-SMN 55KA indujo la formación de CBs típicos de aproximadamente 0,5 μm de diámetro (Fig. 38A y D). El SUMO1 endógeno presentaba su típico patrón nuclear, difuso por el nucleoplasma y concentrado en numerosos cuerpos nucleares identificados como PML (Fig. 38B y E). Además, la mezcla de canales mostró que algunos CBs reclutaban SUMO1 (~15%). Al estudiar la asociación de SUMO1 con los CBs pequeños y microCBs, generados por las formas mutadas SMN K119A y K55AK119A, comprobamos, con gran sorpresa, que la práctica totalidad de los CBs pequeños y microCBs concentraban SUMO1 (Fig. 38G-M).

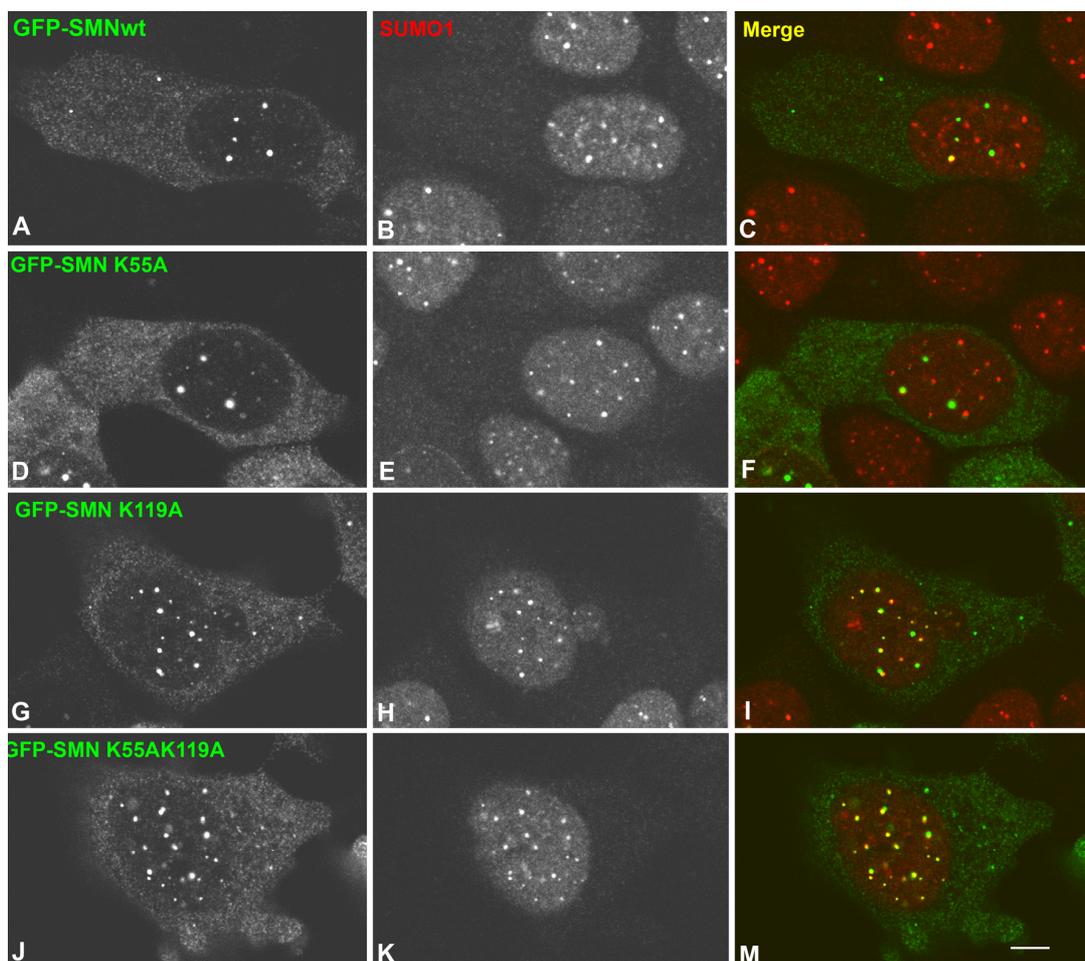


Figura 38. Células MCF7 que sobreexpresan GFP-SMNwt, GFP-SMN K55A, GFP-SMN K119A o GFP-SMN K55AK119A. En A-C, la proteína GFP-SMNwt forma típicos CBs que en ocasiones reclutan SUMO1. D-F. Al sobreexpresar GFP-SMN K55A se reproduce el mismo patrón que la forma silvestre. En G-L, los microCBs inducidos por la proteína GFP-SMN K119A concentran SUMO1. En J-L, la doble mutación K55AK119A potencia la eclosión de microCBs de la GFP-SMN K119A que colocalizan con SUMO1. Barra de medida 5 μm .

Los resultados obtenidos con la microscopía confocal indican, en contra de nuestras previsiones, que la mutación de lisinas de alta probabilidad de sumoilación en la SMN incrementa la presencia de SUMO1 en los microCBs, hasta alcanzar casi el

100% en la doble mutación. Sin embargo, el hecho de que dos moléculas colocalicen en la misma estructura no quiere decir que estén interaccionando molecularmente. Por ello, decidimos investigar si las proteínas de fusión GFP-SMNwt, GFP-SMN K55A, GFP-SMN K119A y GFP-SMN K55AK119A interaccionaban con SUMO1. Realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación en lisados nucleares de células MCF7 que expresaban cada uno de los cuatro plásmidos, inmunoprecipitamos GFP con el anticuerpo anti-GFP, seguido de SDS-PAGE y western blotting (Fig. 39, calles 1-5). En las calles 1-4 (Fig. 39, superiores) se muestra como el anticuerpo anti-SUMO1 reconoce cuatro bandas, a la altura que se corresponde con los pesos moleculares de los complejos GFP-SMNwt-SUMO1, GFP-SMN K55A-SUMO1, GFP-SMN K119A-SUMO1 y GFP-SMN K55AK119A-SUMO1. La presencia de proteína inmunoprecipitada fue confirmada reincubando la misma membrana con anti-SMN (Fig. 39, calles 1-4, inferiores).

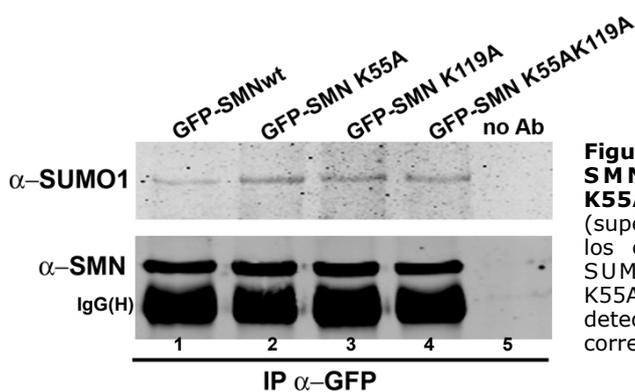


Figura 39. Ensayo de coIP de GFP-SMNwt, GFP-SMN K55A, GFP-SMN K119A, GFP-SMN K55AK119A. Obsérvese como en las calles 1-4 (superiores) anti-SUMO1 detecta las cuatro bandas de los complejos GFP-SMNwt-SUMO1, GFP-SMN K55A-SUMO1, GFP-SMN K119A-SUMO1 y GFP-SMN K55AK119A-SUMO1. La proteína inmunoprecipitada se detectó con anti-SMN (calles 1-4, inferiores). La calle 5 corresponde al control de coIP sin anticuerpo.

Esta prueba bioquímica indica que mutación de la lisina de la secuencia consenso de sumoilación en la SMN no impide que otras lisinas de secuencias no consenso interaccionen con SUMO1, incluso con mayor afinidad. Sin embargo, es muy evidente que el déficit de K119 o de K55 y K119 interfiere con el proceso de fusión de los microCBs en típicos CBs de gran tamaño. Esta es una razón de peso, para proponer que la sumoilación de la lisina K119 es crucial para la formación de los CBs típicos, es decir, que la sumoilación de la secuencia consenso es determinante para que la SMN pueda establecer las interacciones moleculares con otras proteínas nucleadoras del CB. Es muy intrigante conocer si la interacción molecular de SUMO1 con SMN en otras lisinas es inespecífica o determina funciones alternativas que en futuros estudios pretendemos determinar.