



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

SUMO a la retina: expressió gènica i rellevància en la modificació posttaduccional del factor de transcripció NR2E3

Víctor Abad Morales

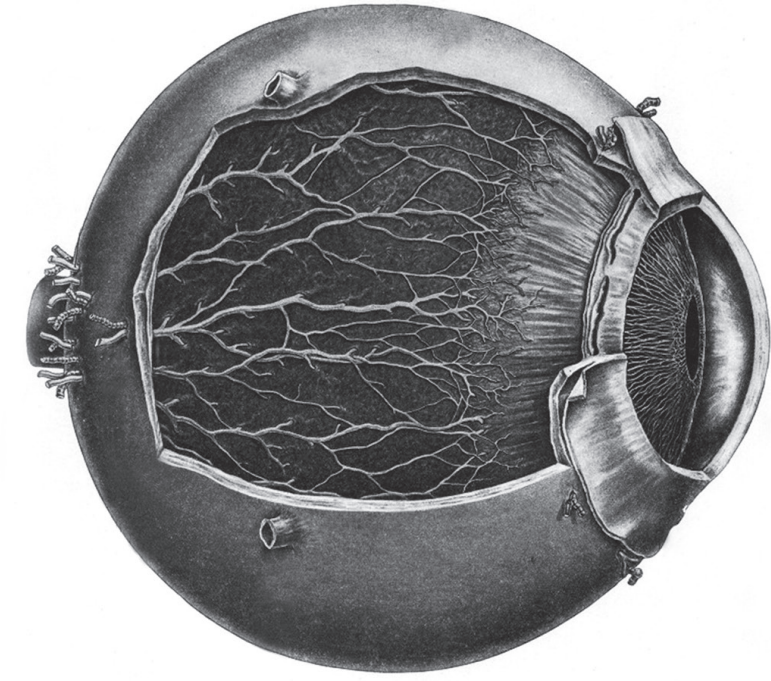
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual 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.



SUMO a la retina: expressió gènica i rellevància en la modificació posttraduccional del factor de transcripció NR2E3



SUMO a la retina: expressió gènica i rellevància en la modificació posttraduccional del factor de transcripció NR2E3

Víctor Abad Morales
Novembre 2016

**SUMO a la retina: expressió gènica i
rellevància en la modificació
posttraduccional del factor de transcripció
NR2E3**

Memòria presentada per

Víctor Abad Morales

Per optar al grau de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Gemma Marfany Nadal

al Departament de Microbiologia, Genètica i Estadística,

Universitat de Barcelona.

Programa de Genètica (H0Q03)

Gemma Marfany Nadal

Víctor Abad Morales

Barcelona, Novembre de 2016

Agraïments

Aquesta tesi és el resultat de l'esforç de molta gent, als qui vull agrair el temps i la paciència que han invertit en mi.

A nivell institucional vull donar les gràcies a la Universitat de Barcelona per acollir-me com a estudiant de màster i doctorat, i a l'Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB) per atorgar-me la beca de finalització de la tesi doctoral. I, per últim, vull recordar la meva estimada Universitat Autònoma, punt de partida de tot el que aquí es culmina.

A nivell personal serà impossible poder fer arribar la meva gratitud a totes aquelles persones que la mereixen, perquè tota la gent del meu voltant ha participat d'una forma o una altra. Així que, ja de bon començament, doneu-vos tots per aludits.

Primerament i, com es obvi, vull agrair a la meva directora i tutora, la Dra. Gemma Marfany Nadal, tot el que ha fet per mi fins arribar a on som avui. Gràcies de tot cor per transmetre'm tot el teu coneixement i passió per la ciència. Perquè al final, tot es resumeix en això: passió. He intentat estar a l'alçada del que se m'exigia i ser al màxim una persona de ciència, amb rigor i dedicació. Segurament no hauré tingut massa èxit, però sàpigues que si en part ho he aconseguit és per la teva feina.

L'altra persona en majúscules per a mi és la Mariona Esquerdo Barragan. Segurament quan tot això passi i ens fem grans, els records es faran borrosos i les cares desconegudes. Però sempre portaré el teu nom lligat a aquests anys i a la meva persona. Has fet de tot i ho has estat tot per a mi durant aquests anys. Sense tu no només no hagués acabat aquest doctorat, sinó que mai hagués sigut la persona que avui sóc. Gràcies per caminar al meu costat.

També vull agrair a l'Àlex Garanto les explicacions, discussions i re-explicacions de gairebé tots els protocols, reactius, aparells, etc. Tu et vas encarregar de fer de mi una persona menys perillosa en un laboratori, i de pas, em vaig endur un amic de per vida.

I és que en matèria d'amics, aquests anys me n'han donat molts, que espero conservar per sempre. Alguns d'ells ja ni tinc el contacte, com el Christian o la Erica. D'altres formen part de whatsapps, viatges i mojitos. Gràcies Judit i Sílvia. Sou el meu cercle més íntim del lab, i unes increïbles persones.

Per descomptat que als membres del lab més actual, Vasilis, Elena i Majo, també vull agrair totes les hores i les anècdotes viscudes. També us vull agrair que, quan us explicava coses, em fessiu sentir escoltat i, fins i tot, reconegut.

Amb el pas dels anys, que al final han resultat ser 6, han passat moltes persones per aquí i totes han deixat una marca. Així doncs, gràcies Amanda, Marina, Pilar, Esther, Sheila, Anna, Mireia, Elena, Sebas i Mari. I especialment, gràcies Marta, perquè ja fa uns quants anys que estem aquí i sempre m'he sentit que en tu m'hi podia recolzar.

Òbviament, també vul agrair aquesta tesi a tota la gent de les altres plantes del departament, i fins i tot d'altres departaments que eren altres i ara són el nostre. I, d'entre tota aquesta gent, gràcies Eudald. Has estat la sorpresa i el retrobament, ets el company i el confident, i sempre seràs l'amic incondicional i la persona permanent.

A nivell més ampli vull agrair a la gent de sempre per patir-me com sempre heu fet. A la gent de la Troupe, que ha anat i vingut, que s'ha juntat i ha crescut. D'entre ells al Xavi, per ser un germà. I a l'Anna, perquè fas de les idees treball, i perquè has fet aquesta preciosa portada. I per descomptat als podrideros, ei mens, samurais i demés.

També al Jan i a la Laura, que em seguíu des d'abans que jo em seguís a mi mateix. Al Creus, amb qui vaig iniciar aquest camí des de l'Autònoma, i que sembla que ja no deixarem mai. Al Bruno i les seves ganes de viure. També a la Clàudia i les birres a la Juani, als tetuaneros i els retrobaments, als bcn meetings i les iniciatives, i a la Núria i tot el que m'has donat. I a tanta i tanta gent que heu estat amb mi en algun moment o altre i que heu fet de mi qui sóc.

I per últim, vull agrair aquesta tesi doctoral a la meva família, perquè petita o gran és la que tinc i la que m'arrela a qui sóc. Als que ja no hi sou i sempre hi sereu, perquè de ben segur esteu orgullosos de mi, i això m'omple. I per damunt de tot i tothom, als meus pares. Vosaltres sou el motiu de la meva vida. I de ben cert que la tesi ha estat una de gran, però és que vosaltres m'heu donat totes les oportunitats.

A tots vosaltres, gràcies.

ÍNDEX

ABREVIATURES	5
INTRODUCCIÓ	11
1. SUMO i la Sumoïlació	13
1.1. Les Modificacions Posttraduccionals (PTMs)	13
1.2. Ubiquitina i UbLs	14
1.3. SUMO	15
1.4. Cicle enzimàtic	16
1.4.1. Lligases E3 de SUMO	18
1.4.2. Proteases de SUMO	20
1.5. Mecanismes moleculars de la sumoïlació	21
1.5.1. Interacció amb UBC9	21
1.5.2. Interacció amb SUMO	21
1.5.3. Interacció amb una E3 lligasa	22
1.6. Efectes de la sumoïlació	22
1.6.1. A nivell molecular	22
1.6.2. A nivell cel·lular	23
SUMO i el cicle cel·lular	23
SUMO i el manteniment de la integritat genòmica	24
SUMO i el transport subcel·lular	24
SUMO i la transcripció	24
1.7. Integració fisiològica de la sumoïlació	25
1.7.1. <i>cross-talk</i> de SUMO i Ubiquitina	25
1.7.2. L'enigma de SUMO	27
2. La retina	28
2.1. Fotoreceptors	30
2.1.1. Morfologia i funció	30
2.1.2. Desenvolupament	32
2.1.3. Factors de transcripció en la diferenciació	32

NR2E3	34
3. SUMO i retina	35
3.1. PIAS3 regula el desenvolupament dels fotoreceptors	35
3.2. HDAC4 promou la supervivència dels fotoreceptors	37
3.3. La retina i SUMO regulen la maquinària circadiària	37
OBJECTIUS	41
MATERIALS I MÈTODES	45
1. Procediments ètics	47
2. Manipulació animal i dissecció de teixits	47
3. Purificació d'RNA i obtenció de cDNA	48
4. RT-qPCR	48
5. Hibridació <i>in situ</i>	49
6. Construccions de plasmidis	51
7. Mutagènesi dirigida	55
8. Cultiu cel·lular i transfecció	55
9. Sincronització del cicle cel·lular	56
10. Anàlisi de la vida mitjana de la proteïna	57
11. Anàlisi de degradació de proteïna via proteasoma	57
12. Obtenció de lisats proteics	57
13. Immunodetecció per <i>Western Blot</i>	58
14. Assaig de BRET	58
15. Assaig de la luciferasa amb promotors específics	60
16. Immunoprecipitació (IP)	61
17. ChiP	61
18. Electroporació de cultius organotípics de retina	63
19. Assajos d'interacció proteica amb el sistema BiOD	64
20. Immunolocalització amb fluorescència	65
RESULTATS	67
1. Anàlisi de l'expressió de l'mRNA dels gens de la via de SUMO en la retina de ratolí adult	69
1.1. Nivells d'expressió de SUMO i els seus enzims en la retina de ratolí	69

1.2.	Variacions en l'expressió gènica induïda per l'exposició a la llum	71
1.3.	Patró espacial de l'expressió dels gens de la via de SUMO	72
1.4.	Comparació dels patrons espacials de l'mRNA i la proteïna	76
2.	Anàlisi de la sumoïlació del factor de transcripció de fotoreceptors NR2E3	78
2.1.	Estudi de l'estabilitat proteica de les formes WT i mutants d'NR2E3	78
2.1.1.	Expressió i degradació d'NR2E3	79
2.1.2.	Vida mitjana	81
2.2.	Estudi de les interaccions d'NR2E3 WT i 123	83
2.2.1.	Dinàmiques d'interacció: l'assaig BRET	83
	Interacció dimèrica d'NR2E3	86
	Interacció d' NR2E3 amb PIAS3	87
	Interacció d'NR2E3 amb HDAC4	89
	Activitat de promotors específics de fotoreceptors	90
1.1.1.	Comprovació de les interaccions: la CoIP	91
	Interacció de diferents formes d'HDAC4 amb NR2E3	93
1.1.2.	Interacció amb promotors específics: la tècnica de ChIP	94
1.1.3.	Noves interaccions amb NR2E3: l'assaig de BioID	96
	Interacció d'NR2E3 amb PIAS3 i HDAC4	102
	Interacció de CBX4 amb NR2E3	103
1.2.	Estudi de la conjugació de SUMO en NR2E3	104
1.2.1.	Identificació de la modificació d'NR2E3 en K185	105
1.2.2.	Comprovació de la conjugació d'NR2E3 amb SUMO2	107
1.2.3.	Efecte d'UBC9 en la sumoïlació d'NR2E3	109
1.3.	Estudi de la localització cel·lular d'NR2E3 i els seus interactors	112
1.3.1.	Localització subcel·lular durant les diferents fases del cicle cel·lular	116
	DISCUSSIÓ	119
1.	Rellevància de l'expressió de SUMO i els enzims del seu metabolisme a retina	121
1.1.	Expressió dels gens de la via de SUMO i alguns factors de transcripció de fotoreceptors a la retina de ratolí	121
1.2.	Variacions dels nivells d'expressió en les diferents condicions de llum/foscor	123

1.3.	Localització de l'expressió dels gens de la via de SUMO a la retina	124
2.	Sumoïlació del factor de transcripció retinal NR2E3	125
2.1.	Estabilitat proteica d'NR2E3 WT i NR2E3 123	126
2.2.	Interacció dimèrica d'NR2E3 WT i NR2E3 123	127
2.3.	Interacció d'NR2E3 WT i NR2E3 123 amb PIAS3	127
2.4.	Interacció d'NR2E3 WT i NR2E3 123 amb HDAC4	129
2.5.	Interacció d'NR2E3 WT i 123 amb CBX4	130
2.6.	Estudi del conjunt d'interaccions d'NR2E3 WT i 123	132
2.7.	Sumoïlació d'NR2E3	133
2.8.	E3 lligases de SUMO per NR2E3	134
2.9.	Localització cel·lular d'NR2E3, CBX4 i HDAC4	135
	CONCLUSIONS	139
	BIBLIOGRAFIA	143
	ANNEX 1	161
	PUBLICACIÓ 1	163
	ANNEX 2	175
	PUBLICACIÓ 2	177



ABBREVIATURES



Abreviatura	Nom complert
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophtalmology</i>
AS	<i>Antisense</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
bio	Seqüència biotinilable
BMAL1	<i>Brain and muscle ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)- like 1</i>
BMI1	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
BSA	<i>Bobine serum albumine</i>
C-	Control negatiu
CB	Cos cel·lular
cDNA	DNA complementari
CEEA	Comitè Ètic d'Experimentació Animal
CERKL	<i>Ceramide kinase like</i>
ChIP	<i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i>
CHX	Cicloheximida
CLOCK	<i>Circadian Locomoter Output Cycles Kaput Protein</i>
CNS	Sistema nerviós central
CoIP	co-Immunoprecipitació
CRX	<i>Cone-rod homeobox</i>
CRY	<i>Chryptochrome</i>
CTBP	<i>C-terminal-binding protein</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
D	Àcid aspàrtic
DAAM	Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DBD	Domini d'unió a DNA
DESI1	<i>Desumoylating isopeptidase-1</i>
DESI2	<i>Desumoylating isopeptidase-2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMNT3	<i>DNA methyltransferase 3</i>
DTT	<i>1,4-Dithiothreitol</i>
DUB	<i>Deubiquitinating enzymes</i>
E	Àcid glutàmic
E19	Dia embrionari 19
EDTA	<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>
EGR2/KROX20	<i>Early Growth Response 2</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ER α	Receptor d'estrògens α
ESCS	<i>Enhanced S-cone syndrome</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Fwk10	Setmana fetal 10

ABREVIATURES

G	Glicina
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GCL	Capa de les cèl·lules ganglionars
gDNA	DNA genòmic
GNAT	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1</i>
HD	<i>Huntington Disease</i>
HDAC4	<i>Histone deacetylase 4</i>
HDAC7	<i>Histone deacetylase 7</i>
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
Hes1	<i>Hairy and enhancer of split-1</i>
HTT	<i>Huntingtin</i>
I	Isoleucina
ICC	Immunocitoquímica
IHC	Immunohistoquímica
I κ B α	<i>Inhibitor of NFκB α</i>
INL	Capa nuclear interna
IP	Immunoprecipitació
Ip	<i>Input</i>
IPL	Capa plexiforme interna
IS	Segment intern de fotoreceptors
ISH	Hibridació <i>in situ</i>
K	Lisina
LBD	Domini d'unió a lligand
Lhx2	<i>LIM-homeobox 2</i>
L-OPS	L-opsina
mBU	<i>miliBRET Units</i>
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor-2</i>
MEK1	<i>Meiotic chromosome-axis-associated kinase 1</i>
min	minuts
MMS21	<i>Methyl methanesulfonate sensitivity-related protein</i>
M-OPS	M-opsina
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MUL1	<i>mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1</i>
NEDD8	<i>Neural precursor cell expressed developmental down-regulated 8</i>
NEM	N-Etilmaleimida
NF κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
Notch1	<i>Notch homolog 1</i>
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
NR2E3	<i>Nuclear receptor subfamily 2 group E member 3</i>
NRL	<i>Neural retinal leucine-zipper</i>
ONL	Capa nuclear externa
Op	<i>Output</i>
OPL	Capa plexiforme externa
OPN4	Melanopsina

OS	Segment extern de fotoreceptors
OTX2	<i>Orthodenticle homeobox 2</i>
P60	Dia postnatal 60
PAX6	<i>Pair box 6</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PC2/CBX4	<i>Polycomb protein 2</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PEI	Polietilenimina
PER	<i>Period</i>
PFA	Paraformaldehid
PhR	Fotoreceptor
PIAS1-4	<i>Protein inhibitor of activated STAT 1-4</i>
PML	<i>promyelocytic leukemia nuclear body</i>
Pmt3	<i>Schizosaccharomyces pombe homologue of Smt3</i>
PPH3	<i>PhosphoHistone H3</i>
PRC1	<i>Polycomb repressive complex 1</i>
PTM	<i>Post-translational modification</i>
RANBP2	<i>Ran-binding protein 2</i>
RANGAP1	<i>Ran-GTPase-activating protein 1</i>
RASD2	<i>RASD family, member 2</i>
RHO	Rodopsina
RHT	Tracte retinohipotàlamic
Rluc	<i>Renilla Luciferase</i>
RNF4	<i>RING finger protein 4</i>
ROR β	<i>RAR-related orphan receptor β</i>
RP	Retinosi pigmentària
RPC	<i>Retinal progenitor cell</i>
RPE	Epiteli pigmentari
rpm	revolucions per minut
RT	Temperatura ambient
RT-qPCR	PCR quantitativa de transcripció reversa
RX1	<i>Retinal homeobox 1</i>
RXR γ	<i>Retinoic acid receptor γ</i>
S	<i>Sense</i>
S	Sobrenedant
SAE1	<i>SUMO-activating enzyme 1</i>
SAE2	<i>SUMO-activating enzyme 2</i>
SCN	Nucli supraquiasmàtic
SENP	<i>Sentrin/SUMO-specific proteases</i>
SIM	<i>SUMO-interacting motif</i>
SIX3	<i>Sine oculis-related homeobox 3</i>
SIX6	<i>Sine oculis-related homeobox 6</i>
SIZ1	<i>SAP and Miz-finger domain-containing protein 1</i>
SLX5/SLX8	<i>SUMO-Targeted Ubiquitin ligases complex subunit 5/8</i>

ABREVIATURES

SMT3	<i>Suppressor of mitotic 3</i>
S-OPS	S-opsina
SP-RING	<i>Domini zinc finger RING-like</i>
STUb1	<i>SUMO-Targeted Ubiquitin ligases</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
SUP	<i>SUMO protease</i>
TDG	<i>Thymine-DNA glycosylase</i>
TLS	<i>Translocated in liposarcoma</i>
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TOP2	<i>DNA topoisomerase II</i>
TOPORS	<i>topoisomerase I-binding, arginine/serine-rich</i>
TRAF7	<i>Tumor-necrosis-factor-associated protein 7</i>
TRβ2	<i>Thyroid hormone receptor β2</i>
TTFL	<i>transcriptional-translational feedback loop</i>
Ub	<i>Ubiquitin</i>
UB	Universitat de Barcelona
UBC9	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme 9</i>
UBC9~SUMO	Enzim E2 conjugador UBC9 carregat amb SUMO
UbL	<i>Ubiquitin-Like protein</i>
USPL1	<i>Ubiquitin-specific protease-like 1</i>
V	Valina
VSX2	<i>Visual system homeobox 2</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WB1	<i>Wash Buffer 1</i>
WT	<i>Wild-type</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
Ψ	Residu hidrofòbic



INTRODUCCIÓ



1. SUMO I LA SUMOÏLACIÓ

1.1. LES MODIFICACIONS POSTTRADUCCIONALS (PTMs)

La complexitat del proteoma de les cèl·lules eucariotes és entre dos i tres ordres de magnitud major a la predita per la capacitat codificant del seu genoma. En humans, es calcula que el genoma consta d'uns 20.000–25.000 gens¹, mentre que el nombre total de proteïnes s'estima en més d'1 milió. Per tant, un sol gen codifica per múltiples proteïnes (Figura 1).

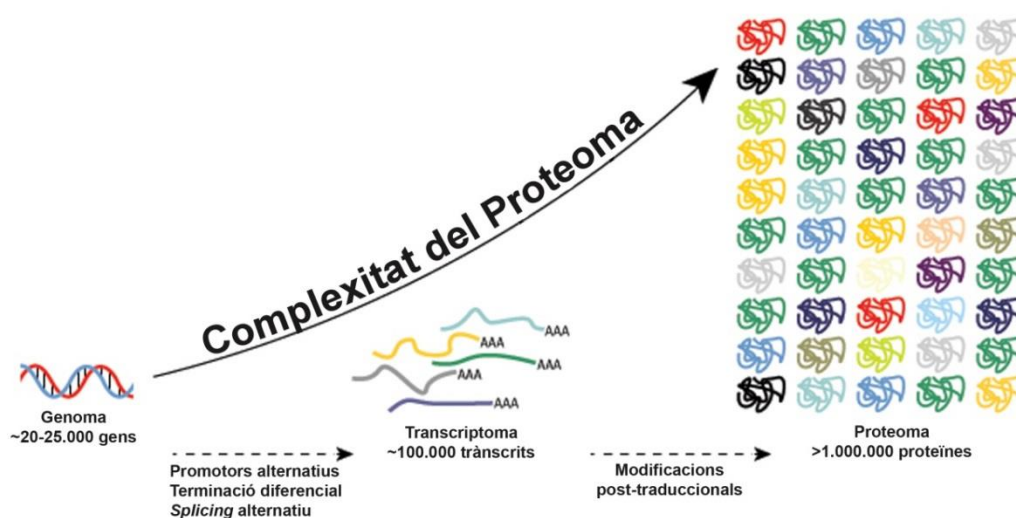


FIGURA 1. INCREMENT DE LA COMPLEXITAT DEL PROTEOMA. Figura adaptada de ThermoFisher Scientific

(<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html>).

Aquest increment de la complexitat del proteoma es dona a diferents nivells. D'una banda, es poden donar mecanismes com la recombinació genòmica, els promotors alternatius, la terminació diferencial, o el *splicing* alternatiu dels transcrits, que generen diferents mRNAs a partir d'un sol gen². De l'altra, es troben el conjunt de les anomenades modificacions posttraduccionals (o PTMs, de l'anglès *post-translational modifications*).

Les PTMs consisteixen en la modificació covalent i generalment enzimàtica d'un residu aminoacídic per mitjà de la unió de petites molècules (com succeeix a la fosforilació, l'acetilació o la metilació), glúcids, lípids o pèptids (com a la ubiquitinació), aquests últims mitjançant enllaços isopeptídics a partir d'una cadena lateral. Així, es

INTRODUCCIÓ

genera un sistema de control ràpid i eficient de l'activitat de proteïnes ja existents, bàsic per a la senyalització i el funcionament cel·lulars. A més, les diferents PTMs es poden donar en múltiples residus d'una mateixa proteïna, oferint una combinatòria que es tradueix en una major complexitat biològica.

Així doncs, la integració del conjunt de PTMs en un codi coherent i global és una prioritat per tal d'entendre les xarxes de regulació dels diferents processos cel·lulars, fisiològics, patològics i del desenvolupament.

1.2. UBIQUITINA I UBLs

La ubiquitina (Ub) és una petita proteïna reguladora (8,5 kDa) molt conservada en tots els organismes eucariotes. La seva conjugació a una proteïna diana s'anomena ubiquitinació, i es caracteritza per ser un procés enzimàtic reversible que comporta un consum d'energia en forma d'ATP. Aquesta modificació pot implicar canvis en la proteïna substrat a nivell d'activitat, localització o interacció. No obstant, la conseqüència funcional més estudiada és la degradació a través del complex de proteasoma³.

Tot i que la ubiquitinació és la modificació més coneguda i estudiada, existeixen d'altres proteïnes semblants a la Ub, anomenades genèricament com a proteïnes modificadores *Ubiquitin-like* (UBL). Les UBLs són proteïnes estructuralment similars a la ubiquitina que es processen, activen, conjuguen i deconjuguen en reaccions enzimàtiques anàlogues a les de la ubiquitinació. A mamífers, se n'han descrit al voltant de 20 UBLs, molt conservades al llarg del regne eucariota. D'entre les més estudiades, destaca NEDD8 (*Neural precursor cell expressed developmental down-regulated 8*), i SUMO, respectivament implicats en els processos de neddilació i sumoilació, essent aquest últim objecte d'estudi d'aquesta tesi doctoral (Figura 2).

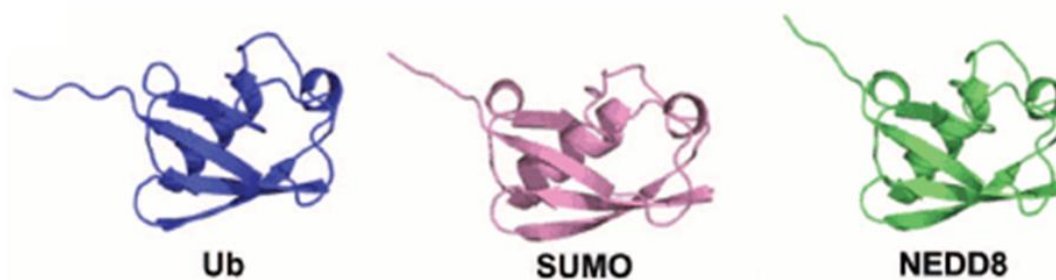


FIGURA 2. UB I UBLs. Estructura tridimensional de les proteïnes humanes Ub, SUMO i NEDD8. Figura adaptada⁴.

1.3. SUMO

La proteïna SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) és un petit pèptid d'aproximadament 12 kDa, essencial per al correcte funcionament de totes les cèl·lules eucariotes, que va ser identificada per primera vegada l'any 1996 per quatre grups independents⁵⁻⁸. Igual que la resta de membres de la seva família –les UbLs–, és una proteïna molt semblant a la ubiquitina, amb la que comparteix un 18% d'identitat en la seqüència i un 48% de similitud en l'estructura tridimensional⁹ (Figura 2).

Tot i ser una proteïna present en totes les cèl·lules eucariotes, el seu grau de complexitat varia entre espècies. Així, alguns organismes només tenen un tipus de SUMO, com és el cas dels llevats *Saccharomyces cerevisiae* amb *Smt3*, o *Schizosaccharomyces pombe* amb *Pmt3*. Per aquests organismes SUMO té un rol essencial, ja que la deleció del gen *Pmt3* causa una greu disfunció en el creixement¹⁰, mentre que la de *Smt3* resulta en la pèrdua de la viabilitat cel·lular¹¹. Altres exemples d'espècies amb només una proteïna SUMO són *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*, en els que hi juga un paper crític en el desenvolupament¹².

En canvi, en el cas dels mamífers trobem fins a 4 paràlegs diferents, anomenats SUMO1-4. SUMO1 va ser descrita per primera vegada com a modificador covalent en l'estudi de la sumoïlació de la proteïna de porus nuclear RanGAP1 (*Ran-GTPase-activating protein 1*)¹³. A nivell de seqüència, és la més diferent de les quatre, compartint únicament un 47% d'identitat amb els paràlegs SUMO2 i SUMO3. En canvi, aquestes últimes només varien, entre elles, en tres residus de l'extrem N-terminal, pel que se les acostuma a agrupar com a SUMO2/3. Inicialment, van ser predites a partir de cerques en bases de dades¹⁴ tot i que, posteriorment, es van poder purificar i detectar la seva conjugació a altres proteïnes diana¹⁵. Pel que fa al quart paràleg, SUMO4, va ser predit a partir de seqüències de DNA genòmic, amb un 87% d'identitat amb la seqüència aminoacídica amb SUMO2. A partir de la seva seqüència, es va conjugar experimentalment en la seva forma madura, expressada exògenament en cèl·lules sota condicions d'estrès extrem¹⁶. No obstant, l'absència d'introns en la seva seqüència, la manca de detecció de proteïna endògena i les incògnites en la possible maduració i processat, fan que SUMO4 encara no es consideri plenament una proteïna SUMO funcional^{17,18}.

Pel que fa a la seva estructura terciària, les proteïnes SUMO es caracteritzen per un plegament central de conformació β globular –característic de la Ub– i per un motiu di-

INTRODUCCIÓ

glicina C-terminal que permet la seva conjugació (Figura 2). A més, en el cas de SUMO2/3 trobem un lloc de sumoïlació intern. Aquesta diferència respecte SUMO1 fa que els paràlegs de SUMO en mamífers presentin diferents capacitats de conjugació, tant *in vitro* com *in vivo*¹⁹. D'aquesta forma, SUMO2/3 poden formar cadenes de polisumoïlació a partir de la conjugació consecutiva de molècules de SUMO a la lisina interna. Per contra, SUMO1 només es detecta com a monòmer o finalitzant les cadenes de poliSUMO2/3^{7,19,20}. No obstant, s'han aconseguit formar cadenes de poliSUMO1 *in vitro* en presència de SUMO1 en excés i de la proteïna substrat RanBP2 (*Ran-binding protein 2*)²¹.

1.4. CICLE ENZIMÀTIC

La sumoïlació es defineix com la conjugació covalent i reversible d'una proteïna SUMO a una proteïna diana. Aquesta conjugació es dona per mitjà de la formació d'un enllaç isopeptídic entre SUMO i una lisina de la proteïna substrat, gràcies a l'acció de diversos enzims. Normalment, aquesta lisina es troba dins d'una seqüència -o motiu-consens²², tot i que també s'han descrit conjugacions a lisines en motius no-consens²³. A nivell funcional, la sumoïlació actua com a mecanisme de senyalització cel·lular i intervé en la regulació de processos essencials per al desenvolupament i el metabolisme, com ho són el transport nucli-citoplasma, l'apoptosi o la transcripció, entre d'altres²⁴⁻²⁷.

El cicle de la sumoïlació és un procés reversible molt semblant al de la ubiquitinació, en el que hi participen de forma jeràrquica i consecutiva diversos grups d'enzims (E1, E2, E3 i proteases) encarregats de l'activació, conjugació i deconjugació de la proteïna SUMO a la lisina diana (Figura 3). Tot i que les reaccions enzimàtiques d'ambdues modificacions són essencialment iguals, el nombre total d'enzims que intervenen en la sumoïlació és molt reduït en comparació amb els implicats en la ubiquitinació (l·listats a la Taula 1). A més, en el cas de la sumoïlació cal un pas previ de maduració de SUMO per tal d'iniciar el cicle.

Així, el cicle de la sumoïlació parteix de la síntesi d'un precursor inactiu de SUMO, que necessita un tall a C-terminal realitzat per un membre de la família de les SENPs (*sentrin/SUMO-specific proteases*). D'aquesta manera queda exposat un motiu di-glicina que possibilita la conjugació de la proteïna²⁸. Un cop la proteïna SUMO és madura, el següent pas és la seva activació, en un procés dependent d'ATP dut a terme per l'enzim activador E1, un heterodímer que en mamífers està format per SAE1 (*SUMO-*

activating enzyme 1) i SAE2²⁹. D'aquesta forma, es genera un enllaç tioèster entre el sofre de la cisteïna del centre actiu de SAE2 i l'oxigen de la glicina C-terminal de SUMO.

A continuació, SUMO és transferit a l'únic enzim conjugador E2, anomenat UBC9 (*Ubiquitin-conjugating enzyme 9*), formant novament una unió tioèster amb la cisteïna del seu centre actiu³⁰⁻³⁵. No solament és l'únic E2 del cicle de la sumoïlació sinó que, a més, té la capacitat de lligar SUMO directament al motiu consens de sumoïlació d'algunes proteïnes diana, tot i que amb molt baixa afinitat^{22,36}. De fet, es poden arribar a sumoïlar determinats substrats *in vitro* únicament amb E1 i altes concentracions de UBC9. No obstant, en contextos fisiològics és necessària la interacció *in vivo* amb una lligasa E3 per al reconeixement específic i eficient de la proteïna a sumoïlar³⁷. Per tal de donar reversibilitat a la modificació, un conjunt de SUMO proteases (SUPs), entre les que també s'hi troben les SENPs, s'encarreguen de deconjugar la proteïna SUMO de la proteïna diana (Figura 3).

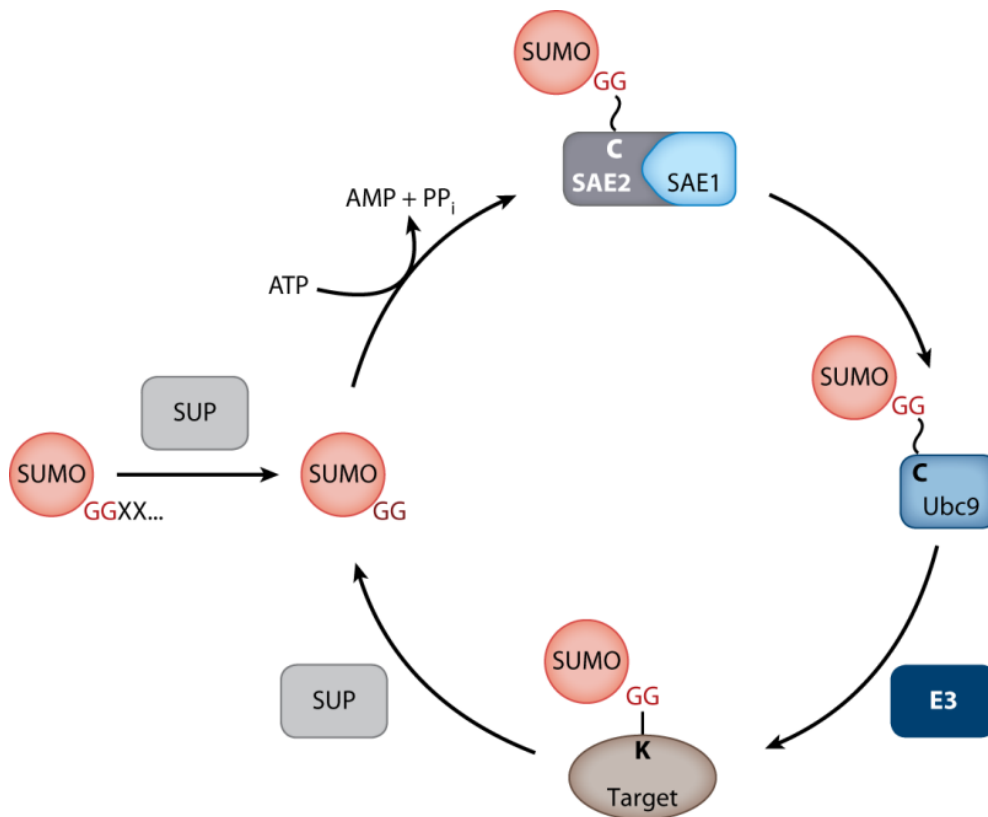


FIGURA 3. Cicle enzimàtic de la sumoïlació, amb els seus processos i enzims responsables. La proteasa de SUMO (SUP) s'encarrega de la maduració del precursor de SUMO. SUMO madur és activat per l'heterodímer E1 (SAE1 i SAE2) i transferit a la cisteïna del centre actiu de l'enzim E2 (UBC9). A continuació, mitjançant el reconeixement específic de l'enzim E3, SUMO és conjugat amb un enllaç isopeptídic a una lisina (K) d'una proteïna diana (Target). El procés és reversible per l'acció d'una SUP que deconjuga SUMO de la proteïna diana³⁷.

TAULA 1. Proteïnes i enzims del cicle de SUMO en llevat i mamífers.

Família de proteïnes	Llevat (<i>S. Cerevisiae</i>)	Mamífers
SUMO	Smt3	SUMO1 SUMO2 SUMO3
SUMO E1	Aos1 Uba2	SAE1 SAE2
SUMO E2	Ubc9	UBC9
SUMO E3		CBX4 EGR2 HDAC4 HDAC7A Mms21 MMS21 MUL1 Siz1 PIAS1 PIAS2 Siz2 PIAS3 PIAS4 RANBP2 RASD2 TOPORS TLS TRAF7
SUMO proteases	Ulp1 Ulp2	DESI1 DESI2 SENP1 SENP2 SENP3 SENP5 SENP6 SENP7 USPL1

1.4.1. LLIGASES E3 DE SUMO

Les lligases E3 de SUMO s'encarreguen de catalitzar la transferència de la proteïna SUMO des de l'enzim E2 a la lisina diana de la proteïna substrat³, actuant com a mediadores o estabilitzadores de la sumoïlació. Així, poden fer d'*scaffold* posant en contacte la proteïna substrat amb UBC9 carregada amb SUMO (UBC9~SUMO), o bé poden bloquejar la flexibilitat de l'enllaç tioèster d'UBC9~SUMO, en una orientació que afavoreixi l'atac nucleofílic de la lisina diana.

A diferència del cicle de la ubiquitinació, el nombre de lligases E3 de SUMO descrites és, a dia d'avui, molt reduït (en mamífers, trobem un total de 15 lligases, en comparació amb les aproximadament 660 E3 de la Ub). Una de les més estudiades és la família de Siz/PIAS (*Protein inhibitor of activated STAT*), formada per PIAS1-4³⁸⁻⁴². Aquestes lligases contenen tres motius conservats característics: (i) un domini PINIT N-

terminal, important en el reconeixement del substrat, (ii) un domini central *zinc finger RING-like* (SP-RING), que reconeix UBC9 i afavoreix la sumoïlació⁴³, i (iii) un domini C-terminal d'interacció amb SUMO. D'aquesta forma actuen com a *scaffold* per a la modificació de la proteïna diana, d'igual forma que les lligases E3 de Ub que contenen el domini RING.

A nivell funcional, les proteïnes PIAS tenen un paper molt rellevant en la regulació de la transcripció, no només per la seva activitat E3 lligasa, sinó també per la seva capacitat d'unió no covalent a proteïnes sumoïlades⁴⁴. Tot i que la família PIAS n'és l'exemple més característic, existeixen altres proteïnes que contenen el domini SP-RING i que també han estat descrites com a lligases E3 de SUMO. Entre elles hi trobem TOPORS (*topoisomerase I-binding, arginine/serine-rich*)⁴⁵, MUL1 (*mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1*)⁴⁶ i MMS21⁴⁷⁻⁴⁹. És important destacar el cas de TOPORS, ja que és la primera lligasa dual de SUMO i Ub^{45,50}, fet que suggereix un paper central d'aquesta lligasa en el *cross-talk* entre sumoïlació i ubiquitinació, observat en alguns substrats i que es discutirà més endavant.

Existeixen altres lligases E3 de SUMO que actuen de forma similar a les anteriors, però que no contenen cap domini SP-RING. És el cas, per exemple, del membre de la família de les proteïnes Polycomb PC2/CBX4⁵¹ (referit a partir d'ara com a CBX4 per simplicitat), que forma part del complex multimèric PRC1 (*polycomb repressive complex 1*). Aquesta proteïna és capaç d'unir-se i promoure la conjugació de SUMO1 en substrats com CTBP (*C-terminal-binding protein*)⁵¹⁻⁵³, CTCF (*CCCTC-binding factor*)⁵⁴ o DNMT3 (*DNA methyltransferase 3*)⁵⁵. També s'ha descrit com, per mitjà de la sumoïlació, contribueix en el reclutament de la proteïna del complex PC BMI1 a llocs de dany al DNA⁵⁶.

De forma similar, HDAC4 (*histone deacetylase 4*)^{57,58} i HDAC7⁵⁹, el factor de transcripció KROX20/EGR2⁶⁰, la proteïna G Rhes/RASD2⁶¹, la proteïna d'unió a RNA TLS (*translocated in liposarcoma*)⁶² i TRAF7 (*tumor-necrosis-factor-associated protein 7*)⁶³, també han estat descrites com a lligases E3 de SUMO sense domini SP-RING que funcionen com a mòduls de reconeixement de substrats.

En canvi, RanBP2 és la única lligasa amb un mecanisme molecular diferent. Aquesta nucleoporina va ser una de les primeres lligases E3 de SUMO descrites, i és fonamental en el paper de la sumoïlació en el transport nucli-citoplasma^{21,64}. No obstant, i a diferència de la resta de lligases, RanBP2 no s'uneix a la proteïna substrat,

INTRODUCCIÓ

tot i promoure'n la seva sumoïlació. Estudis estructurals postulen que actua posicionant UBC9~SUMO1 en una conformació que provoca la transferència de SUMO1 a la proteïna substrat^{64,65}.

1.4.2. PROTEASES DE SUMO

El darrer grup d'enzims que tanquen el cicle de la sumoïlació són les proteases de SUMO. Es tracta d'un conjunt de cisteïna proteases que s'encarreguen de la maduració i de la deconjugació de les proteïnes SUMO -o desumoïlació-, per mitjà de les seves activitats hidrolasa i isopeptidasa, respectivament. Tot i que la maduració de SUMO és essencial per a l'inici de la sumoïlació, no s'han trobat evidències que indiquin que estigui regulada o que pugui ser un factor limitant en el conjunt del cicle. Per contra, la desumoïlació és un procés determinant i molt controlat, que dona reversibilitat i dinamisme a la modificació. Mentre que en el cas de la ubiquitinació hi ha descrites gairebé 100 proteases o DUBs (*Deubiquitinating enzymes*), menys d'una desena d'enzims conformen el conjunt de les proteases de SUMO.

La primera isopeptidasa descrita va ser Ulp1 en llevats⁶⁶. A partir de la seva seqüència, noves proteases van ser identificades en altres organismes⁶⁷⁻⁷¹. En el cas dels mamífers es va trobar la família de les SENPs (SEN1-3 i SEN5-7), que difereixen en la seva distribució cel·lular, especificitat pels diferents paràlegs de SUMO i preferència per les activitats de maduració i deconjugació. SEN1/2 són principalment responsables de la maduració de SUMO, i participen en la deconjugació tant de SUMO1 com de SUMO2/3⁷²⁻⁷⁴. SEN3/5 actuen traient les formes monomèriques de SUMO2/3 de la proteïna substrat⁷⁵⁻⁷⁷, mentre que SEN6/7 editen les cadenes de poliSUMO2/3^{78,79}. Pel que fa a la seva localització subcel·lular, SEN1/6/7 són principalment nucleoplasmàtiques, mentre que SEN2 es troba ancorada als complexos de porus nuclear. En canvi, SEN3/5 estan molt enriquides als nuclèols. Curiosament, tot i que SEN4 es troba anotada en algunes bases de dades, no existeix cap seqüència EST (*Expressed Sequence Tag*) que codifiqui la proteïna, pel que se la considera un pseudogèn⁸⁰.

Posteriorment es van descriure altres proteases de SUMO que únicament presenten activitat isopeptidasa. D'una banda trobem DESI1 (*desumoylating isopeptidase-1*) i DESI2⁸¹, que presenten una alta especificitat per determinats substrat. De l'altra, USPL1 (*Ubiquitin-specific protease-like 1*), una proteïna dels cossos de Cajal únicament eficient en la deconjugació de les cadenes de poliSUMO2/3⁸².

1.5. MECANISMES MOLECULARS DE LA SUMOÏLACIÓ

La sumoïlació d'una proteïna substrat implica necessàriament la interacció de l'enllaç tioèster de UBC9~SUMO amb la lisina diana, ja sigui de forma directa, o per mitjà d'una lligasa E3 de SUMO. Aquest reconeixement de la proteïna diana es pot donar a través de tres mecanismes diferents, no necessàriament excloents, per mitjà de la interacció amb UBC9, amb SUMO o amb una E3 lligasa. (Figura 4).

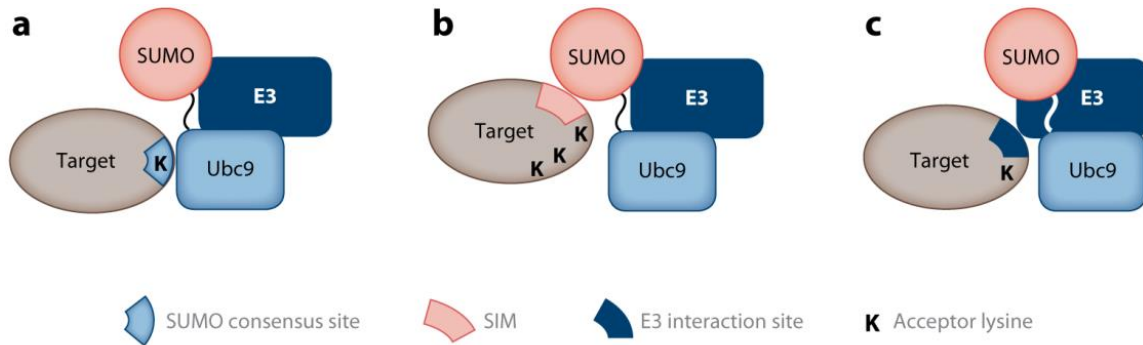


FIGURA 4. Mecanismes moleculars de la sumoïlació. La sumoïlació de la proteïna diana en una lisina acceptora (K) es pot donar per la interacció (a) d'un motiu consens (SUMO consensus site) amb UBC9, (b) d'un motiu SIM amb SUMO o (c) de la proteïna diana amb una E3 lligasa específica³⁷.

1.5.1. INTERACCIÓ AMB UBC9

D'una banda, la lisina acceptora es pot trobar dins d'un motiu consens de SUMO, reconegut per UBC9. La seva forma canònica ve determinada per la seqüència $\Psi Kx D/E$ (on Ψ és un residu hidrofòbic, K correspon a la lisina diana, x és qualsevol aminoàcid, i D o E són els àcids aspàrtic i glutàmic, respectivament)³⁶. No obstant, s'han descrit altres formes no canòniques, com és el cas del motiu consens invertit $D/E x K \Psi$, o l'hidrofòbic $\Psi \Psi \Psi K x E$, entre d'altres⁸³. En conjunt, aproximadament la meitat de les proteïnes que se sumoïlen contenen un motiu consens, que a més, és crític per al reconeixement d'UBC9 i la correcta sumoïlació.

1.5.2. INTERACCIÓ AMB SUMO

Un segon mecanisme es pot donar en aquelles proteïnes que contenen un motiu d'interacció amb SUMO, anomenat SIM (*SUMO-interacting motif*). Aquest està format per un conjunt de residus hidrofòbics (típicament $(V/I)-X-(V/I)-(V/I)$ or $(V/I)-(V/I)-X-(V/I)$) i és capaç de reclutar UBC9~SUMO per mitjà de la unió no covalent amb SUMO. D'aquesta forma, són varies les lisines que poden ser modificades, fins i tot de forma múltiple, sempre que es trobin properes al motiu. A més, aquest tipus de

INTRODUCCIÓ

conjugació provoca que, tot i que una lisina concreta pugui ser preferent, no sigui crítica per a la sumoïlació de la proteïna, a diferència dels motius consens⁸⁴.

Cal destacar que els dominis SIM no només han estat identificats en proteïnes substrat, sinó també en molts enzims i *partners* d'unió. D'aquesta forma, a més de mediar la sumoïlació, aquesta seqüència aminoacídica també pot intervenir, per mitjà de la interacció proteïna-proteïna, en el reclutament de complexos i en processos *downstream*⁸⁵⁻⁸⁷. De fet, vàries lligases E3 de SUMO presenten domini SIM, el qual és essencial tant per a la seva activitat enzimàtica com per al reconeixement de substrats, com en el cas de RANBP2 o CBX4^{37,53,88}.

A més, se sap que aquesta interacció pot ser específica per als diferents paràlegs de SUMO, ja que l'afinitat per SUMO1 depèn de la presència de càrregues negatives properes al SIM, mentre que SUMO2 només requereix de la hidrofobicitat de la SIM, sense càrregues addicionals⁸⁹.

1.5.3. INTERACCIÓ AMB UNA E3 LLIGASA

Per últim, i com ja s'ha comentat, el tercer mecanisme d'interacció per a la sumoïlació d'una proteïna consisteix en la presència d'una lligasa E3 de SUMO que permeti la correcta orientació de UBC9~SUMO respecte la lisina diana. Un exemple és el cas de la proteïna de llevat PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), que depèn estrictament de la presència de la E3 lligasa Siz1 per tal de fer accessible al centre catalític de UBC9 la lisina de PCNA a modificar⁹⁰⁻⁹².

1.6. EFECTES DE LA SUMOÏLACIÓ

1.6.1. A NIVELL MOLECULAR

Els efectes de la sumoïlació són específics de substrat i, per tant, difícils de predir. No obstant, a nivell molecular existeixen tres escenaris possibles no excloents⁹³. Primerament, la sumoïlació d'una proteïna pot emascarar una superfície d'unió i, conseqüentment, evitar la interacció amb altres proteïnes. D'aquesta manera, es poden veure afectades la unió d'un factor de transcripció a la cromatina⁹⁴, l'activitat d'un enzim⁹⁵, o l'agregació de proteïnes desplegadas⁹⁶. En segon lloc, i a la inversa, la sumoïlació pot generar noves interaccions, reclutant proteïnes efectores tant per interacció directa no covalent amb SUMO, com a través d'un nou domini d'interacció en la interfase SUMO-substrat. En aquest cas, hi juguen un paper molt important els dominis d'interacció amb SUMO i els SIMs. Per últim, la sumoïlació pot induir canvis

conformacionals en la proteïna substrat que regulin directament la seva funció, per exemple, activant o inactivant enzims⁹⁷ (Figura 5).

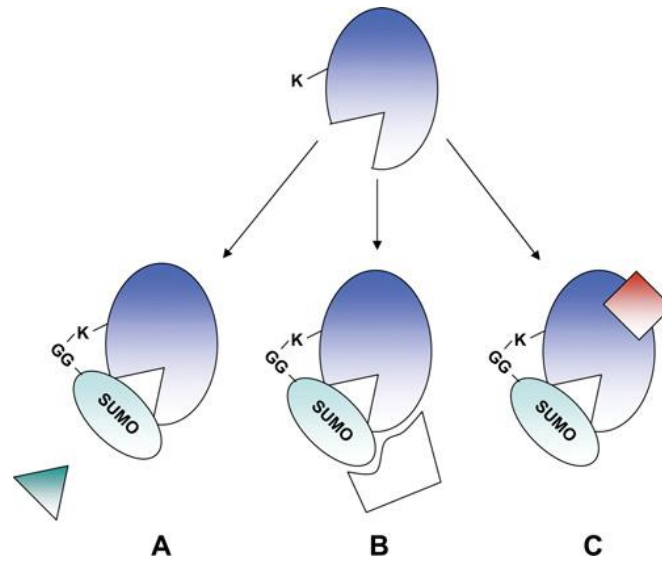


FIGURA 5. Efectes moleculars de la sumoïlació d'una proteïna. La sumoïlació de la proteïna substrat pot (A) evitar la interacció amb una altra proteïna, (B) generar una nova interfície d'interacció amb noves proteïnes, o (C) induïr canvis conformacionals a la proteïna sumoïlada²³.

1.6.2. A NIVELL CEL·LULAR

La sumoïlació intervé en molts i diversos processos cel·lulars. Degut a la seva especificitat, cada conjugació a un substrat té un significat biològic diferent. No obstant, són molts els estudis que remarquen el paper central de SUMO en la regulació del cycle cel·lular, la transcripció, o el transport de proteïnes, entre d'altres.

SUMO I EL CICLE CEL·LULAR

Els primers estudis que es van fer sobre aquesta modificació posttraduccional ja van demostrar que determinades mutacions en la maquinària de la sumoïlació provoquen greus defectes en el cycle cel·lular, arribant fins i tot a aturar-lo. Un clar exemple és l'enzim E2 Ubc9, que participa en la correcta progressió de les fases S i M del cycle cel·lular per mitjà del control de l'estabilitat de les ciclins específiques d'aquestes fases^{27,30}. Posteriorment, també s'ha demostrat la importància de la deconjugació de SUMO en la regulació de varis aspectes de la mitosi, com en el control de la cohesió dels cromosomes en les regions centromèriques, on l'acció isopeptidasa de Smt4 sobre la DNA topoisomerasa II (Top2) hi juga un paper determinant⁹⁸.

INTRODUCCIÓ

SUMO I EL MANTENIMENT DE LA INTEGRITAT GENÒMICA

A part del clar paper de SUMO en el cicle cel·lular, els experiments genètics inicials també indicaven que la maquinària de sumoïlació era necessària per a la correcta reparació de danys en el DNA. Així, en resposta a un estrès genotòxic, la conjugació o deconjugació de SUMO pot ser important en el reclutament o dissolució de complexos proteics encarregats de reparar el DNA⁹⁹. Un exemple el trobem en la reparació per l'excisió d'una base (BER), on la conjugació de SUMO1 o SUMO3 a l'enzim TDG (*Thymine-DNA glycosylase*) regula la seva dissociació del lloc sense base, permetent una eficient renovació enzimàtica⁹⁷.

SUMO I EL TRANSPORT SUBCEL·LULAR

La localització de determinades proteïnes depèn del seu estat de sumoïlació, en un procés dinàmic i reversible. Així, tot i existir proteïnes citoplasmàtiques sumoïlades, en la majoria de casos de transport subcel·lular la sumoïlació està associada amb la localització nuclear, ja sigui promovent la seva importació, com amb el factor de transcripció p65¹⁰⁰, o bloquejant la seva exportació, com amb el corepressor transcripcional CtBP¹⁰¹. En el cas de la proteïna RanGAP1, la seva forma deconjugada es localitza exclusivament al citoplasma cel·lular, mentre que un cop modificada amb SUMO s'associa a les proteïnes del complex de porus nuclear (NPC)⁸. No obstant, en ocasions la sumoïlació promou la exportació del nucli, com succeeix amb la kinasa MEK1¹⁰². Per tant, encara que no existeix una teoria que pugui unificar tots els resultats experimentals, l'estat de sumoïlació de determinades proteïnes és crític per a promoure o bloquejar el transport nucli-citoplasma.

SUMO I LA TRANSCRIPCIÓ

En el control de l'expressió gènica, l'especificitat de la transcripció s'assoleix per mitjà de la unió de combinacions de determinats factors de transcripció a promotors concrets. Alhora, aquests factors de transcripció recluten un conjunt d'enzims responsables de la reestructuració de la cromatina i de les modificacions posttraduccionals de les histones, mecanisme epigenètic de control de l'expressió gènica que s'engloba dins de l'anomenat "codi de les histones"¹⁰³.

En aquest context, s'ha demostrat que les modificacions amb SUMO influeixen tant en la unió dels factors de transcripció als promotors, com en el posterior reclutament dels enzims que remodelen la cromatina. A més, s'ha vist que SUMO directament pot

intervenir com a component del codi de les histones¹⁰⁴. D'aquesta manera, la sumoïlació pot comportar una activació o una repressió de la transcripció¹⁰⁵.

En la majoria d'estudis, la conjugació de SUMO juga un paper repressor de la transcripció. En mamífers, la sumoïlació de factors de transcripció com LEF1, Sp3, IRF-1, Elk-1 o alguns receptors nuclears hormonals, inhibeix la seva activitat transcripcional¹⁰⁶. Aquesta també es pot donar en alguns elements co-reguladors, com en el cas de HAT p300, que promou la interacció de p300 amb HDAC6 contrarestant l'efecte positiu de p300 en la transcripció¹⁰⁷.

No obstant, existeixen alguns estudis que demostren que SUMO també pot actuar com a activador de la transcripció. Alguns exemples són Gli, el factor de transcripció de la via de Hedgehog, o GATA-1, que participa del procés de la hematopoiesi, entre d'altres¹⁰⁶.

En conseqüència, si en general la modificació amb SUMO promou una repressió transcripcional, l'acció de les proteases específiques de SUMO són les encarregades de revertir aquest efecte⁶⁸, com s'ha pogut demostrar en la desumoïlació per part de DESI1 del repressor transcripcional BZEL¹⁰⁸.

Per últim, cal afegir que alguns dels efectes cel·lulars de la sumoïlació, anteriorment descrits, també poden afectar a la transcripció per mitjà de la regulació de l'estabilitat, la degradació o la localització de determinats components de la maquinària transcripcional. Un exemple el trobem en la sumoïlació de IκBα, l'inhibidor de NFκB, que evita la seva degradació i en conseqüència, suprimeix la transcripció depenent de NFκB¹⁰⁹.

1.7. INTEGRACIÓ FISIOLÒGICA DE LA SUMOÏLACIÓ

1.7.1. *CROSS-TALK* DE SUMO I UBIQUITINA

Les lisines són acceptors no només de SUMO, sinó de totes les UbLs, les metilacions i les acetilacions. En conseqüència, la sumoïlació d'un substrat en una lisina concreta pot evitar que aquesta sigui modificada per altres PTMs, variant així l'estat funcional de la proteïna.

En aquest sentit, cal destacar la importància de la interacció entre els sistemes de SUMO i ubiquitina en l'estabilitat proteica de determinats substrats, ja sigui evitant o promovent la seva degradació via proteasoma per mitjà de la poliubiquitinació¹¹⁰. Així, s'han descrit casos en els que la sumoïlació d'una proteïna bloqueja la seva degradació

INTRODUCCIÓ

per competició directa amb la ubiquitinació en una lisina comuna^{109,111} (Figura 6a). És el cas, per exemple, de la Huntingtina (Htt), la proteïna patogènica que en acumular-se produeix la malaltia de Huntington (HD). Estudis demostren que la sumoïlació entra en competició directa amb la ubiquitinació per les mateixes lisines de la Htt i que, en conseqüència, la conjugació amb SUMO estabilitza la proteïna i afavoreix l'aparició de la malaltia i la neurodegeneració¹¹².

En altres casos, per contra, la modificació amb SUMO promou la subseqüent ubiquitinació –i posterior degradació– a través d'unes lligases d'ubiquitina depenents de SUMO, anomenades STUbls (*SUMO-Targeted Ubiquitin ligases*)^{113–116}. Alguns exemples són Slx5/Slx8 en llevats i RNF4 en humans, que presenten una alta conservació evolutiva, suggerint un paper central d'aquestes proteïnes en el *crossstalk* d'ambdues modificacions (Figura 6b).

Per últim, en moltes ocasions les conseqüències fisiològics de les dues modificacions poden ser diferents tot i donar-se en mateix residu, depenent del context cel·lular en el que es donin (Figura 6c). En el cas de la proteïna PCNA, prèviament esmentada, la seva sumoïlació està relacionada amb la prevenció de la recombinació homòloga, en un procés independent de la integritat del DNA⁹⁰. D'altra banda, la ubiquitinació del mateix residu en condicions de dany al DNA desencadena la seva reparació, mitjançant una polimerasa tolerant al dany del DNA¹¹⁷.

En resum, existeixen molts exemples en els que els sistema de SUMO i Ub interaccionen, generant un *crossstalk* essencial per a la regulació de múltiples processos cel·lulars. No obstant, el coneixement detallat de la interacció entre aquests dos sistemes és encara molt escàs, i calen més estudis per tal d'entendre completament la seva rellevància.

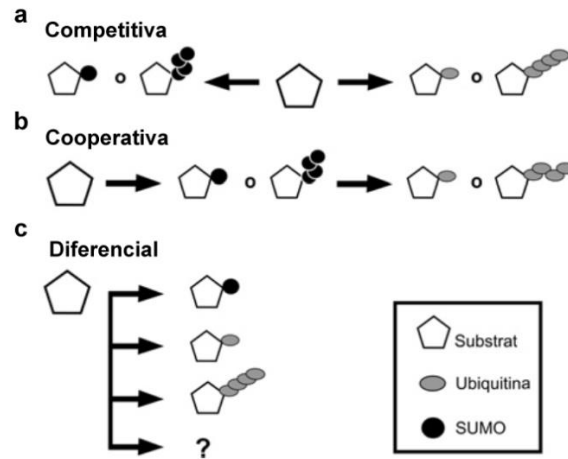


FIGURA 6. INTERACCIONS ENTRE ELS SISTEMES DE SUMO I UBIQUITINA. La conjugació de SUMO i Ub en un mateix residu pot tenir efectes antagònics, cooperatius o diferencials, generant així una interacció entre els dos sistemes competitiva (a), cooperativa (b) o diferencial (c).

1.7.2. L'ENIGMA DE SUMO

En la majoria de sumoïlacions, la modificació de la proteïna substrat es dona només en una petita proporció del total de proteïna disponible. No obstant, les conseqüències funcionals d'aquesta modificació assolixen nivells màxims d'afectació, com en el cas de l'activació o repressió transcripcional. Aquest fenomen es coneix amb el nom d'enigma de SUMO¹¹⁸, i és una de les grans incògnites funcionals d'aquesta modificació.

Tot i que els mecanismes moleculars subjacents en la majoria de casos es desconeixen, són diversos els models que expliquen l'enigma de SUMO a través de casos concrets. Tots ells convergeixen en la idea que la sumoïlació podria ser en molts processos necessària per iniciar una funció subcel·lular determinada, però no un requisit per a mantenir-la. D'aquesta manera la proteïna substrat adquireix una funcionalitat induïda per SUMO que es podria mantenir un cop deconjugada.

2. LA RETINA

La vista és el sentit que capta, interpreta i processa la llum de l'exterior de forma contínua, a fi de relacionar els individus amb el seu entorn. Per a l'espècie humana, igual que per a moltes altres espècies, és una funció bàsica i molt desenvolupada, fruit d'una llarga evolució i regulació, que intervé en tots els aspectes del comportament. Aquesta evolució ha permès l'especialització de determinats teixits, fins a desenvolupar un òrgan sensorial encarregat de la captació de la llum: l'ull (Figura 7). La seva forma globular i el conjunt d'estructures que el conformen, permeten projectar la llum exterior en la retina, on s'interpreta i processa l'estímul lumínic. La informació que es genera viatja llavors al cervell i conforma un 30% del total d'informació que rep el cervell¹¹⁹.

La retina és una fina capa de teixit neuronal altament especialitzat que recobreix l'ull per la seva cara posterior interna. Durant el desenvolupament embrionari, s'origina com una projecció del cervell, pel que se la considera part del sistema nerviós central (CNS). Té una estructura trilaminar formada per diferents tipus de neurones i les seves connexions. En el cas dels mamífers, trobem set tipus cel·lulars diferents: cèl·lules ganglionars, amacrines, horitzontals, interplexiformes, bipolars, fotoreceptors (PhR) i de Müller. Tot i que cada tipus cel·lular té una funció i una localització única, cal destacar el paper dels PhR dins la fisiologia de la retina, ja que són les úniques cèl·lules fotosensibles i, en conseqüència, les encarregades de la conversió de l'estímul lumínic en impuls electroquímico, o fototransducció.

La disposició dels diferents tipus cel·lulars dins la retina permet distingir tres capes concèntriques de nuclis, que s'ordenen de fora a dins de l'ull en la capa nuclear externa (ONL), on trobem els fotoreceptors; la capa nuclear interna (INL), amb els somes de les cèl·lules bipolars, horitzontals, amacrines, interplexiformes i de Müller; i la capa de les cèl·lules ganglionars (GCL). Aquestes últimes connecten la retina amb el cervell per mitjà dels seus axons, que corren just per sota dels nuclis i conformen l'anomenat nervi òptic. A més, separant les capes nuclears trobem dues capes sinàptiques, de fora a dins: la plexiforme externa (OPL) i la plexiforme interna (IPL). Per últim, recobrint externament la retina es troba una monocapa de cèl·lules epitelials pigmentades anomenada epiteli pigmentari (RPE). La seva funció és protegir els PhR, absorbint gran part de la llum que els arriba amb un pigment anomenat melanina. Alhora, també s'encarreguen del manteniment dels PhR, fagocitant els seus discos membranosos i

metabolitzant-los (Figura 7). Atès que les cèl·lules fotosensibles es troben a la capa més externa, la llum que entra a l'interior de l'ull ha de travessar tota la retina per tal d'arribar als PhR i així iniciar la cadena de la fototransducció.

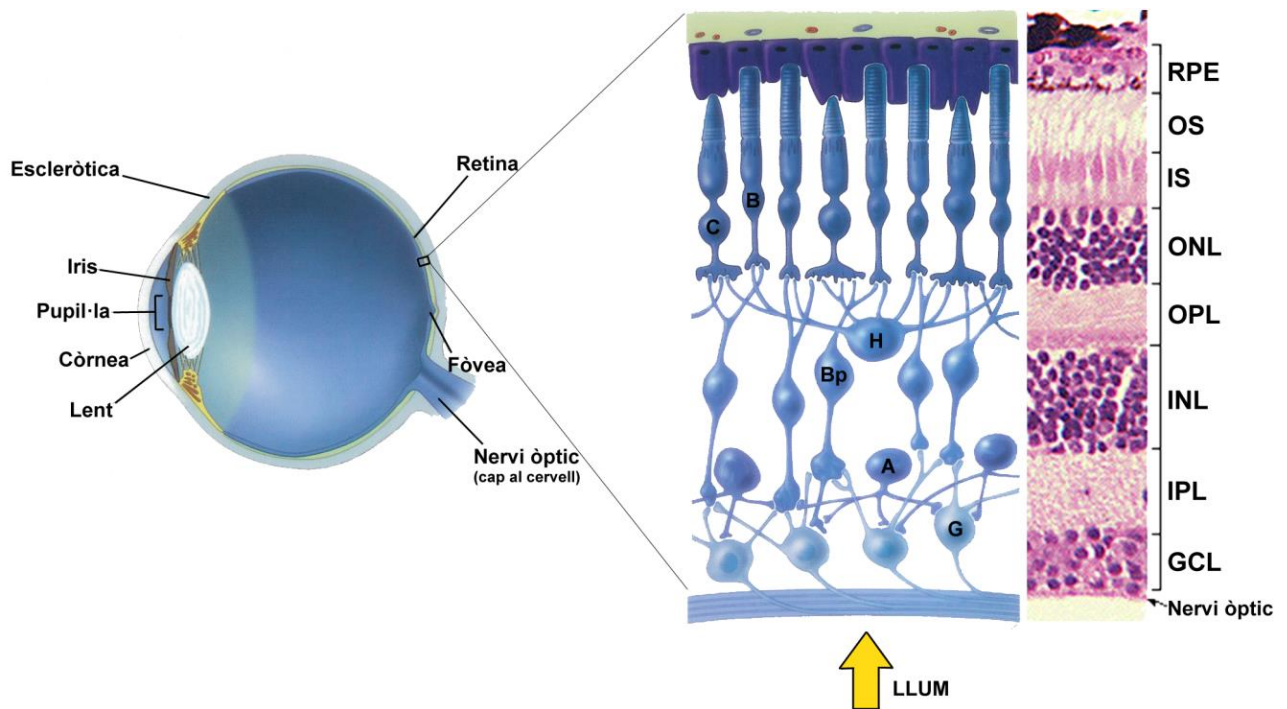


FIGURA 7. ESTRUCTURA DE L'ULL I LA RETINA. A l'esquerra, estructura de l'ull humà amb les principals parts que el conformen. A la dreta, magnificació d'una secció de la retina esquemàtica (esquerra) i real (dreta), amb la representació dels principals tipus neuronals: els fotorceptors, amb els cons (C) i els bastons (B), les cèl·lules horitzontals (H), bipolars (Bp), amacrines (A) i ganglionars (G). No hi són representades les cèl·lules glials de Müller. La fletxa groga indica la direcció d'entrada de llum, a través de totes les capes de la retina: de les cèl·lules ganglionars (GCL), plexiforme interna i externa (OPL i IPL), nuclear interna i externa (INL i ONL) i de l'epiteli pigmentari (RPE). Figura adaptada del llibre *Human physiology*. Fox, S. I. (2002). Boston: McGraw-Hill.

Un cop transformat l'estímul lumínic en impuls electroquímic, aquest viatja i es processa a través de les cèl·lules bipolars fins a les ganglionars. En aquest processat visual, les cèl·lules horitzontals fan sinapsi amb PhR i bipolars per millorar la qualitat de la imatge; mentre que les cèl·lules amacrines interconnecten les bipolars per controlar el flux d'informació. A més, existeix un altre flux d'informació invers de les ganglionars als PhR, que és transmès per les cèl·lules interplexiformes. Finalment, i un cop l'estímul ha passat per tots els tipus cel·lulars, les cèl·lules ganglionars envien el senyal a través del nervi òptic fins al còrtex visual, on es crea la imatge definitiva. És important remarcar que la visió és l'únic sentit que connecta directament amb el còrtex, sense haver de fer sinapsi prèvia a l'hipocamp. Pel que fa a les cèl·lules de

INTRODUCCIÓ

Müller, són l'únic tipus cel·lular glial de la retina, pel que la seva funció principal és el manteniment de l'estabilitat del teixit, tant a nivell fisiològic com estructural.

2.1. FOTORECEPTORS

2.1.1. MORFOLOGIA I FUNCIÓ

Els fotoreceptors de vertebrats es divideixen en dos tipus diferents: els cons i el bastons. Els primers són responsables de l'agudesia visual i la visió cromàtica, mentre que els segons s'encarreguen de la visió nocturna i perifèrica. Tot i la diferent especialització visual, comparteixen la capacitat de captar la llum degut als seus pigments fotosensibles, anomenats opsines; així com una morfologia molt polaritzada, amb una estructura dividida en tres parts: el segment extern (OS), el segment intern (IS), i la terminal sinàptica, que els connecta amb les cèl·lules bipolars i horitzontals de la INL (Figura 8a).

El segment extern és el responsable de la fototransducció, ja que és on es troben els pigments fotosensibles. Es localitzen dins d'unes estructures laminars membranoses apilades en forma de disc, generades a la part basal de l'OS i fagocitades pel RPE a la part apical, en un procés de renovació contínua. Mentre que en els cons aquests discs es troben units a la membrana plasmàtica, en els bastons els trobem separats i interns dins del OS.

El segment intern conté els mitocondris, la majoria d'òrgànuls cel·lulars i el nucli. Així, és en aquest segment on es donen els processos metabòlics, l'endocitosi i la biosíntesi de molècules, que poden ser transportades a l'OS a través d'una estructura ciliar modificada que connecta els dos segments.

Les principals diferències entre cons i bastons es troben en l'OS. A nivell morfològic, com els seus noms indiquen, els bastons es caracteritzen per una estructura allargada i cilíndrica, mentre que els cons tenen un OS de forma conoïdal. Per altra banda, la diversificació funcional ve marcada pel fotopigment que hi expressen. En bastons només hi trobem la rodopsina, una proteïna extremadament abundant en l'OS -hi representa el 95%-, capaç de detectar fins a un únic fotó de llum. És per aquest motiu que els bastons són els responsables de la visió nocturna, és a dir, en condicions de poca llum, així com de la perifèrica.

Per contra, en cons trobem diversos fotopigments o opsines, sensibles a diferents longituds d'ona i responsables de la visió cromàtica. En el cas dels humans hi ha tres

tipus de cons, determinats per l'opsina que expressen: cons S, sensibles a la llum blava, de longitud d'ona curta (*short*); cons M, sensibles a la llum verda (*medium*); i cons L, sensibles a la vermella (*long*). Es distribueixen homogèniament en mosaic al llarg de la retina, tot i que existeix una regió extremadament rica en cons anomenada fòvea, que confereix una major agudeses visual. En ratolins, en canvi, només hi trobem les opsines S i M, que es coexpressen distribuïnt-se en gradients oposats al llarg de la retina (Figura 8b).

La proporció dels diferents subtipus de fotoreceptors en la retina madura estan optimitzats per les necessitats de cada espècie. Tant en humans com en ratolins, els bastons són els fotoreceptors majoritaris, tot i que la relació respecte els cons difereix: 20:1 en el cas dels humans i 30:1 en el dels ratolins. Aquesta diferència és deguda a que els ratolins són animals nocturns i per tant, necessiten una millor visió en condicions escotòpiques, o de baixa llum. En el cas dels humans, els bastons es distribueix gradualment a la perifèria de la fòvea, arribant al seu màxim nombre a la seva regió més distal.

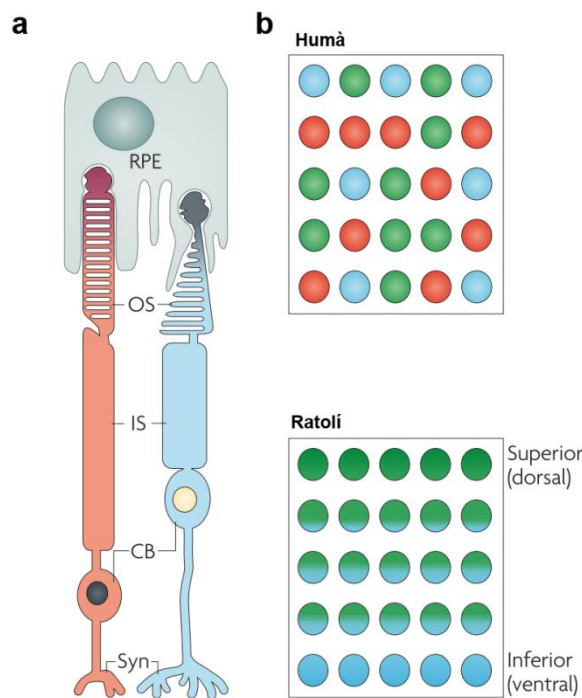


FIGURA 8. MORFOLOGIA I DISTRIBUCIÓ DELS FOTORECEPTORS EN LA RETINA. (a) Compartiments cel·lulars i estructurals del bastó (esquerra) i el con (dreta), amb la terminal sinàptica (Syn), el cos cel·lular (CB), el segment intern (IS) i el segment extern (OS), aquest últim sent fagocitat en la part apical per una cèl·lula de l'epiteli pigmentari (RPE). (b) Distribució en la retina de humà (a d'alt) i ratolí (a baix) dels cons S (blau), M (verd) i L (vermell). Figura adaptada¹¹⁹.

INTRODUCCIÓ

2.1.2. DESENVOLUPAMENT

El desenvolupament i formació de la retina és un procés altament regulat, en el que cal una correcta diferenciació i distribució de tots els tipus cel·lulars a partir d'un únic progenitor retinal (RPC). Aquesta regulació ve determinada tant per mecanismes intrínsecs del propi progenitor com per canvis en l'entorn cel·lular al llarg del temps¹²⁰.

Dins de la formació de la retina, el desenvolupament dels fotoreceptors és bàsic per al correcte funcionament del teixit. Com a procés, es divideix en cinc passos principals: (i) proliferació de les RPCs multipotents; (ii) restricció de la competència de les RPCs; (iii) especificació i determinació del destí cel·lular a precursor de fotoreceptor, durant o després de l'última mitosi; (iv) expressió dels gens de fotoreceptor; i (v) creixement axonal, formació de sinapsis i biogènesi de l'OS. Aquest procés implica que un mateix precursor de fotoreceptor pot esdevenir tant un bastó com un con i, per tant, la determinació del destí requereix d'una complexa xarxa d'expressió gènica altament regulada.

En humans, els fotoreceptors es generen prenatalment a partir de la setmana fetal 8 (Fwk 8), amb expressió d'S opsina a partir de la Fwk 12 i de la rhodopsina, M i L opsines a la Fwk 15¹²¹. En el cas dels ratolins, el pic d'S opsina es produeix a partir del dia embrionari 11 (E11) i d'M opsina al dia postnatal 6 (P6). Pel que fa als bastons, el pic de formació es dona ens els primers dies de vida, seguit de l'expressió de la rhodopsina^{119,122}. A partir d'aquest punt, la maduració és molt semblant per a totes dues espècies: augmenten la seva expressió d'opsines, i desenvolupen els segments externs cap al RPE i els axons cap a les cèl·lules bipolars i horitzontals, per tal de formar les sinapsis¹¹⁹.

2.1.3. FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ EN LA DIFERENCIACIÓ

Com ja s'ha comentat anteriorment, la diferenciació dels PhR és un procés molt regulat a nivell gènic, en el que nombrosos factors de transcripció dirigeixen cadascun dels passos que porten una RPC a esdevenir un con o un bastó. Tot i que encara hi ha molts interrogants, el conjunt d'estudis que s'han dut a terme fins ara permeten tenir un idea cada cop més detallada dels factors de transcripció que hi intervenen.

Durant el desenvolupament de la retina de ratolí, els RPCs multipotents es diferencien d'una cèl·lula embrionària i es mantenen en continua proliferació per l'expressió de factors de transcripció com PAX6 (*pair box 6*), RX1 (*retinal homeobox 1*), SIX3, SIX6,

LHX2 (*LIM-homeobox 2*), VSX2 (*visual system homeobox 2*), HES1 I NOTCH1. Eventualment, aquestes cèl·lules progenitores poden patir una restricció del llinatge cel·lular, com passa amb els precursors de fotoreceptors. En aquest punt, l'expressió d'OTX2 (*orthodenticle homeobox 2*), juntament amb altres senyals desconeguts, és necessària per determinar el destí a fotoreceptor. A continuació s'expressa CRX (*cone-rod homeobox*), que actua per sota d'OTX2 i promou l'expressió dels gens específics de fotoreceptors, així com la seva posterior diferenciació terminal. Sinèrgicament amb CRX, també s'expressa el receptor nuclear ROR β , iniciant així l'expressió d'S-opsina i la diferenciació a con S. Per últim, el receptor de l'hormona tiroidea β 2 (TR β 2) és l'encarregat de coordinar el patró de distribució de les diferents opsines, fent de mediador en la diferenciació dels cons M.

Com que la via de diferenciació per defecte en fotoreceptors és cap a cons S, cal l'acció d'altres factors de transcripció que regulin la diferenciació a bastons, evitant alhora el fenotip de con S. El primer factor de transcripció en expressar-se és NRL (*neural retinal leucine-zipper*), que interacciona amb CRX i molts altres factors de transcripció per induir l'expressió dels gens específics de bastons. Un d'aquests gens és el receptor nuclear orfe NR2E3, encarregat del silenciament dels gens específics de cons i de l'activació dels de bastons (Figura 9).

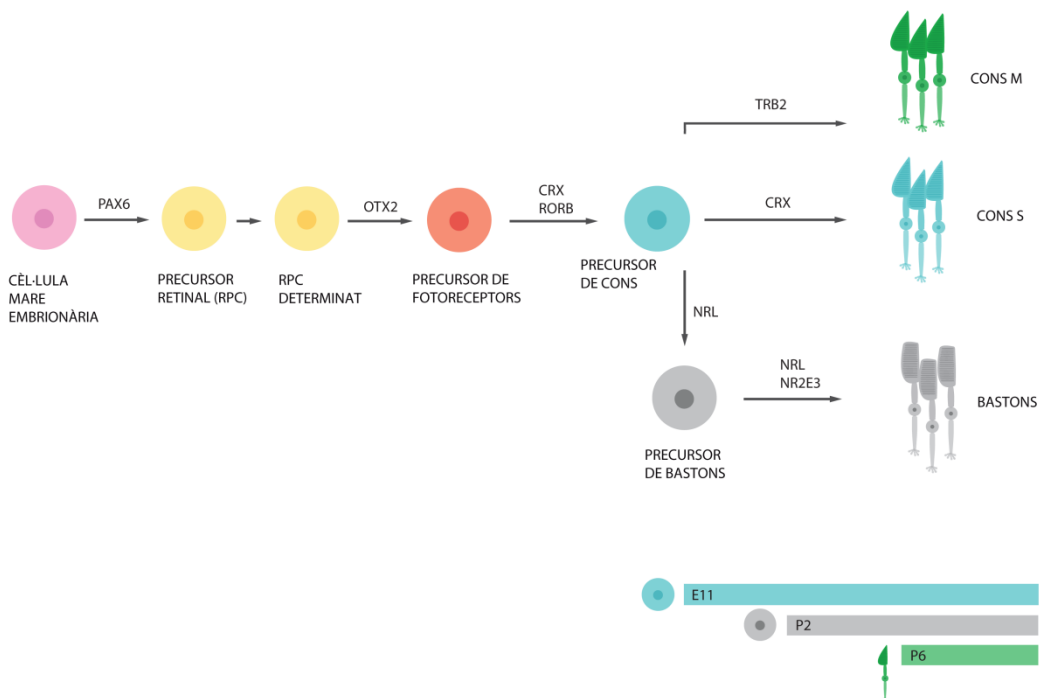


FIGURA 9. DESENVOLUPAMENT DELS FOTORECEPTORS EN RATOLÍ. Principals factors de transcripció expressats en les diferents fases del desenvolupament dels fotoreceptors en ratolí, des d'una cèl·lula mare embrionària fins a un con S o M o un bastó. Figura cedida molt amablement per la Mariona Esquerdo Barragan.

INTRODUCCIÓ

NR2E3

El receptor nuclear orfe de classe 2 NR2E3 és un factor de transcripció de retina específic de fotoreceptors, que juga un paper essencial en la determinació dels bastons durant el seu desenvolupament. S'encarrega del silenciament dels gens específics de cons en aquells precursors de fotoreceptors que expressen el factor de transcripció NRL i alhora, actua sinèrgicament amb NRL i CRX com a activador de gens específics de bastons com *RHO* o *GNAT* (Figura 9)¹²³⁻¹²⁵. En conseqüència, l'absència d'NR2E3 en la retina de ratolí causa un excés de cons S generats a partir de precursors de fotoreceptors, en comptes d'una població de bastons¹²⁶.

En la retina adulta, NR2E3 és essencial en el manteniment de la repressió dels gens específics de cons i l'activació dels de bastons, i necessari per a la viabilitat funcional i la supervivència cel·lular¹²⁷. Així, sense NR2E3 els bastons esdevenen fotoreceptors híbrids no funcionals que expressen alhora gens específics de cons i de bastons¹²⁸. En humans, les mutacions en el gen *Nr2e3* han estat associades amb diverses malalties oculars que impliquen una degeneració retinal progressiva, com ho són la síndrome de cons S (ESCS)¹²⁹, o la retinosi pigmentària (RP)¹³⁰.

A nivell estructural, NR2E3 té una conformació modular molt conservada evolutivament en tots els receptors nuclears (NRs), formada per dos dominis funcionals diferents: (i) un domini N-terminal d'unió al DNA (DBD); i (ii) i un domini C-terminal d'unió a lligand (LBD)¹³¹ (Figura 10). Entremig dels dominis s'hi troba una regió frontissa o *Hinge*, que aporta flexibilitat per a la correcta funció de la proteïna. Com la resta de NRs de classe 2, NR2E3 actua formant homodímers, com s'ha pogut observar en diversos estudis sota condicions no desnaturalitzants¹³²⁻¹³⁵.

3. SUMO I RETINA

La retina és un teixit neuronal altament especialitzat que requereix d'un control acurat de la transcripció, l'estabilitat i la localització de les seves proteïnes. Aquest control s'assoleix per mitjà d'una complexa xarxa gènica que, alhora, necessita una gran regulació. En aquest context, diversos estudis demostren com la sumoïlació intervé en la regulació de processos en el desenvolupament i manteniment de la retina.

D'una banda, s'ha demostrat que els factors de transcripció específics de fotoreceptors NRL i NR2E3, així com determinats gens de la maquinària del ritme circadiari, estan regulats via sumoïlació¹³⁶⁻¹³⁸. D'altra banda, també s'ha descrit com mutacions en el gen de la E3 lligasa dual (ubiquitina i SUMO) TOPORS causen una progressiva degeneració de la retina en humans, anomenada retinosi pigmentària¹³⁹ (RetNet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>); i que les SUMO E3 lligases HDAC4 i TLS han estat relacionades amb la supervivència i apoptosi dels fotoreceptors^{140,141}.

3.1. PIAS3 REGULA EL DESENVOLUPAMENT DELS FOTORECEPTORS

Diversos grups han estudiat els nivells d'expressió d'alguns dels enzims del metabolisme de SUMO, particularment en teixits neuronals de ratolí. També s'han dut a terme anàlisis globals del transcriptoma per *microarrays* i *next generation sequencing* en retines murines en desenvolupament, principalment focalitzades en les diferències d'expressió en comparació amb soques mutants defectives^{142,143}. D'aquesta forma, s'ha pogut demostrar l'expressió en retina d'algunes de les lligases E3 de SUMO relacionades amb la regulació de receptors de neurotransmissors¹⁴⁴.

L'exemple més rellevant és el de la lligasa PIAS3, que s'expressa selectivament durant el desenvolupament dels fotoreceptors en retines de ratolí¹⁴³. El patró d'expressió espacial i temporal del seu mRNA correspon amb el de la proteïna, que presenta un pic en fotoreceptors durant la primera setmana postnatal, coincidint amb l'expressió dels factors de transcripció CRX, NRL i NR2E3. No només coincideixen en un context cel·lular, sinó que s'ha demostrat que PIAS3 interacciona amb aquests factors de transcripció, fent de pont d'unió per a la formació de complexos en els promotors específics de fotoreceptors. A més, PIAS3 promou la sumoïlació d' NR2E3, necessària per al correcte silenciament dels gens específics de cons. Mitjançant l'anàlisi de la seqüència d'NR2E3 de ratolí amb el programa de predicció SUMOplot (<http://www.abgent.com/doc/sumoplot>) es van identificar tres lisines altament

INTRODUCCIÓ

conservades evolutivament amb alta probabilitat de sumoïlació, que en el cas de ratolí corresponen als residus K178, K315 i K322, i en humà a K185, K330 i K337¹³⁷ (Figura 10).

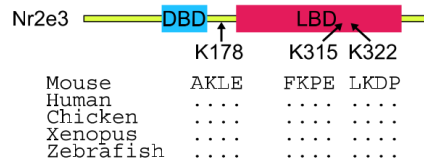


FIGURA 10. SEQÜÈNCIA DE NR2E3. El factor de transcripció NR2E3 té dos dominis funcionals d'unió a DNA (DBD) i al lligand (LBD). A més, al llarg de la seva seqüència s'hi han identificat tres lisines (K) amb una alta probabilitat de sumoïlació, molt conservades evolutivament.

Alhora, PIAS3 també sumoïla altres factors fins al moment desconeguts que funcionarien com a activadors de la transcripció en els gens de bastons¹³⁷. De forma similar, altres estudis suggereixen una activació d'NRL també dependent de sumoïlació, tot i que en aquest cas sembla que PIAS3 no és la lligasa que s'encarrega de la conjugació de SUMO¹³⁶ (Figura 11).

Paral·lelament, PIAS3 actua en el desenvolupament i manteniment dels cons, regulant l'expressió de la M opsina i silenciament la de S opsina. D'aquesta forma controla la distribució i patró d'expressió d'aquestes dues opsines al llarg de la retina, en un mecanisme dependent de sumoïlació semblant al descrit en bastons, però actuant sobre els factors de transcripció TRβ2 i RXRγ¹⁴⁵.

En conclusió, aquests estudis demostren com PIAS3 actua d'E3 lligasa en la sumoïlació de factors de transcripció de fotoreceptors, jugant un paper essencial en la coordinació del seu desenvolupament, diferenciació i manteniment de la retina.

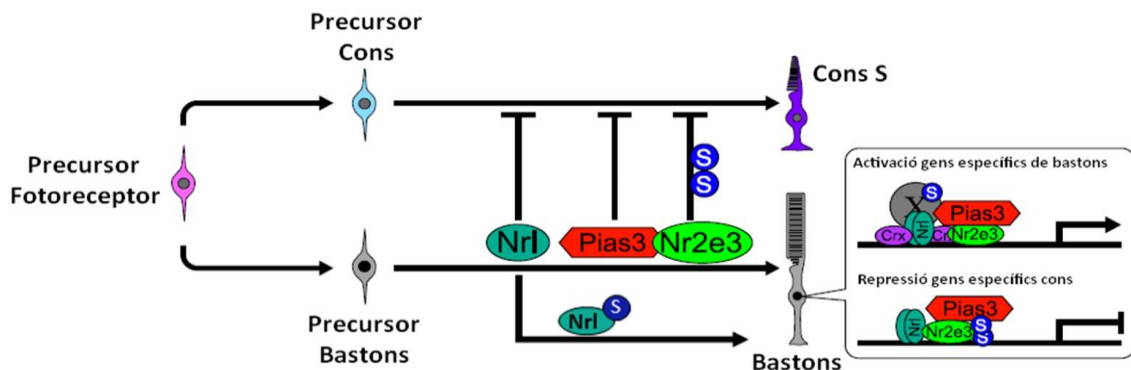


FIGURA 11. PARTICIPACIÓ DE LA SUMOÏLACIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT DELS FOTORECEPTORS. Els factors de transcripció NR2E3 i NRL promouen l'activació del gens específics de bastons. A més, la sumoïlació (S) d'NR2E3 per part de PIAS3 reprimeix l'expressió dels gens específics de cons (imatge adaptada¹³⁷).

3.2. HDAC4 PROMOU LA SUPERVIVÈNCIA DELS FOTORECEPTORS

Un altre membre de la maquinària de sumoïlació rellevant en retina és la E3 lligasa HDAC4. Tot i formar part del cicle de SUMO, la seva funció enzimàtica principal és la de deacetilar histones, promovent la condensació de la cromatina i afavorint així la repressió transcripcional. Juntament amb HDAC5, 7 i 9, forma part de les HDACs de classe IIa, que es caracteritzen pel seu important paper en la regulació del desenvolupament i creixement específics de teixit. Té uns alts nivells d'expressió en cor, cervell i múscul esquelètic, i es localitza en continu transport entre nucli i citoplasma¹⁴⁶.

Estudis de silenciament gènic descriuen que la manca d'*Hdac4* en ratolí provoca una mort prematura durant el període perinatal¹⁴⁷. D'altra banda, s'ha demostrat *in vivo* que HDAC4 és capaç de promoure la sumoïlació a través de la interacció amb UBC9, com en el cas del factor de transcripció MEF2, del qual en regula negativament la seva activitat transcripcional^{57,148}. Alhora, HDAC4 també és conjugada amb cadenes de SUMO2 *in vivo* en una única lisina (K559) gràcies a l'acció d'una altra lligasa de SUMO: RANBP2¹⁹. Tot i que no s'han pogut detectar canvis en la localització subcel·lular ni en la unió amb d'altres proteïnes conegudes¹⁴⁹, la mutació d'aquesta lisina genera una disminució de l'activitat de repressió transcripcional i de la seva activitat enzimàtica.

Cal destacar l'important paper d'HDAC4 en la supervivència neuronal i el desenvolupament dels fotoreceptors. En aquest sentit, s'ha demostrat que la reducció d'expressió d'*Hdac4* durant el desenvolupament de la retina de ratolí provoca una major apoptosi dels bastons i les cèl·lules bipolars, mentre que una sobreexpressió redueix la mort natural de les bipolars. A més, la sobreexpressió d'*Hdac4* en models de degeneració retinal resulten en una prolongació de la supervivència de fotoreceptors¹⁴⁰. Posteriorment, s'ha pogut determinar que aquest fenomen és gràcies a un petit domini N-terminal, clau per a la protecció dels fotoreceptors^{150,151}.

3.3. LA RETINA I SUMO REGULEN LA MAQUINÀRIA CIRCADIÀRIA

En fisiologia i comportament, els ritmes circadiaris proporcionen un avantatge selectiu, permetent l'anticipació dels organismes als canvis del seu ambient. Aquests ritmes es basen en un rellotge biològic molecular generat per cicles de transcripció-traducció (*transcriptional-translational feedback loop*, TTFL). En mamífers, les variacions

INTRODUCCIÓ

circadiàries s'observen en els nivells d'activitat, la temperatura corporal, la producció d'hormones com el cortisol i la melatonina, les funcions cognitives, el metabolisme i la son, entre d'altres¹⁵². Per aquest motiu cal que l'organisme tingui una representació interna del temps en sincronia amb el medi, rebent i processant estímuls de l'exterior¹⁵³.

El senyal principal per aconseguir aquesta sincronia amb l'ambient és la llum, que es capta a través de l'ull amb la retina i que es transmet pel tracte retinohipotalàmic (RHT) fins al nucli supraquiasmàtic (SCN) del cervell, considerat el rellotge primari de l'organisme¹⁵⁴. No obstant, la captació de l'estímul lumínic no es dona pels fotoreceptors, sinó mitjançant un subgrup de cèl·lules ganglionars directament fotosensibles¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Aquestes expressen un pigment sensible a la llum blava anomenat melanopsina (OPN4) i són les encarregades de generar un estímul directe al SCN, no vinculat amb la formació d'una imatge¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

A nivell molecular, estudis amb neurones dissociades del SCN han demostrat que els ritmes circadianis pròpiament es generen a escala cel·lular a través dels anomenats gens rellotge¹⁶¹. Aquest mecanisme de regulació consta bàsicament d'un heterodímer d'activadors transcripcionals anomenats BMAL1 i CLOCK, que dirigeixen l'expressió dels gens *Per1*, *Per2*, *Cry1* i *Cry2*. Alhora, les proteïnes PER i CRY interaccionen i es transloquen a nucli, on inhibeixen la unió de BMAL1-CLOCK. Així, aquest simple mecanisme molecular, que augmenta de complexitat amb l'addició d'altres components proteics i de determinades PTMs, genera en els diferents teixits una oscil·lació amb un període aproximat de 24 hores^{154,162}.

Una de les PTMs més importants en la regulació d'aquests gens rellotge és la sumoïlació, que intervé en l'activitat de l'heterodímer format pels factors de transcripció BMAL1 i CLOCK, essencials en el procés de regulació circadiana. BMAL1 mostra un patró circadian de sumoïlació *in vivo* que correspon amb la seva activació en el fetge de ratolí¹⁶³. Aquesta conjugació, preferentment de SUMO2/3, localitza BMAL1 exclusivament en uns cossos nuclears anomenats PML (*promyelocytic leukemia nuclear body*) i alhora, promou la seva transactivació i degradació depenent d'ubiquitina¹⁶⁴. Pel que fa a CLOCK, s'ha demostrat que també és un substrat per a la conjugació de SUMO, fet que augmenta la seva activitat transcripcional i la d'altres proteïnes regulades per aquest factor de transcripció, com és el cas de receptor d'estrògens α ER α ¹⁶⁵. En conjunt, la sumoïlació constitueix un nivell addicional de regulació dins de la maquinària de control del ritme circadian.

En retina, degut a la diferent disponibilitat de llum al llarg del dia, són molts els processos que es donen de forma rítmica per a l'òptim funcionament d'aquest teixit. Així, els nivells de transcrits dels diferents ftopigments¹⁶⁶, o el metabolisme i fagocitosi dels discos membranosos dels fotoreceptors¹⁶⁷⁻¹⁶⁹, són alguns dels casos d'oscil·lacions circadiàries regulats en aquest teixit. Per aquest motiu, és essencial el correcte funcionament de la maquinària que governa el ritme diari, diferencialment expressada en cadascun dels tipus cel·lulars que hi trobem en la retina¹⁷⁰.



OBJECTIUS



Dins d'un objectiu genèric de **caracteritzar l'expressió dels gens de la via de SUMO a retina**, emprant retines de ratolí adult, es va proposar:

1. Quantificar els nivells d'expressió de l'mRNA dels gens de la via de SUMO i alguns factors de transcripció rellevants per a fotoreceptors a la retina de ratolí adult, en diferents condicions de llum/foscor.
2. Localitzar l'expressió de l'mRNA i d'algunes proteïnes dels gens de la via de SUMO a les diferents capes de la retina de ratolí adult.
3. Elaborar un mapa d'expressió dels gens de la via de SUMO a la retina de ratolí adult.

Dins d'un objectiu centrat en **estudiar la sumoïlació del factor de transcripció de fotoreceptors NR2E3**.

4. Identificar noves E3 lligases de SUMO que interaccionin i conjuguin el factor de transcripció de fotoreceptors NR2E3.
5. Analitzar el possible paper biològic de la conjugació de SUMO en el factor de transcripció de fotoreceptors NR2E3, mitjançant la comparació amb un mutant no sumoïlable.



MATERIALS I

MÈTODES



1. PROCEDIMENTS ÈTICS

Tots els procediments es van dur a terme d'acord amb els principis d'ús d'animals de recerca en oftalmologia i visió d'ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*), així com amb les regulacions de la Unitat d'Estabularització de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona (UB). Així mateix, tots els procediments van ser avaluats i aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la UB, emmarcats en els procediments número 6562 i 7185 atorgats pel Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (DAAM) de la Generalitat de Catalunya.

2. MANIPULACIÓ ANIMAL I DISSECCIÓ DE TEIXITS

Les mostres de retines murines i les seccions d'ull es van obtenir de ratolins de dos mesos (P60) C57BL/6J. L'eutanàsia dels animals es va realitzar mitjançant dislocació cervical. Algunes retines van ser processades en fresc just després de ser extretes, mentre que d'altres van ser immediatament congelades en nitrogen líquid. Les retines per a les quatre condicions de llum-foscors van ser obtingudes de ratolins estabularitzats en un cicle de llum/foscors de 12:12 hores (considerat com a condicions normals), en un moment del cicle i en unes condicions lumíniques determinades, tal i com s'indica a la Figura 12.

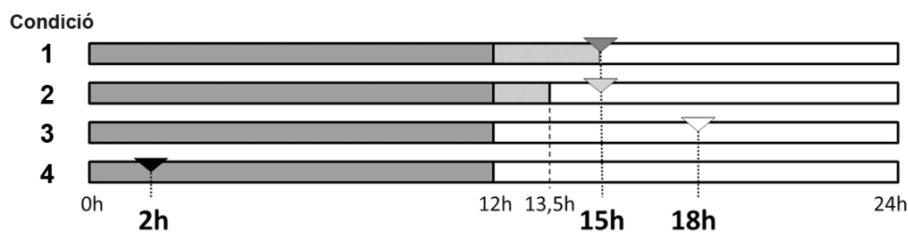


FIGURA 12. CONDICIONS DE LLUM/FOSCOR EN L'OBTENCIÓ DE LES RETINES. L'esquema mostra les quatre condicions de llum/foscors (quadre gris i blanc, respectivament) amb els temps de dissecció de les retines, indicats amb les puntes de fletxa: condició 1 (gris fosc)- última fase de foscors allargada 3 h (retines obtingudes en la foscors); condició 2 (gris clar)- última fase de foscors allargada 1'5 h més 1'5 h d'exposició a la llum (retines obtingudes a la llum); condició 3 (blanc)- retines obtingudes en condicions normals del cicle de llum/foscors després de 6 h d'exposició a la llum; condició 4 (negre)- retines obtingudes en condicions normals del cicle de llum/foscors després de 2 hores d'exposició a la foscors.

Per a les crioseccions, es van *disseccionar* els ulls fins a obtenir les còpies oculars (*eyecups*), que es van fixar en 4% Paraformaldehid (PFA) durant 2 hores a temperatura ambient (RT). Seguidament, es van rentar, crioprotegir durant tota la nit (*overnight*) en

MATERIALS I MÈTODES

acrilamida a 4°C, submergir en O.C.T. (Tissue-Tek, Sakura Finetech, Torrance, CA) i congelar en nitrogen líquid per a la seva posterior criosecció a -17°C.

Els cultius organotípics retinals es van realitzar a partir de ratolins recent nascuts (P0) C57BL/6J. Els animals van ser decapitats i els caps es van rentar immediatament en Etanol 70% i mantenir en medi de cultiu *Leibovitz's L-15* (Gibco). Amb l'ajuda d'una lupa binocular, pinces i tisores es van extreure i *disseccionar* els ulls, separant la retina de l'epiteli pigmentari i la resta d'estructures oculars. Finalment, amb una agulla de 25G i una ganiveta es van tallar les retines en trossos d'aproximadament 400 µm, que servien per a l'electroporació de DNA.

3. PURIFICACIÓ D'RNA I OBTENCIÓ DE CDNA

A partir de les mostres de retina obtingudes es va purificar l'RNA per a l'obtenció de cDNA. Així, per cadascuna de les quatre condicions de llum-foscor, tres mostres independents, contenint cadascuna tres retines congelades, van ser homogeneïtzades amb un Polytron PT 1200 E (Kinematica, AG, Lucerne, Switzerland). L'extracció d'RNA total es va realitzar amb el *High Pure RNA Tissue Kit* (Roche), seguint les instruccions del fabricant amb algunes modificacions menors. Per a l'eliminació total del DNA genòmic (gDNA) de la mostra, es va allargar el tractament amb la DNasaI fins a 45 min. A més, en aquells casos en els que encara es va detectar restes de gDNA, es va realitzar una segona digestió amb DNasaI i el seu corresponent tampó de digestió, directament sobre l'RNA purificat durant 1 hora a 37°C, seguit de 10 min a 65°C per tal d'inactivar l'enzim. Finalment, es va obtenir el cDNA per transcripció inversa amb el *qScript™ cDNA Synthesis Kit* (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD), seguint les instruccions del fabricant.

4. RT-QPCR

La RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) o *Realtime PCR* és una tècnica que permet la quantificació de l'amplificació d'una seqüència de DNA. Així, amb la finalitat de quantificar les expressions dels gens de la via de SUMO en retina es va realitzar una qRT-PCR sobre cDNA de retines sotmeses a les quatre condicions de llum/foscor especificades en la Figura 12, utilitzant el reactiu *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* i la placa *LightCycler® 480 Multiwell Plate 384* (Roche Applied Science), en un volum final de 10 µL que contenia 2,5 µL de cDNA. Amb la intenció d'optimitzar les condicions de la tècnica, diferents concentracions de cDNA van ser provades: sense

diluir, 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 i 1:1000. Amb els resultats obtinguts es va decidir utilitzar la dilució 1:5 del cDNA, ja que va donar uns valors d'amplificació centrats en el total de cicles de la PCR (les condicions de temperatura de la PCR es troben llistades a la Taula 5). Les dades obtingudes del termociclador LightCycler® 480 van ser analitzades amb el software del lector, utilitzant el mètode *Advanced Relative Quantification*. L'expressió de *Gapdh* va ser usada com a normalitzadora dels nivells d'expressió dels gens d'estudi. A més, *Rho* i *Cerkl* van ser considerats gens de referència, com a alt i baix nivell d'expressió en la retina de ratolí, respectivament. A més, per tal de minimitzar l'error tècnic, es van realitzar triplicats per cada gen i mostra.

Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard dels nivells d'expressió detectats en les tres mostres biològiques. Després de comprovar la igualtat en les desviacions i la distribució normal en les diferents condicions (tests de Bartlett i Shapiro Wilk, respectivament), es va dur a terme un anàlisi de comparació múltiple de les mitjanes entre les diferents condicions amb el test de Tukey-Kramer per trobar diferències estadísticament significatives. El conjunt de *primers* usats, específics per cada gen, es troben llistats a la Taula 2.

5. HIBRIDACIÓ *IN SITU*

La hibridació *in situ* permet l'estudi de la localització de l'expressió gènica, per mitjà de la hibridació d'una ribosonda d'RNA marcada, complementària a l'mRNA del gen d'estudi. Així, aquesta tècnica es va utilitzar per a l'estudi de la localització de l'expressió dels gens de la via de SUMO en talls de retina de ratolí. Per a la hibridació *in situ* de cadascun dels gens d'estudi, es va amplificar un fragment del seu cDNA (400-500 bp) a partir de la retrotranscripció de l'RNA total de retina de ratolí. Aquests fragments, amplificats amb els *primers* de la Taula 2, es van clonar en el vector *pGEM-T® Easy Vector* (Promega). A continuació, es va amplificar utilitzant un oligo extern del vector, per tal d'incloure el promotor flanquejant de la RNAPol T7 o Sp6. Amb el producte de la PCR es van generar les ribosondes *Sense* i *Antisense* amb RNTPs marcats amb Digoxigenina (Roche), que van ser seguidament purificades amb les columnes *Mini quick spin RNA columns* (Roche) i diluïdes en 50% formamida (Sigma-Aldrich).

Paral·lelament, seccions de 16-18 µm de retines de ratolins C57BL/6J P60, disposades en vidres portaobjectes *Superfrost™ Plus Microscope Slides* (Electron Microscopy

MATERIALS I MÈTODES

Sciences, Hatfield, PA) van ser assecades 1 h a RT, rentades en PBS 1x (3 x 10 min), tractades 15 min amb 2 µg/ml de proteïnasa K a 37°C, novament rentades en PBS 1x (2 x 5 min) i fixades amb PFA 4%. L'acetilació amb 0'1 M trietanolamina-HCl pH 8'0, contenint primer 0'25% i després 0'5% anhídrida acètica, es va realitzar durant 5 min per cada concentració. Seguidament, es van prehibridar les seccions de retina a 55°C amb solució de prehibridació (50% formamida, 10% Dextrà, 1x solució Denhardt's, 0,9 M NaCl, 100 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA, 10 mM NaH₂PO₄ i 1 mg/ml tRNA de llevat) durant 2-4 hores i, a continuació, es van incubar *overnight* amb la mateixa solució afegint la corresponent ribosonda marcada amb Digoxigenina (2 µg/ml). Després de la hibridació, els talls van ser rentats en 2x SSC durant 20 min a 55°C, equilibrats en NTE (0'5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA) a 37°C, i tractats amb 10 µg/ml RNasa A en NTE a 37°C per 30 min. En acabat, les seccions van ser rentades a 37°C 15 min en NTE, dues vegades en 2x SSC i 0'2x SSC, equilibrades en *Buffer 1* (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), i bloquejades en *Blocking Buffer* (1% BSA and 0'1% Tritó-X-100 en Buffer 1) durant 1 hora. A continuació, es va incubar *overnight* a 4°C afegint l'anticòs anti-Digoxigenina-AP (1:1000, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) al *Blocking Buffer*. Llavors, les seccions van ser rentades dues vegades en *Buffer 1* durant 15 min, i en *Buffer 2* (100 mM Tris-HCl pH 9'5, 150 mM NaCl) i *Buffer 2* suplementat amb 50 mM MgCl₂ durant 5 min cadascun, abans de la seva exposició amb *BM Purple AP Substrate* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Finalment, les reaccions van ser aturades rentant en PBS 1x, i les seccions van ser muntades en cobreobjectes amb *Fluoprep* (Biomérieux, France) i fotografiades utilitzant una càmera Leica DFC connectada a un microscopi òptic Leica DM IL (Leica Microsystems, Germany).

TAULA 2. LLISTAT DE PRIMERS 1. Seqüència dels parells de primers utilitzats per a la qPCR en cDNA de retina (esquerra) i la hibridació *in situ* (dreta), incloent totes les proteïnes SUMO i els seus enzims, més els gens de referència *Gapdh*, *Rho* i *Cerkl*.

qRT-PCR				Hibridació <i>in situ</i>			
Gen	Cadena	Seqüència (5'-3')	T _m (°C)	Gen	Cadena	Seqüència (5'-3')	T _m (°C)
<i>Gapdh</i>	<i>Forward</i>	agagctgaacgggaagctcact	68	<i>Gapdh</i>	<i>Forward</i>	tgacaatgaatacggctacagcaa	63
<i>Gapdh</i>	<i>Reverse</i>	tactccttggaggccatgtagg	68	<i>Gapdh</i>	<i>Reverse</i>	tactccttggaggccatgtagg	62
<i>Sumo1</i>	<i>Forward</i>	tcctctgagccgcggtgt	62	<i>Sumo1</i>	<i>Forward</i>	tcctctgagccgcggtgt	62
<i>Sumo1</i>	<i>Reverse</i>	ccgtttgttccctgataaacttc	62	<i>Sumo1</i>	<i>Reverse</i>	gggggtctccgcaccact	62
<i>Sumo2</i>	<i>Forward</i>	tccacaacagtcacgactaca	62	<i>Sumo2</i>	<i>Forward</i>	tgagtgagcccttatccata	63
<i>Sumo2</i>	<i>Reverse</i>	tgagaaccaaaccatgctca	62	<i>Sumo2</i>	<i>Reverse</i>	tgagaaccaaaccatgctca	63
<i>Sumo3</i>	<i>Forward</i>	tgacataaccacttggtctcc	68	<i>Sumo3</i>	<i>Forward</i>	tgacataaccacttggtctcc	64
<i>Sumo3</i>	<i>Reverse</i>	tgatggagcaccctcaaacata	68	<i>Sumo3</i>	<i>Reverse</i>	ggatcatgaactgactgatacttcacac	62
<i>Pias1</i>	<i>Forward</i>	gcctcgctgtgtcccga	66	<i>Pias1</i>	<i>Forward</i>	taagtgcaggaggagcacatc	63

Pias1	<i>Reverse</i>	tgttgaagacacaaggctgct	66	Pias1	<i>Reverse</i>	tgttgaagacacaaggctgct	64
Pias2	<i>Forward</i>	gactgtagccagtgatgcaagcaa	72	Pias2	<i>Forward</i>	cacctcacccttaacagcaagc	63
Pias2	<i>Reverse</i>	gatgaactaacgtgagtactgctttca	76	Pias2	<i>Reverse</i>	gatgaactaacgtgagtactgctttca	62
Pias3	<i>Forward</i>	gcgcagtcaccaggggaat	62	Pias3	<i>Forward</i>	gcgcagtcaccaggggaat	64
Pias3	<i>Reverse</i>	gagccacaatgctgctgacac	66	Pias3	<i>Reverse</i>	tgatgagcttccgatggtaag	62
Piasy	<i>Forward</i>	cgcaccctccatcattc	58	Piasy	<i>Forward</i>	ccagtcgagcagcttagttg	64
Piasy	<i>Reverse</i>	cgacaccacgttattgcacatt	64	Piasy	<i>Reverse</i>	cgacaccacgttattgcacatt	62
Topors	<i>Forward</i>	cagacagagagacaaaacacaagagg	76	Topors	<i>Forward</i>	cagacagagagacaaaacacaagagg	62
Topors	<i>Reverse</i>	ggcaaaggctgttctctcttcat	74	Topors	<i>Reverse</i>	ttgcttgtgtccgtagccttcc	63
Sae1	<i>Forward</i>	aagcgtactgccccgactac	68	Sae1	<i>Forward</i>	gggcaccatgtgtgtctagtgc	65
Sae1	<i>Reverse</i>	cacttgcagggcagctgataac	68	Sae1	<i>Reverse</i>	cacttgcagggcagctgataac	64
Sae2	<i>Forward</i>	tgaagatgctgcaaaagcatt	62	Sae2	<i>Forward</i>	gagcagatggaagatccagatga	62
Sae2	<i>Reverse</i>	ttggttccgaccagaccaag	62	Sae2	<i>Reverse</i>	ttggttccgaccagaccaag	63
Ubc9	<i>Forward</i>	cgagcacaagcgaagaagttg	66	Ubc9	<i>Forward</i>	gcttccatcttggtgtgtgac	64
Ubc9	<i>Reverse</i>	cccaggtttctgagaaggacga	68	Ubc9	<i>Reverse</i>	cccaggtttctgagaaggacga	64
Ranbp2	<i>Forward</i>	gcgacttcacatttctcatcaca	66	Ranbp2	<i>Forward</i>	tcacggctccagggaaagtctgta	64
Ranbp2	<i>Reverse</i>	tcctccatctgtctcgtgactttt	68	Ranbp2	<i>Reverse</i>	tcctccatctgtctcgtgactttt	63
Rasd2	<i>Forward</i>	ccctgtgccattctcttgttt	66	Rasd2	<i>Forward</i>	gatgccccagccaggttc	63
Rasd2	<i>Reverse</i>	gtggtttctccagggacactga	68	Rasd2	<i>Reverse</i>	gtggtttctccagggacactga	63
Cbx4	<i>Forward</i>	taccagggcgccacaag	60	Cbx4	<i>Forward</i>	gcaggcagtgaaaatcaagtgc	64
Cbx4	<i>Reverse</i>	ctcctcggcagcacgctt	58	Cbx4	<i>Reverse</i>	ctcctcggcagcacgctt	62
Mms21	<i>Forward</i>	ccgttacatatccttcagtgccata	72	Mms21	<i>Forward</i>	ccgttacatatccttcagtgccata	63
Mms21	<i>Reverse</i>	ctggtgcttgaactgcacgaactt	70	Mms21	<i>Reverse</i>	ccagagctgatacaggattggaa	62
Hdac4	<i>Forward</i>	tctgctctgctggaaacgag	66	Hdac4	<i>Forward</i>	tagcccgaagctgctgttctct	64
Hdac4	<i>Reverse</i>	gacgcaggagtatacgggtaa	68	Hdac4	<i>Reverse</i>	gacgcaggagtatacgggtaa	63
Hdac7a	<i>Forward</i>	cagaacagatcgcgctcaaat	64	Hdac7a	<i>Forward</i>	tctggtgtccacaccctagc	64
Hdac7a	<i>Reverse</i>	tagtggttatgggtggccagct	66	Hdac7a	<i>Reverse</i>	tagtggttatgggtggccagct	64
Mul1	<i>Forward</i>	gtgcatggtgcttgcctcacta	66	Mul1	<i>Forward</i>	cctggccttgcctgatgtagttg	64
Mul1	<i>Reverse</i>	atcctcttgaccacgccaatct	68	Mul1	<i>Reverse</i>	atcctcttgaccacgccaatct	66
Tls	<i>Forward</i>	cggtggtggttatggcaatc	62	Tls	<i>Forward</i>	cggtggtggttatggcaatc	63
Tls	<i>Reverse</i>	gctgtccagtttcttctgtttgtc	66	Tls	<i>Reverse</i>	ggccccacgatcctggt	65
Traf-7	<i>Forward</i>	aggagattgccttccctgcgctc	68	Traf-7	<i>Forward</i>	aggagattgccttccctgcgctc	66
Traf-7	<i>Reverse</i>	agagcgcagcacaataccat	64	Traf-7	<i>Reverse</i>	tcaaggctcttctctagctggta	63
Senp1	<i>Forward</i>	gagggccccagaaactactga	68	Senp1	<i>Forward</i>	gagggccccagaaactactga	64
Senp1	<i>Reverse</i>	ccatcttcagctgacagcctc	64	Senp1	<i>Reverse</i>	ctaaccgccaaggtccttcttc	63
Senp2	<i>Forward</i>	gggctgcttgaaccctggt	62	Senp2	<i>Forward</i>	gggctgcttgaaccctggt	63
Senp2	<i>Reverse</i>	cagttcgcactccagcattag	64	Senp2	<i>Reverse</i>	gcatttgttcttctgtatgggtga	63
Senp3	<i>Forward</i>	cgagctctccgaccctctcata	70	Senp3	<i>Forward</i>	cgagctctccgaccctctcata	65
Senp3	<i>Reverse</i>	tgggtccaccttagtccatct	68	Senp3	<i>Reverse</i>	gggtctttttagtagagcagca	63
Senp5	<i>Forward</i>	ctcgtgtgcggaagaggatcta	68	Senp5	<i>Forward</i>	ctcgtgtgcggaagaggatcta	63
Senp5	<i>Reverse</i>	acctgtattcagttcacatctaag	66	Senp5	<i>Reverse</i>	tctggagtcctgctgagtgag	64
Senp6	<i>Forward</i>	ccttgatcctccttatggactca	70	Senp6	<i>Forward</i>	gtggctcagagtgcaggag	62
Senp6	<i>Reverse</i>	ccccaaagagtaaatgctgtgtctg	72	Senp6	<i>Reverse</i>	ccccaaagagtaaatgctgtgtctg	64
Senp7	<i>Forward</i>	ttcctcgccatgtaataaagacc	66	Senp7	<i>Forward</i>	actgggtgtttagtgagggtc	63
Senp7	<i>Reverse</i>	gatgtgacttgtcaacacacctgac	74	Senp7	<i>Reverse</i>	gatgtgacttgtcaacacacctgac	63

6. CONSTRUCCIONS DE PLASMIDIS

En l'estudi de la sumoïlació d'NR2E3, es van realitzar mutagènesis dirigides, utilitzant els primers de la Taula 3, contra les lisines ja definides com a sumoïlables¹³⁷ (a la

MATERIALS I MÈTODES

proteïna humana: K185, K330, K337) per a convertir-les en arginines, a partir d'una construcció d'NR2E3 humà en pcDNA4/His-MaxC, cortesia del Dr. Anand Swaroop (referida a partir d'ara com a hNR2E3 WT). D'aquesta manera es va obtenir la combinatòria de construccions, llistades a la Taula 4, amb la primera (K185, enumerada com a 1), segona (K330 o 2) i/o tercera (K337 o 3) lisina mutades. Així, la construcció amb les tres lisines mutades correspon a la hNR2E3 123.

Per a l'estudi de la interacció entre proteïnes mitjançant els assajos de BRET, es va fusionar una de les proteïnes d'interès a la proteïna donadora Rluc (Renilla Luciferasa), i l'altra, a l'acceptora YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), utilitzant els vectors pRluc-N1 i pEYFP-N1, amablement van ser cedits pel Dr. Francisco Ciruela¹⁷¹. Al primer vector (pRluc-N1), es van clonar les seqüències codificants de dels gens *Pias3* i *Hdac4* (mPIAS3 i mHDAC4, respectivament) a partir de cDNA de retines de ratolí, així com també les seqüències de hNR2E3-WT i hNR2E3-123, a partir de les construccions anteriorment descrites. Aquestes últimes, també van ser clonades en el segon vector (pEYFP-N1), igual que les seqüències codificants de mNR2E3 i mNRL obtingudes de cDNA de retines de ratolí. Totes les seqüències van ser amplificades per PCR utilitzant primers que contenen dianes de restricció en l'extrem 5', evitant el codó STOP, per al seu correcte clonatge en pauta a l'extrem N-terminal de les proteïnes Rluc o YFP. Els primers usats i els vectors obtinguts es troben llistats a la Taula 3 i la Taula 4, respectivament.

TAULA 3. LLISTAT DE PRIMERS 2. Parelles de primers utilitzades en la mutagènesi dirigida d'NR2E3 humà i en la clonació amb dianes de restricció d'NR2E3 i les seqüències codificants d'*Hdac4*, *Pias3*, *Nr2e3* i *Nrl* de ratolí. En majúscula es troben indicats els nucleòtids que incorporen la mutació o les dianes dels enzims de restricció.

Gen	Cadena	Seqüència (5'-3')	Descripció
<i>NR2E3</i>	Forward	tgaaacctgtgcta G gctggagccagag	Mutació de la lisina 1 K185R
<i>NR2E3</i>	Reverse	ctctggctccagc C tagcacaggtttca	Mutació de la lisina 1 K185R
<i>NR2E3</i>	Forward	cttggtcctcttca G gccagagacgcgg	Mutació de la lisina 2 K330R
<i>NR2E3</i>	Reverse	cgcgctctctggc C tgaagaggaccaag	Mutació de la lisina 2 K330R
<i>NR2E3</i>	Forward	cggggcctga G ggatcctgagcacgta	Mutació de la lisina 3 K337R
<i>NR2E3</i>	Reverse	tacgtgctcaggatcc C tcaggccccg	Mutació de la lisina 3 K337R
<i>NR2E3</i>	Forward	GTGGAATTC atggagaccaga	Clonatge amb diana de EcoRI
<i>NR2E3</i>	Reverse	CGGGGTACCA agtttttgaacatatcacaaggagct	Clonatge amb diana de KpnI
<i>Hdac4</i>	Forward	GGAATTC atgagctcccaaagccatcc	Clonatge amb diana de EcoRI
<i>Hdac4</i>	Reverse	CGCAAGCTT cagtgggtgttctcctcca	Clonatge amb diana de HindIII
<i>Pias3</i>	Forward	GAAGATCT atggcggagctgggc	Clonatge amb diana de BglII
<i>Pias3</i>	Reverse	CGCAAGCTT gtccaaggaaatgacgtctgacc	Clonatge amb diana de HindIII
<i>Nr2e3</i>	Forward	GAAGATCT atgagctctacagtggctgcc	Clonatge amb diana de BglII
<i>Nr2e3</i>	Reverse	CGCAAGCTT gtttttgaacatgtcacacaggag	Clonatge amb diana de HindIII
<i>Nrl</i>	Forward	GGAATTC atggctttccctcccagtc	Clonatge amb diana de EcoRI
<i>Nrl</i>	Reverse	CGGGATCC aggaagaggtgtgtgtgtcg	Clonatge amb diana de BamHI

Per a l'estudi de la interacció d'hNR2E3-WT amb HDAC4, es va disposar de diverses construccions de la deacetilasa humana en el vector pcDNA3.1 (Taula 4), cedides amablement pel Dr. Xiang-Jiao Yang⁵⁷. D'una banda, es va utilitzar la versió humana WT d'HDAC4 (1-1084) i els seus fragments C-terminal (621-1084) i N-terminal (1-666), tots ells clonats amb l'epítot Flag a N-terminal. D'altra banda, també es va disposar de la forma WT i mutada (K559R) amb l'epítot Myc unit al pèptid His6 a N-terminal.

Les construccions per als assajos de BioID van ser facilitades molt amablement pel Dr. James Sutherland. Per a l'estudi de les interaccions proteiques amb NR2E3, es van clonar les seves formes WT i 123 amb l'enzim optimitzat de BirA WT o R118G (anomenats a partir d'ara com a BirA o BirA*), en un vector amb el promotor CAGdX i l'epítot Myc. Els inserts es van amplificar a partir de les construccions hNR2E3 WT i hNR2E3 123 amb els *primers* de la Taula 3, inserint les dianes de restricció d'EcoRI i XbaI. Es va incloure el codó STOP per tal d'obtenir una proteïna de fusió amb l'enzim biotinitador en N-terminal, seguit del nostre factor de transcripció. D'altra banda, també es va facilitar una construcció amb la lligasa E3 de SUMO CBX4, seguida de BirA*, en un vector amb el promotor CMV (Taula 4).

Per a l'estudi de la sumoïlació d'NR2E3 amb SUMO2, dues construccions més van ser cedides pel grup del Dr. James Sutherland¹⁷², tot i que no van ser usades en assajos de biotinització. Ambdues contenien una forma biotinitable de SUMO2 humà (degut a un pèptid substrat per a BirA en N-terminal, anomenat *bio*), seguit de l'enzim optimitzat BirA. Una d'elles, a més, incorporava l'únic enzim de SUMO E2 conjugador UBC9. Per tal d'evitar la formació de proteïnes de fusió degut a la concatenació de les seqüències, el vector incorporava unes seqüències anomenades T2A (procedents del virus *Thoseaasigna*), que permetien la traducció multicistronica de les diferents proteïnes (Figura 13).

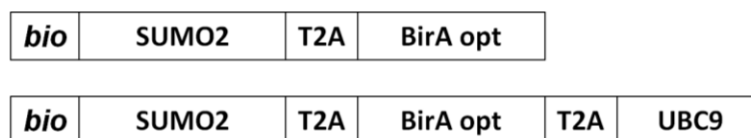


FIGURA 13. ESQUEMA DE LES SEQÜÈNCIES DE bioSUMO2 I bioSUMO2-UBC9. Cada requadre conté una de les seqüències de les construccions multicistroniques bioSUMO2 (superior) i bioSUMO2-UBC9 (inferior), amb el pèptid *bio*, SUMO2, BirA opt, UBC9 i les seqüències víriques T2A.

MATERIALS I MÈTODES

Per a l'estudi de l'activitat d'alguns gens específics de retina, es van utilitzar els vectors pGL3-Promoter, que contenen el promotor de vaca de Rodopsina o el promotor murí de la S-opsina dirigint l'expressió del gen reporter luciferasa, cedits molt amablement pel Dr. Anand Swaroop¹⁷³. D'aquesta manera, canvis en l'activitat transcripcional d'aquests promotors es van poder mesurar amb l'expressió de la luciferasa. Per últim, també es va disposar de les construccions de SUMO1 i SUMO2 amb l'epítot HA, clonades en pcDNA 3.1, que ja teníem al laboratori.

TAULA 4. PLASMIDIS D'EXPRESSIÓ EMPRATS EN DIFERENTS ASSAJOS. Les construccions utilitzades en l'assaig de BRET estan marcades amb [^], i les de BiolD amb ⁺.

Construcció	Vector	Epítot	Descripció
hNR2E3 WT	pcDNA4/His-Max C	Xpress	Isoforma 2 humana d'NR2E3 (WT)
hNR2E3 1	pcDNA4/His-Max C	Xpress	Isoforma 2 humana d'NR2E3 (K185R)
hNR2E3 12	pcDNA4/His-Max C	Xpress	Isoforma 2 humana d'NR2E3 (K185R, K330R)
hNR2E3 13	pcDNA4/His-Max C	Xpress	Isoforma 2 humana d'NR2E3 (K185R, K337R)
hNR2E3 123	pcDNA4/His-Max C	Xpress	Isoforma 2 humana d'NR2E3 (K185R, K330R, K337R)
mNR2E3-YFP[^]	pEYFP N1	-	Fusió d'NR2E3 de ratolí amb YFP
mNRL-YFP[^]	pEYFP N1	-	Fusió d'NRL de ratolí amb YFP
hNR2E3 WT-YFP[^]	pEYFP N1	-	Fusió d'NR2E3 WT humà amb YFP
hNR2E3 123-YFP[^]	pEYFP N1	-	Fusió d'NR2E3 123 humà amb YFP
hNR2E3 WT-Rluc[^]	pRluc N1	-	Fusió d'NR2E3 WT humà amb Rluc
hNR2E3 123-Rluc[^]	pRluc N1	-	Fusió d'NR2E3 123 humà amb Rluc
mPIAS3-Rluc[^]	pRluc N1	-	Fusió de PIAS3 de ratolí amb Rluc
mHDAC4-Rluc[^]	pRluc N1	-	Fusió d'HDAC4 de ratolí amb Rluc
HDAC4	pcDNA3.1	Flag	HDAC4 humana (1-1084)
HDAC4 N-term	pcDNA3.1	Flag	Part N-terminal d'HDAC4 humana(1-666)
HDAC4 C-term	pcDNA3.1	Flag	Part C-terminal d'HDAC4 humana (621-1084)
HDAC4 WT	pcDNA3.1	Myc + His6	Forma humana d'HDAC4 (WT)
HDAC4 K559R	pcDNA3.1	Myc + His6	Forma humana d'HDAC4 (K559R)
BirA*-WT⁺	pCAG	Myc	Fusió BirA opt R118G i NR2E3 humà WT
BirA-WT⁺	pCAG	Myc	Fusió BirA opt WT i NR2E3 humà WT
BirA*-123⁺	pCAG	Myc	Fusió BirA opt R118G i NR2E3 humà 123
BirA-123⁺	pCAG	Myc	Fusió BirA opt WT i NR2E3 humà 123
CBX4-BirA**	pCMV	-	Fusió CBX4 humà i BirA opt R118G
bioSUMO2-UBC9	pCAG	-	SUMO2 humà amb seqüència <i>bio</i> I UBC9
bioSUMO2	pCAG	-	SUMO2 humà amb seqüència <i>bio</i>
SUMO1-HA	pcDNA3.1	HA	SUMO1 humà amb l'epítot HA
SUMO2-HA	pcDNA3.1	HA	SUMO2 humà amb l'epítot HA
Prom Rho	pGL3-Prom	-	Promotor de la Rodopsina amb el gen de la luciferasa
Prom S-ops	pGL3-Prom	-	Promotor de la S-opsina amb el gen de la luciferasa
β-Gal	pCMV-β-gal	-	β-Galactosidasa

7. MUTAGÈNESI DIRIGIDA

Per tal de convertir cadascuna de les lisines (AAG) sumoïlables d'hNr2e3 en arginines (AGG), es van dissenyar parelles de *primers* complementaris que continguessin el canvi de nucleòtid (Taula 3). Es van tenir en compte tres consideracions a l'hora de dissenyar els *primers*: i) màxima centralitat del nucleòtid a mutar dins la seqüència; ii) longitud del *primer* de 25-45 nucleòtids; iii) i temperatura de *melting* (Tm) d'aproximadament 78°C, sense comptar el nucleòtid mutat ni els que el flanquegen a banda i banda. Amb la construcció humana d'NR2E3 WT com a motlle, es van realitzar les PCRs amb la *AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), amb les condicions d'amplificació descrites a la Taula 5. A continuació, es van digerir els productes de PCR amb l'enzim de restricció DpnI (Promega) per tal de tallar les cadenes metilades del DNA motlle (procedent de la producció d'*E.coli*). El producte de la digestió es va transformar en cèl·lules competents DH5α d'*E.coli* i les minipreps obtingudes van ser totalment seqüenciades amb *BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems) per tal de comprovar la seva integritat.

TAULA 5. CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ PER PCR.

Mutagènesi dirigida	qRT-PCR
	95°C - 5 min
94°C - 2 min	95°C - 10 s
94°C - 20 s	62°C - 15 s
50°C - 1 min	72°C - 20 s
68°C - 7 min	95°C - 5 s
68°C - 7 min	65°C - 1 min
	97°C
	40°C - 10 s

} x 30 } x 45

8. CULTIU CEL·LULAR I TRANSFECCIÓ

La línia cel·lular precursora retinal 661W va ser cultivada en medi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) 4'5 g/L glucosa, 1.1g/L piruvat de sodi (Invitrogen), suplementat amb 0'3 g/L glutamina i 40 µL/L β-mercaptoetanol (Invitrogen). En canvi, les cèl·lules HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) i HEK293T (*Human Embryonic Kidney* transformades amb l'antigen T del virus SV40) van ser crescudes en medi DMEM amb L-glucosa (ATCC). Tots els medis de cultiu van ser alhora suplementats

MATERIALS I MÈTODES

amb 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS; Invitrogen) i 1% Penicil·lina-Estreptomicina (PenStrep, Invitrogen). Les cèl·lules es van fer créixer en incubadors a 37°C i 5% CO₂.

Per a la seva transfecció, les cèl·lules van ser sembrades en medi sense antibiòtic durant 16-24 hores. Seguidament se'ls va afegir les construccions de DNA juntament amb la Lipotransfectina (Nitorlab) en un ràtio 3:1 (µL Lipotransfectina:µg DNA) en medi OPTIMEM (Gibco), seguint les indicacions del fabricant.

Alternativament, en l'assaig de BRET, 500.000 cèl·lules HEK293T van ser sembrades per pou en plaques de 6 pous, i transfectades a les 16-24 hores usant Polietilenimina (PEI) (Sigma-Aldrich). La concentració de liposomes es va augmentar a una ràtio de 3'5:1 amb el DNA en 150 mM NaCl i es va procedir seguint les condicions del fabricant. Les quantitats de DNA transfectat pels controls + i - es troben llistades a la Taula 6. Es va mantenir fixa la quantitat de la construcció amb la proteïna donadora de llum (Rluc), i es van transfectar quantitats creixents de l'acceptora (YFP) A més, es va utilitzar el vector buit pcDNA3 per equilibrar les quantitats de DNA total a 4 µg.

TAULA 6. CONDICIONS DE TRANSFECCIÓ EN L'ASSAIG DE BRET. (*) mPIAS3-Rluc i mHDAC4-Rluc, (^) hNR2E3 WT/123-Rluc.

Control +			Control -		
Prot-Rluc*	Prot-YFP	pcDNA3	Prot-Rluc	Prot-YFP	pcDNA3
1 µg	-	3 µg	1 µg	-	3 µg
1 µg	0'25 µg	2'75 µg	-	0'25 µg	3'75 µg
1 µg	0'5 µg	2'5 µg	-	0'5 µg	3'5 µg
1 µg	1 µg	2 µg	-	1 µg	3 µg
1 µg	2 µg	1 µg	-	2 µg	2 µg
1 µg	3 µg	-	-	3 µg	1 µg
Prot-Rluc^	Prot-YFP	pcDNA3	Prot-Rluc	Prot-YFP	pcDNA3
0'5 µg	-	3 µg	0'5 µg-	-	3 µg
0'5 µg	0'25 µg	3'25 µg	-	0'25 µg	3'75 µg
0'5 µg	0'5 µg	3 µg	-	0'5 µg	3'5 µg
0'5 µg	1 µg	2'5 µg	-	1 µg	3 µg
0'5 µg	2 µg	1'5 µg	-	2 µg	2 µg
0'5 µg	3'5 µg	-	-	3'5 µg	0'5 µg

9. SINCRONITZACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR

Amb la finalitat d'estudiar la localització de les proteïnes d'interès en les diferents fases del cicle cel·lular, es van sincronitzar cèl·lules HEK293 en cultiu amb un doble bloqueig amb Timidina (Sigma-Aldrich)¹⁷⁴. A les 24 hores de la seva transfecció, les cèl·lules van ser bloquejades amb 2'5 µM de Timidina durant 18 hores, rentades tres

vegades amb PBS 1x, incubades durant 9 hores amb medi de cultiu i bloquejades, per segona vegada, amb 2'5 µM Timidina durant 17 hores. D'aquesta manera es van arrestar les cèl·lules a l'inici de la fase S. A continuació, es van fixar les cèl·lules després del segon bloqueig (T0, fase S), o alternativament després de ser incubades en medi de cultiu durant 6 o 8 hores (T6 i T8, fase G2/M) o 12 hores (T12, fase G1).

10. ANÀLISI DE LA VIDA MITJANA DE LA PROTEÏNA

Per a l'estudi de la vida mitjana de la proteïna humana NR2E3 en la seva forma WT i mutada 123, es va afegir l'inhibidor de la síntesi proteica cicloheximida (CHX) (Sigma-Aldrich) a 150 µM en cèl·lules HEK293, 36 hores després de la seva transfecció amb cadascuna de les dues construccions. Paral·lelament, es van generar les mateixes condicions sense afegir CHX (per tant, sense inhibició de la síntesi proteica) com a control de la tècnica. Després d'optimitzar els temps d'anàlisi, es va decidir recollir les cèl·lules a les 0, 2, 4, 6, 8 i 12 hores després d'afegir la CHX. Ambdues formes de hNR2E3 van ser immunodetectades per *Western Blot* i quantificades en relació a la proteïna normalitzadora GAPDH, mitjançant el programa informàtic *Multi Gauge* (Fujifilm).

11. ANÀLISI DE DEGRADACIÓ DE PROTEÏNA VIA PROTEASOMA

En l'estudi de la degradació via proteasoma de la proteïna humana NR2E3 en la seva forma WT i mutada 123, es va afegir al medi cel·lular l'inhibidor de proteasoma MG132 (Sigma-Aldrich) a una concentració final de 10 µM, 36 hores després de la transfecció. Transcorregudes 16 hores de l'addició, es van lisar i bullir les cèl·lules per al seu posterior processat per *Western Blot*.

12. OBTENCIÓ DE LISATS PROTEICS

Per a la seva obtenció de lisats proteics, en acabar el temps de cultiu posttransfecció per a cadascun dels experiments, les cèl·lules van ser rentades dues vegades directament en el pou de cultiu i recollides en PBS 1x fred per tal d'eliminar les restes de medi. Seguidament es van centrifugar durant 5 min a 2000 rpm i 4°C i es va descartar tot el sobrenedant. Els *pellets* cel·lulars van ser ressuspesos en *Protein Loading Buffer* 1x (120 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% Glicerol, 0,2% Blau de Bromofenol en Aigua MiliQ) amb 5% 2-Mercaptoetanol, i bullits durant 5 min a 95°C.

MATERIALS I MÈTODES

Després d'una breu centrifugació, les mostres es van processar per WB o, alternativament, guardar a -20°C fins al seu ús.

13. IMMUNODETECCIÓ PER *WESTERN BLOT*

La immunodetecció de proteïnes per *Western Blot* (WB) es va realitzar sobre lisats proteics o mostres obtingudes per IP o BioID, que van ser carregades en gels SDS-PAGE 7'5% o 10% acrilamida, transferides en membranes de PVDF (Roche) i bloquejades 2 h a RT en PBST (PBS 1x, 0'1% Tween) amb 5% BSA (*Bovine Serum Albumine*) o 10% llet, depenent de l'anticòs. A continuació, van ser incubades *overnight* a 4°C amb l'anticòs primari, rentades 3 x 10 min en PBST, incubades 1 h a RT amb l'anticòs secundari i novament rentades 3 x 10 min en PSBT. Finalment, les membranes van ser revelades amb els reactius *Lumi-Light Western Blotting Substrate* (Roche) o, alternativament, *ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (Amersham), i la quimioluminescència va ser detectada amb un lector LAS-4000 mini (Fujifilm). Per al processat i la quantificació de les imatges obtingudes es va utilitzar el software *Multi Gauge* (Fujifilm).

Les dilucions i bloquejos dels diferents anticossos primaris i secundaris es troben llistats en la Taula 7.

14. ASSAIG DE BRET

L'assaig de BRET permet l'estudi de la dinàmica d'interacció entre dues proteïnes que es troben fusionades a una molècula donadora d'energia o a una molècula acceptora d'aquesta energia, per mitjà de la quantificació de la transferència d'energia entre aquestes dues molècules. L'assaig va ser realitzat seguint el protocol del grup del Dr. Paco Ciruela¹⁷¹ amb algunes modificacions. Breument, les cèl·lules transfectades amb les construccions marcades amb [^] de la Taula 4, seguint les condicions de la Taula 6, van ser recollides a les 48 h de la transfecció, i rentades dues vegades en PBS 1x, centrifugant a 200 g durant 5 min. A continuació, es van ressuspèndre en PBS 1x vigilants de no lisar-les, per obtenir una concentració de 200.000 cèl·lules per cada 90 µL.

TAULA 7. ANTICOSSOS. Conjunt d'anticossos utilitzats en la metodologia, amb les especificacions de l'hoste del què provenen, les concentracions utilitzades en les diferents tècniques i el bloqueig usat en el WB (per a aquells que correspongui).

Anticòs	Hoste	Dilució	Bloqueig WB
α-Biotin HRP (7075, Cell Signaling)	<i>Goat</i>	1:1000 (WB)	5% BSA
α-CBX4 (18544-1-AP, Proteintech)	<i>Rabbit</i>	1:50 (ICC/IHC)	-
α-Flag™ (FG4R, ThermoFisher Scientific)	<i>Mouse</i>	1:500 (WB)	5% BSA
α-GAPDH (ab9484, Abcam)	<i>Mouse</i>	1:1000 (WB)	5% BSA
α-GFP (sc-8334, Santa Cruz)	<i>Rabbit</i>	1:1000 (WB)	5% BSA
α-HA (MMS-101, Covance)	<i>Mouse</i>	1:1000 (WB)	10% llet
α-Histone H3 (phospho S10) (ab14955, Abcam)	<i>Mouse</i>	1:1000 (ICC)	-
α-HDAC4 (17449-1-AP, Proteintech)	<i>Rabbit</i>	1:500 (WB), 1:50 (IHC/ICC)	10% llet
α-Myc (Myc.A7, ThermoFisher Scientific)	<i>Mouse</i>	1:1000 (WB)	5% BSA
α-NR2E3 (ab41922, Abcam)	<i>Mouse</i>	1:1000 (WB), 1:50 (IHC/ICC)	10% llet
α-PCNA (ab29, Abcam)	<i>Mouse</i>	1:50 (ICC)	-
α-PIAS3 (ab58406, Abcam)	<i>Rabbit</i>	1:1000 (WB), 1:50 (IHC/ICC)	10% llet
α-PIAS4 (orb32098, Biorbyt)	<i>Rabbit</i>	1:50 (IHC)	-
α-Rho (ab5417, Abcam)	<i>Mouse</i>	1:500 (IHC)	-
α-Rluc (ab185925, Abcam)	<i>Rabbit</i>	1:1000 (WB)	5% BSA
α-SENP1 (ab58417, Abcam)	<i>Rabbit</i>	1:50 (IHC)	-
α-TLS (orb100082, Biorbyt)	<i>Rabbit</i>	1:100 (IHC)	-
α-TOPORS (H-127, Santa Cruz)	<i>Rabbit</i>	1:50 (IHC)	-
α-Tubulin (T5168, Sigma Aldrich)	<i>Mouse</i>	1:1000 (WB)	5% BSA
α-Xpress (R910-25, ThermoFisher Scientific)	<i>Mouse</i>	1:1000 (WB)	5% BSA
α-Mouse IgG-PO (A5906, Sigma Aldrich)	<i>Sheep</i>	1:2000 (WB)	5% BSA/ 10% llet
α-Rabbit IgG-PO (NA934V, Ge Healthcare)	<i>Donkey</i>	1:2000 (WB)	5% BSA/ 10% llet
Alexa Fluor® 488 α-Mouse IgG	<i>Goat</i>	1:200 (IHC)	-
Alexa Fluor® 568 α-Rabbit IgG	<i>Goat</i>	1:200 (IHC), 1:300 (ICC)	-
Alexa Fluor® 647 α-Mouse IgG	<i>Goat</i>	1:300 (ICC)	-

Per a l'anàlisi de la transferència d'energia es van pipetejar 90 μ L de cada suspensió cel·lular per triplicat, paral·lelament en dues plaques de 96 pous: una negra, per a la lectura de la fluorescència, i una blanca, per a la lectura simultània de fluorescència i luminescència. Per a la lectura de la fluorescència de la molècula acceptora es van afegir 10 μ L de PBS 1x a cada pou de la placa negra fins a un volum final de 100 μ L, i es va analitzar la placa negra amb un lector de placa POLARstar Omega (BMG Labtech), utilitzant els filtres d'excitació de 485 ± 12 nm i de detecció de 535 ± 30 nm. En acabar, es van afegir 10 μ L de benzyl-coelenterazina (NanoLight Technologies) a una concentració final de 5 μ M a cada pou de la placa blanca. Després d'1 min de l'addició del reactiu, es van llegir les emissions simultànies amb els dos filtres del lector

MATERIALS I MÈTODES

(475 ± 30 nm i 535 ± 30 nm). Transcorreguts 10 min de l'addició del reactiu, una segona lectura es va realitzar a la placa blanca, amb la mateixa configuració. Per als controls negatius, es va realitzar el mateix procediment, substituint els 90 μ L d'una única mostra per 45 μ L de la suspensió cel·lular transfectada amb la proteïna de fusió amb Rluc i 45 μ L de cada concentració de la proteïna de fusió amb YFP, barrejades al moment.

Per al càlcul de la ràtio del BRET (expressada en *miliBRET Units*, mBU) es va dividir l'emissió a 535 nm entre l'emissió a 475 nm de la lectura d'1 min. La normalització de l'increment de la fluorescència de l'acceptor (YFP) es va obtenir dividint-la entre l'emissió del donador (Rluc) als 10 min, quan l'energia de transferència decau. Finalment, es va construir la corba de saturació representant gràficament la ràtio del BRET respecte la senyal d'emissió normalitzada d'acceptor/donador. La corba hiperbòlica resultant es va analitzar com a regressió no lineal amb el programa *GraphPad Prism*.

Prèviament a la realització de la tècnica, es va comprovar la correcta expressió de cadascuna de les construccions, que van ser transfectades individualment en cèl·lules HEK293T, a concentracions creixents fins a un màxim de 4 μ g. Seguint el mateix procediment que en l'anàlisi del BRET, es van llegir les corresponents fluorescències (per YFP, en placa negra) o luminescències (per Rluc, afegint coelenterazina en placa blanca), i es van processar les dades amb el GraphPad Prism. D'aquesta manera es va comprovar la expressió i la saturació de les diferents construccions per a l'optimització de les condicions del BRET.

15. ASSAIG DE LA LUCIFERASA AMB PROMOTORS ESPECÍFICS

La quantificació de l'activitat dels promotors de S-opsina i Rodopsina es va realitzar mitjançant un assaig de luciferasa usant les corresponents construccions (Taula 4). Les cèl·lules van ser lisades en *Reporter Lysis Buffer* (Promega), congelades a -80°C i centrifugades 2 min a 12000 g per tal de descartar les restes cel·lulars. Els valors de la luciferasa van ser mesurats després de 5 min de reacció amb el *ONE-Glo Luciferase Assay System* (Promega) en una placa blanca de 96 pous, utilitzant el luminòmetre *Modulus Microplate Multimode Reader* (Turner Biosystems). Els resultats van ser normalitzats amb els valors obtinguts de la reacció de la β -galactosidasa, expressada en el vector pCMV- β -Gal, amb el *Beta-Glo Assay System* (Promega), tot seguint les instruccions del fabricant.

16. IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP)

La immunoprecipitació (IP) és una tècnica que permet la precipitació d'una proteïna coneguda utilitzant un anticòs específic. En condicions no desnaturalitzants, aquesta proteïna pot trobar-se unida a d'altres formant complexos, per la qual cosa la IP permet la identificació de proteïnes d'interacció, el que anomenem co-immunoprecipitació (CoIP). En aquest estudi, un total de 16 retines van ser *disseccionades* i homogeneïtzades, en fresc, amb un homogeneïtzador Polytron PT1200E (Kinematica, AG, Lucerna, Suïssa), en 400 µL de RIPA *Buffer* (0.25% Desoxicolat w/v, 1% NP40 v/v, 1 M Tris pH 7.5, 500 mM EDTA i 5 M NaCl) suplementat amb inhibidor de proteases *cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) i 10 mM N-Etilmaleimida (NEM) (Sigma-Aldrich). Alternativament, en el cas de mostres de cultiu cel·lular, la homogeneïtzació es va fer passant les mostres deu vegades per una xeringa amb una agulla de 25 G.

Seguidament, es van centrifugar les mostres a 13000 rpm durant 10 minuts a 4°C. El sobrenedant es va recollir en un nou tub, del que se'n van separar 40 µL com a "Input". La resta de mostra retinal o cel·lular, es va incubar dins un tub amb 12 µg o 4 µg d'anticòs, respectivament, tota la nit (*overnight*) rotant sobre si mateix (*end-over-end*) a 4°C. Per tal de capturar els complexos proteïna-anticòs, es van incubar les mostres durant 4 hores *end-over-end* a RT amb 50 µL de Sepharose-Protein G (Invitrogen), prèviament compensades en 5 volums de PBS 1x seguit d'una centrifugació a 3000 rpm durant 30 s. Seguidament, es van centrifugar les mostres 30 s a 3000 rpm i es va guardar el sobrenedant com a control de l'eficiència de la tècnica. El *pellet* es va rentar tres vegades en 10 volums de PBS 1x, amb centrifugacions com les anteriors. Després de treure l'últim sobrenedant, els *pellets* van ser eluïts en 50 µL de *Protein Loading Buffer* 2x i 5 µL de 2-Mercaptoethanol, i bullits a 95°C durant 5 min. Per a la seva immunodetecció, les mostres van ser processades per *Western Blot*, o alternativament congelades per a la seva posterior utilització.

17. CHIP

La immunoprecipitació de cromatina o *Chromatin Immunoprecipitation* (ChIP) és l'estudi de la unió de proteïnes o complexos proteics a seqüències concretes del DNA per mitjà de la IP d'una proteïna coneguda. Per a la realització de la tècnica, dues retines fresques de ratolins P60 de la soca C57BL/6J van ser obtingudes i fixades en solució de *Crosslinking* (1% Formaldehid, 50 mM Hepes pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.5 mM

MATERIALS I MÈTODES

EGTA i 100 mM NaCl) durant 15 min, canviant la solució cada 5 min. Tots els rentats amb les diferents solucions es van realitzar amb un volum d'1 mL a RT i girant *end-over-end*. Per tal d'aturar la unió covalent del DNA i les proteïnes (*crosslinking*), es van fer dos rentats, un de ràpid i l'altre de 10 min, amb solució STOP (0'01% Tritó-X-100 i 0'125 M Glicina en PBS 1x). Seguidament, es van dur a terme dos rentats de 10 min, un amb Solució A (10 mM Hepes pH 7'9, 10 mM EDTA, 0'5 mM EGTA i 0'25% Tritó-X-100) i l'altre amb Solució B (10 mM Hepes pH 7'9, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0'5 mM EGTA i 0'01% Tritó-X-100). Amb la intenció de trencar el DNA en fragments d'aproximadament 200 pb, es van homogenitzar les mostres en 800 µL de Solució de Sonicació (10 mM Hepes pH 7'9, 1 mM EDTA i 0'5 mM EGTA) utilitzant l'homogenitzador *Kontes Pellet Pestle* (Kimble™), i es van passar 10 vegades per una xeringa amb una agulla de 18 G. Llavors, les mostres van ser dividides en volums de 300 µL i sonicades amb el sonicador *Bioruptor® Plus* (Diagenode) en tres rondes de 10 min en sèries de 30 s ON/ 30 s OFF, afegint gel per evitar el sobreescalfament del sonicador. Per tal de descartar el *pellet* i recollir el sobrenedant, les mostres sonicades es van centrifugar a 13000 rpm durant 10 min a 4°C, i se'n van separar 80 µL i 20 µL (marcats com a *Chromatin* i *Input*, respectivament) com a control de la qualitat i correcta sonicació de les mostres. De la resta es van agafar dos volums de 200 µL, corresponents al "Control -" i "Output", i es van incubar amb 800 µL de Solució IP (20 mM Tris-HCl pH 8, 1% Tritó-X-100, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA i inhibidor de proteases *cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) i 2 µg d'anticòs durant 3 hores *end-over-end* a 4°C. Per al control negatiu (C -), es va utilitzar l'anticòs secundari SAMPO, mentre que pels *Outputs*, els anticòs de les proteïnes d'interès. A continuació, es van incubar les mostres amb 20 µL de *DynaBeads® Protein G* (ThermoFisher Scientific) durant 1 hora *end-over-end* a 4°C. Llavors, amb l'ajuda d'un imant *DynaMag™-2* (ThermoFisher Scientific) es van fer 5 rentats a RT de 10 min amb Solució IP, un més amb una solució 0'25M LiCl, 0'5% NP-40, 0'5% desoxicolat de sodi, 2 mM EDTA i 10 mM Tris-HCl pH8, i dos amb TE (1mM EDTA i 10mM Tris-HCl pH 8). Juntament amb els vials *Chromatin* i *Input*, es van afegir els volums necessaris per arribar a 100 µL amb *RNAsa DNAsa Free* (Roche) a una concentració final de 50 µg/mL en TE, i es van incubar 30 min a 37°C. Seguidament es van incubar a 65°C *overnight* amb 0'5% SDS i 500 µg/mL Proteinasa K. En acabat, es van afegir 100 µL de TE i, en el cas de l'*Output* i el Control-, es van vortejar les mostres i recuperar el sobrenedant utilitzant l'imant. Finalment, es van purificar els 200 µL de

mostra amb el *E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit* (Omega) per a l'obtenció dels fragments de DNA de les mostres de l'*Output* i el C -.

Per mitjà d'una PCR quantitativa (qPCR) es van analitzar les mostres de DNA obtingudes amb cada ChIP (*Input*, C - i *Output*), utilitzant el mateix sistema i condicions que en el cas de la RT-qPCR, anteriorment descrita (Taula 5). L'amplificació de les seqüències dels promotors de ratolí de la *M-ops*, *S-ops*, *Rho*, *Crx*, *Nr2e3* i *Nrl*, es va realitzar amb les parelles de *primers* llistats a la Taula 8. Les dades es van analitzar amb el programa LightCycler 480, per mitjà d'una quantificació relativa de les mostres de DNA del C - i l'*Output* en relació a l'amplificació de l'*Input*, per a cada parella de *primers*. Els resultats van ser finalment normalitzats amb el valor del C - (rebut aquest el valor d'1), pel que els valors de l'*Output* corresponen a les vegades d'expressió respecte al C -, o amplificació inespecífica.

TAULA 8. LLISTAT DE PRIMERS 3. Parelles de *primers* dels promotors dels gens llistats, utilitzats en l'amplificació de les mostres del ChIP per q-PCR.

Gen	Primer	Seqüència 5'-3'
<i>Mops</i>	Forward	gtggattggactcagaaacatggaa
<i>Mops</i>	Reverse	ccaaaccttcaccatctgatctct
<i>Sops</i>	Forward	aggtgagatgcagaggagcctg
<i>Sops</i>	Reverse	ggcctggaggatgctgacctatatt
<i>Rho</i>	Forward	gatatctcgcggatgctgaatca
<i>Rho</i>	Reverse	acagcgcaactccaggcac
<i>Crx</i>	Forward	agccagggttacatgaaatactgctg
<i>Crx</i>	Reverse	tgtagaccaagccacaacatccaa
<i>Nr2e3</i>	Forward	aggaggaaactgaggttcggagag
<i>Nr2e3</i>	Reverse	ggtaaggacagattcacctccatcg
<i>Nrl</i>	Forward	agcaaaccaaaagcaaagcgct
<i>Nrl</i>	Reverse	ggcactttgtcacaataacaaaaaccg

18. ELECTROPORACIÓ DE CULTIUS ORGANOTÍPICS DE RETINA

La transfecció de DNA és una tècnica molt eficient en cultius cel·lulars. No obstant, en cultius organotípics, el DNA s'introdueix en les cèl·lules del teixit per a la seva expressió per mitjà de l'electroporació, utilitzant polsos elèctrics per incrementar la permeabilitat de la membrana cel·lular. Així, un cop disseccionades i trossejades les retines de ratolins P0 de la soca C57BL/6J, els fragments van ser electroporats amb el *Neon® Transfection System* (Invitrogen), tot seguint les instruccions del fabricant. Es van utilitzar 6 µg d'una construcció amb GFP (com a control de la tècnica) i 6 µg del nostre DNA a electroporar, en un volum final de 10 µL en *Buffer R* per electroporació, i

MATERIALS I MÈTODES

una configuració de l'electroporador de 500 V, 50 ms i 5 polsos. Finalment, es van plaquejar els explants retinals en la membrana del *transwell* cel·lular *Millicell®Cell Culture Inserts* 0'4 µm, 30 mm de diàmetre (Millipore), disposats en plaques de cultiu cel·lular de 6 pous (Thermo Scientific) sobre 2 mL de medi de cultiu *Neurobasal®-A* (Gibco), suplementat amb Penicil·lina-Estreptomicina 1X (BioWest), L-glutamina 1 mM (Gibco), D-glucosa 0'06% (Sigma), NaH₂CO₃ 0'0045% (BioWest) i B27® 1X (Gibco).

19. ASSAJOS D'INTERACCIÓ PROTEICA AMB EL SISTEMA BIOID

El sistema BioID utilitza l'activitat de l'enzim conjugador de biotina BirA per a l'estudi de les interaccions proteiques, mitjançant la fusió d'una forma promíscua de l'enzim a la proteïna d'estudi. La seva transfecció en un sistema cel·lular en presència de biotina permet la seva conjugació covalent a totes les proteïnes d'interacció o pròximes a la proteïna fusionada, que poden ser purificades i analitzades.

Així, després de transfectar les cèl·lules HEK293 o electroporar els explants retinals de ratolí amb les construccions de DNA corresponents (marcades amb + a la Taula 4), es va suplementar el medi de cultiu amb D-Biotina (Sigma). En el cas dels cultius cel·lulars es va afegir 24 hores abans de recollir-les a una concentració final de 50 µM. Per als explants retinals, es va augmentar la concentració a 200 µM en el medi de cultiu just en el moment de l'electroporació (48 hores abans de la recollida). A més, també es va suplementar la barreja d'electroporació de DNA en *Buffer R* amb 100 µM de D-Biotina. A continuació, les cèl·lules van ser rentades dues vegades i recollides en un 1 mL de PBS 1x fred, centrifugant 5' a 4°C i 1500 rpm. En quant als explants, aquests van ser directament recollits en PBS 1x fred i rentats dues vegades i recollides en les mateixes condicions de centrifugació indicades abans. Els *pellets* de cèl·lules o explants van ser ressupesos en 1 mL de *Lysis Buffer* (8 M Urea, 1% SDS, 60 mM NEM (Sigma-Aldrich), inhibidor de proteases *Complete™*, *Mini Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), en PBS 1x, i passats 10 vegades a través d'una agulla de 25 G. Per eliminar totes les restes cel·lulars insolubles, es van centrifugar les mostres durant 20 min a 14000 rpm. El sobrenedant obtingut es va transferir a un tub nou, juntament amb 3 mL de *Binding Buffer* (3 M urea, 1 M NaCl, 0'25% SDS, 60 mM NEM i inhibidors de proteases, en PBS 1x), i d'allà se'n va extreure 80 µL per congelar, corresponents a l'*Input*. La resta de volum es va afegir a 80 µL de la resina *High Capacity NeutrAvidin Agarose Resin* (Pierce, Thermo Scientific), prèviament equilibrada, i es va incubar a RT

durant 18 hores en rotació. La resina va ser equilibrada amb 10 volums (500 µL) de PBS 1x (una vegada) i de *Binding Buffer* (dues vegades), centrifugant durant 4 min a 2000 rpm. Transcorregut el període d'incubació, les mostres es van centrifugar 5 min a 3000 rpm, i el sobrenedant es va recollir i se'n va conservar una alíquota de 80 µL, corresponent a la mostra que anomenarem Sobrenedant. El *pellet* de resina obtingut, es va rentar en 500 µL de diferents *Wash Buffers* (WB), centrifugant sempre 4 min a 1500 rpm per recuperar la resina. Els rentats realitzats van ser els següents: 2x WB1, 3x WB2, 1x WB3, 3x WB4, 1x WB1, 1x WB5 i 3x WB6. Totes les solucions van ser preparades en PBS 1x, filtrades amb membranes de 0'22 µM i guardades a RT per no més d'un mes. La composició de les solucions usades és la següent. WB1: 8 M urea, 0'25% SDS; WB2: 6 M Hidroclorur de Guanidina; WB3: 6'4 M urea, 1 M NaCl, 0'2% SDS; WB4: 4 M urea, 1 M NaCl, 10% isopropanol, 10% etanol, 0'2% SDS; WB5: 8 M urea, 1% SDS; WB6: 2% SDS. Després de l'últim rentat, es van afegir 50 µL d'*Elution Buffer* (4X SDS Sample Buffer, 100 mM DTT) als *pellets* de la resina. Per evitar que les proteïnes purificades es tornessin a unir a la resina, es van bullir les mostres dues vegades durant 5 min, vortejant vigorosament entremig, i es van centrifugar 5 min a 14000 rpm, per tal de separar en un nou tub, el volum eluït. Paral·lelament, a les mostres separades com a *Input* i Sobrenedant es van afegir 20 µL de 5X SDS *Sample Buffer* (5% 2-Mercaptoetanol, 0'02% Blau de Bromofenol, 30% Glicerol, 10% SDS, 250 mM Tris-HCl pH 6'8), i es van fer bullir durant 5 min. Finalment, les mostres van ser analitzades per WB per a la detecció de proteïnes biotinilades amb *High Sensitivity Streptavidin-HRP* (Life Technologies) o, alternativament, amb α-Biotin HRP (Taula 7).

20. IMMUNOLocalITZACIÓ AMB FLUORESCÈNCIA

La immunolocalització amb fluorescència de proteïnes en retina o cultiu cel·lular es va dur a terme per mitjà de tècniques d'immunohistoquímica (IHC) o immunocitoquímica (ICC), respectivament. En el primer cas, seccions de 16-18 µm de retines de ratolins C57BL/6J a P60, disposades en vidres portaobjectes *Superfrost™ Plus Microscope Slides* (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) van ser assecades 30-45 min a RT, rentades 10 min en PBS 1x i bloquejades durant 1 h en *Blocking Buffer* (2% *Sheep Serum* i 0'3% Tritó-X-100, en PBS 1x). Seguidament, es van afegir els anticossos primaris en *Blocking Buffer* per a la seva incubació *overnight* a 4°C. A continuació, es van rentar les mostres en PBS 1x (3 x 10 min) i es van incubar 1 h a RT amb DAPI (Roche Diagnostics, Indianapolis, NY) (1:300) i els corresponents anticossos secundaris

MATERIALS I MÈTODES

conjugats amb Alexa Fluor 488 o 568 (Life Technologies, Grand Island, NY). Finalment, es van rentar novament les seccions amb PBS 1x (3 x 10 min) i es van muntar les mostres amb *Fluoprep* (bioMérieux) per a la seva anàlisi amb microscòpia confocal (SP2, Leica Microsystems).

En el segon cas, cèl·lules HEK293 cultivades en cobreobjectes tractats amb Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), van ser fixades amb PFA al 2% durant 10 min i al 4% durant 20 min. A continuació, les cèl·lules van ser rentades en PBS 1x (3 x 5 min), bloquejades 20 min en *Blocking Buffer* (2% *Sheep Serum* i 0'1% Tritó-X-100, en PBS 1x) i incubades amb els anticossos primaris en *Blocking Buffer overnight* a 4°C. En acabat, es van tornar a rentar en PBS 1x (3 x 5 min) i es van incubar 2h a RT amb DAPI (Roche Diagnostics, Indianapolis, NY) (1:300) i els corresponents anticossos secundaris conjugats amb Alexa Fluor 568 o 647 (Life Technologies, Grand Island, NY) en PBS 1x. Per últim, es van rentar novament les cèl·lules amb PBS 1x (3 x 5 min) i es van muntar els cobreobjectes amb *Mowiol* (Sigma-Aldrich) per a la seva posterior anàlisi amb microscòpia confocal (SP2, Leica Microsystems).

Els anticossos i les seves dilucions utilitzades en ambdues tècniques, es troben llistats a la Taula 7.

Per al processat i anàlisi de les imatges es va usar el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) amb el paquet de processat Fiji (<https://fiji.sc/>).



RESULTATS



1. ANÀLISI DE L'EXPRESSIONI DE L'MRNA DELS GENS DE LA VIA DE SUMO EN LA RETINA DE RATOLÍ ADULT

1.1. NIVELLS D'EXPRESSIONI DE SUMO I ELS SEUS ENZIMS EN LA RETINA DE RATOLÍ

Atès que el ratolí és un dels animals model més emprats en l'estudi de la retina, i que els gens de la via de SUMO en humans tenen els seus ortòlegs en ratolí, es va proposar avaluar els nivells d'expressió relatius d'mRNA de tots els enzims del metabolisme de SUMO i proporcionar un mapa preliminar dels seus patrons d'expressió en la retina adulta de ratolí. Tenint en compte que la via de SUMO és rellevant en la regulació del ritme circadiari, també es va investigar si l'exposició a la llum o a la foscor era causant d'algun efecte transcripcional (ja sigui inducció o repressió) en els gens de la via.

Tres mostres retinals van ser obtingudes de ratolins P60 estabularitzats en 12:12 h de llum/foscor, en quatre condicions diferents (Figura 12), anomenades: condició 1- després de 15 hores en la fase de foscor (en condicions normals els animals ja portarien tres hores exposats a la llum); condició 2- després de 13'5 hores de fase de foscor seguit d'1'5 hores de llum (per tal de detectar pics ràpids d'activació/repressió deguts a l'exposició a la llum, comparant directament amb la condició anterior); condició 3- després de 6 hores d'exposició a la llum (durant la fase normal de llum); i finalment, condició 4- després de 2 hores de foscor (durant una fase normal de foscor, per tal de detectar una activació/inhibició transcripcional deguda a l'exposició a la foscor o a la fase circadiària de foscor).

Es van realitzar RT-PCRs quantitatives per valorar els nivells d'expressió de 30 gens (les parelles de *primers* dissenyats es troben llistats a la Taula 2), incloent SUMO i els seus enzims E1, E2 i E3 i proteases (Figura 14A). També es va analitzar un gen retinal altament expressat que presenta un comportament de ritme circadiari (*Rho*)¹⁶⁶, i tres factors de transcripció rellevants pel destí i funcionament de con i bastó, i que poden ser sensibles a les condicions de llum/foscor (*Crx*, *Nrl*, *Nr2e3*, Figura 14B). A més, dos gens implicats en distròfies de retina, el prèviament mencionat *Rho* més *Cerkl*, van ser inclosos com a valors llindar interns de referència per a nivells alts i baixos d'expressió en retina, respectivament.

Tots els valors van ser normalitzats respecte a l'expressió de *Gapdh* i multiplicats per 10⁴ (excepte *Rho*, amb nivells d'expressió de 4 a 5 ordres superior a la resta) i, per tant,

RESULTATS

els valors relatius d'expressió poden ser directament comparats. La Figura 14 mostra els valors mitjans i la desviació estàndard de tres mostres biològiques diferents per cada gen i condició. Cada mostra va ser obtinguda d'un mínim de 3 retines i analitzada en 3 replicats experimentals per minimitzar l'error tècnic. Els colors de les barres corresponen als de les quatre condicions de la Figura 12 (1: gris fosc, 2: gris clar, 3 blanc, 4: negre).

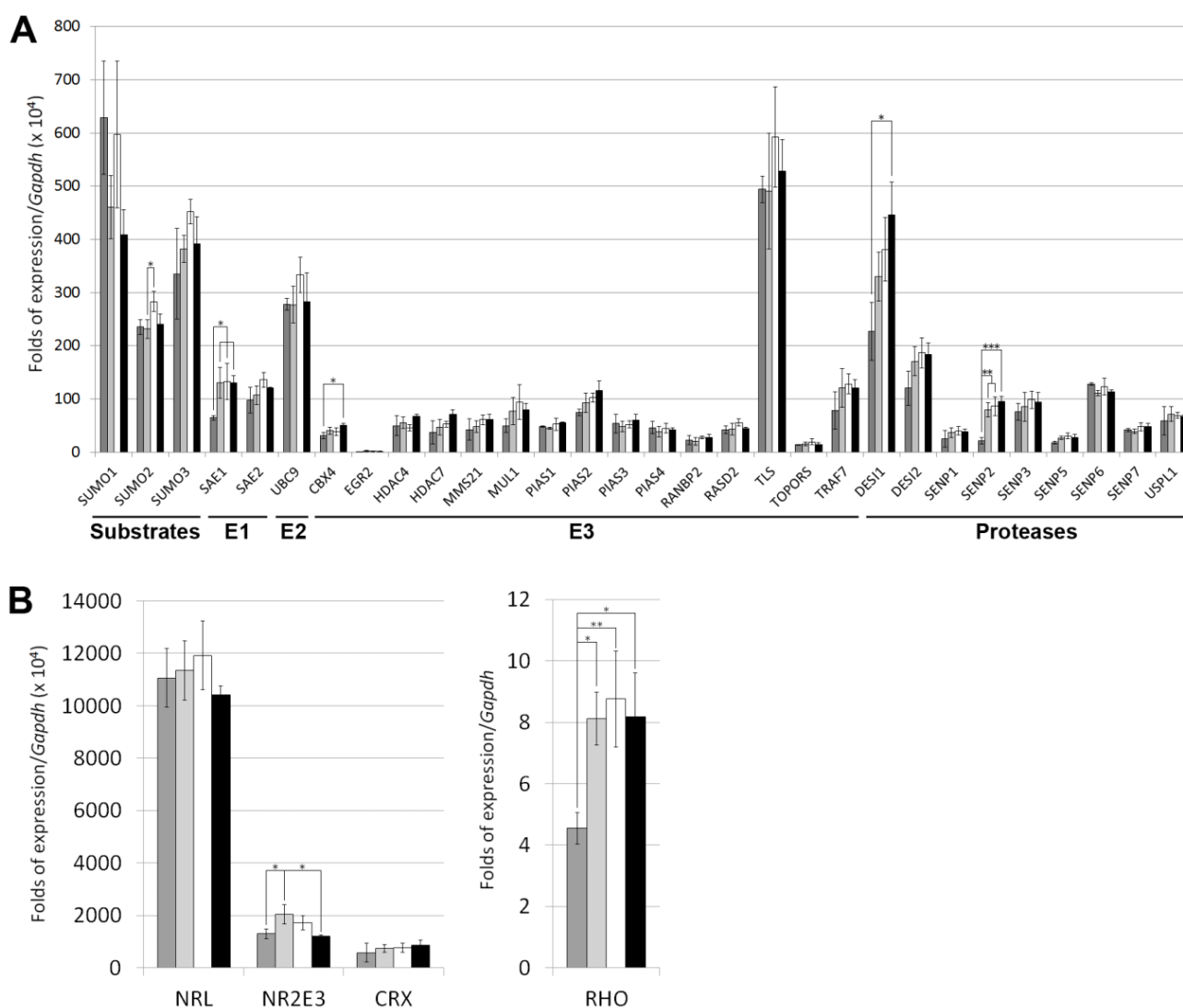


FIGURA 14. EXPRESSIÓ QUANTITATIVA RELATIVA DELS GENS DE SUMO, ELS ENZIMS DE LA SEVA VIA I ALTRES GENS RETINALS EN LA RETINA DE RATOLÍ. (A) Nivells transcripcionals dels gens de SUMO i dels seus enzims. Els nivells d'expressió corresponen a la ràtio respecte l'expressió de *Gapdh* (utilitzat com a normalitzador) multiplicat per 10^4 . (B) Nivells transcripcionals de diversos gens retinals. Els nivells de *Rhodopsina* (panell dret) són equiparables als de *Gapdh*, pel que la ràtio està directament representada, mentre que la ràtio dels factors de transcripció (esquerra) estan multiplicats per 10^4 . El color de les barres en A i B indiquen la condició en el que les retines van ser obtingudes (explicat a la Figura 12). Els valors de l'expressió dels gens són la mitjana de tres mostres independents de cDNA de retina, per cada condició, pel que les barres de la desviació estàndard indiquen la variabilitat d'expressió entre diferents individus. El test de Tukey-Kramer va ser usat per la comparació de les mitjanes de les condicions. Els asteriscs (*, ** o ***) mostren una diferència estadísticament significativa amb un $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$, respectivament.

Els resultats van mostrar que els tres gens que codifiquen per les proteïnes Sumo1, Sumo2 i Sumo3 es trobaven altament expressats a retina. Notablement, es va detectar que el gen de l'únic enzim E2 conjugador (*Ubc9*) estava més expressat que els gens que codifiquen pels dos component de l'heterodímer E1 activador (*Sae1* i *Sae2*). D'altra banda, el conjunt de E3 lligases i proteases de SUMO van mostrar una major variabilitat en els nivells d'expressió. La lligasa més expressada va ser *Tls*, en contrast amb l'expressió basal d'*Egr2*, amb una diferència d'aproximadament dos ordres de magnitud. En el cas de les proteases, *Desi1* va ser la més expressada, mentre que *Senp1* i *Senp5* van ser les més baixes en nivells d'expressió. Pel que fa als gens retinals rellevants analitzats, *Rho* va mostrar l'expressió més elevada, directament comparable a *Gapdh*, seguit d'*Nrl* i, finalment, *Nr2e3* i *Crx*.

1.2. VARIACIONS EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA INDUÏDA PER L'EXPOSICIÓ A LA LLUM

Tot i que, en general, els nivells de transcripció dels gens estudiats es van mantenir en les diferents condicions de llum/fosc, es van trobar alguns gens que presentaven una expressió consistentment i significativa alterada. Com es mostra a la Figura 15, *Sae1*, *Senp2* i *Rho* (patró I) van mostrar un ràpid pic d'activació en resposta a l'exposició a la llum (condició 1 respecte 2), mantinguda durant les fases de llum i l'inici de la foscor (condicions 3 i 4). De forma similar, *Cbx4* i *Desi1* (patró II) van mostrar un creixement constant de l'expressió de la condició 1 a la 4. El factor de transcripció retinal *Nr2e3* (patró III) va patir un pic molt pronunciat en resposta a l'exposició a la llum (condició 2) que va decaure de forma continuada fins a recuperar els nivells inicials (condicions 4 i 1). Finalment, l'expressió de *Sumo2* (patró IV) va augmentar durant la fase de llum (condició 3), sent lleugerament inferior en la resta de condicions.

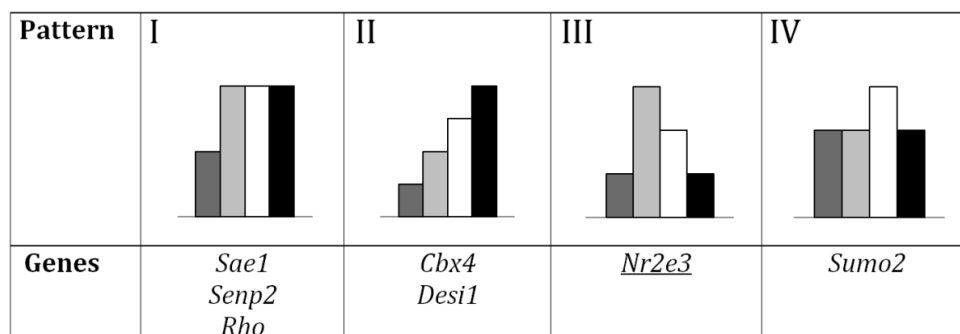


FIGURA 15. PATRONS D'EXPRESSIÓ DELS GENS DE LA VIA DE SUMO I ALTRES GENS RETINALS EN LA RETINA DE RATOLÍ EN DIFERENTS CONDICIONS DE LLUM/FOSCOR. D'acord amb la qRT-PCR, diversos gens de l'estudi van ser agrupats en quatre patrons d'expressió amb significació estadística. Cal destacar que els tres primers mostren una activació per l'exposició a la llum (condició 1 respecte 2) que es manté (I), continua creixent (II) o decreix (III) en les següents condicions (3 i 4). Per contra, el patró IV mostra un increment únic en la tercera condició. El color de les barres és el mateix que la Figura 12.

RESULTATS

Tot i que es van poder observar altres patrons de comportament, la variabilitat en els valors d'expressió no va permetre trobar significances estadístiques (e.g. *Crx* va mostrar un nivell baix d'expressió en la condició 1 per algunes mostres, en comparació amb la resta de condicions, suggerint una activació transcripcional en resposta a una exposició a la llum, però aquesta activació no arribava a tenir significació estadística).

Amb la intenció d'aprofundir en l'estudi dels efectes de l'exposició lumínica sobre l'expressió gènica en retina, un altre membre del grup (Elena Borrego Domènech) va realitzar explants retinals de diversos individus. Aquests es van extreure de l'animal després de la fase de foscor del cicle de llum/foscor. Seguidament, una retina de cada individu (n=6) es va mantenir en la foscor (condició 1) mentre que l'altra es va exposar a la llum durant 1'5 hores (condició 2). Els lisats de les dues retines de cada animal van ser processats i immunodetectats simultàniament per poder comparar-los directament. Els resultats obtinguts de les quantificacions dels *Western Blots* es mostren en la figura 5 de la publicació adjuntada a l'Annex 1 d'aquest treball, que també recull el conjunt de resultats descrits en els apartats anteriors¹⁷⁵.

Breument, els resultats van mostrar un augment dels nivells proteics dels factors de transcripció CRX i NR2E3, comparant els explants retinals de la condició de llum (condició 2) respecte de la condició de foscor (condició 1). Aquest increment degut a l'exposició lumínica concordava amb l'observat a nivell transcripcional per mitjà de la RT-qPCR (Figura 14b). Alhora, també es va realitzar el mateix estudi sobre TLS, la E3 lligasa de SUMO amb els nivells més alts d'expressió gènica en retina, que no havia donat diferències entre condicions lumíniques (Figura 14a). Els nivells d'expressió de la proteïna van mostrar una gran variabilitat, pel que no es va detectar cap diferència estadísticament significativa. En conjunt, els resultats dels nivells proteics de CRX, NR2E3 i TLS van reforçar els obtinguts per RT-qPCR a nivell d'expressió gènica.

1.3. PATRÓ ESPACIAL DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS DE LA VIA DE SUMO

Per tal de localitzar l'expressió de SUMO i els seus enzims en la retina de ratolí, es va recórrer a la hibridació *in situ* (ISH) per obtenir un atlas d'expressió complet, independentment de la manca de disponibilitat d'anticossos comercials per a totes les proteïnes. Les ribosondes *Antisense* (amb les seves respectives ribosondes *Sense*) van ser generades per cada gen, i hibridades en seccions de retines de ratolí adult (P60), obtingudes en condicions d'exposició a la llum (condició 3 de la Figura 12). Com a

control positiu de la tècnica es va utilitzar una ribosonda contra el gen *Rho*, que localitza en el segment intern (IN) dels bastons amb un elevat nivell d'expressió.

Per a cada gen, les ISH de les ribosondes *Antisense* i *Sense* (control negatiu) van ser processades en paral·lel per tal de considerar el senyal obtingut com a específic de la localització de l'mRNA de cada gen. Tot i no ser una tècnica quantitativa, la intensitat relativa de la detecció de l'mRNA en les diferents capes retinals és comparable dins de la mateixa retina. Les imatges representatives de la ISH per cada gen es mostren en la Figura 16. A més, un resum esquemàtic qualitatiu de les dades de localització per a cada capa retinal i gen, agrupats per nivell d'expressió, conforma la Figura 17.

L'expressió de *Sumo1*, *Sumo2* i *Sumo3* va resultar molt ubiqua, tot i que amb algunes diferències. L'expressió de *Sumo1* va ser molt elevada en el IN de fotoreceptors i a les capes plexiformes, i no detectada a la GCL, on *Sumo2* mostrava un gran senyal; mentre que l'expressió de *Sumo3* no va detectar-se en les capes nuclears. D'altra banda, en concordança amb la seva funció essencial en la via de SUMO, els gens de l'heterodímer de l'E1 activador *Sae1* i *Sae2*, i el de l'únic E2 conjugador *Ubc9* compartien un patró ubic, tot i que *Ubc9* presentava un senyal més intens a la GCL (Figura 16).

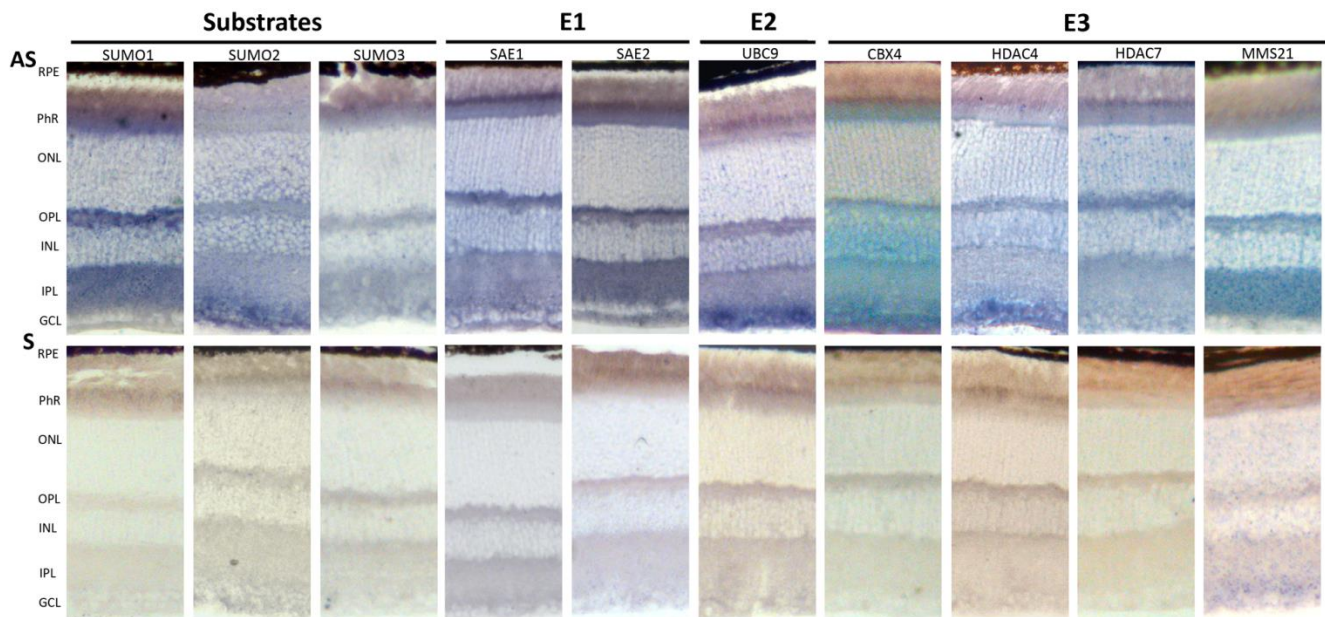
Com es podria esperar, les proteases i E3 lligases de SUMO van mostrar una àmplia varietat de patrons d'expressió (Figura 16 Figura 17). El segment intern dels fotoreceptors va tenir senyal de tots els gens, particularment elevat per a *Cbx4*, *Desi2*, *Mul1*, *Pias1*, *Pias4*, *Rasd2*, *Senp1*, *Senp7*, *Tls* i *Uspl1*. Ambdues capes nuclears (ONL i INL) van compartir un patró d'expressió similar, i el senyal perinuclear va ser detectat per a la majoria de gens. *Pias1*, *Senp6* i *Senp7* van produir un senyal molt intens en la ONL i INL, mentre que *Tls* només ho va fer en la INL. Per contra, *Pias2* i *RanBP2* van ser quasi indetectables en les dues capes nuclears. Cal destacar la forta senyal de localització de la majoria de gens en les capes plexiformes, sobretot en la OPL, en clar contrast amb les corresponents ribosondes *Sense* (control negatiu). Pel que fa a la GCL, va donar un patró molt distintiu per a cada gen, amb una alta expressió de *Cbx4*, *Hdac4*, *Pias3*, *Senp2*, *Senp6*, *Tls* i *Topors*, mentre que no se'n va detectar senyal –o molt dèbil– per a *Mms21*, *Pias2*, *Pias4*, *RanBP2*, *Rasd2* i *Senp3*.

Considerant el patró produït per cada gen (Figura 17), la localització de l'mRNA de *Pias2* i *RanBP2* va ser extremadament dèbil en les capes nuclears de la retina (ONL, INL i GCL). Pel que fa l'mRNA de *Tls*, va seguir un patró de localització únic, amb una gran senyal en el IN dels fotoreceptors, la INL i GCL. Per últim, cal remarcar que

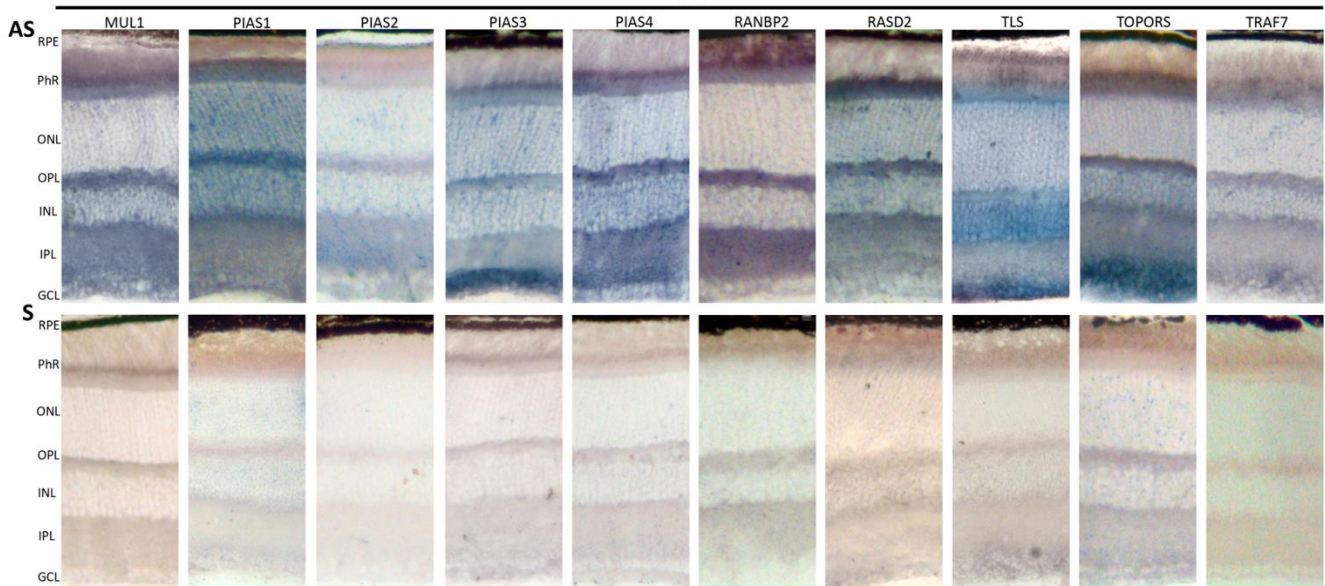
RESULTATS

l'mRNA de *Senp2* va ser localitzat no només en el citoplasma sinó també en el nucli d'algunes cèl·lules de la GCL, una localització que no va ser detectada per a cap altre gen de l'estudi (marcat amb fletxes negres en la magnificació de la Figura 16).

FIGURA 16. HIBRIDACIÓ *IN SITU* EN CRIOSECCIONS DE RETINES MURINES PELS GENS DE SUMO I ELS SEUS ENZIMS E1, E2, E3 LLIGASES I PROTEASES. Imatges representatives obtingudes després de la hibridació *in situ* amb la ribosonda *Antisense* (AS) i *Sense* (S), revelades en paral·lel durant el mateix període de temps. La ribosonda AS mostra al patró d'expressió del gen, mentre que la S correspon al control negatiu de la tècnica. El gen de la *Rhodopsina*, que mostra elevada expressió a nivell de transcrit en el segment intern de fotoreceptors, va ser usat com a control positiu. El requadre inferior dret es una magnificació de la hibridació *in situ* de *Senp2* a nivell de les cèl·lules ganglionars (GCL), en el que les fletxes negres indiquen localització d'mRNA en alguns nuclis. RPE: epiteli pigmentari, PhR: fotoreceptors, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de les cèl·lules ganglionars.

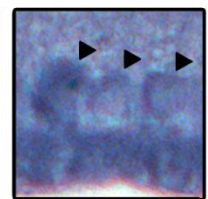
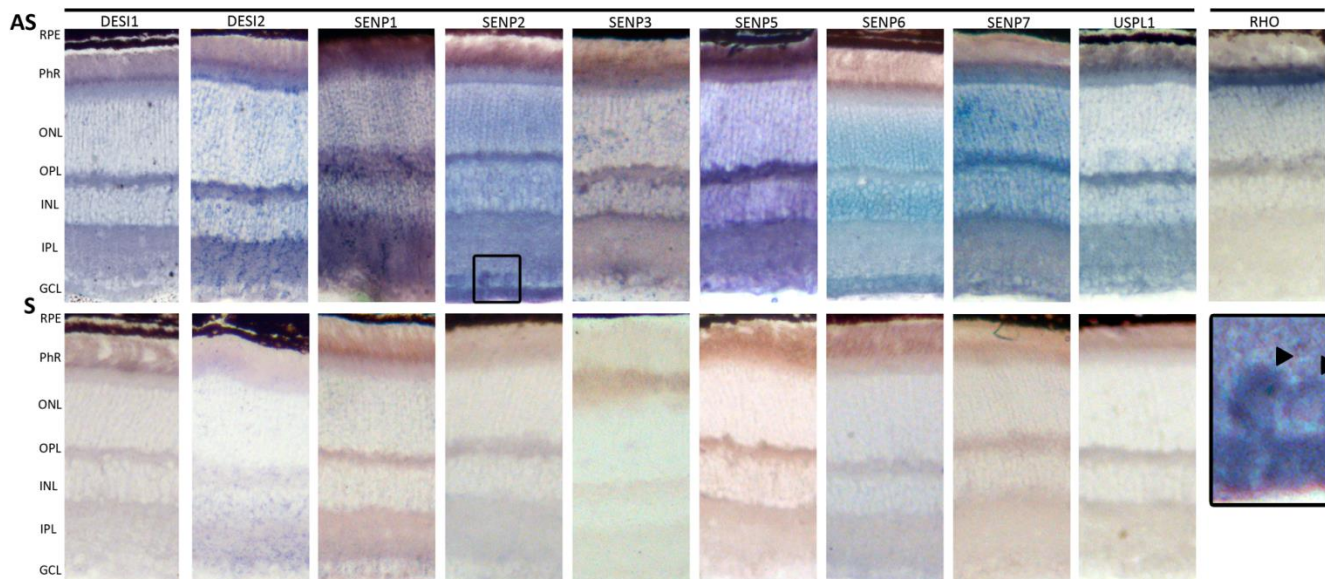


E3



Proteases

Control



RESULTATS

Gene	PhR	ONL	OPL	INL	IPL	GCL
PIAS1						
SENP7						
DESI2						
MUL1						
SAE2						
SENP1						
PIAS4						
SUMO1						
CBX4						
SAE1						
USPL1						
RASD2						
TLS						
SUMO3						
SENP6						
SENP5						
MMS21						
SENP2						
DESI1						
HDAC7						
PIAS3						
SUMO2						
UBC9						
HDAC4						
SENP3						
RANBP2						
TOPORS						
TRAF-7						
PIAS2						

FIGURA 17. ESQUEMA RESUM DELS RESULTATS DE LA HIBRIDACIÓ *IN SITU*. Representació esquemàtica i resumida dels patrons de localització de l'mRNA dels diferents gens de la via de SUMO, a partir dels resultats de les respectives hibridacions *in situ* en retines de ratolí. La intensitat del color de cada requadre reflecteix la intensitat del senyal d'hibridació per a cada gen i capa retinal. RPE: epitel·li pigmentari, PhR: fotoreceptors, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de les cèl·lules ganglionars.

1.4. COMPARACIÓ DELS PATRONS ESPACIALS DE L'MRNA I LA PROTEÏNA

La immunodetecció d'una proteïna concreta depèn de l'existència d'un anticòs comercial i de la seva especificitat. Per aquest motiu, atès que no hi havia anticossos per a totes les proteïnes i enzims de la via de SUMO, es va descartar l'estudi de la seva localització proteica, i es va optar per la detecció dels seus mRNAs per mitjà de ribosondes. No obstant, en alguns casos disponibles es van utilitzar anticossos contra enzims de la via de SUMO per a la seva localització per immunohistoquímica (IHC) en talls de retina, amb la intenció de reforçar els resultats de la hibridació *in situ* (ISH).

Cal tenir en compte que la traducció de l'mRNA és un procés cel·lular que té lloc al citoplasma i al reticle endoplasmàtic, mentre que la proteïna madura pot desenvolupar la seva funció en els diferents compartiments de la cèl·lula. En conseqüència, la localització de l'mRNA i la proteïna no ha de ser necessàriament coincident. Tot i això, la seva expressió proteica en les diferents capes retinals i tipus cel·lulars podia donar suport als resultats obtinguts. Així, en la Figura 18 es recullen els resultats de la ISH i la IHC per alguns dels enzims de la via de SUMO: HDAC4, PIAS3, SENP1 i TOPORS.

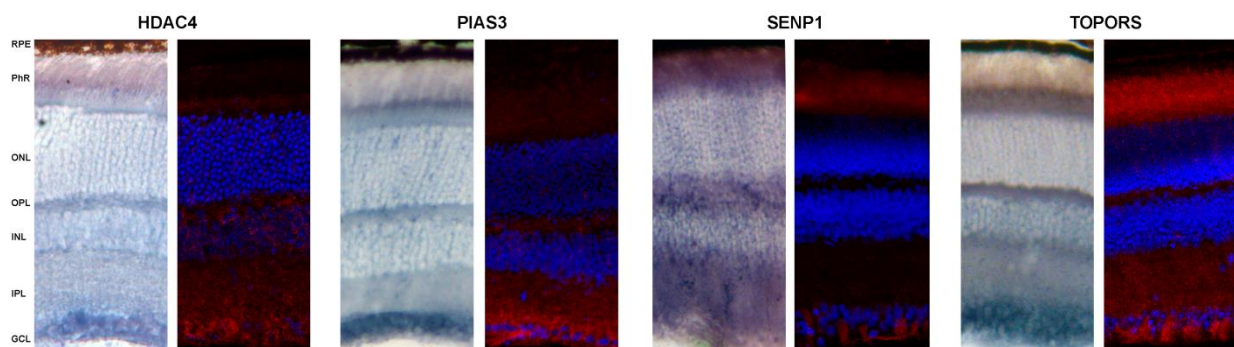


FIGURA 18. LOCALITZACIÓ DE L'mRNA I LA PROTEÏNA D'ALGUNS ENZIMS DE SUMO EN RETINA DE RATOLÍ. Comparativa dels resultats obtinguts per mitjà de les tècniques d'ISH (esquerra) i IHC (dreta) pels enzims de SUMO HDAC4, PIAS3, SENP1 i TOPORS en talls de retina de ratolí. La immunolocalització dels enzims (en vermell) està referenciada respecte als nuclis de la retina marcats amb DAPI (blau). RPE: epitel·li pigmentari, PhR: fotoreceptors, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de les cèl·lules ganglionars.

Com es mostra en la Figura 18, les E3 lligases HDAC4 i PIAS3 van ser localitzades a les capes plexiformes, als fotoreceptors i a la capa de les cèl·lules ganglionars (GCL), coincidint amb la seva expressió d'mRNA. A més, es va detectar HDAC4 de forma perinuclear en la capa nuclear interna (INL), també detectada per al seu mRNA. D'altra banda, la E3 lligasa TOPORS i la proteasa SENP1 es van detectar principalment als fotoreceptors i al voltant de les cèl·lules ganglionars, i de forma molt dèbil a la capa plexiforme interna (IPL).

En conjunt, tot i que la localització de l'expressió de l'mRNA i de la proteïna per ISH i IHC no és idèntica, els patrons concorden i es reforcen mútuament.

2. ANÀLISI DE LA SUMOÏLACIÓ DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ DE FOTORECEPTORS NR2E3

El receptor nuclear NR2E3 és un factor de transcripció clau en la diferenciació dels fotoreceptors, promovent l'expressió dels gens específics de bastons i silenciant la dels gens de cons. Aquesta repressió està parcialment regulada per la E3 lligasa de SUMO PIAS3, que sumoïla NR2E3 en tres residus específics molt conservats, corresponents a les lisines K178, K315 i K322 en ratolí¹³⁷. Així, segons alguns autors, PIAS3 promou la conjugació de SUMO1 a NR2E3 per tal de generar una forma di-sumoïlada i una tri-sumoïlada. Aquesta última desapareix en mutar el centre catalític de la lligasa, però no la forma di-sumoïlada, pel que es preveu que altres E3 lligases de SUMO poden actuar sobre NR2E3. D'altra banda, l'estudi amb les formes mutades d'NR2E3 indica que la di-sumoïlació es dona sempre en la lisina K178 i tant en K315 com en K322, mentre que no hi ha una explicació clara per a la forma tri-sumoïlada. A més, es desconeixen les implicacions funcionals de la mutació de les diferents dianes de sumoïlació en NR2E3, així com les altres possibles E3 lligases de SUMO que modifiquen el factor de transcripció.

En aquest context, es van generar diverses construccions amb les formes mutants de les tres lisines (equivalents en posició a les de ratolí) de la isoforma 2 humana d'NR2E3 (K185, K330 i K337), amb la finalitat de caracteritzar les possibles diferències funcionals en comparació amb la forma WT (Taula 4), i a més, es va proposar la identificació de noves lligases de la maquinària de SUMO.

2.1. ESTUDI DE L'ESTABILITAT PROTEICA DE LES FORMES WT I MUTANTS D'NR2E3

Com s'ha descrit prèviament en la Introducció d'aquest treball, els sistemes de sumoïlació i ubiquitinació estan interrelacionats i coordinats, ja que, com la majoria de modificacions posttraduccional, comparteixen la conjugació a lisines de la proteïna diana. Aquest *crossstalk* entre els dos sistemes pot ser cooperatiu, com en alguns casos on la polisumoïlació d'una lisina potencia la ubiquitinació i posterior degradació de la proteïna, o competitiu, quan una mateixa lisina pot patir diverses PTMs amb diferents conseqüències biològiques. D'aquesta manera, la mutació de les diferents lisines sumoïlables d'NR2E3 humà (hNR2E3) podria afectar a l'estabilitat del factor de transcripció, ja sigui evitant o promovent la seva inestabilitat i degradació. Per aquest

motiu, es va plantejar l'estudi de les diferències en la degradació i en la vida mitjana de les formes WT i mutants.

2.1.1. EXPRESSIÓ I DEGRADACIÓ D'NR2E3

Amb la intenció d'analitzar els nivells d'expressió i de degradació de les formes mutants en relació a la proteïna WT, es van transfectar cèl·lules HEK293 amb les construccions hNR2E3 WT, 1, 12, 13 i 123, per duplicat. Per tal d'inhibir el proteasoma, la via central de degradació de proteïnes en una cèl·lula, es va tractar un dels replicats de cada transfecció amb MG132 (+). La immunodetecció de la proteïna per *Western Blot* (WB) contra l'epítip Xpress no va revelar diferències en els nivells d'expressió de les diferents construccions, tot i que la quantitat de proteïna detectada amb la inhibició del proteasoma era lleugerament superior en tots els casos, indicant que el proteasoma regula els nivells de proteïna de NR2E3 en cèl·lules transfectades (Figura 19). A més, es va poder detectar una banda de major pes molecular, únicament present en la forma WT (fletxa negra).

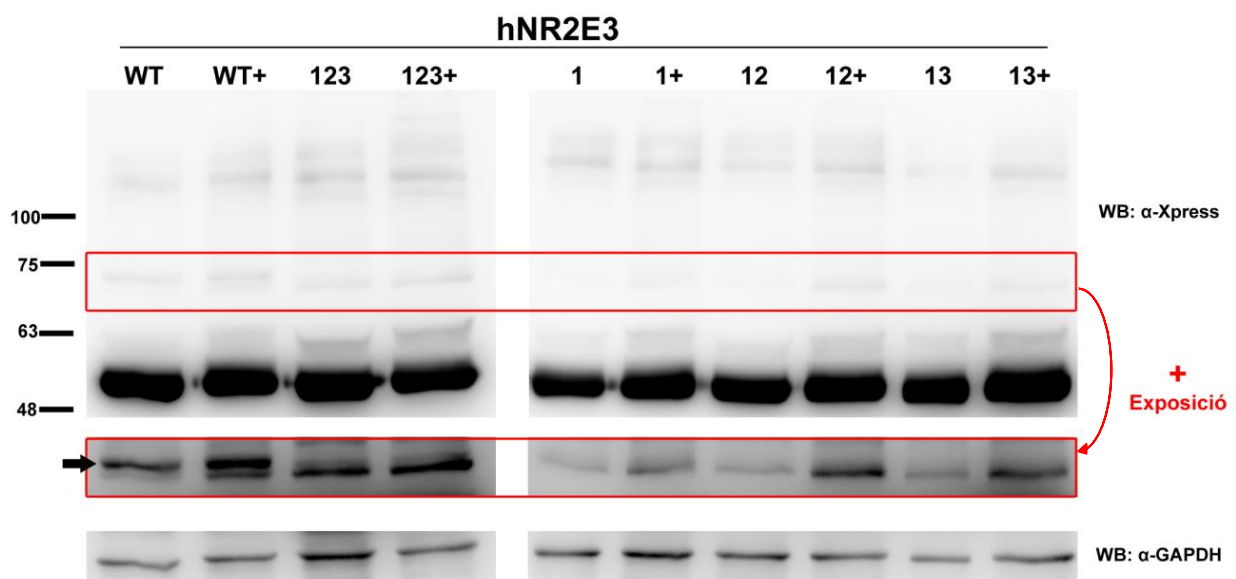


FIGURA 19. EXPRESSIÓ I DEGRADACIÓ DE LES FORMES WT I MUTANTS D'NR2E3. Immunodetecció per WB de les diferents formes d'NR2E3 amb l'anticòs contra l'epítip Xpress. Els nivells de la proteïna incrementen lleugerament en els carrils amb MG132 (+). A més, es va detectar una banda únicament present en la forma WT (requadre vermell superior) d'uns 72 kDa, mostrada amb major exposició en el requadre vermell inferior i marcada amb una fletxa negra. Les marques dels pesos moleculars estan indicats a l'esquerra de la figura en kDa. El panell inferior mostra el control de càrrega amb α-GAPDH. Els números 1, 2 i 3, indiquen les lisines mutades (1 és K185A, 2 és K330A i 3 és K337A).

El mecanisme de senyalització cel·lular que permet la degradació via proteasoma és la poli-ubiquitinació. Per aquest motiu, la inhibició de la seva activitat proteolítica per

RESULTATS

mitjà de MG132 incrementa les formes poli-ubiquitinades de moltes proteïnes. Per comprovar aquest increment es van processar els lisats cel·lulars per a les condicions de hNR2E3 WT, 1 i 123. La detecció amb un anticòs contra la ubiquitina (Ub) va revelar l'acció de MG132, més evident en el control negatiu (\emptyset) que en la resta de condicions, amb un increment en la quantitat de proteïnes d'alt pes molecular, corresponents a formes poli-ubiquitinades (Figura 20). A més, la immunodetecció amb α -Ub va donar una banda de mida molt semblant a la d'hNR2E3, no detectable en el control negatiu (marcada amb una fletxa negra en la Figura 20). Tenint en compte que el pes molecular de la ubiquitina és de 8 kDa, la banda observada correspondria a una forma mono-ubiquitinada d'hNR2E3. Tot i que aquests resultats podrien descriure una modificació específica i no descrita del factor de transcripció, es va decidir seguir amb l'estudi de la modificació d'NR2E3 amb SUMO.

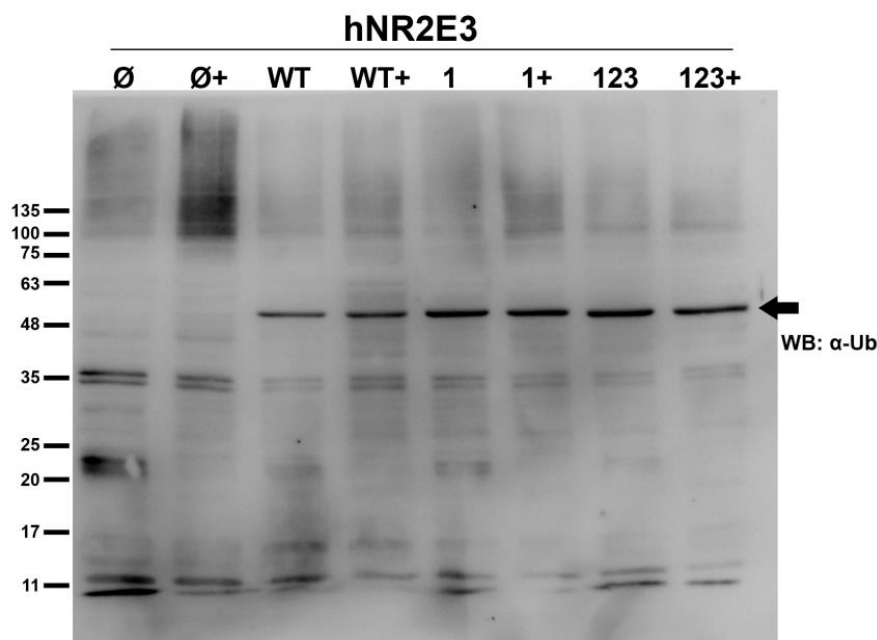


FIGURA 20. NIVELLS D'UBIQUITINACIÓ. Immunodetecció per WB amb α -Ubiquitina (Ub) dels extractes de les condicions hNR2E3 WT, 1 i 123, en comparació amb cèl·lules sense transfectar (\emptyset), per comprovar la inhibició del proteasoma per efecte de l'addició d'MG132 (+). En el segon carril es veu un augment de les proteïnes d'alt pes molecular en comparació amb el primer carril. La resta de carrils no mostren un efecte tan evident, però apareix una banda (fletxa negra) semblant a NR2E3 en pes molecular. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades en kDa a l'esquerra de la figura.

Atès que no es va detectar canvis rellevants a nivell d'expressió ni degradació entre la proteïna WT i la triple mutant en lisines, es va decidir centrar l'estudi d'NR2E3 a les seves formes WT i 123, analitzant els efectes de la mutació de les tres possibles dianes

de sumoïlació respecte la interacció amb diverses lligases de SUMO. Considerant que podria ser interessant analitzar la interacció de NR2E3 amb les E3 lligases de SUMO PIAS3 i HDAC4, es van cotransfectar cèl·lules HEK293 amb les diferents combinacions d'hNR2E3 WT/123 i les lligases, en presència o absència de MG132, per comprovar que la degradació de la proteïna no es veia alterada. Novament, la immunodetecció d'hNR2E3 no va revelar diferències entre WT i 123, ni en presència de les lligases (Figura 21). Alhora, es va tornar a obtenir la banda diferencial en WT, que disminuïa en intensitat en afegir MG132 (requadre vermell).

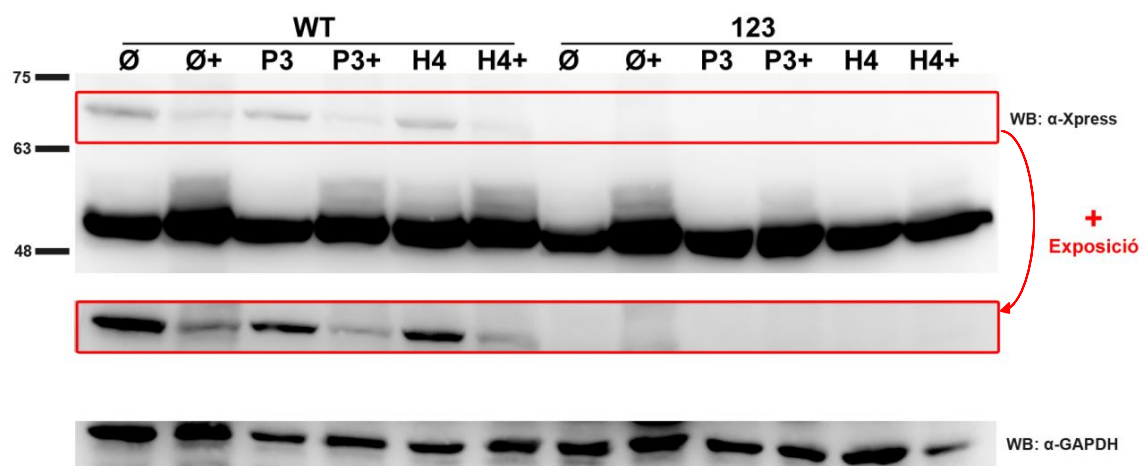


FIGURA 21. EXPRESSIÓ I DEGRADACIÓ D'NR2E3 WT I 123 EN PRESENCIA DE LLIGASES E3 DE SUMO. Immunodetecció de les formes WT i 123 d'NR2E3 en cotransfeccions amb vector buit (∅) o amb les lligases E3 de SUMO PIAS3 i HDAC4. La degradació via proteasoma es va inhibir afegint MG132 (+) en un dels replicats. S'observa un increment de la quantitat de proteïna i de les formes de pesos moleculars majors. Novament, s'observa la banda diferencial només en les transfeccions amb hNR2E3 WT (requadre vermell superior i inferior, augmentant l'exposició), que decreix en intensitat en afegir MG132. Les marques dels pesos moleculars estan indicats a l'esquerra de la figura en kDa. El panell inferior mostra el control de càrrega amb α-GAPDH.

2.1.2. VIDA MITJANA

L'estudi de la vida mitjana de la proteïna hNR2E3 es va realitzar sobre les formes WT i 123, transfectant les construccions en cèl·lules HEK293 i afegint un inhibidor de la síntesi proteica anomenat cicloheximida (CHX). En un primer intent, es va analitzar les mostres a les 0, 6, 12, 24, 36 i 48 hores de l'addició del reactiu. El WB resultant amb α-Xpress va mostrar una forta baixada dels nivells de proteïna durant les primeres hores de l'experiment (Figura 22).

RESULTATS

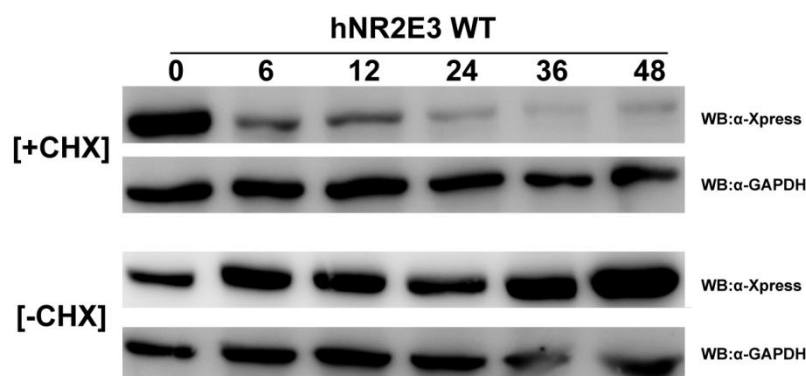


FIGURA 22. DETERMINACIÓ DELS TEMPS EN L'ANÀLISI DE LA VIDA MITJANA D'NR2E3 WT. Primera prova dels temps d'estudi per a la determinació de la vida mitjana d'NR2E3, en els que es va lisar les cèl·lules per als extractes proteics a les 0, 6, 12, 24, 36 i 48 hores de l'addició de la CHX (+CHX), en comparació de les mateixes condicions sense CHX (-CHX). El WB amb α-Xpress immunodetecta els nivells d'NR2E3 (panell superior de cada condició) i amb α-GAPDH, els nivells de control de càrrega.

Per aquest motiu, es va acotar l'estudi a les primeres 12 hores després de la inhibició del proteasoma (0, 2, 4, 6, 8 i 12 hores post-CHX). Es van realitzar tres replicats independents per a cada construcció, en presència o absència de CHX, i es va quantificar la proteïna hNR2E3 WT o hNR2E3 123 respecte a GAPDH. La Figura 23a mostra la immunodetecció per WB d'un dels replicats amb CHX (+CHX) per a les dues formes del factor de transcripció, i un control sense CHX (-CHX). Les dades van ser analitzades i representades gràficament en una corba de regressió no lineal amb el programa informàtic GraphPad Prism (Figura 23b). Els resultats obtinguts mostren la corba de degradació de la proteïna per a les dues formes (WT i 123), sense diferències estadístiques significatives.

Per tant, el fet de tenir una forma sumoïlable o no sumoïlable d'NR2E3 no sembla alterar la seva vida mitjana, al menys en les condicions estudiades. Així, doncs, vam decidir estudiar si aquestes dues formes proteiques mostraven diferències de comportament en les interaccions amb enzims de sumoïlació.

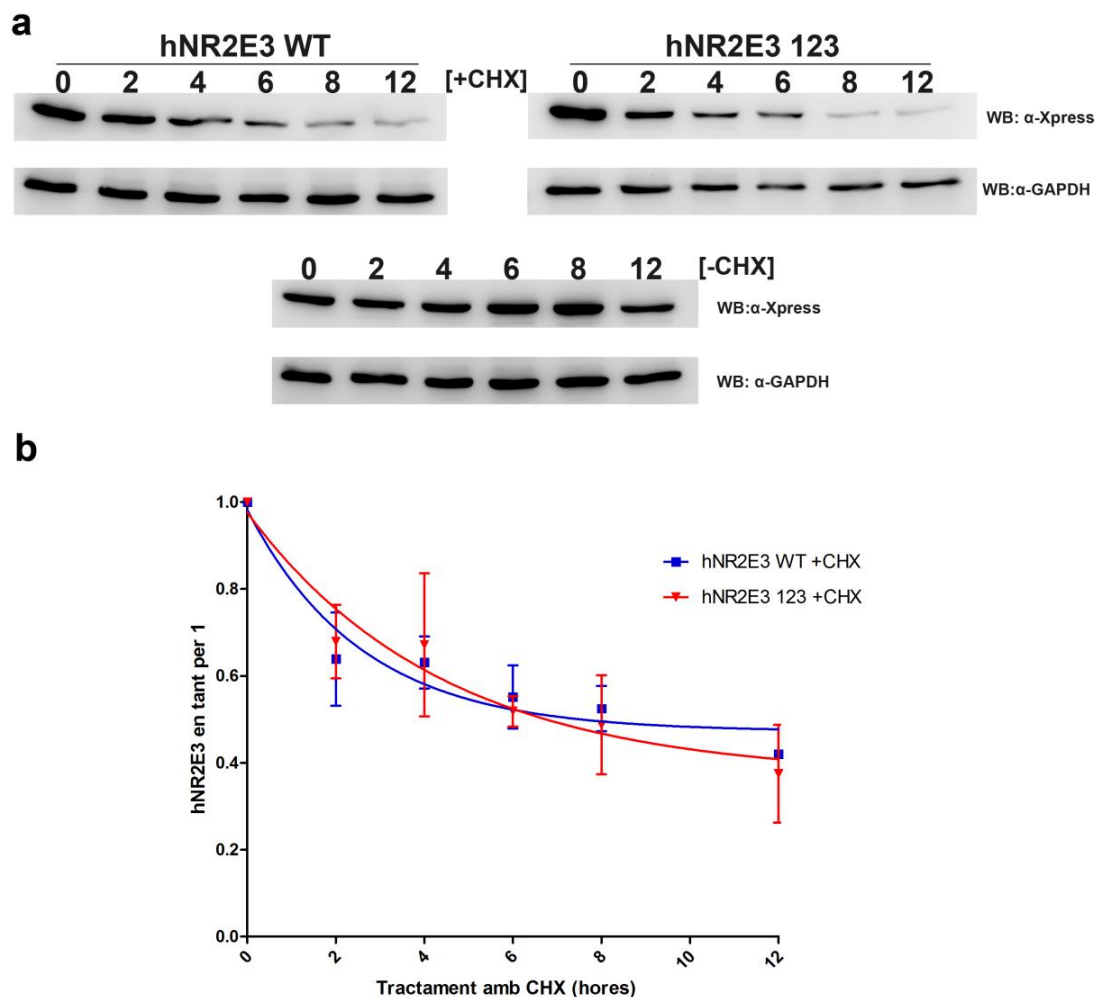


FIGURA 23. DETERMINACIÓ DE LA VIDA MITJANA DE LES PROTEÏNES NR2E3 WT I 123. (a) Immunodetecció en un dels replicats (exemple representatiu) dels nivells d'NR2E3 WT i 123 (α -Xpress) a les 0, 2, 4, 6, 8 i 12 hores de l'addició de la CHX (+CHX) respecte a la proteïna de control de càrrega GAPDH. Els dos panells inferiors mostren un control sense CHX (-CHX), en el que els nivells de cap de les dues proteïnes no varien. (b) Representació gràfica de la quantificació dels nivells d'NR2E3 WT (blau) i 123 (vermell) en comparació a GAPDH i normalitzant tots els valors d'una condició respecte al valor en el temps 0 hores. Cada valor correspon a la mitjana de tres replicats independents (n=3), normalitzats respecte el valor de l'experiment a les 0 hores del tractament amb CHX (que rep el valor d'1). Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard entre replicats.

2.2. ESTUDI DE LES INTERACCIONS D'NR2E3 WT I 123

L'estudi de les interaccions proteiques d'NR2E3 es va abordar amb diversos plantejaments experimentals, per tal de descriure les possibles implicacions de la mutació 123 -respecte al WT- en la interacció dimèrica del factor de transcripció, i en la interacció amb determinades E3 lligases de la maquinària de SUMO.

2.2.1. DINÀMIQUES D'INTERACCIÓ: L'ASSAIG BRET

L'assaig BRET¹⁷¹ (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) és una tècnica que utilitza la transferència d'energia entre una molècula bioluminescent donadora i una molècula

RESULTATS

sensible a la llum acceptora (o cromòfor), per a l'estudi de la interacció entre dues proteïnes, fusionades a aquestes molècules. D'aquesta manera, en presència del seu substrat, la primera molècula emet una llum d'una longitud d'ona determinada. Si la distància entre les dues molècules és inferior a 100 Å (10 nm), l'energia emesa arriba a la segona molècula, excitant-la i provocant l'emissió d'una segona llum de longitud d'ona diferent. Com que la distància de la transferència d'energia és mínima, només es dóna quan les proteïnes d'interès interaccionen. D'aquesta manera, mitjançant la quantificació de les dues emissions en concentracions creixent de la molècula acceptora, es poden estudiar les dinàmiques d'interacció entre diferents proteïnes d'una forma molt precisa i sensible (Figura 24).

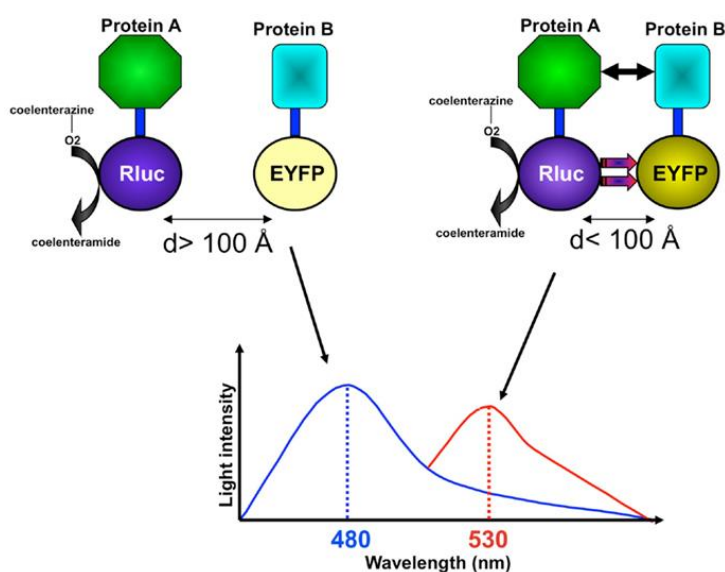


FIGURA 24. REPRESENTACIÓ DE LA TRANSFERÈNCIA D'ENERGIA EN L'ASSAIG DE BRET. Una proteïna A fusionada a la molècula donadora (Rluc) es coexpressa amb una proteïna B fusionada a una molècula acceptora (YFP). En presència del substrat de la Rluc (Coelenterazina), aquesta emet una energia de 480 nm. Si les proteïnes A i B interaccionen, la distància entre Rluc i YFP és inferior a 100 Å, pel que l'energia emesa per Rluc és transferida a la YFP, emetent una segona energia de 530 nm. La quantificació de les dues longituds d'ona permet l'estudi de la interacció entre les proteïnes A i B¹⁷⁶.

Tot i que existeixen diverses combinacions d'aquestes molècules, en aquest estudi es van utilitzar la Rluc (*Renilla luciferase*) com a proteïna donadora -que té per substrat la Coelenterazina- i la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) com a acceptora. L'Assaig es va desenvolupar en el laboratori del Dr. Francisco Ciruela (Unitat de Farmacologia, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, IDIBELL, Universitat de Barcelona), amb els seus protocols (veure la secció de Material i Mètodes) i seguint el seu inestimable consell. Així, a partir de les

construccions llistades a la Taula 4 es van expressar les proteïnes de fusió que van permetre estudiar les interaccions d'NR2E3 amb diverses proteïnes.

Per a l'estudi de la transferència d'energia en l'assaig de BRET, la proteïna donadora (Rluc) es va fixar a una concentració, mentre que es va anar augmentant l'expressió de l'acceptora (YFP). Per aquest motiu, primerament es va comprovar que les diverses construccions s'expressessin amb un nivells suficients per al correcte funcionament de la tècnica. Amb aquesta finalitat, es va transfectar cada construcció per separat en cèl·lules HEK293T a concentracions creixents, com s'especifica en la secció de Materials i Mètodes, per tal d'estudiar les corbes de saturació de la luminescència (Rluc) i la fluorescència (YFP). En el primer cas, es va fixar el valor de DNA en un mínim de luminescència necessària per a la transferència d'energia a la molècula acceptora. Com es pot veure a la Figura 25, PIAS3 va donar els valors més baixos de luminescència, seguida d'HDAC4 i per últim NR2E3 WT i 123, que no només van donar els valors més alts sinó que van saturar amb menys quantitat de DNA transfectat. En vista dels resultats, es va decidir utilitzar 1 µg de mPIAS3-Rluc i, per equivalència en quantitat de DNA, també de mHDAC4-Rluc; mentre que només 0'5 µg dels hNR2E3 WT/123-Rluc.

D'altra banda, la corba de fluorescència de les construccions amb YFP va ser necessària per a l'estudi de l'expressió i la saturació de les diferents construccions. Per aquest motiu es va descartar la construcció de mNRL-YFP, que s'expressava a nivells insuficients per a la tècnica, tot i transfectar 8 µg de la construcció. Posteriorment, el resultat negatiu en la immunodetecció de la proteïna Nrl-YFP per WB amb α-GFP va reforçar la decisió de prescindir d'aquesta construcció en els experiments subsequents (resultats no mostrats). No obstant, la resta de construccions van donar fluorescències creixents fins a 4 µg i en cap cas es va haver de baixar els nivells de DNA (Figura 25). En conjunt, les condicions de transfecció per als diferents BRETs es troben llistades a la Taula 6.

Per a la quantificació de la transferència d'energia en l'assaig, les dades obtingudes amb el lector van ser processades amb el programa *GraphPad* i representades gràficament en una corba de saturació de la quantitat de BRET (mBU) en relació a l'augment de l'expressió de la YFP normalitzada per la Rluc (descriu exhaustivament en l'apartat de Materials i Mètodes).

RESULTATS

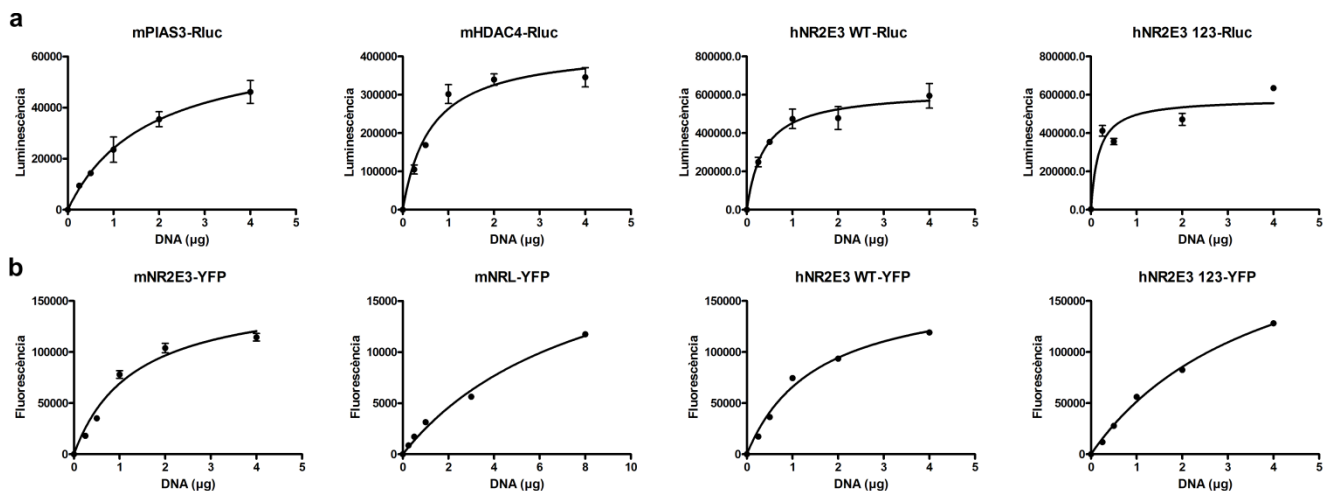


FIGURA 25. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE LES DIFERENTS CONSTRUCCIONS UTILITZADES EN L'ASSAIG DE BRET. Cadascuna de les construccions amb Rluc (a) i YFP (b) utilitzades en l'assaig de BRET va ser transfectada en concentracions creixents. La seva quantificació es va representar gràficament per analitzar els nivells d'expressió i de saturació de cada proteïna de fusió. Cada punt de la gràfica correspon a la mitjana de tres replicats tècnics, i les barres d'error en els eixos X i Y mostren l'error tècnic en l'experiment. (a) De les fusions a Rluc, mPIAS3 va donar els nivells més baixos de luminescència, mentre que hNR2E3 WT i YFP els més alts i saturants. (b) Pel que fa a les fusions a YFP mNR2E3 i hNR2E3 Wt i 123 van donar valors molt semblants. En canvi, mNrl va donar nivells insuficients per l'assaig.

INTERACCIÓ DIMÈRICA D'NR2E3

Un cop fixades les condicions, es va estudiar la interacció dimèrica d'NR2E3 emprant les construccions de hNR2E3 WT i 123, fusionades a YFP i Rluc (Taula 4). Els resultats del BRET per a les quatre combinacions de proteïnes donadora i acceptora van donar uns valors molt elevats de BRET (mBU) en comparació amb els controls negatius i, en general, amb la resta d'experiments de BRET, reforçant l'eficiència de dimerització d'aquest factor de transcripció (Figura 26). No obstant, els testos estadístics no van donar diferències significatives per a cap de les quatre corbes de saturació dels controls positius, pel que es pot concloure que no hi ha diferències en la interacció dimèrica entre hNR2E3 WT i hNR2E3 123 i que, per tant, el fet de ser sumoïlat o no, no alteraria en principi la formació de dímers d'aquesta proteïna.

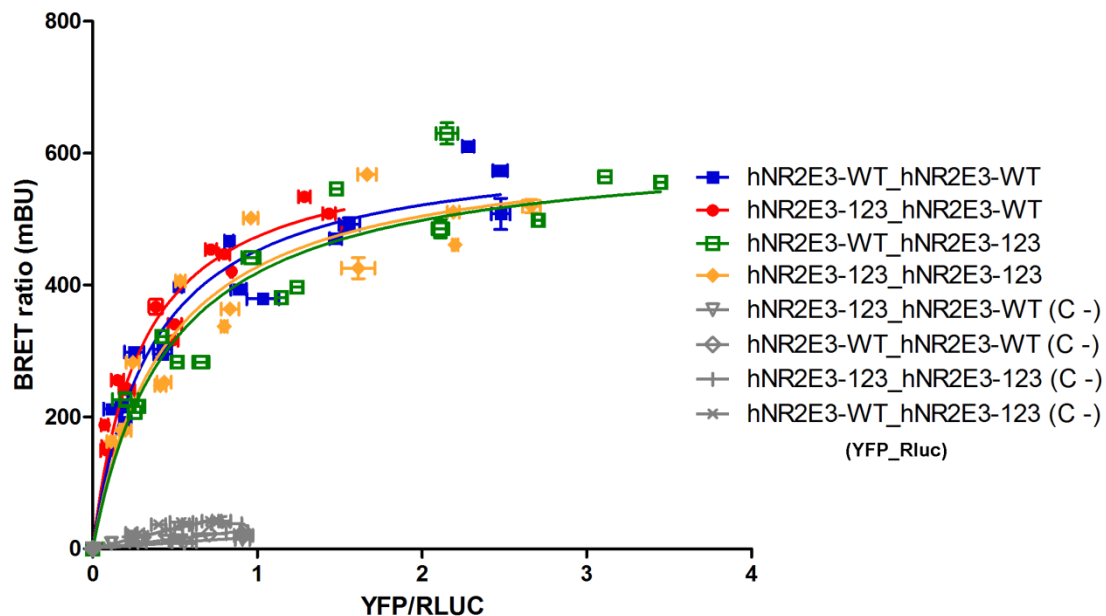


FIGURA 26. ASSAIG DE BRET EN LA INTERACCIÓ DIMÈRICA D'NR2E3 WT I 123. Representació gràfica de la quantificació dels assajos de BRET per a les quatre combinacions d'hNR2E3 WT i 123 en YFP i Rluc (indicades a la part dreta de la gràfica en format YFP_Rluc, amb els respectius colors). També es representen els controls negatius (en gris) per a les mateixes combinacions. En l'eix vertical es representen les unitats de BRET (mBU) i en l'horitzontal la quantitat de YFP normalitzada pel valor de la Rluc en cada condició. Cada valor de la gràfica correspon a la mitjana del BRET de tres replicats tècnics, pel que les barres d'error en els eixos X i Y corresponen a l'error experimental, i no a la variabilitat entre experiments independents. El conjunt de punts reflecteixen aquesta variabilitat, ja que cada condició es va realitzar per triplicat (n=3), en experiments independents amb 6 concentracions diferents de la proteïna acceptora (YFP), i la mitjana de cada valor és la representació gràfica de cada punt en la figura (a excepció dels controls negatius (C-) que corresponen a un únic replicat).

INTERACCIÓ D' NR2E3 AMB PIAS3

La interacció del factor de transcripció NR2E3 amb la E3 lligasa de SUMO PIAS3 ja havia estat descrita amb anterioritat¹³⁷, pel que se la va considerar un control positiu de la tècnica. Així, es va realitzar el BRET amb les proteïnes de ratolí NR2E3 (mNR2E3-YFP) i PIAS3 (mPIAS3-Rluc). La quantificació (Figura 27) va donar diferències significatives amb el control negatiu i una corba de saturació, pel que es van considerar els resultats obtinguts com a interacció real entre aquestes dues proteïnes. No obstant, la gràfica de la quantificació del BRET va donar valors molt inferiors als de l'estudi de la interacció dimèrica del factor de transcripció, pel que es tractava d'una interacció molt menys freqüent o amb menys afinitat que la dimerització, com ja s'esperava.

RESULTATS

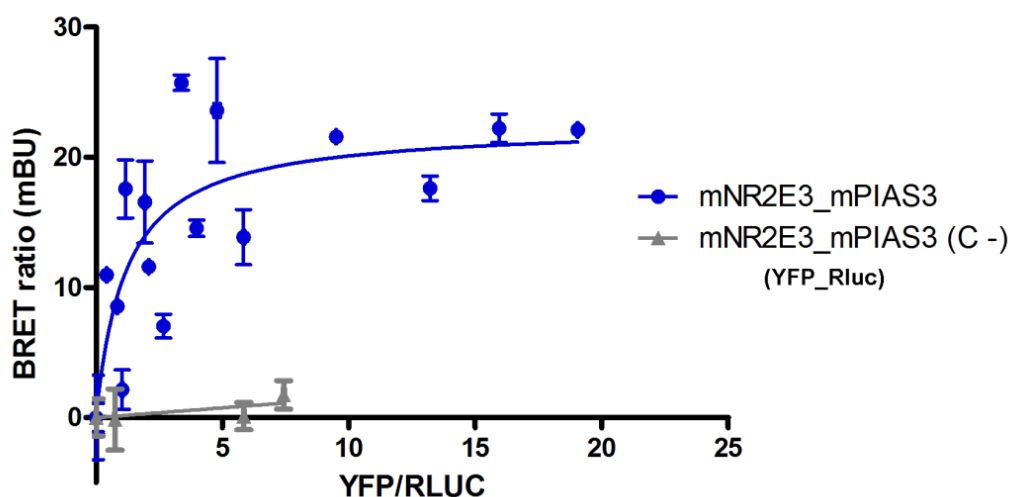


FIGURA 27. ASSAIG DE BRET EN LA INTERACCIÓ D'NR2E3 AMB PIAS3. Representació gràfica de la quantificació de l'assaig de BRET per a mNR2E3-YFP i mPIAS3-Rluc (blau) i el seu control negatiu (gris) (indicat a la part dreta de la gràfica en format YFP_RLuc, amb els respectius colors). En l'eix vertical es representen les unitats de BRET (mBU) i en l'horitzontal la quantitat de YFP normalitzada pel valor de la Rluc en cada condició. Cada valor de la gràfica correspon a la mitjana del BRET de tres replicats tècnics, pel que les barres d'error en els eixos X i Y corresponen a l'error experimental, i no a la variabilitat entre experiments independents. El conjunt de punts reflecteixen aquesta variabilitat, ja que cada condició es va realitzar per triplicat ($n=3$), en experiments independents amb 6 concentracions diferents de la proteïna acceptora (YFP), i la mitjana de cada valor és la representació gràfica de cada punt en la figura (a excepció dels controls negatius (C-) que corresponen a un únic replicat).

A continuació es va decidir estudiar les possibles diferències en la interacció de la lligasa amb la forma humana WT i 123 d'NR2E3. Les corbes obtingudes van donar valors més alts de BRET en comparació amb la interacció anterior, inclosos els controls negatius, i la saturació va ser menys pronunciada (Figura 28a). Tot i això, les corbes de cada condició van donar diferències estadísticament significatives amb els respectius controls negatius, pel que la transferència d'energia va ser deguda a la interacció de PIAS3 amb NR2E3 WT i 123. A més, l'anàlisi estadístic amb el test F de les corbes de les dues condicions va donar diferències significatives en el valor del BRET max ($p<0'01$), equivalent al valor màxim o de saturació de la corba (Figura 28b), pel que la interacció de PIAS3 amb la forma WT va ser major que amb la mutació 123. Aquesta va ser la primera activitat bioquímica diferencial detectada entre les formes d'NR2E3 sumoïlable (WT) i no sumoïlable (123).

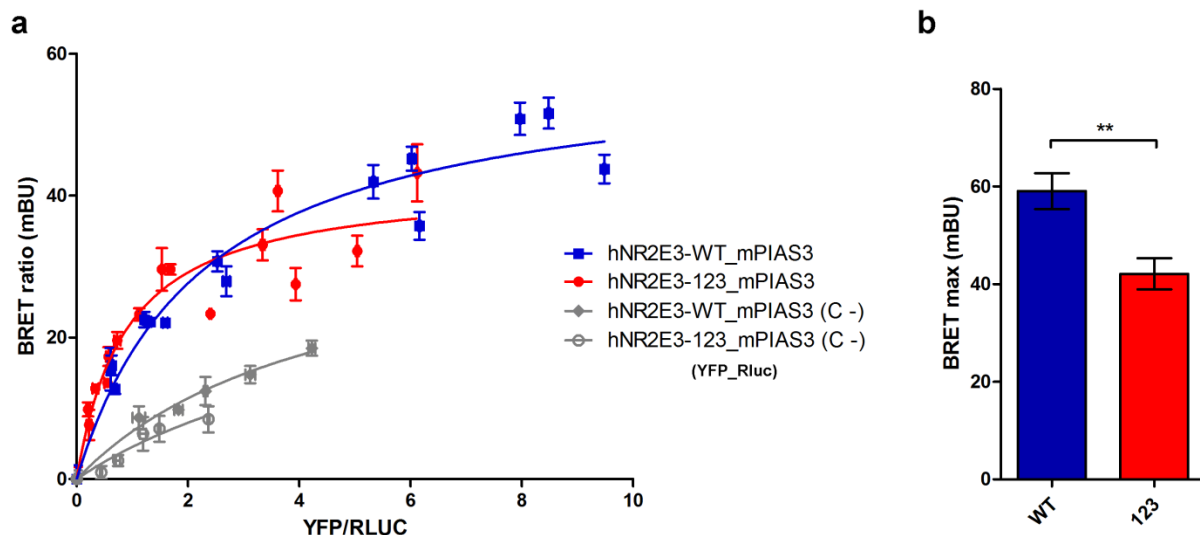


FIGURA 28. ASSAIG DE BRET EN LA INTERACCIÓ D'NR2E3 WT I 123 AMB PIAS3. (a) Representació gràfica de la quantificació de l'assaig de BRET per a hNR2E3 WT-YFP i hNR2E3 123-YFP amb mPIAS3-Rluc (blau i vermell respectivament) i els seus controls negatius (gris) (indicat a la part dreta de la gràfica en format YFP_Rluc, amb els respectius colors). En l'eix vertical es representen les unitats de BRET (mBU) i en l'horitzontal la quantitat de YFP normalitzada pel valor de la Rluc en cada condició. Cada valor de la gràfica correspon a la mitjana del BRET de tres replicats tècnics, pel que les barres d'error en els eixos X i Y corresponen a l'error experimental, i no a la variabilitat entre experiments independents. El conjunt de punts reflecteixen aquesta variabilitat, ja que cada condició es va realitzar per triplicat (n=3), en experiments independents amb 6 concentracions diferents de la proteïna acceptora (YFP), i la mitjana de cada valor és la representació gràfica de cada punt en la figura (a excepció dels controls negatius (C-) que corresponen a un únic replicat). (b) Gràfica de barres dels valors de BRET màxim (BRET max) per a les corbes resultants de les quantificacions de les interaccions amb WT i 123 (amb els mateixos colors que en a). El valor màxim de saturació és major per a la combinació amb hNR2E3 WT, analitzat amb el test estadístic F amb una diferència estadísticament significativa amb $p < 0.01$ (indicat amb **).

INTERACCIÓ D'NR2E3 AMB HDAC4

Seguidament, es va proposar cercar la possible interacció d'NR2E3 amb altres E3 lligases de SUMO. Considerant que ja s'havia descrit que la funció d'HDAC4 era rellevant per a la retina de ratolí^{140,150}, es va proposar estudiar si el factor de transcripció i la lligasa de SUMO i deacetilasa podien interaccionar en cultius cel·lulars, i quantificar aquesta interacció per BRET. A més, com que els nivells de BRET amb PIAS3 van donar més alts per a la construcció que expressava el factor de transcripció humà, es va plantejar fer l'experiment directament amb les formes hNR2E3 WT-YFP i hNR2E3 123-YFP. En l'assaig, les quantificacions de la transferència d'energia van donar corbes molt poc saturants, molt semblants i més properes als controls negatius que en els BRETs anteriors (Figura 29). No obstant, l'anàlisi estadístic F va donar diferències significatives en les corbes de cada condició respecte el seu control negatiu, pel que els resultats van indicar una interacció entre

RESULTATS

HDAC4 i NR2E3, amb no gaire freqüència o amb poca afinitat, però que a més no depenia de la mutació de les tres lisines sumoïlables. Així doncs, es va demostrar que NR2E3 interacciona amb una altra lligasa E3 de SUMO, fet que no havia estat descrit encara, tot i que sense dependre de la capacitat de NR2E3 d'ésser sumoïlat.

No obstant, encara calia demostrar si aquesta interacció es podia confirmar en un entorn fisiològic, com la retina, i quina funció podria tenir aquesta interacció.

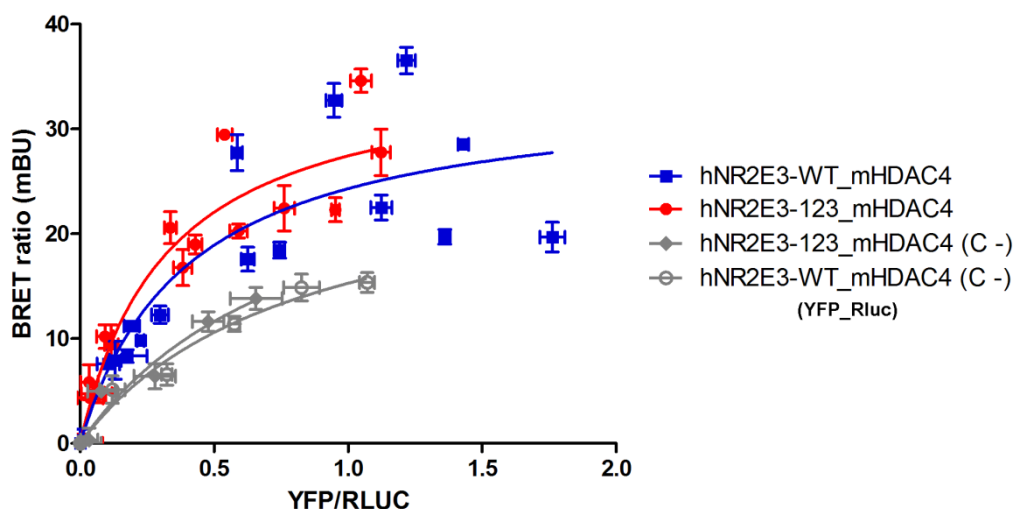


FIGURA 29. ASSAIG DE BRET EN LA INTERACCIÓ D'NR2E3 WT I 123 AMB HDAC4. Representació gràfica de la quantificació de l'assaig de BRET per a hNR2E3 WT-YFP i hNR2E3 123-YFP amb mHDAC4-Rluc (blau i vermell respectivament) i els seus controls negatius (gris) (indicat a la part dreta de la gràfica en format YFP_Rluc, amb els respectius colors). En l'eix vertical es representen les unitats de BRET (mBU) i en l'horitzontal la quantitat de YFP normalitzada pel valor de la Rluc en cada condició. Cada valor de la gràfica correspon a la mitjana del BRET de tres replicats tècnics, pel que les barres d'error en els eixos X i Y corresponen a l'error experimental, i no a la variabilitat entre experiments independents. El conjunt de punts reflecteixen aquesta variabilitat, ja que cada condició es va realitzar per triplicat (n=3), en experiments independents amb 6 concentracions diferents de la proteïna acceptora (YFP), i la mitjana de cada valor és la representació gràfica de cada punt en la figura (a excepció dels controls negatius (C-) que corresponen a un únic replicat).

ACTIVITAT DE PROMOTORS ESPECÍFICS DE FOTORECEPTORS

Aprofitant l'assaig de BRET, es va decidir analitzar els efectes de les interaccions estudiades sobre promotors específics de fotoreceptors, per a inferir si la interacció detectada podia tenir rellevància en la funció del factor de transcripció NR2E3 a la retina. Com ja s'ha comentat, està descrit que NR2E3 promou l'expressió de gens de bastons, mentre que silencia la de bastons¹³⁷. Per aquest motiu, a la cotransfecció del BRET, es va afegir, la construcció del promotor de la Rodopsina o de la S-opsina, dirigint l'expressió del gen de la luciferasa Fluc (representatiu de bastons i cons S, respectivament), i el plasmidi β -Gal com a normalitzador de la transfecció. D'aquesta

manera, es pretenia quantificar la interacció amb el BRET i, alhora, analitzar possibles canvis en els nivells d'activitat dels promotors respecte als esperats, normalitzant la luminescència amb l'expressió de la β -Gal.

No obstant, no es van detectar increments o disminucions en els nivells de luciferasa dels promotors per cap de les interaccions estudiades (els resultats no es mostren). Així doncs el sistema no va funcionar, possiblement a causa de la baixa eficiència de la cotransfecció de cinc construccions, o de la complexitat i transitorietat de les interaccions i la mesura creuada de paràmetres. Un altre factor determinant segurament va ser la manca en el context cel·lular amb els altres factors retinals rellevants en l'activació i repressió dels gens de fotoreceptors, com són CRX i NRL.

1.1.1. COMPROVACIÓ DE LES INTERACCIONS: LA COIP

Amb la finalitat de confirmar per altres tècniques la interacció obtinguda en l'assaig de BRET entre NR2E3 i HDAC4, es van realitzar co-immunoprecipitacions (CoIPs) en cèl·lules HEK293 cotransfectades amb les construccions hNr2e3 WT i mHDAC4-Rluc (no es va provar la interacció d'NR2E3 amb PIAS3, atès que ja havia estat demostrada per altres autors¹³⁷). Com a control negatiu de la tècnica es va substituir una de les dues construccions pel seu vector buit (pcDNA i pRluc-N1, respectivament). Les CoIPs es van realitzar en paral·lel amb l'anticòs contra la proteïna i contra el seu epítip, i es van analitzar per WB els *Inputs* (Ip), *Sobrenedants* (S) i *Outputs* (Op). Com es mostra a la Figura 30a, es va immunodetectar la banda d'HDAC4 (amb α -Rluc i α -HDAC4) en les immunoprecipitacions (IPs) amb α -NR2E3 i α -Xpress, i la banda d'NR2E3 (amb α -Xpress i α -NR2E3) en les IPs amb α -Rluc i α -HDAC4. Per contra, cap banda va ser detectada en les condicions del control negatiu (-). Així doncs, es va poder recuperar de forma específica ambdues proteïnes per mitjà d'immunoprecipitacions recíproques, confirmant la interacció trobada per BRET dins del sistema cel·lular amb una tècnica complementària. La immunodetecció de les proteïnes amb el mateix anticòs amb que s'havien immunoprecipitat van demostrar que les IPs havia sigut eficients i específiques, també pel control negatiu (C-, Figura 30b).

Tot i que els resultats van ser positius per a totes les combinacions d'anticossos, les IPs amb l'anticòs de l'epítip van recuperar més proteïna, ja que no se'n va poder detectar en els Sobrenedants (S). A més, l'anticòs contra HDAC4 va resultar ser poc eficient en la immunodetecció per WB, en comparació amb la resta d'anticossos. No

RESULTATS

obstant, la seva eficiència en la IP va ser comparable a la de la resta d'anticossos, pel que podria ser que l'anticòs funcionés millor en condicions no desnaturalitzants.

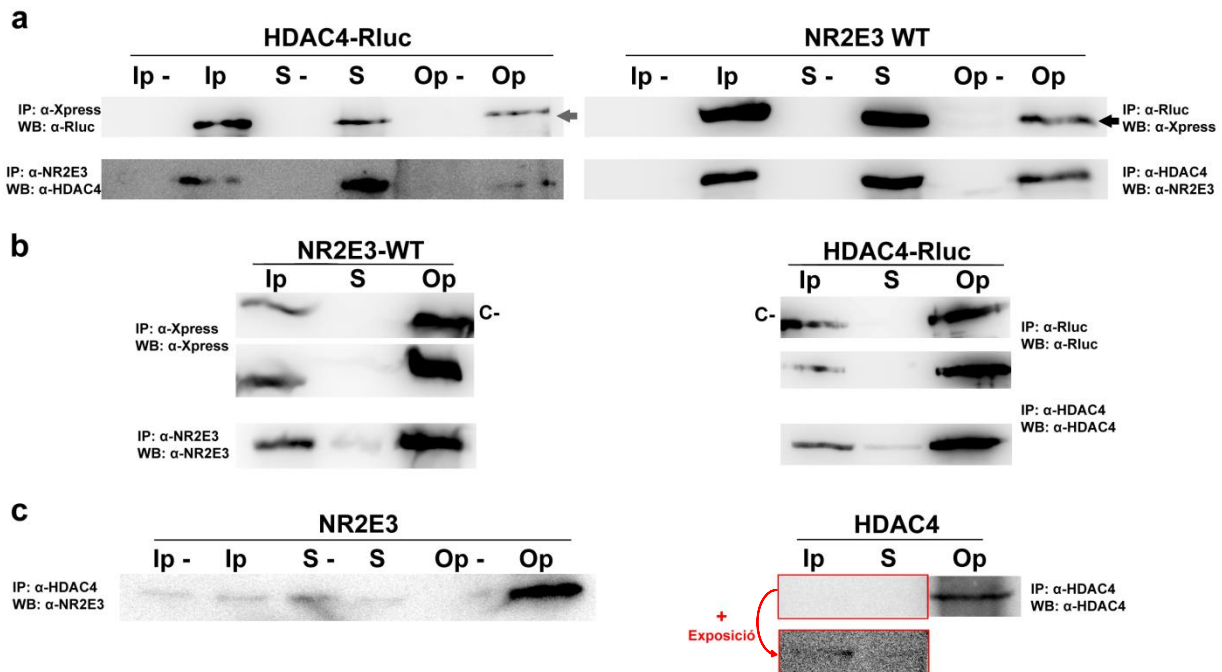


FIGURA 30. INTERACCIÓ D'HDAC4 I NR2E3 PER CoIP. (a) Immunodeteccions creuades d'HDAC4 (esquerra, fletxa gris) i NR2E3 (dreta, fletxa negra) a partir de la IP d'NR2E3 i HDAC4, respectivament, en cèl·lules HEK293 transfectades. Ambdues proteïnes es van detectar en els *Inputs* (Ip), *Sobrenedants* (S) i *Outputs* (Op), però no en els controls negatius (-). Tant les IPs com els WB es van realitzar amb α -Xpress i α -NR2E3 i amb α -Rluc i α -HDAC4. (b) Immunodetecció de l'enriquiment de les proteïnes NR2E3 (esquerra) i HDAC4 (dreta) amb anticossos contra la proteïna i contra l'epítip, per a les CoIPs i pel control negatiu (C-). (c) CoIP en retina de ratolí P60, immunoprecipitant HDAC4 amb el seu anticòs i detectant per WB NR2E3 (esquerra). El control negatiu (-) es va realitzar amb un anticòs inespecífic (SAMPO), i no es va detectar NR2E3 en l'Op-. A la dreta, el control de l'enriquiment amb IP amb α -HDAC4. La immunodetecció està sobreexposada (requadre vermell) per tal de demostrar la presència de HDAC4 en l'*Input* (Ip).

Per tal de confirmar si la interacció també es donava *in vivo*, es van realitzar les mateixes CoIPs en retines de ratolí; en aquest cas, només es podien usar els anticossos α -NR2E3 i α -HDAC4 contra les proteïnes endògenes. Com a control negatiu (-) es va immunoprecipitar amb l'anticòs α -GFP. La CoIP amb α -HDAC4 va permetre l'obtenció d'NR2E3, detectada per WB (Figura 30c). Desafortunadament, no es va poder detectar cap banda en la CoIP inversa (IP amb α -NR2E3 seguida de WB amb α -HDAC4), possiblement a causa d'una diferent afinitat de l'anticòs d'HDAC4, que sembla funcionar millor per a immunoprecipitació que per WB, com ja s'havia demostrat en els resultats previs amb cèl·lules transfectades. Fins i tot el control de la IP (IP i WB amb α -HDAC4) va donar bandes de detecció molt lleus tot i l'enriquiment

de l'*Output*, sobretot en l'*Input* (requadre vermell). Tot i això, es va poder demostrar la interacció entre HDAC4 i NR2E3 a nivell fisiològic en retines de ratolí.

INTERACCIÓ DE DIFERENTS FORMES D'HDAC4 AMB NR2E3

En vista dels resultats obtinguts amb les CoIPs, considerant que HDAC4 és rellevant en el funcionament dels fotoreceptors^{140,150}, i que té una doble activitat deacetilasa i E3 lligasa de SUMO⁵⁷, es va plantejar aprofundir en l'estudi de la interacció d'HDAC4 amb NR2E3. Amb aquesta finalitat, es va disposar de diverses construccions de la forma humana d'HDAC4 -cedides amablement pel Dr. Xiang-Jiao Yang⁵⁷-, que van ser transfectades en cèl·lules HEK293 juntament amb la construcció hNR2E3 WT. D'una banda, les construccions van permetre l'estudi de la regió d'interacció d'HDAC4, per mitjà dels fragments C-terminal (621-1084) i N-terminal (1-666) marcats amb l'epítot Flag. El primer correspon al domini deacetilasa de la proteïna, mentre que el segon conté altres activitats de l'enzim, com la d'E3 lligasa de SUMO. D'altra banda, atès que HDAC4 també és una proteïna diana de sumoilació, es va plantejar l'efecte d'aquesta en la interacció amb NR2E3. Per aquest motiu es van utilitzar les construccions amb la forma WT i mutant de la lisina sumoilable (K559R) de la deacetilasa. El conjunt de construccions es troben llistades a la Taula 4. Com que els epítots Xpress i Flag són molt semblants i els seus anticossos donen reaccions creuades (dades no mostrades), es va utilitzar la construcció d'hNR2E3 WT-YFP, que es va immunoprecipitar amb α -GFP.

Els resultats de la Figura 31 mostren com, a partir de la IP d'NR2E3, es va recuperar el fragment C-terminal d'HDAC4 i les formes WT i K559R. Per contra, no va ser possible recuperar el fragment corresponent a la part N-terminal. Així, a diferència del que s'esperava, NR2E3 interaccionaria amb el domini de deacetilació d'HDAC4 i no amb el domini E3 lligasa, molt probablement de forma independent al seu estat de sumoilació.

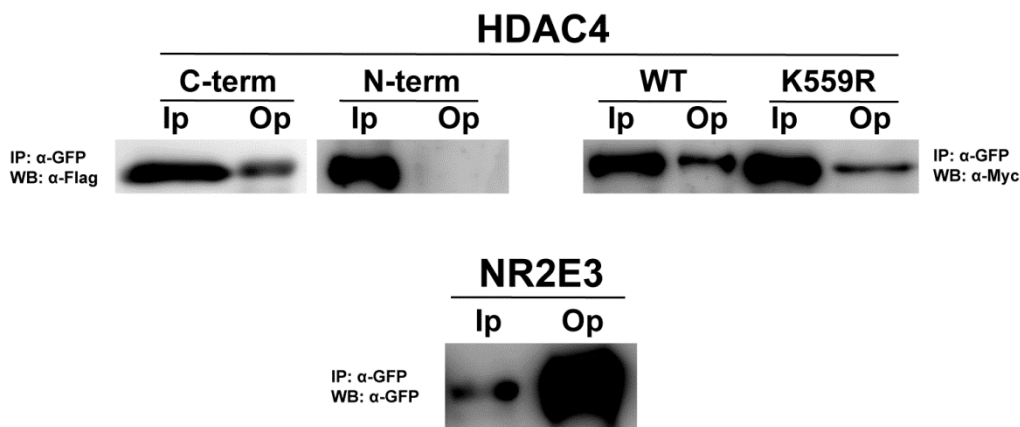


FIGURA 31. INTERACCIÓ D'HDAC4 I NR2E3. Immunodetecció de los CoIPs de les cotransfèccions d'hNR2E3 WT-YFP amb les diferents construccions d'HDAC4 en cèl·lules HEK293. La IP amb α -GFP va permetre detectar la regió C-terminal amb α -Flag, i les formes WT i K559R d'HDAC4 amb α -Myc. En canvi, la regió N-terminal d'HDAC4 no es va detectar. En el panell inferior es mostra l'enriquiment d'NR2E3 amb la seva IP amb α -GFP.

1.1.2. INTERACCIÓ AMB PROMOTORS ESPECÍFICS: LA TÈCNICA DE CHIP

Atès que HDAC4 no s'uneix directament al DNA, la seva activitat deacetilasa d'histones es dona pel seu reclutament a promotors específics per mitjà de la interacció amb proteïnes d'unió a DNA¹⁵¹. Per aquest motiu, es va utilitzar la tècnica de ChIP per estudiar la possible interacció amb NR2E3 en alguns dels promotors específics de fotoreceptors, als que s'hi uneix aquest factor de transcripció. Així, es buscava purificar tots els fragments de DNA –prèviament sonicat– units a NR2E3 (*crosslinking*), mitjançant immunoprecipitació. Aquests fragments es podrien llavors seqüenciar (ChIP seq) o, com es va realitzar en aquest estudi, amplificar per PCR buscant regions ja conegudes (ChIP).

Amb aquesta finalitat es van utilitzar *primers* específics d'amplificació de les regions d'unió d'NR2E3 a promotors dels gens *M-ops*, *S-ops*, *Rho*, *Crx*, *Nr2e3* i *Nrl*, dissenyats per una altra membre del grup (Elena B. Domènech) i llistats a la Taula 8. Al tractar-se d'una immunoprecipitació, els controls de la tècnica per a una mateixa mostra van ser el DNA total sonicat, o *Input* (Ip), i els fragments obtinguts de la IP amb α -NR2E3, o *Output* (Op). A més, la utilització d'un anticòs inespecífic (SAMPO) per a una segona immunoprecipitació en paral·lel es va utilitzar com a control negatiu (C-), que correspondria a tots els fragments de DNA obtinguts per unió inespecífica a l'anticòs.

Tot i que la tècnica havia estat posada a punt prèviament a partir de diversos protocols, les PCRs semi-quantitatives resultants no havien donat els resultats d'amplificació desitjats, ja que no es detectaven diferències clares entre el C- i l'Op.

Així, per tal de quantificar d'una manera més exacta les possibles unions diferencials d'NR2E3, es va optar per analitzar les mostres dels fragments de DNA obtingudes del ChIP per PCR quantitativa, amb les mateixes condicions que les descrites per a la quantificació dels nivells d'expressió dels gens de la via de SUMO Taula 5.

Dues mostres de retines van ser processades en paral·lel per ChIP amb α -NR2E3 i α -HDAC4, i analitzades amb el programa LightCycler 480 utilitzant una quantificació relativa respecte als resultats dels *Inputs* (Ip) per a cada parell de *primers* i mostra. A més, cada C- es va utilitzar com a normalitzador dels resultats de la tècnica, rebent el valor d'1. D'aquesta manera, totes les amplificacions superiors a aquest valor van ser considerades com específiques, i es van representar com a “vegades d'expressió” respecte el C- inespecífic, o *background*.

La Figura 32a i 19b mostra l'amplificació mitjana de tres replicats biològics independents, en relació amb els Ips de cada mostra i parell de *primers*, i normalitzats pels respectius C-. Les barres d'error corresponen a les desviacions estàndards dels replicats i són un reflex de la variabilitat entre mostres. Els resultats del ChIP d'NR2E3 van donar per damunt del valor del C- (equivalent a 1, representat per una línia horitzontal) només en el cas dels promotors de *Rho* i *Nr2e3*; aquest últim amb una amplificació d'aproximadament un ordre de magnitud respecte al C- (Figura 32a). D'altra banda, el ChIP d'HDAC4 va donar valors d'amplificació d'entre 3 i 5 vegades el C- per a tots els promotors (Figura 32b).

Per tal de comprovar l'especificitat de la tècnica, donats els resultats positius de tots els promotors amb HDAC4, es va incloure un altre control en el darrer replicat, utilitzant parells de *primers* de la PCR quantitativa de l'estudi de l'expressió de la maquinària de SUMO en retina, prèviament exposada. Concretament es van utilitzar les parelles de *primers* de les regions codificants de *Cbx4*, *Pias3* i *Topors*, on *a priori* no s'hi hauria de trobar HDAC4 unida a través d'altres proteïnes d'unió a DNA. Els resultats, normalitzats pels respectius controls negatius i sense barra d'error per manca de replicats biològics, van donar valors similars al del conjunt de promotors estudiats (Figura 32c). En conseqüència, els resultats observats amb aquesta tècnica, al menys en les nostres condicions, van passar a ser considerats artefactuals i no fiables. Aquest és un dels estudis que caldria posar a punt en un futur si es vol aprofundir en la relació de la interacció entre HDAC4 i NR2E3 i la regulació de l'activitat transcripcional a retina.

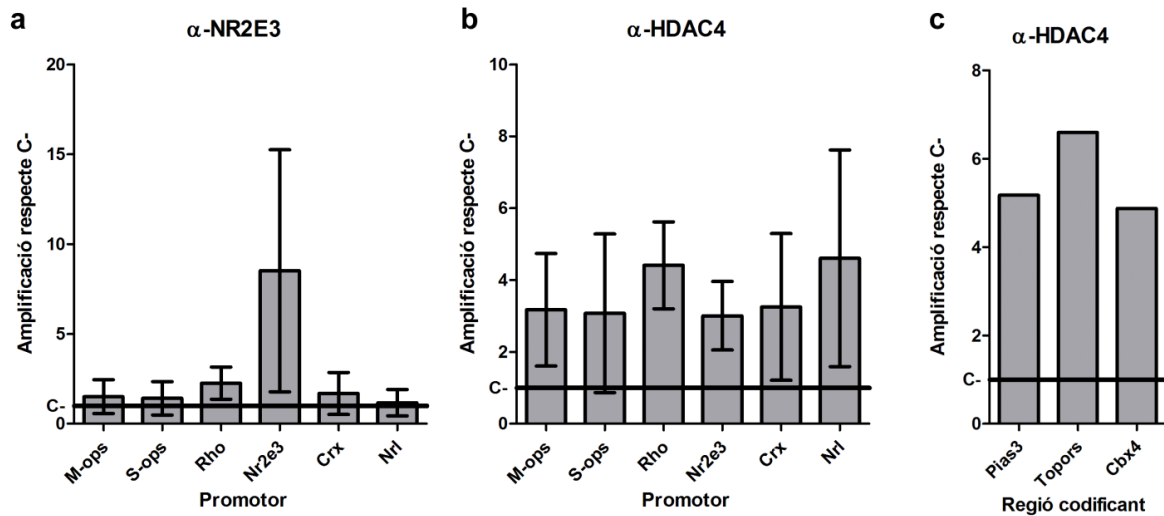


FIGURA 32. AMPLIFICACIÓ DE PROMOTORS ESPECÍFICS DE FOTORECEPTORS A PARTIR DEL CHIP CONTRA NR2E3 I HDAC4. (a i b) Quantificació per q-PCR de les regions d'unió d'Nr2e3 als promotors dels gens específics de fotoreceptors *M-ops*, *S-ops*, *Rho*, *Nr2e3*, *Crx* i *Nr1*, a partir de les mostres obtingudes per ChIP amb α -NR2E3 (a) i α -HDAC4 (b). La quantificació relativa de l'*Output* es va fer en relació a l'*Input* i es va normalitzar pel valor del control negatiu (C-). La barra horitzontal = 1 mostra el resultat del C-, normalitzat amb ell mateix. (a i b) Els resultats són la mitjana de tres experiments amb mostres independent (n=3), i les barres d'error corresponents a la desviació estàndard mostren la variabilitat entre les mostres. (c) Quantificació per q-PCR del ChIP amb α -HDAC4 d'una única mostra per a regions codificants de PIAS3, TOPORS i CBX4, com a control de l'especificitat de l'amplificació.

1.1.3. NOVES INTERACCIONS AMB NR2E3: L'ASSAIG DE BIOID

La conjugació de SUMO pot incorporar canvis en l'estructura de la proteïna diana, alterant els seus dominis d'interacció. Per aquest motiu, es va considerar que una de les diferències en la funció fisiològica de la sumoilació d'NR2E3 podria ser la interacció diferencial amb altres proteïnes. Així, amb la intenció d'explorar aquesta possibilitat, es va recórrer al marcatge amb biotina amb la tècnica del BioID. El BioID és una tècnica que permet l'estudi de la interacció entre proteïnes aprofitant l'activitat enzimàtica de la lligasa de biotina d'*Escherichia coli* BirA. La versió optimitzada d'aquest enzim (BirA opt, a partir d'ara BirA) conjuga, de manera eficient i específica, biotina a lisines de seqüències peptídiques molt concretes, localitzades principalment en carboxilases de la maquinària cel·lular. No obstant, la seva forma mutant R118G perd aquesta especificitat de seqüència, convertint-se en un enzim "promiscu", capaç de conjugar biotina a totes les proteïnes del seu voltant. Així, en fusionar BirA R118G (BirA*) a una proteïna d'interès es genera una proteïna que pot biotinar totes les proteïnes que hi interaccionen o que estiguin localitzades molt pròximes. Mitjançant resines

conjugades amb Streptavidina o Neutravidina (amb una elevada afinitat per la biotina), es poden purificar aquestes proteïnes biotinitilades per, posteriorment, analitzar-les per WB o espectrometria de masses (Figura 33).

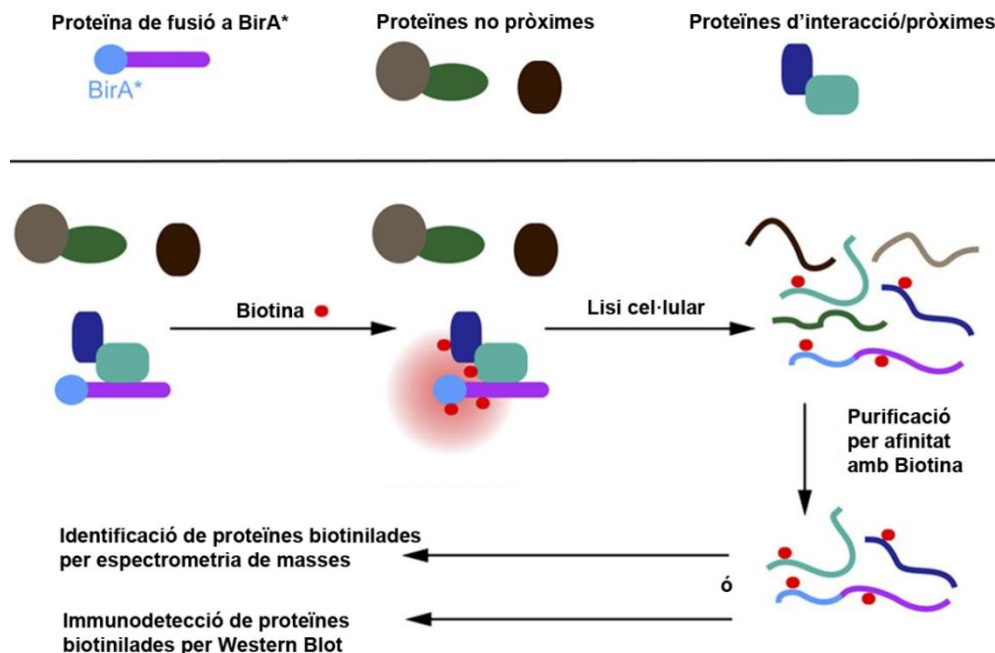


FIGURA 33. ESQUEMA DE L'ASSAIG BIOID. L'expressió de la fusió d'una proteïna d'interès amb l'enzim BirA opt R118G (BirA*) permet la conjugació de biotina en les proteïnes d'interacció o pròximes a la proteïna d'estudi. D'aquesta manera, mitjançant la purificació dels lisats cel·lulars per afinitat amb biotina, es poden identificar aquestes proteïnes per espectrometria de masses o immunodetecció per *Western Blot*¹⁷⁷.

Amb la intenció d'estudiar les diferències en la interacció amb altres proteïnes entre la forma sumoïlable i no sumoïlable d'hNR2E3 (WT i 123), es van clonar totes dues seqüències en vectors amb BirA* i BirA (com a control negatiu). El Dr. Jim Sutherland va facilitar molt amablement els vectors de clonatge i el protocol de purificació de les proteïnes biotinitilades, i alhora va ser de gran ajuda en el seguiment de la tècnica amb el seu consell i experiència.

Es van transfectar i expressar les diferents construccions obtingudes en cèl·lules HEK293, suplementant el medi amb biotina (50 µM durant les 24 hores prèvies a la recollida de les mostres), per tal de comprovar el funcionament del sistema de BioID (Figura 34). Així, es va detectar una banda majoritària amb l'anticòs anti-NR2E3 en tots els *Inputs* (Ip), corresponent a la proteïna de fusió de l'enzim BirA o BirA* (~37 kDa) amb NR2E3 WT o NR2E3 123 (~50 kDa), pel que es va concloure que la proteïna s'expressava correctament i amb nivells similars per a les quatre

RESULTATS

construccions. Alhora, també es va detectar en els *Outputs* (Op) per a les construccions de fusió a BirA* la banda de NR2E3, la qual cosa demostra que la promíscua activitat enzimàtica de BirA* havia permès la seva pròpia biotinització en la proteïna de fusió BirA*-NR2E3 WT (B*WT) o BirA*-NR2E3 123 (B*123). En el cas del WB amb Strep-HRP, que detecta les proteïnes biotinitzades, la proteïna de fusió només es va trobar en els Ips i Ops de les condicions amb BirA*, ja que és la única forma capaç d'autobiotinitzar-se (indicada amb una fletxa negra). A més, es van detectar altres bandes en aquests carrils, corresponents al conjunt de proteïnes biotinitzades per interacció amb la nostra proteïna de fusió. Per últim, es van detectar altres bandes comunes a tots els carrils, corresponents a proteïnes de biotinització interna (possiblement una carboxilasa), formant part del *background* inespecífic de la tècnica.

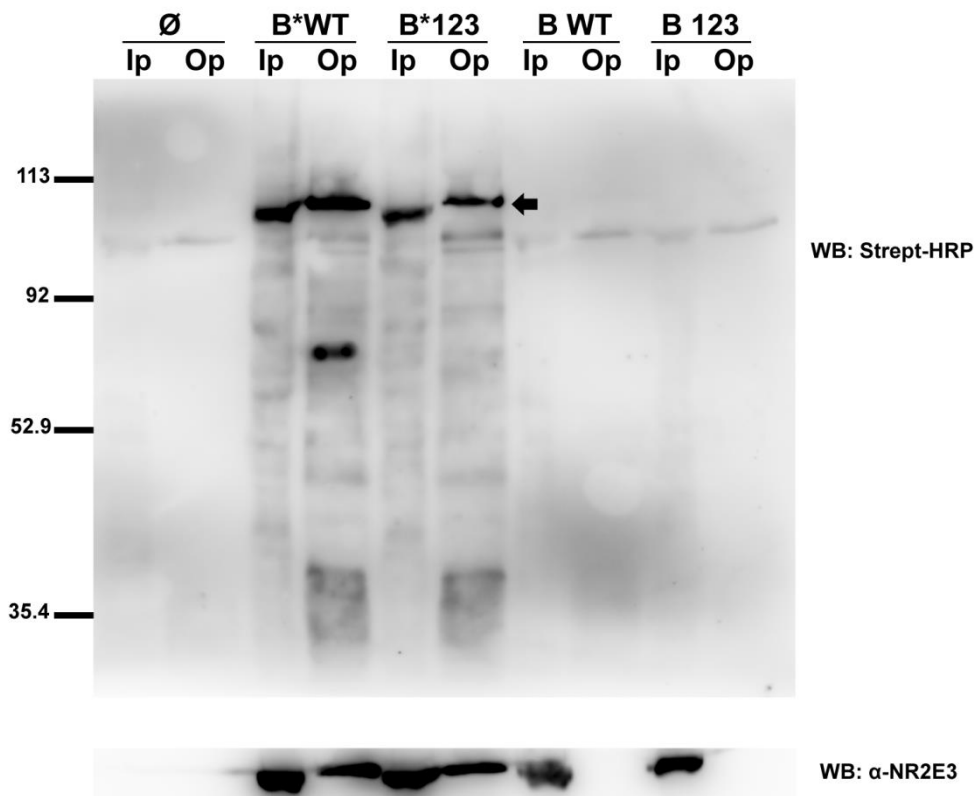


FIGURA 34. ASSAIG BIOID D'NR2E3 WT I 123 EN CÈL·LULES HEK293. Detecció per WB amb Streptavidina-HRP (panell superior) i α -NR2E3 (panell inferior), dels *Inputs* (Ip) i *Outputs* (Op) de l'assaig BioID amb cèl·lules HEK293: sense transfectar (\emptyset), o transfectades amb les construccions BirA*-hNR2E3 WT (B*WT), BirA*-hNR2E3 123 (B*123), BirA-hNR2E3 WT (B WT) i BirA-hNR2E3 123 (B 123). El panell superior mostra totes les proteïnes biotinitzades, amb una banda majoritària (fletxa negra) corresponent a la proteïna de fusió d'NR2E3 WT o 123 a l'enzim BirA*, gràcies a la seva activitat "promíscua". L'expressió de totes les construccions de fusió es va demostrar al panell inferior. L'absència de banda en els Ops de fusió amb BirA demostren la manca d'activitat autobiotinitzadora. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra de la figura en kDa.

Així, l'estudi proteòmic per espectrometria de masses es podria haver realitzat sobre la línia cel·lular, prenent com a controls negatius les construccions amb BirA i comparant les formes WT i 123 amb BirA* per tal de trobar diferències. No obstant, el context de la línia cel·lular HEK293 distava molt del fisiològic de la retina, mancant molts dels components transcripcionals que interaccionen amb NR2E3, pel que es va decidir provar, a continuació, l'expressió de la construcció BirA*-hNr2e3 WT en explants de retina mitjançant electroporació i conjuntament amb la construcció de GFP, per tal de visualitzar l'eficiència de la tècnica. Com que les condicions del teixit i els tipus cel·lulars no eren les mateixes, es van provar diferents concentracions de biotina i hores de tractament per tal d'assegurar l'entrada de biotina. Com es pot veure en la Figura 35, no es va aconseguir entrar/conjugar la biotina de forma eficient, ja que en el WB usant Strept-HRP, la banda de la proteïna de fusió BirA*-hNR2E3 WT (marcada amb una fletxa) gairebé no es va detectar en comparació amb la carboxilasa interna (que sempre es biotinila).

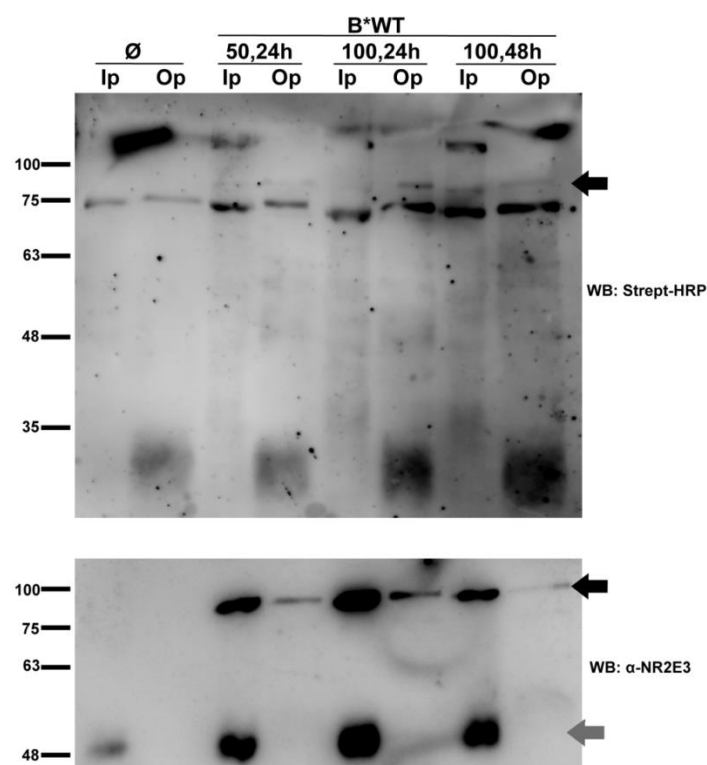


FIGURA 35. ASSAIG BIOD D'NR2E3 EN EXPLANTS DE RETINA ELECTROPORATS EN DIVERSES CONDICIONS. Detecció per WB amb Strept-HRP i α -NR2E3, dels *Inputs* (Ip) i *Outputs* (Op) del BioID en explants de retina sense electroporar (\emptyset), o electroporats amb la construcció BirA*-hNR2E3 WT (B*WT). Es van realitzar tres suplementes de biotina diferents: 50 μ M durant 24 hores (50,24h), 100 μ M durant 24 hores (100,24h), o 100 μ M durant 48 hores (100,48h). La fletxa negra assenyalava la proteïna de fusió expressada (en els Ips amb α -NR2E3) i biotinilada (en el WB amb Strept-HRP i en els Ops amb α -NR2E3), mentre que la fletxa grisa indica la proteïna NR2E3 endògena. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra de la figura en kDa.

RESULTATS

El WB contra NR2E3 va descartar que fos un problema d'expressió de la construcció, ja que aquesta es va detectar en els Ips electroporats amb la construcció (fletxa negra), juntament amb una banda de menor pes molecular corresponent a la forma endògena d'NR2E3 (fletxa gris). En comparació, els Ops van donar una banda molt lleu de la proteïna de fusió, indicant novament que la biotinització (i, per tant, l'enriquiment dependent d'aquesta modificació) no havia estat eficient.

A partir d'aquest punt, es van realitzar diverses proves -sense èxit- amb diferents concentracions de biotina en el medi de cultiu, en el volum d'electroporació i en els explants ja electroporats. En l'últim intent, la concentració de biotina en el medi de cultiu i en el volum d'electroporació va ser de 100 μ M. A més, es va afegir biotina en pols per sobre dels explants, un cop electroporats i plaquejats en pous amb *Transwells*, fins a una concentració de 700 μ M (condició A) i 850 μ M (condició B), i es van incubar durant 48 hores fins al moment de la recollida de les mostres. No obstant, els resultats van seguir sent insuficients (Figura 36).

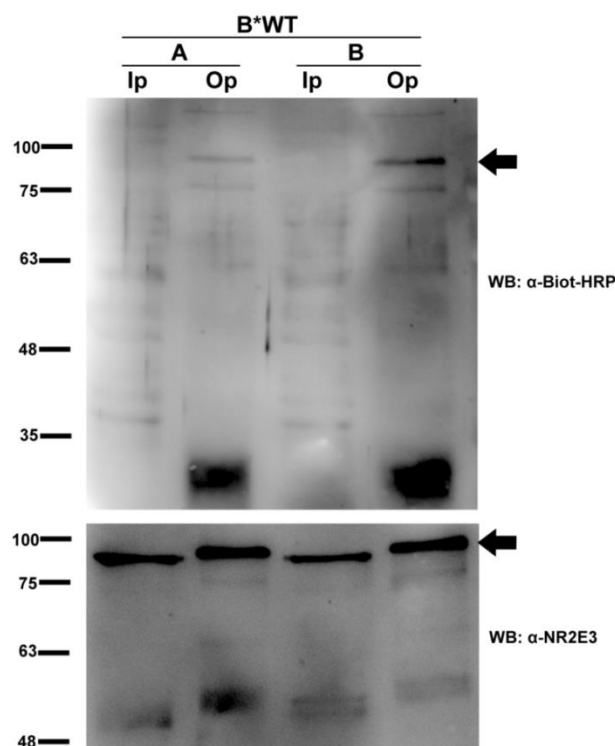


FIGURA 36. ASSAIG BIOID D'NR2E3 EN EXPLANTS DE RETINA 2. Immunodetecció per WB amb α -Biotina-HRP i α -NR2E3, dels *Inputs* (Ip) i *Outputs* (Op) de l'assaig BioID sobre explants de retina. Aquests van ser electroporats amb la construcció BirA*-hNR2E3 WT (B*WT), i van ser tractats amb un suplement de 100 μ M biotina en el medi d'electroporació i 700 μ M (A) o 850 μ M (B) en el medi del *Transwell*. La fletxa negra assenyalava la proteïna de fusió (en els Ips amb α -NR2E3) i biotinitzada (en el WB amb α -Biotina-HRP i en els Ops amb α -NR2E3). Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra de la figura en kDa.

A partir dels resultats obtinguts es va concloure que la biotina no era absorbida de forma eficient per les cèl·lules retinals, pel que es va decidir treballar amb alguna línia cel·lular pròxima a la retina; concretament, amb la línia cel·lular precursora retinal de fotoreceptors 661W. Amb aquesta finalitat, es van realitzar les mateixes transfeccions que en la primera prova amb HEK293, però incrementant el suplement de biotina a 100 μ M durant 48 hores. Els resultats de la Figura 37 mostren una insuficient biotinització de BirA*-hNR2E3 WT i 123, segons immunodetecció amb α -Biotina-HRP, com ja havia passat amb els explants retinals.

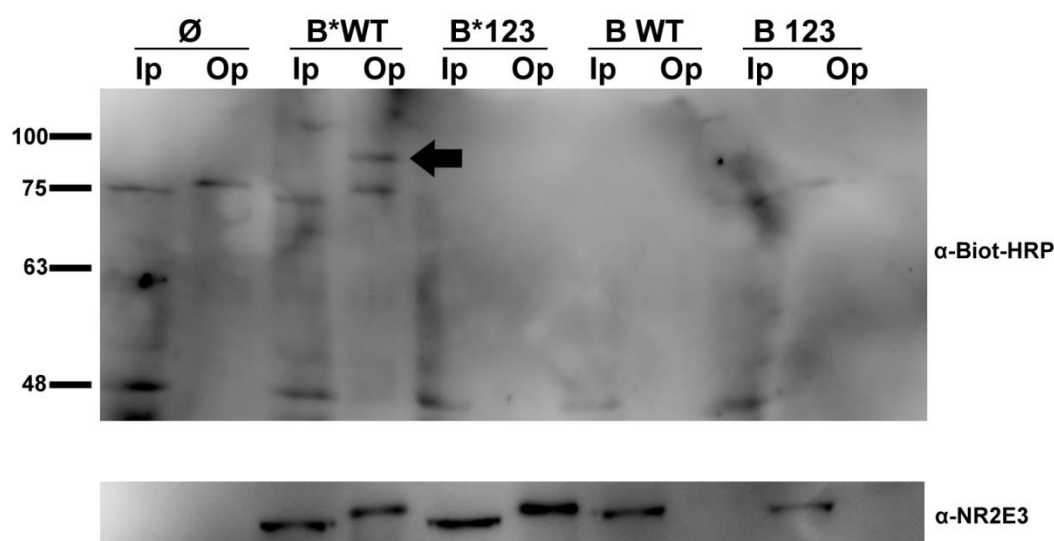


FIGURA 37. ASSAIG BIOD D'NR2E3 WT I 123 EN CÈL·LULES 661W. Immunodetecció per WB amb α -Biotina-HRP i α -NR2E3, dels Inputs (Ip) i Outputs (Op) de l'assaig BioID amb cèl·lules 661W sense transfectar (\emptyset), o transfectades amb les construccions BirA*-hNR2E3 WT (B*WT), BirA*-hNR2E3 123 (B*123), BirA-hNR2E3 WT (B WT) i BirA-hNR2E3 123 (B 123). La fletxa negra del panell superior i la immunodetecció del panell inferior corresponen a la proteïna de fusió expressada (Ips amb α -NR2E3) i biotinitzada (α -Biotina-HRP i Ops amb α -NR2E3). Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra de la figura, en kDa.

En vista dels resultats, es va decidir analitzar els sobrenedants (S) d'aquesta darrera transfecció, per tal de comprovar que la purificació de les proteïnes biotinitzades fos eficient i determinar si l'únic punt dèbil de la tècnica era la conjugació de la biotina. Com es pot veure en la Figura 38a, els Sobrenedants (S) van donar uns nivells de proteïna de fusió molt semblants als Ips, pel que es pot concloure que hi havia una molt baixa eficiència de recuperació de les proteïnes biotinitzades. Analitzant una de les transfeccions en cèl·lules HEK293 es va poder comprovar com, tot i purificar una fracció de les proteïnes biotinitzades, l'eficiència del procés també era molt baixa (Figura 38b). A més, la comparació dels WB amb α -NR2E3 de cèl·lules 661W i HEK293 va

RESULTATS

revelar uns baixos nivells d'expressió de la proteïna de fusió en el primer tipus cel·lular, possiblement deguts a una menor eficiència de transfecció.

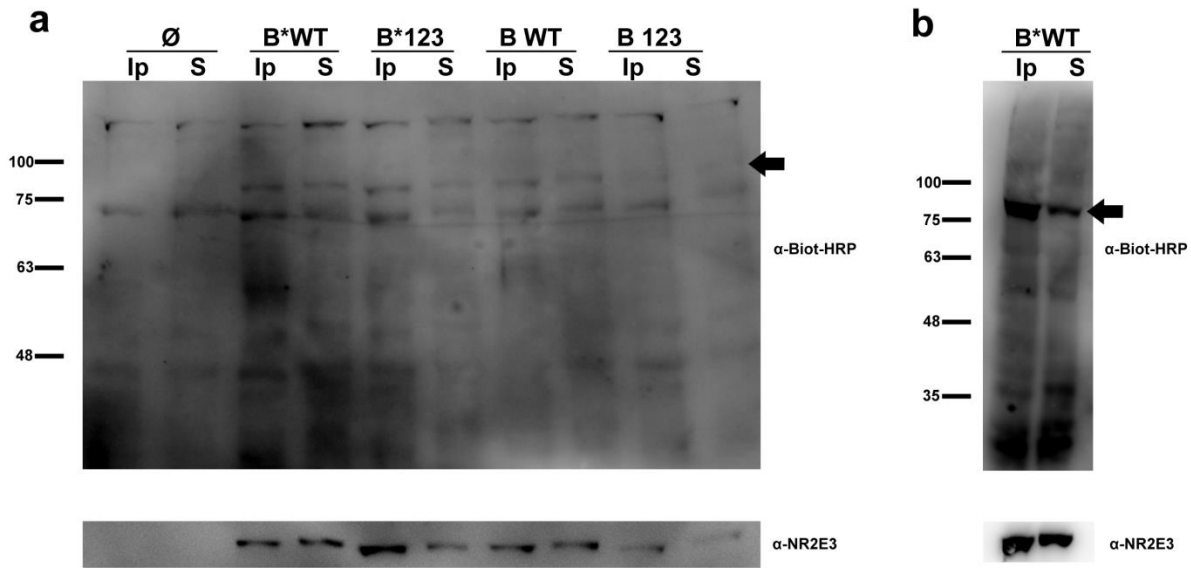


FIGURA 38. ESTUDI DE L'EFICIÈNCIA DE RECUPERACIÓ DE PROTEÏNES BIOTINILADES EN L'ASSAIG BIOID DE CÈL·LULES 661W I HEK293. Immunodetecció per WB amb α -Biotina-HRP i α -NR2E3, dels *Inputs* (Ip) i Sobrenedants (S) del BioID amb cèl·lules 661W (a) sense transfectar (\emptyset), o transfectades amb les construccions BirA*-hNR2E3 WT (B*WT), BirA*-hNR2E3 123 (B*123), BirA-hNR2E3 WT (B WT) i BirA-hNR2E3 123 (B 123); o amb cèl·lules HEK293 (b) amb la construcció BirA*-hNR2E3 WT (B*WT). La banda marcada amb la fletxa negra (en a i b) correspon a la proteïna de fusió. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra de la figura en kDa.

INTERACCIÓ D'NR2E3 AMB PIAS3 I HDAC4

Donada la poca eficiència del sistema BioID obtinguda en l'electroporació de retines de ratolí, es va plantejar comprovar la seva especificitat. Amb aquesta finalitat, es van cotransfectar cèl·lules HEK293 paral·lelament amb BirA*-hNR2E3 WT més el vector buit pcDNA3, mPIAS3-Rluc o mHDAC4-Rluc, amb un suplement de 50 μ M biotina durant les últimes 24 hores d'incubació. La purificació de la fracció proteica biotilada va donar molt similar al primer experiment de BioID (Figura 39). A més, el WB amb α -Rluc va permetre detectar l'expressió de les dues lligases de SUMO en fusió amb Rluc i la seva obtenció per BioID. Tot i que les bandes dels Ops són molt dèbils en comparació amb la quantitat de proteïna dels Ips –segurament degut a la baixa eficiència de purificació–, la seva presència demostra, d'una banda l'especificitat del sistema del BioID i, de l'altra, la interacció novament de les dues lligases amb NR2E3.

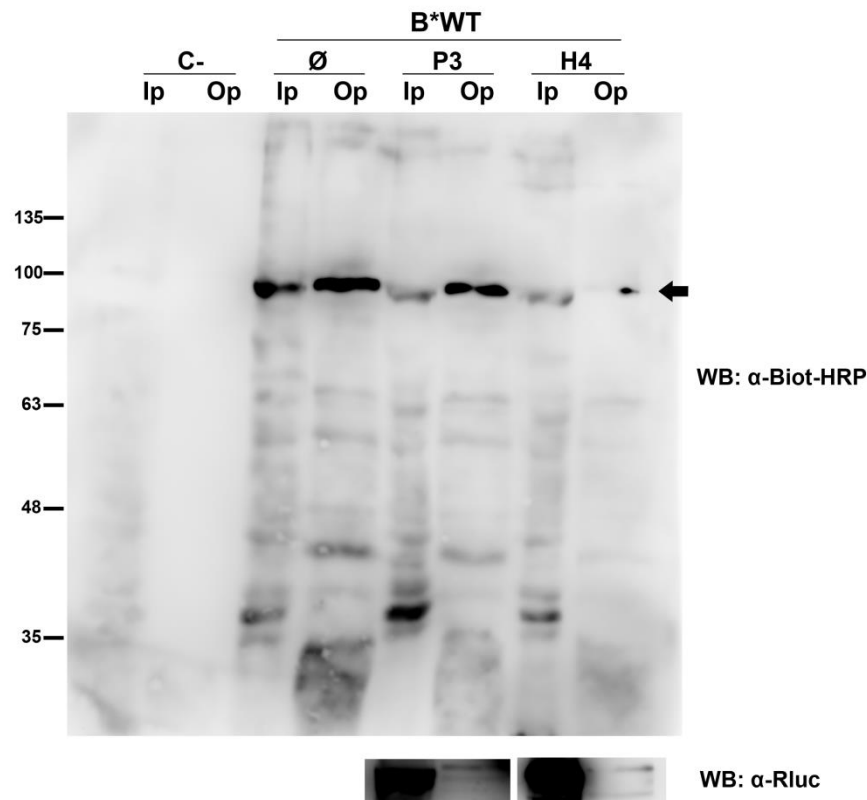


FIGURA 39. ASSAIG BIOID PER A L'ESTUDI DE LA INTERACCIÓ D'NR2E3 AMB PIAS3 I HDAC4. Immunodetecció per WB amb α -Biotina-HRP i α -Rluc, dels *Inputs* (Ip) i *Outputs* (Op) de l'assaig BioID amb cèl·lules HEK293 sense transfectar (C-), o transfectades amb la construccions BirA*-hNR2E3 WT (B*WT) més el vector buit (\emptyset), mPIAS3-Rluc (P3) o mHDAC4-Rluc (H4). La banda majoritària en el panell superior (marcada amb la fletxa negra) correspon a la proteïna de fusió. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra de la figura en kDa.

INTERACCIÓ DE CBX4 AMB NR2E3

D'altra banda, el Dr. Sutherland també va facilitar una construcció amb l'enzim BirA* fusionat a CBX4, permetent la incorporació d'una altra lligasa E3 de SUMO a l'estudi de la interacció amb NR2E3. Cal recordar que CBX4 pertany al grup Polycomb de remodeladors cromatínics, molt important en la repressió transcripcional. Així doncs, es van cotransfectar BirA*-CBX4 i hNR2E3 WT en cèl·lules HEK293, incubades durant les últimes 24 hores amb 50 μ M biotina. Com a control negatiu, es va utilitzar el vector buit pcDNA3 en comptes de la proteïna de fusió. Els resultats de la Figura 40 mostren la expressió i biotinització de la proteïna de fusió, amb un pes molecular d'aproximadament 115 kDa (\sim 37 kDa de BirA* més \sim 80 kDa de CBX4). A més, el WB amb α -Xpress va immunodetectar NR2E3 WT amb alts nivells d'expressió en l'Ip i

RESULTATS

molt baixos en l'Op. Tot i aquesta diferència, cal remarcar que el resultat va demostrar que es donava la interacció entre NR2E3 i CBX4.

Seguidament, es va repetir la transfecció però amb la forma mutant d'NR2E3 (hNR2E3 123). El revelat del WB contra l'epítip Xpress no va detectar la banda en l'Op, pel que podria ser que la proteïna perdés la capacitat d'interacció amb la forma mutada del factor de transcripció (Figura 40). No obstant, la baixa resolució i eficiència de la tècnica no permet demostrar aquests canvis en la interacció, i caldria realitzar altres estudis més quantitius que corroborin o descartin aquesta afirmació. Per tant, no es pot concloure que la interacció de CBX4 i NR2E3 depengui de la capacitat del factor de transcripció de ser sumoïlat.

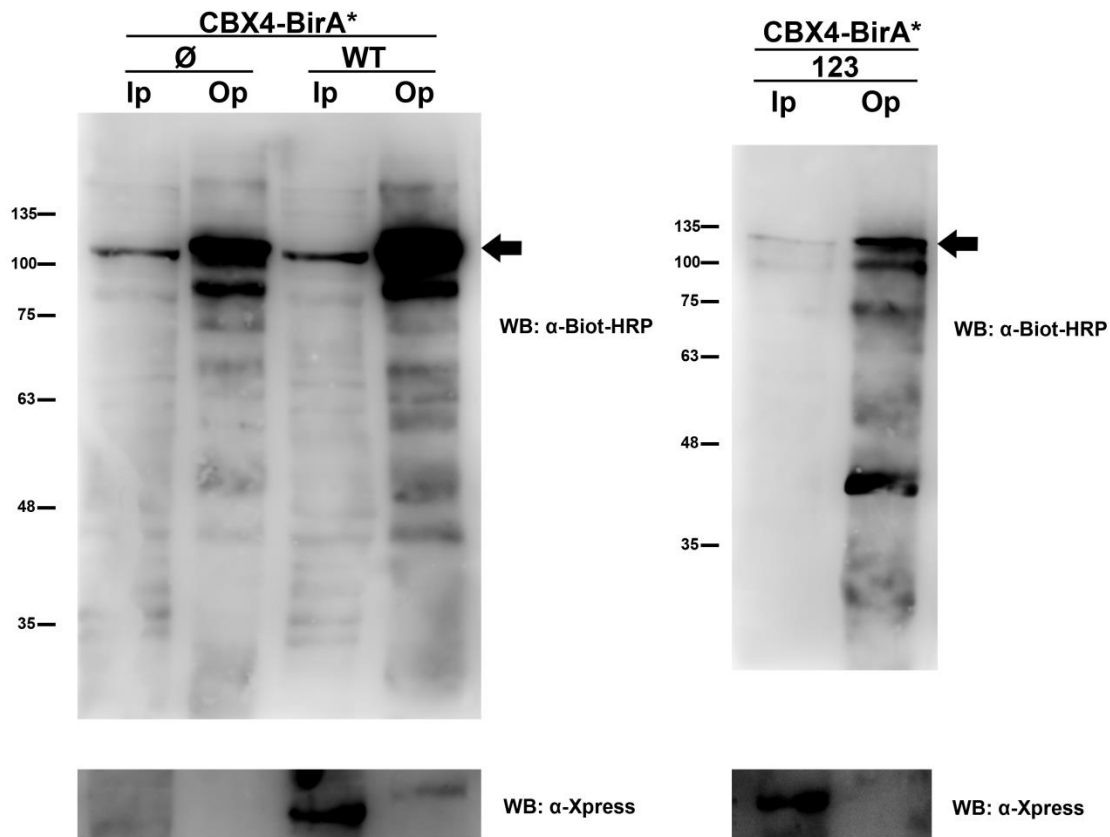


FIGURA 40. ASSAIG BIOD PER A L'ESTUDI DE LA INTERACCIÓ DE CBX4 AMB NR2E3. Immunodetecció per WB amb α -Biotina-HRP i α -Xpress, dels *Inputs* (Ip) i *Outputs* (Op) de l'assaig BioID en cèl·lules HEK293 transfectades amb la construccions CBX4-BirA* més el vector buit (\emptyset), hNR2E3 WT (WT) o hNR2E3 123 (123). La banda de major pes molecular en el panell superior (indicada amb una fletxa negra en els dos panells superiors) correspon a la proteïna de fusió. Els panells inferiors corresponen a la immunodetecció d'NR2E3 WT, només detectada en els Ips de les condicions transfectades amb la construcció hNR2e3 Wt o 123 (WT o 123), i únicament en l'Op de la condició WT. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra de la figura en kDa.

1.2. ESTUDI DE LA CONJUGACIÓ DE SUMO EN NR2E3

En l'estudi de l'expressió de les diferents construccions d'hNR2E3, es va detectar una banda d'aproximadament 70 kDa en els carrils corresponents a la forma WT, que no apareixia en les diferents formes mutants (Figura 19). Atès que totes les formes mutants d'NR2E3 compartien la mutació de la primera lisina, es va concloure que la banda diferencial estava relacionada amb K185. Aquesta havia estat descrita en la bibliografia com la lisina principal en la sumoïlació d'NR2E3¹³⁷, pel que es va plantejar que la banda observada correspongués a la conjugació de SUMO a NR2E3. No obstant, en l'estudi de l'estabilitat proteica d'NR2E3, la cotransfecció de les construccions hNR2E3 WT amb les lligases E3 de SUMO PIAS3 i HDAC4 no va incrementar aquesta banda (Figura 21), pel que es va considerar que cap de les dues lligases no participava en la producció de la banda observada deguda a la modificació per sumoïlació.

1.2.1. IDENTIFICACIÓ DE LA MODIFICACIÓ D'NR2E3 EN K185

D'altra banda, el descobriment de la interacció entre NR2E3 i CBX4 va aportar una nova E3 lligasa de SUMO a l'estudi. Així, es van transfectar cèl·lules HEK293 amb hNR2E3 WT o 123, juntament amb la construcció CBX4-BirA*, per estudiar possibles canvis en la producció o intensitat d'aquesta banda addicional, de major pes molecular. Alhora, es van transfectar dues condicions més afegint la construcció de SUMO1-HA o SUMO2-HA. La Figura 41 mostra la immunodetecció d'NR2E3 per WB amb α -Xpress per a les mostres de les diferents transfeccions, en el que es va tornar a detectar la banda d'aproximadament 70 kDa només en els carrils amb la forma d'NR2E3 WT (marcada amb <). A més, es va observar l'aparició d'una nova banda lleugerament major a l'anterior, només en el carril amb SUMO2-HA (marcada amb *). Atès que la construcció de SUMO2 transfectada està fusionada a l'epítot HA, el pes molecular de la proteïna resultant incrementa en aproximadament 2 kDa. Aquest canvi de pes podria explicar la diferència entre les dues bandes i permetria considerar la banda de modificació d'NR2E3 com a resultat de la conjugació de SUMO2. En afegit, el WB també va revelar una disminució en la quantitat de proteïna del factor de transcripció, tant WT com 123, en els carrils cotransfectats amb CBX4-BirA*, respecte al control amb el vector buit pcDNA3 (\emptyset).

Adicionalment, el requadre vermell de la Figura 41 mostra el resultat d'un temps d'exposició més llarg, per tal d'apreciar bandes menys intenses i de major pes molecular. El primer carril no s'inclou en el requadre degut a la seva major intensitat en comparació amb la resta de carrils de la figura. Aquestes bandes de major pes

RESULTATS

molecular –indicades amb els números 1, 2, 3 i 4– no es van detectar en tots els carrils. De fet, la banda 4 va ser l'única comuna en WT i 123 i, per tant, de producció independent de la mutació de les lisines K185, K330 i K337. La primera banda (1), d'una mida aproximada de 100 kDa, només es va observar en els carrils transfectats amb hNR2E3 WT. Atès el seu pes molecular en comparació a la banda de sumoïlació, es podria tractar d'una forma di-sumoïlada d'NR2E3, amb dues molècules de SUMO conjugades. Aquesta teoria es reforça amb les bandes 2 i 3, només presents en el carril amb SUMO2-HA i NR2E3 WT, que equidisten entre elles respecte a la banda 1. Així, d'igual forma que en les bandes < i *, l'augment de mida podria explicar-se com a la diferència de pes entre la proteïna SUMO2 endògena i la SUMO2-HA transfectada. En conseqüència, la banda 2 correspondria a la di-sumoïlació amb una SUMO2-HA i una SUMO2 endògena, i la banda 3 a la conjugació de dues SUMO2-HA.

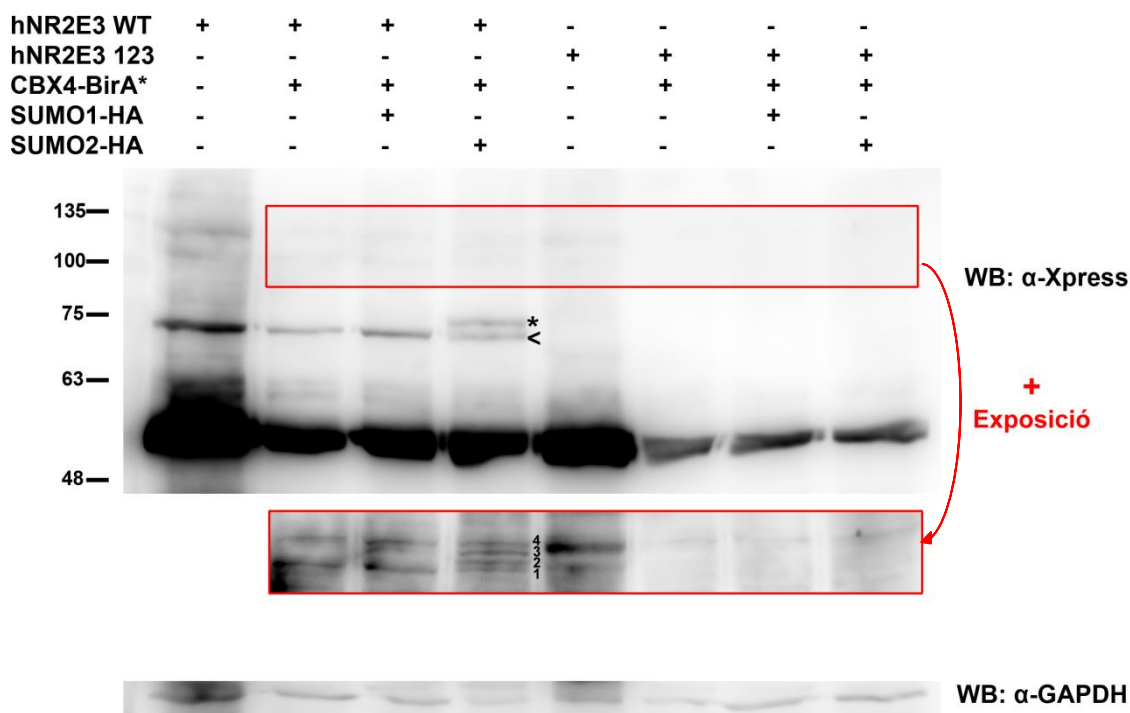


FIGURA 41. ESTUDI DE LA SUMOÏLACIÓ D'NR2E3 EN PRESENCIA DE LA E3 LLIGASA CBX4. Immunodetecció per WB amb α -Xpress i α -GAPDH, dels extractes proteics de cèl·lules HEK293 transfectades amb diverses construccions (indicades a la part superior). La banda majoritària (~55 kDa) correspon a NR2E3 sense modificar, mentre que les bandes * i < corresponen a la sumoïlació del factor de transcripció. El requadre vermell mostra una regió del WB amb major exposició, per tal d'apreciar quatre bandes de major pes molecular, numerades com a 1, 2, 3 i 4. El panell inferior mostra la proteïna GAPDH, utilitzada com a control de càrrega. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra de la figura en kDa.

Per tal de comprovar si l'aparició de la banda marcada com * depenia de l'acció de l'E3 lligasa CBX4, es va realitzar una transfecció combinant hNR2E3 WT i SUMO2-HA

amb el vector buit pcDNA3 (\emptyset), o amb la construcció d'una de les tres lligases: CBX4-BirA*, mPIAS3-Rluc i mHDAC4-Rluc. Les dues bandes (* i <) van ser immunodetectades en tots els carrils pel que es va concloure que la banda era únicament depenent de l'expressió de SUMO2-HA (Figura 42). Cal mencionar, però, que les bandes de sumoïlació van ser més dèbils en el carril amb HDAC4, pel que la deacetilasa podria estar afectant a la modificació d'NR2E3.

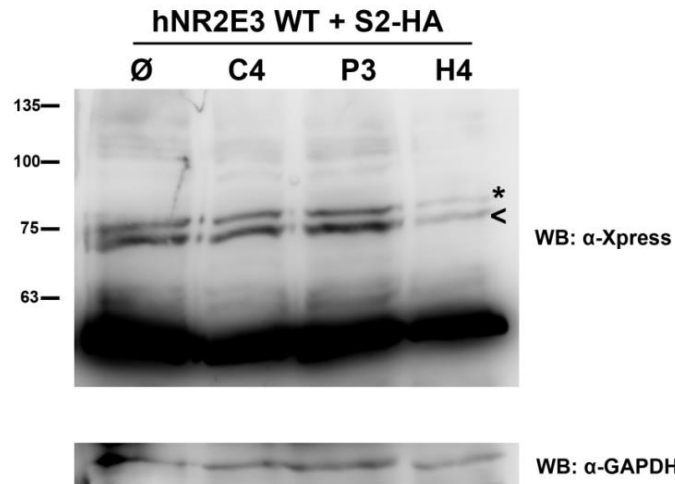


FIGURA 42. ESTUDI DE LA CONJUGACIÓ DE SUMO2-HA EN NR2E3 EN PRESENCIA DE DIFERENTS E3 LLIGASES. Immunodetecció per WB amb α -Xpress i α -GAPDH, dels extractes proteics de cèl·lules HEK293 transfectades amb hNR2E3 WT més el vector buit (\emptyset), CBX4-BirA* (C4), mPIAS3-Rluc (P3) o mHDAC4-Rluc (H4). La banda majoritària (~55 kDa) correspon a NR2E3 sense modificar, mentre que les bandes * i < corresponen a la sumoïlació del factor de transcripció. El panell inferior mostra la proteïna GAPDH, utilitzada com a control de càrrega. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra de la figura en kDa.

1.2.2. COMPROVACIÓ DE LA CONJUGACIÓ D'NR2E3 AMB SUMO2

Considerant els resultats observats i per tal de comprovar si la banda detectada corresponia a la conjugació de SUMO2 en NR2E3, es van realitzar CoIPs en cèl·lules HEK293 transfectades amb hNR2E3 WT o hNR2E3 123 amb SUMO1-HA o SUMO2-HA. Com que la conjugació de SUMO1 i SUMO2 es dona en un ampli ventall de proteïnes, la seva immunoprecipitació (IP) amb α -HA no hagués permès l'enriquiment de la possible conjugació sobre NR2E3. Per aquest motiu, es va fer la IP del factor de transcripció amb α -Xpress per, seguidament, immunodetectar les mostres amb l'anticòs contra l'epítip HA, i així detectar específicament si una part d'NR2E3 estava modificada per SUMO.

RESULTATS

Com es mostra en els panells inferiors de cada condició en la Figura 43, la IP contra NR2E3 va permetre l'obtenció del factor de transcripció en els *Outputs* (Op) (marcat amb una fletxa negra), tot i que sense aconseguir enriquir la proteïna respecte dels *Inputs* (Ip). També es van poder detectar en els Ips amb la forma WT d'NR2E3 les bandes ja obtingudes en els experiments previs (< i *), que correspondrien a les formes sumoïlades d'NR2E3 sense epítot HA (<, en les condicions amb SUMO1-HA i SUMO2-HA) o amb epítot HA (*, només en la condició amb SUMO2-HA). No obstant, aquestes no es van poder obtenir en els Ops.

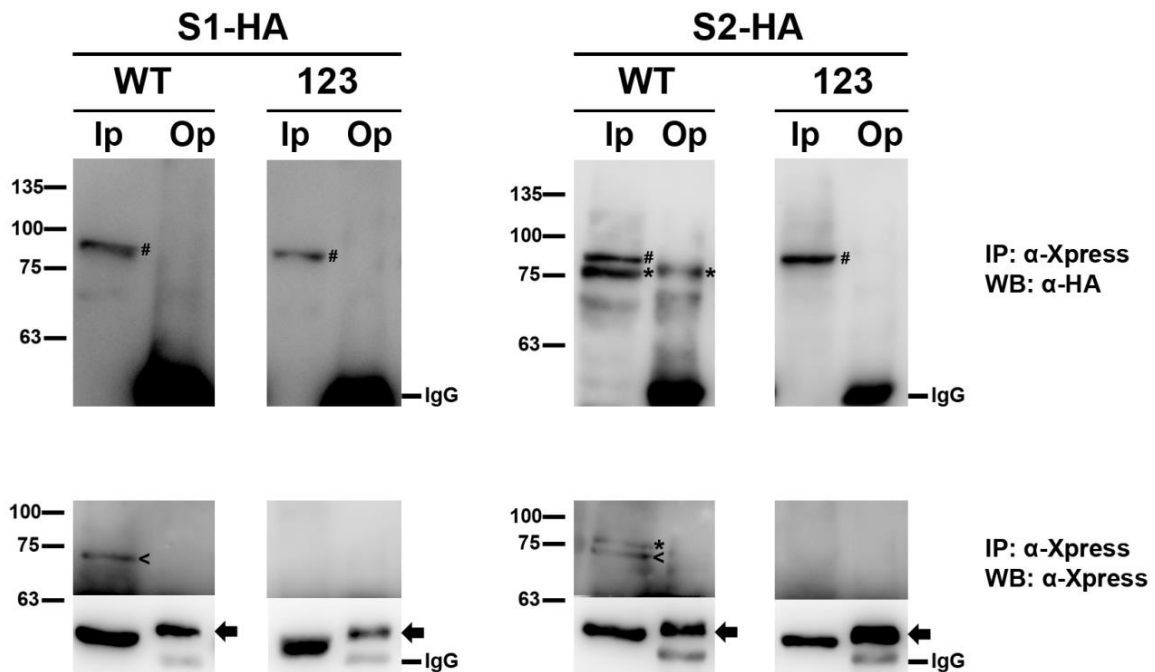


FIGURA 43. ESTUDI DE LA SUMOÏLACIÓ D'NR2E3. Immunodetecció de los CoIPs de les cotransfeccions d'hNR2E3 WT o hNR2E3 123 amb les construccions SUMO1-HA (S1-HA) o SUMO2-HA (S2-HA). Els panells superiors mostren els WBs amb α -HA de la IP amb α -Xpress per a les diferents condicions. D'una banda es va detectar una banda no relacionada amb NR2E3 en els *Inputs* (Ip) de les quatre condicions (marcada amb #). També es va detectar la banda de sumoïlació d'NR2E3 WT amb SUMO2-HA (*) per aquesta condició. Els panells inferiors es mostren les IPs d'NR2E3 amb α -Xpress (fletxa negra). A més, per a les condicions amb la forma WT també es van detectar les bandes de sumoïlació < i *. Atès que l'anticòs secundari és el mateix per a α -Xpress i α -HA (SAMPO), en tots els *Outputs* (Ops) es va detectar la cadena pesada de les IgGs de l'anticòs utilitzat en la IP, amb un pes molecular de 50 kDa. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra dels panells de la figura en kDa.

Pel que fa al WB amb α -HA (panells superiors de cada condició), es va immunodetectar una banda en els Ips de totes quatre condicions (marcada amb #), d'aproximadament ~85 kDa, que també s'havia detectat en transfeccions anteriors només amb SUMO2-HA o SUMO1-HA (no es mostren les dades) i que, per tant, no eren específiques d'NR2E3. D'altra banda, en la cotransfecció d'NR2E3 WT amb SUMO2-HA es va

immunodetectar una segona banda de 75 kDa, tant en l'Ip com en l'Op. Aquesta banda coincidia en mida amb la banda *, obtinguda en les transfeccions anteriors amb aquestes dues construccions, pel que es va considerar com a prova de la conjugació de SUMO2 a NR2E3.

1.2.3. EFECTE D'UBC9 EN LA SUMOÏLACIÓ D'NR2E3

Les lligases E3 de SUMO actuen com a *scaffold* d'unió afavorint la interacció de l'enllaç tioèster entre l'enzim conjugador E2 de SUMO UBC9 carregat amb SUMO (UBC9~SUMO) i la lisina substrat de la proteïna diana. Per aquest motiu, es va decidir estudiar el possible efecte afavoridor de la presència d'UBC9 en la sumoïlació d'NR2E3. Amb aquesta finalitat, es va aprofitar una construcció multicistronica que expressava alhora SUMO2 i UBC9 (bioSUMO2-UBC9)¹⁷², facilitada molt amablement pel Dr. Sutherland. A més, la construcció estava dissenyada per a l'estudi de la conjugació de SUMO2 mitjançant biotinització, pel que també incorporava l'expressió de l'enzim BirA opt i una seqüència de biotinització (*bio*) unida a SUMO2. No obstant, aquestes característiques no van ser usades en aquest estudi.

Així, es van cotransfectar cèl·lules HEK293 amb hNR2E3 WT i bioSUMO2-UBC9, juntament amb una de les E3 lligases (CBX4-BirA*, mPIAS3-Rluc o mHDAC4-Rluc) o amb el vector buit pcDNA3. Alhora, dues condicions més es van utilitzar com a control de la sumoïlació: els lisats de la transfecció d'hNR2E3 WT amb vector buit o amb SUMO2-HA, usats a la Figura 41 i Figura 42, respectivament. La immunodetecció per WB amb l'anticòs contra l'epítot Xpress va revelar diferències entre les diverses condicions (Figura 44a). El primer control (primer carril) va donar la banda d'NR2E3 lliure (marcada amb una fletxa negra) i la banda de la seva sumoïlació interna (<). Aquestes dues bandes també es van poder observar en el segon control (segon carril), juntament amb la banda de conjugació de SUMO2-HA a NR2E3 (*). Pel que fa als carrils amb bioSUMO2-UBC9, es va detectar NR2E3 (fletxa), la banda de sumoïlació interna (<) i una banda amb la mateixa mida que la de la conjugació amb SUMO2-HA (*). Aquesta similitud en el pes molecular es deu a que la unió de SUMO2 al pèptid *bio* implica un augment de mida molt semblant al de la unió de SUMO2 a l'epítot HA.

D'altra banda, de les transfeccions amb les tres lligases de SUMO, la única que va mantenir els nivells d'intensitat de les bandes d'NR2E3 respecte el control va ser la de

RESULTATS

PIAS3 (cinquè carril). Sorprenentment, tant la coexpressió amb CBX4 com HDAC4 (carrils quart i sisè, respectivament), van donar intensitats inferiors a les bandes de sumoïlació (* i <) o de NR2E3 lliure (fletxa) respecte al control sense lligasa.

A partir d'aquests resultats, es va decidir fer replicats de les transfeccions d'hNR2E3 WT i bioSUMO2-UBC9 amb mHDAC4-Rluc, CBX4-BirA* o el vector buit pcDNA3, per tal de realitzar un anàlisi estadístic de les implicacions d'aquestes lligases en l'expressió i en l'estat de sumoïlació d'NR2E3. Així, es va quantificar la banda d'NR2E3 lliure respecte el control de càrrega GAPDH per a cadascun dels replicats i es va normalitzar amb el valor del control sense lligasa de cada replicat (anomenat WT Ø i considerat el 100% de proteïna NR2E3 lliure). Alhora, també es van quantificar les dues bandes de sumoïlació (* i <), que es van normalitzar respecte la quantificació d'NR2E3 lliure de cada condició i replicat. Novament es va considerar la condició WT Ø com al 100% de proteïna sumoïlada. Les mitjanes de les quantificacions de les transfeccions amb CBX4 (n=5) i amb HDAC4 (n=4) es mostren a la gràfica de la Figura 44b, i les barres d'error corresponen a les desviacions estàndards dels replicats.

Com es pot observar a la Figura 44b, l'expressió d'NR2E3 va baixar amb la coexpressió de qualsevol de les dues lligases (CBX4 i HDAC4). En canvi, només en el cas de CBX4 es va detectar una davallada dels nivells d'NR2E3 sumoïlat respecte a la baixada de la proteïna lliure, analitzats amb el test T per a mostres aparellades amb una diferència estadísticament significativa ($p < 0,05$, marcat amb *). Cal comentar que no es van poder realitzar tests estadístics per analitzar la baixada dels nivells d'NR2E3 degut a la manca de desviació estàndard per al valor de la condició WT Ø (considerat com a 100% en cada replicat).

Atès el resultat de la quantificació, es va considerar que la reducció en la sumoïlació d'NR2E3 amb l'addició de CBX4 fos deguda a un augment de la seva degradació via proteasoma, pel que es va estudiar els efectes de l'inhibidor de proteasoma MG132. Els resultats de la immunodetecció amb α -Xpress es mostren a la Figura 44c. Com es pot observar, tot i l'increment en la detecció d'NR2E3, els nivells de la proteïna sumoïlada es va mantenir igual de baixos, pel que es va descartar que la reducció de la sumoïlació d'NR2E3 per CBX4 fos deguda a la degradació via proteasoma. A més, es va observar per a totes dues condicions una lleugera baixada dels nivells de sumoïlació, com ja s'havia demostrat anteriorment (Figura 21).

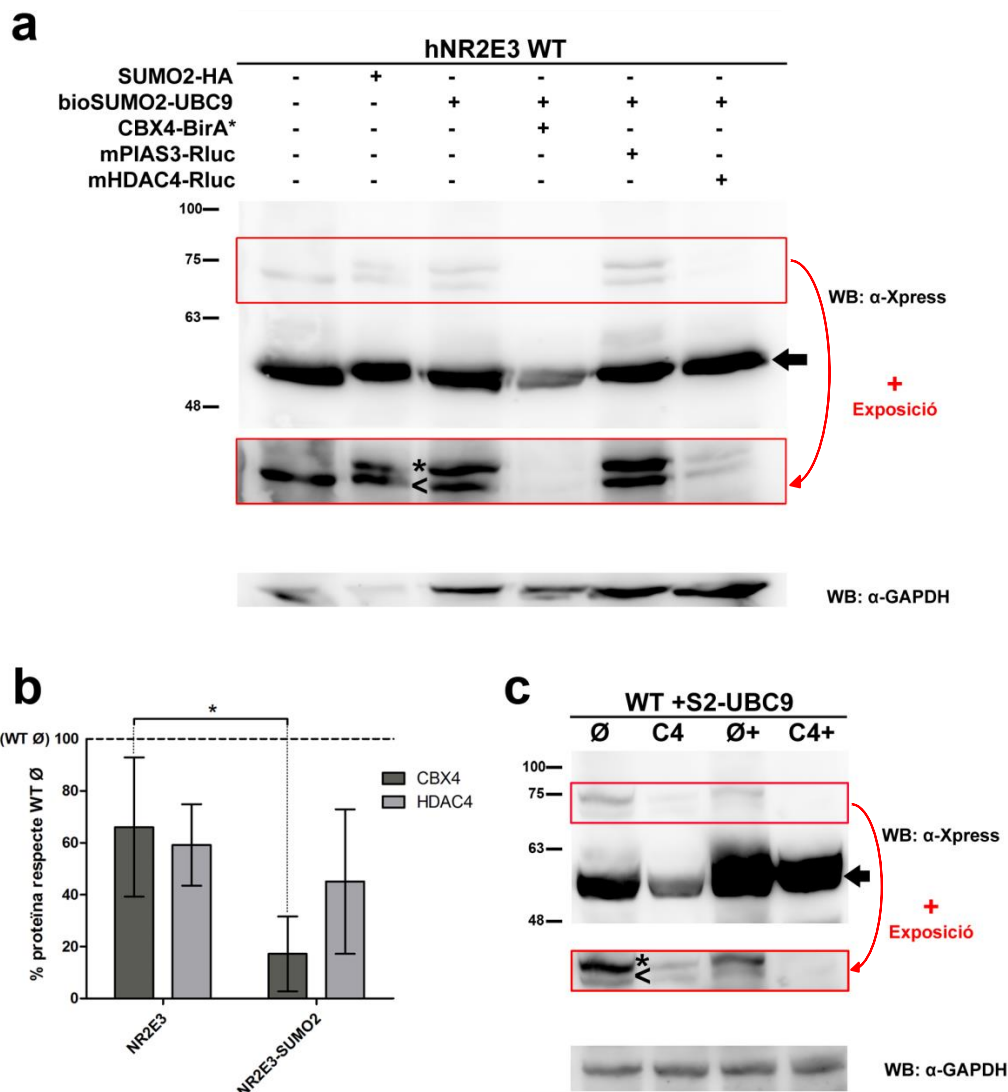


FIGURA 44. EFECTE DE UBC9 I DIVERSES E3 LLIGASES DE SUMO EN LA SUMOÏLACIÓ D'NR2E3. (a) Immunodetecció de les cotransfaccions d'hNR2E3 WT i bioSUMO2-UBC9 amb les construccions CBX4-BirA*, mPIAS3-Rluc, mHDAC4-Rluc o el vector buit pcDNA3. A més, es van afegir dues condicions de control de la sumoïlació d'NR2E3: hNR2E3 WT amb vector buit o amb SUMO2-HA. El panell superior mostra el WB amb α -Xpress per a les diferents condicions. D'una banda es va detectar la banda d'NR2E3 lliure (fletxa negra). De l'altra, es van detectar les bandes de sumoïlació interna (<) o de la conjugació amb SUMO2-HA o bioSUMO2 (*). El requadre vermell mostra una major exposició per a una millor visualització de les bandes de sumoïlació. A més, el panell inferior mostra la immunodetecció del control de càrrega GAPDH. (b) Representació gràfica de la quantificació dels replicats en l'estudi dels nivells d'expressió i sumoïlació d'NR2E3, en presència de CBX4 (gris fosc, n=5) o HDAC4 (gris clar, n=4). Per a cada replicat, els nivells de la proteïna NR2E3 lliure es van quantificar respecte el control de càrrega GAPDH, i es van normalitzar respecte la condició sense lligasa (WT Ø, considerada com a 100% de proteïna i indicada amb la línia discontinua). La mitjana dels valors obtinguts es mostra en el primer parell de barres, i les barres d'error corresponen a la desviació estàndard dels diferents replicats. El segon parell de barres correspon a la quantificació de les dues bandes de sumoïlació d'NR2E3 respecte a la quantita de proteïna lliure, per a cada condició i replicat. Novament, es van referenciar respecte la condició sense lligasa (WT Ø, 100% de proteïna sumoïlada). L'estudi estadístic amb el test T per a mostres aparellades va demostrar diferències significatives entre la baixada dels nivells d'NR2E3 lliure i els de les seves formes sumoïlades ($p < 0,05$, marcat amb *). (c) Per a l'estudi de la degradació via proteasoma de les bandes de sumoïlació, es va immunodetectar NR2E3 amb α -Xpress en els lisats de cèl·lules cotransfectades amb hNR2E3 WT (WT) i bioSUMO2-UBC9 (S2-UBC9), amb vector buit pcDNA3 (Ø) o amb CBX4-BirA* (C4). Paral·lelament, es van tractar dues condicions més amb l'inhibidor de proteasoma MG132 (+). Les immunodeteccions no detecten augment de les bandes de sumoïlació d'NR2E3 (* i <) per efecte de la inhibició del proteasoma. Les mides del marcador de pes molecular estan indicades a l'esquerra dels panells en kDa, en els panells a i c.

RESULTATS

1.3. ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ CEL·LULAR D'NR2E3 I ELS SEUS INTERACTORS

Considerant que els resultats previs havien demostrat la interacció de les tres E3 lligases de SUMO (PIAS3, HDAC4 i CBX4) amb el factor de transcripció NR2E3, es va plantejar l'estudi de la seva localització cel·lular. Mitjançant tècniques immunohistoquímiques (IHC) de fluorescència en talls de retina, es van realitzar diverses proves amb α -NR2E3 contra la proteïna endògena. Malauradament, els resultats del marcatge van ser inespecífics (no es va detectar el factor de transcripció en els nuclis dels fotoreceptor, i els resultats no es mostren). Per aquest motiu, es va decidir utilitzar les construccions hNR2E3 WT/123-YFP, que mitjançant l'excitació del cromòfor YFP permetia la seva localització directa. L'aproximació més fisiològica hagués correspost a la microinjecció subretinal de la construcció, o l'electroporació en explants de retina. No obstant, aquestes tècniques tenen una molt baixa eficiència i requereixen molt de temps, així com una optimització de les condicions per a l'obtenció de resultats vàlids. Per això, es va decidir utilitzar primerament un sistema més senzill, com són les cèl·lules HEK293.

Es van realitzar cotransfeccions de les construccions hNR2E3 WT o hNR2E3 123 amb cadascuna de les E3 lligases (CBX4-BirA*, mHDAC4-Rluc o mPIAS3-Rluc). Mitjançant tècniques d'immunocitoquímica (ICC) de fluorescència amb els anticossos específics de les lligases, es van localitzar les diverses proteïnes sobreexpressades, utilitzant un microscopi òptic confocal per capturar un únic pla focal que assegurés la colocalització.

En les primeres proves es va comprovar, d'una banda, la inespecificitat de l'anticòs α -PIAS3, ja que els resultats obtinguts no van marcar correctament la seva localització cel·lular¹³⁷ (Figura 45a). En conseqüència, atès que PIAS3 era originàriament el control positiu en l'estudi de la interacció amb NR2E3 i que ja s'havia descrit la seva colocalització en diversos promotors de fotoreceptor, es va decidir descartar la seva immunolocalització en cèl·lules HEK293.

D'altra banda, la transfecció únicament amb la construcció hNR2E3 WT-YFP o hNR2E3 123-YFP va mostrar una variabilitat en la localització del factor de transcripció, independentment de la mutació de les lisines. Com es pot veure en la Figura 45b, el factor de transcripció es va localitzar principalment en el nucli, com cabria esperar. Aquesta localització, però, va observar-se amb diferents intensitats i distribucions subnuclears. A més, en alguns casos també es va localitzar a nivell

citoplasmàtic i, en moltes ocasions, formant uns grànuls densos distribuïts per tot el compartiment subcel·lular (indicat amb una punta de fletxa blanca a la Figura 45b). Considerant que els grànuls poguessin ser agregats proteics, es va decidir disminuir les concentracions de DNA transfectat. No obstant, els grànuls van persistir, pel que es va descartar que es degués a una sobreproducció de la proteïna dins la cèl·lula. Una altra hipòtesi plausible és que els grànuls només continguessin YFP, com a conseqüència del trencament de la proteïna de fusió amb NR2E3. Per això, es va utilitzar l'anticòs α -NR2E3 per a immunodetectar el factor de transcripció, que va demostrar més especificitat que no pas en la tècnica d'IHC. Els resultats mostren com els grànuls es marquen igual amb l'anticòs, si bé és cert que de vegades amb menor intensitat (Figura 45c). Tanmateix, aquest fet podria ser degut al difícil accés de l'anticòs a l'interior d'aquest grànuls densos.

Seguidament, per comprovar si els grànuls es devien a la fusió amb YFP o si, per contra, es donaven per acumulació d'NR2E3, es va decidir transfectar les construccions hNR2E3 WT o 123 per a la seva immunolocalització amb α -Xpress. Els resultats obtinguts van mostrear una localització nuclear d'NR2E3, tant en la seva forma WT com 123, en ocasions amb petites agrupacions subnuclears, com ja s'havia observat per a les seves formes fusionades a YFP. En canvi, no es van detectar les acumulacions subcel·lulars, pel que es va concloure que aquestes eren degudes a la fusió del factor de transcripció a la proteïna YFP, i a una possible agregació de la proteïna mitjançada per aquesta última.

RESULTATS

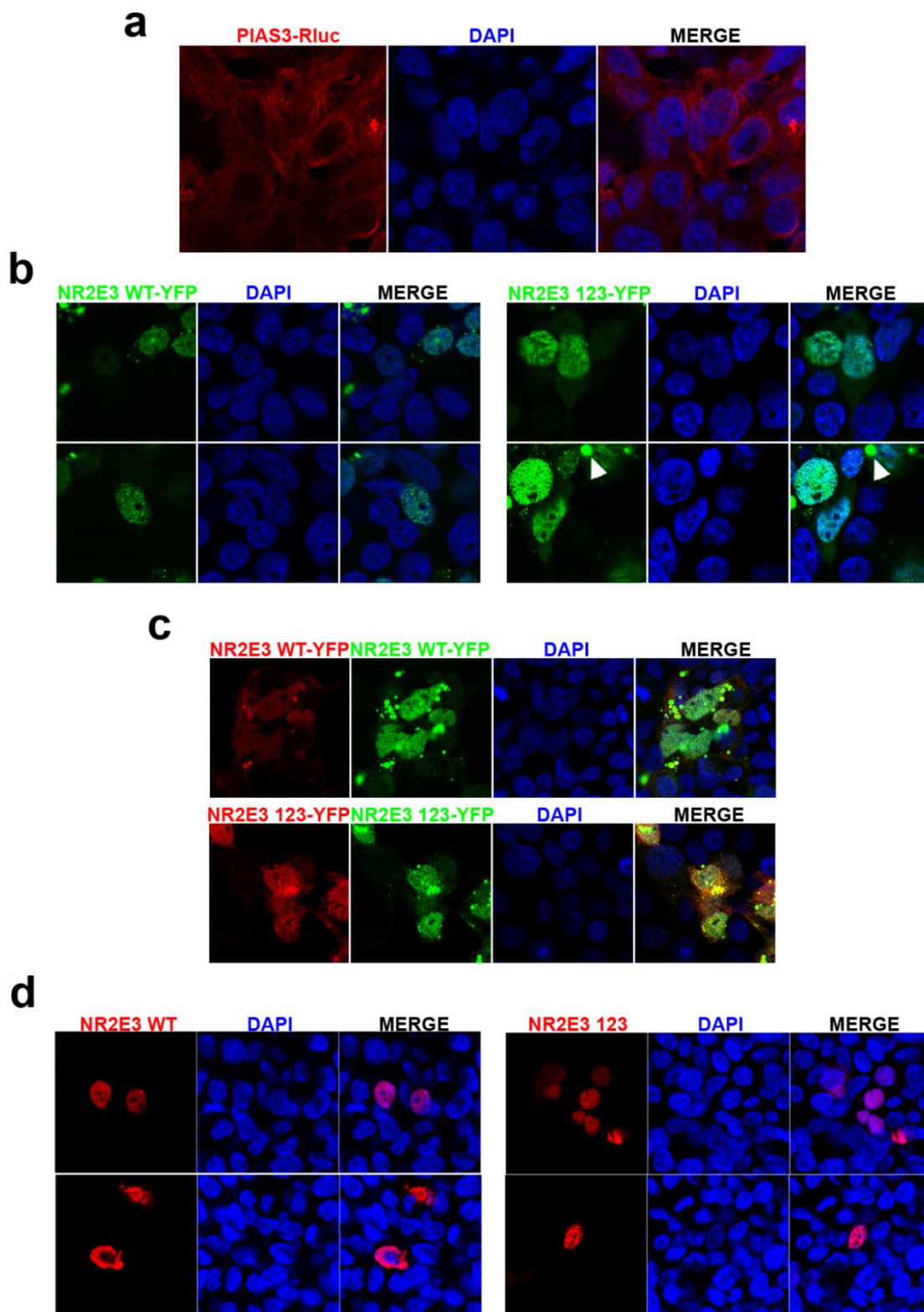


FIGURA 45. PROVES D'IMMUNOLocalITZACIÓ PER ICC EN CÈL·LULES HEK293. (a) Immunolocalització de PIAS3-Rluc amb α -PIAS3 (vermell). La detecció es dona en totes les cèl·lules de manera inespecífica. (b) Detecció de la fluorescència (verd) d'NR2E3 WT-YFP (esquerra) i NR2E3 123-YFP (dreta). Les acumulacions subcel·lulars es van indicar amb la punta de fletxa blanca. (c) Detecció de la immunofluorescència (vermell) amb α -NR2E3 i de la fluorescència (verd) d'NR2E3 WT-YFP (esquerra) i NR2E3 123-YFP (dreta). (c) Detecció de la immunofluorescència (vermell) amb α -Xpress d'NR2E3 WT (esquerra) i NR2E3 123 (dreta). (a, b, c i d) El marcatge dels nuclis en blau està realitzat amb el reactiu DAPI, i la imatge resultant de la unió dels diversos canals de colors correspon a la darrera imatge de cada panell (*Merge*).

Com a conseqüència dels resultats previs, es va decidir estudiar només la localització de les E3 lligases CBX4 i HDAC4 en combinació amb NR2E3 WT-YFP o NR2E3 123-YFP. Com es mostra a la Figura 46, CBX4 es va localitzar exclusivament i de manera uniforme en el nucli, colocalitzant amb les dues formes d'NR2E3 (Figura 46a). No obstant, la localització d'ambdues proteïnes al nucli no sempre va implicar una colocalització. Com es veu a la Figura 46a (indicat amb una punta de fletxa blanca), CBX4 (en vermell) està associada a la cromatina (marcada amb DAPI), mentre que NR2E3 (en verd) es troba envoltant l'expressió de CBX4. D'altra banda, es va decidir afegir dues condicions més amb la construcció de bioSUMO2-UBC9, tenint en compte que s'havien observat canvis en NR2E3 amb CBX4 en presència de l'enzim E2 conjugador UBC9. Tanmateix, no es van observar canvis en la localització de les dues proteïnes (Figura 46b), pel que l'addició de SUMO no va fer variar la colocalització d'ambdues proteïnes.

Per últim, HDAC4 es va expressar conjuntament amb bioSUMO2-UBC9. Els resultats de la ICC van ser més variables que en el cas anterior, ja que es va poder localitzar HDAC4 en el citoplasma i el nucli amb diferents intensitats (Figura 46c). Així, algunes cèl·lules van donar un patró principalment nuclear, mentre que d'altres van ser més uniformes en tota la cèl·lula o, fins i tot, majoritàriament citoplasmàtic. A més, aquesta localització nuclear es va observar en forma d'agregats de diverses mides o de manera uniforme en tot el nucli.

En resum, tot i observar diferents patrons de localització subcel·lular, sobretot en el cas d'HDAC4 i NR2E3 (WT i 123), es va obtenir colocalització nuclear del factor de transcripció NR2E3 amb les E3 lligases de SUMO HDAC4 i CBX4, la qual cosa dóna peu a explorar quina és la possible rellevància fisiològica d'aquesta interacció.

RESULTATS

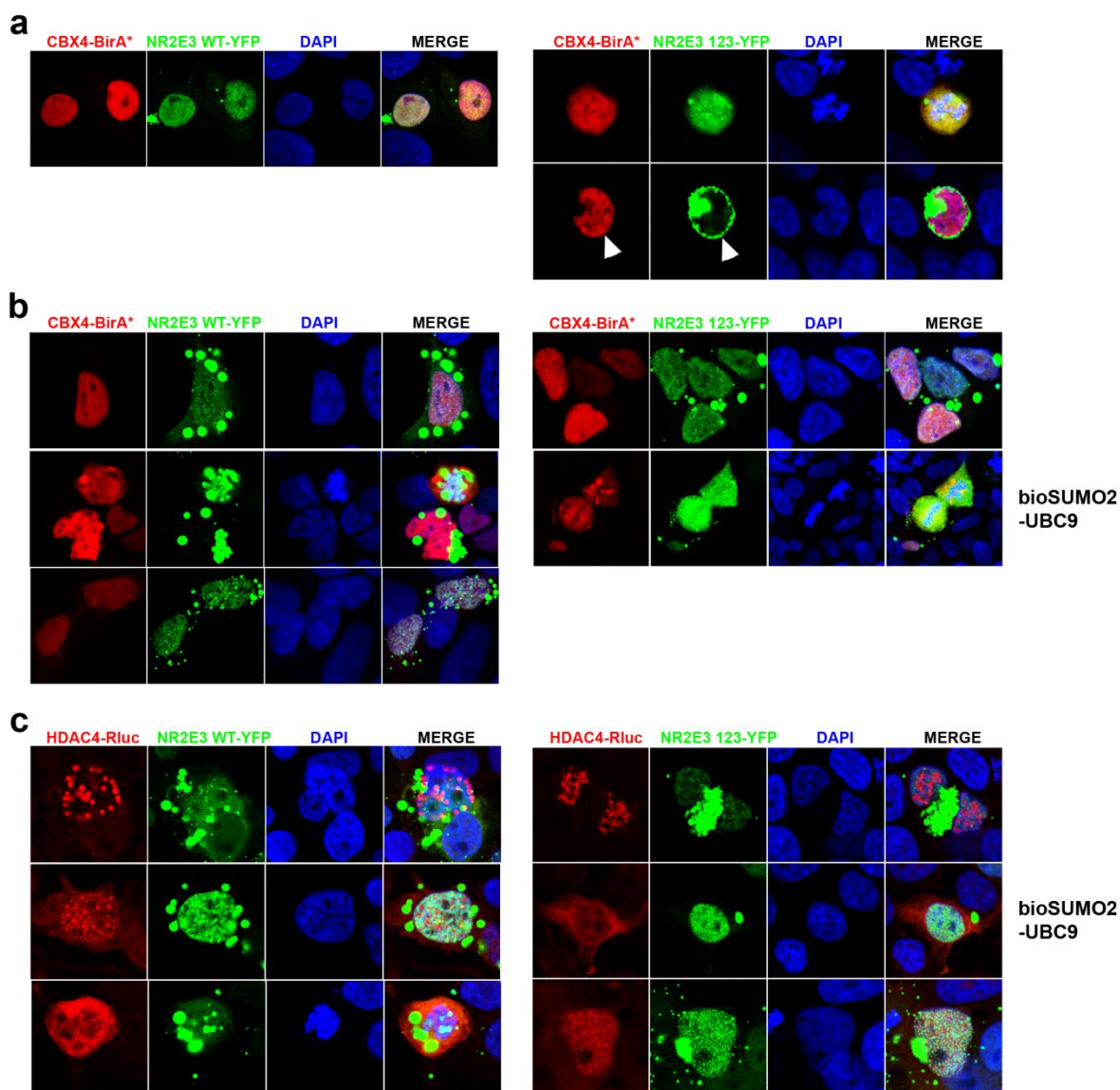


FIGURA 46. COLOCALITZACIÓ D'NR2E3 AMB CBX4 I HDAC4 EN CÈL·LULES HEK293. (a i b) Immunolocalització de CBX4-BirA* amb α -CBX4 (vermell) i detecció de la fluorescència (verd) d'NR2E3 WT-YFP (esquerra) o NR2E3 123-YFP (dreta). Les proteïnes colocalitzen en el nucli, tot i que no sempre (punta de fletxa blanca). (b) Cotransfecció de la construcció bioSUMO2-UBC9. (c) Immunolocalització de HDAC4-Rluc amb α -HDAC4 (vermell) i detecció de la fluorescència (verd) d'NR2E3 WT-YFP (esquerra) o NR2E3 123-YFP (dreta). Les proteïnes colocalitzen i presenten diferents localitzacions i intensitats. (a, b i c) El marcatge dels nuclis en blau està realitzat amb el reactiu DAPI, i la imatge resultant de la unió dels diversos canals de colors correspon a la darrera imatge de cada panell (Merge).

1.3.1. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DURANT LES DIFERENTS FASES DEL CICLE CEL·LULAR

Tot i colocalitzar el factor de transcripció NR2E3 en les seves formes WT i 123 amb les E3 lligases CBX4 i HDAC4, no es va aconseguir explicar la variabilitat en els nivells d'intensitat i localització subcel·lular observats per a aquestes proteïnes. Atès que tant el factor de transcripció com les lligases formen part de la maquinària d'interacció amb el DNA, es va plantejar que aquesta variabilitat fos dependent de la

fase del cicle cel·lular. Per aquest motiu, es van transfectar novament les construccions hNR2E3 WT o 123 amb CBX4-BirA* o mHDAC4-Rluc en cèl·lules HEK293 que, seguidament van ser sincronitzades en cicle cel·lular amb un doble bloqueig amb timidina. D'aquesta manera, es van realitzar les immunolocalitzacions en cèl·lules a les 0, 6, 8, i 12 hores del bloqueig amb timidina, corresponents a les fases S, G2/M, G2/M i G1, respectivament. Per tal de marcar la fase de cada cèl·lula, es van utilitzar dos marcadors diferents: l'anticòs contra la proteïna PCNA (marcador de síntesi de DNA) per a les fases S i G1, i l'anticòs contra la fosfoHistona H3 (PPH3, marcador de compactació cromatínica) per a les fases G2/M.

Els resultats de la Figura 47 mostren la localització cel·lular d'NR2E3 WT i 123 amb CBX4 o HDAC4, en la fase de mitosi (fase M) del cicle cel·lular, obtingudes en els temps T6 i T8 de la sincronització cel·lular. Tant el factor de transcripció (WT i 123) com les E3 lligases de SUMO (CBX4 i HDAC4) es van localitzar a la perifèria del DNA. Atès que durant la mitosi la membrana nuclear es desintegra, les localitzacions obtingudes van correspondre al volum total de la cèl·lula en divisió. Així, les proteïnes es van trobar excloses del DNA i colocalitzant en tot el compartiment cel·lular.

FASE M

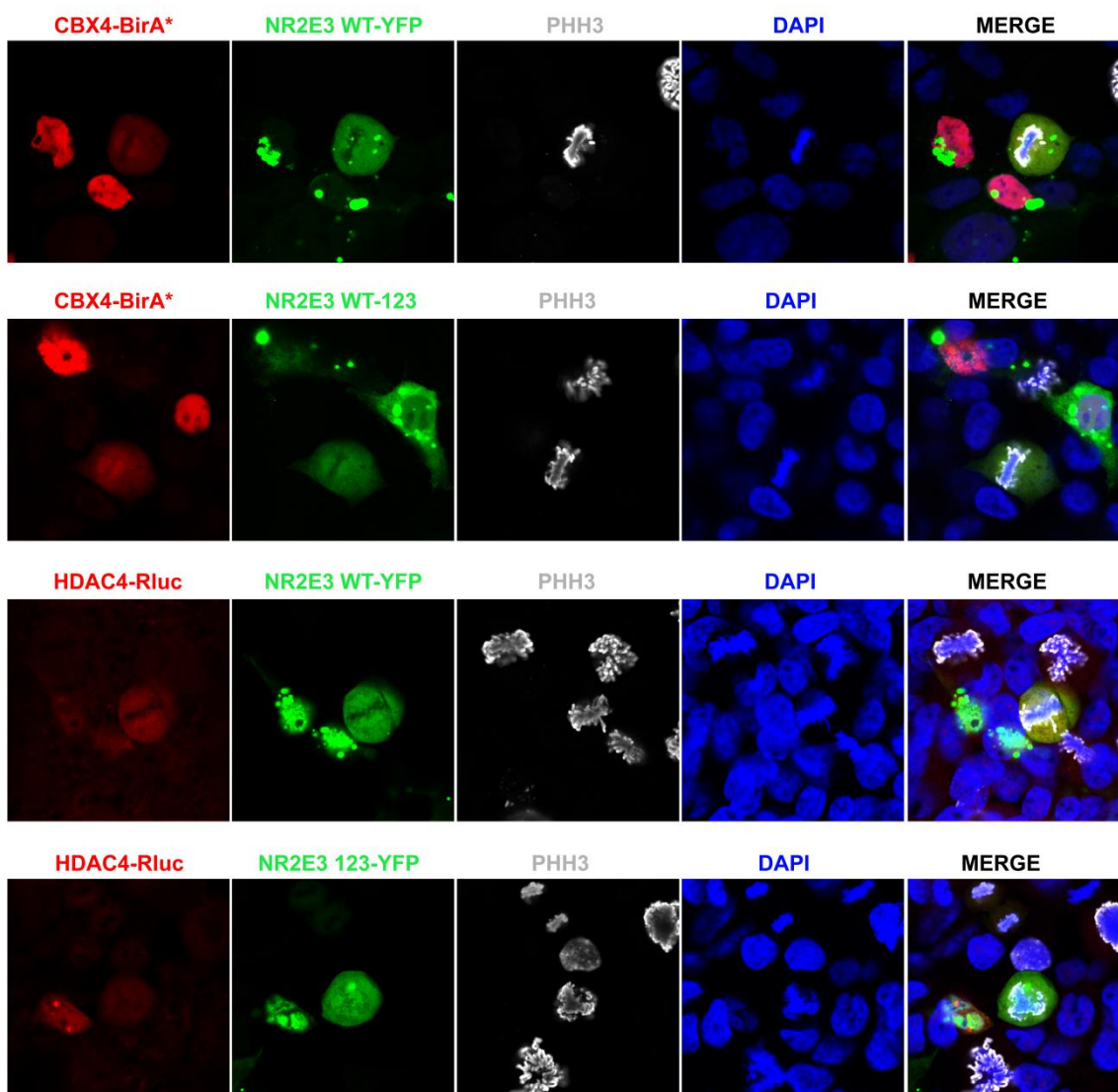


FIGURA 47. COLOCALITZACIÓ D'NR2E3 WT I 123 AMB CBX4 I HDAC4 EN CÈL·LULES HEK293 EN FASE M. Immunolocalització de CBX4-BirA* amb α -CBX4 o HDAC4-Rluc amb α -HDAC4 (vermell), i detecció de la fluorescència d'NR2E3 WT-YFP o NR2E3 123-YFP (verd), en cèl·lules HEK293 en fase de mitosi (M). Les proteïnes colocalitzen en el compartiment cel·lular, excloses del DNA compactat. La compactació de la cromatina es va immunodetectar amb α -PPH3 (gris), mentre que el marcatge dels nuclis està realitzat amb el reactiu DAPI (blau). La imatge resultant de la unió dels diversos canals de colors correspon a la darrera imatge de cada panell (Merge).



DISCUSSIÓ



1. RELLEVÀNCIA DE L'EXPRESSIONI DE SUMO I ELS ENZIMS DEL SEU

METABOLISME A RETINA

La majoria d'estudis sobre la rellevància funcional de SUMO s'han centrat en la seva funció al cicle cel·lular, la reparació del DNA i el càncer en estudis realitzats en cultius cel·lulars, però no existeixen dades de la relació dels diferents components de la via de SUMO en teixits altament especialitzats. En conseqüència, els treballs sobre la importància de SUMO a retina són molt escassos i molts dels descobriments publicats tracten la sumoïlació de substrats particulars, com ho són els factors de transcripció (TF), receptors de neurotransmissors o reguladors del rellotge circadiari. En conseqüència, mancava un anàlisi descriptiu i sistemàtic de l'expressió dels gens del metabolisme a la retina. Per aquest motiu, un dels objectius principals d'aquesta tesi va ser la caracterització de l'expressió dels gens de la via de SUMO en la retina adulta de ratolí, proporcionant així una imatge detallada dels seus nivells d'expressió i de la seva localització en les diferents capes retinals.

1.1. EXPRESSIONI DELS GENS DE LA VIA DE SUMO I ALGUNS FACTORS DE

TRANSCRIPCIÓ DE FOTORECEPTORS A LA RETINA DE RATOLÍ

La RT-qPCR va detectar l'expressió de tots els gens de la via de SUMO en la retina de ratolí. Com s'esperava, els gens que codifiquen les proteïnes SUMO, *Sumo1-3*, van mostrar uns alts nivells d'expressió deguts al seu paper central en la sumoïlació. D'altra banda, els gens que codifiquen per als monòmers de l'heterodímer E1 activador, *Sae1* i *Sae2*, van donar expressions equiparables; i *Ubc9*, que codifica l'únic enzim E2 conjugador, va ser un dels gens més expressats.

L'ampli rang dels nivells d'expressió de les E3 lligases i proteases de SUMO obtingut en la RT-qPCR, suggereixen diferents rols funcionals i rellevància fisiològica per a cadascun dels enzims, ja que presenten una especificitat per la proteïna substrat, normalment de manera no redundant. En el grup de les E3 lligases, *Egr2* (també conegut com al factor de transcripció *Krox20*) va mostrar el nivell més baix d'expressió, mentre que *Tls* el més alt, amb aproximadament tres ordres de magnitud de diferència en els nivells d'mRNA (Figura 14). En aquets context, és important remarcar que *Tls* (un dels gens causants de l'esclerosi lateral amiotròfica en humans) ja havia estat estudiat en retina, ja que la seva sobreexpressió implica una progressiva

DISCUSSIÓ

degeneració dels fotoreceptors a *Drosophila*¹⁴¹, i a més participa en la regulació del receptor del neurotransmissor NMDA en les cèl·lules ganglionars de rata¹⁷⁸. Altres gens rellevants en retina van mostrar nivells mitjans-baixos d'expressió en comparació amb la resta de lligases: *Hdac4*, promotor de la supervivència de les cèl·lules retinals¹⁴⁰; *Topors*, un dels gens causant de retinosi pigmentària en humans¹³⁹; i *Pias3*, que intervé en la regulació de la repressió transcripcional d'NR2E3¹³⁷.

Per últim, les proteases de SUMO van mantenir les seves expressions en nivells mitjos, amb diferències que oscil·laven dins d'un mateix ordre de magnitud. Cal remarcar dins d'aquest grup funcional, que els més expressats van ser els gens de *Desi1* i *Desi2*, que codifiquen per a les dues proteases més recentment incorporades⁸¹, fet que podria indicar una funció important a la retina.

Pel que fa als tres factors de transcripció de fotoreceptors, els seus nivells d'expressió van ser més elevats que els dels gens de la maquinària de SUMO, probablement pel seu paper central en la regulació de l'expressió gènica en el funcionament i el manteniment dels fotoreceptors. Els nivells de *Crx* i *Nr2e3* van ser molt semblants, mentre que *Nrl* va resultar expressar-se un ordre de magnitud més que aquests. Atès que *Nrl* és un dels gens centrals en el control de l'expressió de bastons, podria ser que aquesta expressió més elevada correspongués al major nombre de bastons en la retina de ratolí.

En afegit, cal tenir en compte que les mostres de cDNA utilitzades per la RT-qPCR provenen d'RNA de retines totals, mentre que l'expressió d'aquests tres factors de transcripció és exclusiva de fotoreceptors. Per això, la seva expressió encara pot ser major en comparació amb la maquinària de SUMO, que es pot expressar en els altres tipus cel·lulars. En aquest sentit, els nivells del gen del fotopigment majoritari de bastons, *Rho*, equiparables als del gen de referència *Gapdh*, són un exemple encara més extrem dels alts nivells de determinats transcrits en un tipus cel·lular.

L'expressió gènica de la retina de ratolí ja havia estat descrita, tant durant estadis del seu desenvolupament embrionari com postnatal, per mitjà de tècniques com el *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) i els *microarrays*¹⁴³, o comparant els transcriptomes de retines *wild-type* i *Nrl*^{-/-} de ratolí amb *Next Generation Sequencing* (NGS)¹⁴². No obstant, aquestes aproximacions se centraven en la identificació de gens sobreexpressats o silenciats comparant les diferents condicions genètiques i, excepte en el cas de *Pias1* i *Pias3* en el desenvolupament retinal, cap gen de la via de SUMO havia

mostrat un canvi substancial en la seva expressió. Aquesta estabilitat aparent podria explicar-se com un manteniment dels nivells de transcripció durant el desenvolupament retinal o, probablement, com que subtils diferències dels nivells d'expressió es podrien arribar a descartar en les anàlisis de *high-throughput* a causa de la gran astringència dels valors de tall, i en canvi, podrien ressaltar en estudis més dirigits i a escala més reduïda, com el que es presenta en aquesta part de la tesi. De fet, la regulació dels gens de SUMO podria dependre d'altres mecanismes a part de la transcripció, com ho són l'estabilitat proteica o la regulació de l'activitat enzimàtica per modificacions posttraduccionals (e.g. molts enzims de la via de SUMO mostren una regulació retroactiva i un *crossstalk* entre SUMO i ubiquitina¹¹⁰). No cal oblidar que molts gens reguladors d'altres gens o proteïnes presenten nivells baixos i relativament estables d'expressió si s'analitza el conjunt de la retina en l'adult, ja sigui perquè no es té en consideració un moment o un tipus cel·lular concrets on és important la seva transcripció, o perquè poden exercir la seva funció amb poca quantitat de producte gènic.

1.2. VARIACIONS DELS NIVELLS D'EXPRESSIÓ EN LES DIFERENTS CONDICIONS DE LLUM/FOSCOR

En relació als nivells d'expressió en les quatre condicions de llum/foscor, la maquinària de SUMO es va mantenir en general inalterada. Només en el cas de *Sumo2*, *Sae1*, *Cbx4*, *Desi1* i *Senp2* es van detectar diferències estadísticament significatives en l'expressió d'alguna de les quatre condicions. Tot i estar descrit que SAE1 actua en forma d'heterodímer amb SAE2 com a enzim E1 activador de SUMO, la inducció de l'expressió de *Sae1* observada després de l'exposició a la llum, en comparació amb l'estabilitat de *Sae2*, podria denotar una regulació diferencial per aquests dos gens, segons les condicions exteriors. D'altra banda, del conjunt de lligases E3 de SUMO, només el gen *Cbx4* va mostrar variacions significatives, amb un nivell màxim de transcripció durant la fase de foscor (condició 4), mentre que del grup de les proteases, format per menys gens, *Desi1* i *Senp2* van presentar canvis d'expressió comparant les condicions de llum i foscor. En conjunt, es van poder detectar quatre patrons diferents.

Una explicació possible pels resultats observats seria que la sumoïlació podria estar regulant –o sent regulada– en resposta a l'exposició a la llum. De fet, cada cop es troben més casos de gens que mostren un comportament circadiari, amb un ritme marcat per cicles d'expressió molt dinàmics, en els que les PTMs com la sumoïlació hi

DISCUSSIÓ

poden estar jugant un paper rellevant. No obstant, cal remarcar que l'activació circadiària respon a un patró de sincronització i arriba a ser independent de l'estímul principal, en aquest cas la llum, i que també pot haver-hi gens no regulats de forma circadiària però que responguin directament a la presència o absència de l'estímul lumínic.

Atès que els factors de transcripció analitzats són reguladors transcripcionals de gens *downstream*, una petita variació en els nivells d'mRNA o proteïna, o fins i tot la seva interacció en complexos activadors o repressors pot tenir efectes significatius en la fisiologia de la retina. En aquest context, és important remarcar que l'increment en els nivells d'mRNA després de l'exposició a la llum van ser confirmats tant per a *Crx* com per a *Nr2e3*, en quantificar els nivells relatius de les seves proteïnes en explants retinals. De fet, les diferències a nivell de transcrit es van magnificar en ambdós casos a nivell proteic (en el cas d'NR2E3, es va detectar un increment d'1'4 vegades en mRNA i d'1'8 vegades en la proteïna, en comparar les condicions 2 (llum) i 1 (foscor)). No obstant, calen més estudis per revelar la importància fisiològica d'aquest increment d'expressió quan les retines s'exposen a la llum.

1.3. LOCALITZACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS DE LA VIA DE SUMO A LA RETINA

Pel que fa a la localització de l'mRNA, tot i que la hibridació *in situ* no és un assaig directament quantitatiu, es van poder detectar diferents intensitats de senyal (alta, baixa o no detectable) per a cada gen en les capes retinals (Figura 16). La majoria de gens van mostrar un senyal ubic, incloent tant les capes plexiformes com les nuclear, la qual cosa indica una funció basal en la majoria de cèl·lules. És important remarcar que tots els gens analitzats es van expressar als fotoreceptors, amb una localització majoritària dels seus mRNAs al segment intern, on es troba la maquinària de traducció d'aquest tipus cel·lular. Més remarcable encara va ser la detecció d'alts nivells d'expressió d'mRNA en les capes plexiformes, indicant una localització en els processos sinàptics (la baixa resolució de la tècnica, respecte a l'estructura retinal fina, no va permetre una localització més acurada). Tot i que aquests resultats cal prendre'ls amb precaució a l'espera de nous treballs que proporcionin una localització més precisa i coneixement de la seva rellevància funcional, existeixen evidències de la localització d'mRNAs específics al llarg dels axons i en les sinapsis, formant complexos ribonucleoproteics (RNPs, *P-bodies*, grànuls d'estrès, entre d'altres)¹⁷⁹. A més, la localització dels mRNAs no té perquè coincidir en el mateix lloc de les capes retinals

que les proteïnes que codifiquen. Les neurones són cèl·lules d'estructura i morfologia complexa, altament especialitzades, que s'estenen per vèries capes. Així, l'mRNA pot acumular-se en regions actives de traducció, mentre que les proteïnes exerceixen la seva funció en localitzacions subcel·lulars més allunyades del soma.

En comparació amb resultats previs, la E3 lligasa *Pias3* és un dels pocs gens de la via de SUMO que ja s'havia estudiat a la retina. L'expressió del seu mRNA havia estat detectada durant el desenvolupament dels fotoreceptors, expressió que es reduïa un cop formada la retina adulta¹⁴³. No obstant, altres estudis havien detectat la proteïna PIAS3 en la GCL i en el segment extern de fotoreceptors en la retina madura¹⁴⁴, tal i com s'esperava pel seu paper regulador d'NR2E3, no només en desenvolupament sinó en el manteniment de la fisiologia dels fotoreceptors adults. En aquest treball, també s'ha detectat l'expressió de *Pias3* en la retina adulta de ratolí (P60) en totes les capes retinals, tot i que prominentment en la GLC. Posteriorment, la immunolocalització amb l'anticòs contra PIAS3 en talls de retina adulta va confirmar el patró de localització de l'mRNA, en concordança amb els resultats prèviament ja publicats (Figura 18). De la mateixa manera, altres proteïnes van ser immunolocalitzades amb anticossos comercials disponibles, reforçant els resultats obtinguts en la localització de l'expressió, com ara per als gens *Hdac4*, *Senp1* i *Topors*.

En resum, l'àmplia expressió dels gens de la via de SUMO i la diversitat dels patrons d'expressió detectats en les diferents capes retinals i condicions de llum/fosc en ratolí –a més dels estudis previs en gens i substrats concrets– clarament donen suport a la rellevància fisiològica de la sumoïlació com a modificació posttraduccional en aquest teixit. Atès que un dels conceptes emergents es el requeriment de conjugacions i deconjugacions simultànies de SUMO en múltiples proteïnes diana involucrades en un mateix procés biològic, dins de complexos posttraduccional dinàmics^{180,37}, aquest atlas d'expressió d'mRNA pretén ser un marc de referència que ajudi en la investigació de la retina, servint de punt de partida en l'estudi dels processos regulats per SUMO en la retina.

2. SUMOÏLACIÓ DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ RETINAL NR2E3

El receptor nuclear NR2E3 és un factor de transcripció de fotoreceptors rellevant pel seu desenvolupament i manteniment que, conjuntament amb altres factors com ara CRX i NRL, actua alhora com a activador dels gens específics de bastons i com a

DISCUSSIÓ

repressor dels de cons. Estudis previs, realitzats amb el factor de transcripció de ratolí, van demostrar que aquesta repressió depenia de la seva sumoïlació en tres lisines molt conservades, per mitjà de l'acció de la E3 lligasa PIAS3. Tot i que aquesta lligasa sembla central en la conjugació de SUMO a NR2E3, l'estudi va descartar que fos la única del conjunt d'E3 lligases de SUMO en modificar el factor de transcripció.

Per aquest motiu, es van abordar diferents aproximacions experimentals, tot comparant les formes d'NR2E3 WT i no sumoïlable (123), amb la finalitat d'aprofundir en l'estudi de la seva sumoïlació i identificar noves E3 lligases de SUMO modificadores del factor de transcripció.

2.1. ESTABILITAT PROTEICA D'NR2E3 WT I NR2E3 123

Les lisines són els residus diana de la majoria de modificacions posttraduccionals (PTMs), pel que la seva mutació pot implicar canvis en la proteïna. Per aquest motiu es van estudiar les diferències en l'estabilitat i la degradació d'NR2E3 WT i la seva forma no sumoïlable, NR2E3 123.

D'una banda, els estudis amb l'inhibidor de proteasoma MG132 van demostrar que NR2E3 es degrada via proteasoma, però no van revelar diferències en la degradació de les diferents formes mutants del factor de transcripció respecte NR2E3 WT. Així, atès que la poliubiquitinació és el mecanisme de senyalització cel·lular de degradació via proteasoma, aquesta es deu donar en lisines diferents a les mutades (K185, K330 i K337). De fet, la ubiquitinació és un procés menys estricte que la sumoïlació pel que fa al residu de lisina diana de la modificació¹¹⁰, podent donar-se ubiquitinació en altres lisines properes si la diana preferencial per a ubiquitinar es troba mutada. Per aquest motiu, no es pot descartar que no sigui aquest el cas.

A més, la immunodetecció amb un anticòs contra la ubiquitina (Ub) va revelar una banda principal que per mida correspondria a una possible monoubiquitinació d'NR2E3. Atès que aquesta es dona en totes les formes mutants estudiades, cap de les tres lisines sumoïlables són el residu de la modificació. Així doncs, aprofundir en l'estudi de la monoubiquitinació d'NR2E3 podria ser rellevant per a entendre millor el funcionament i la regulació d'aquest factor de transcripció de fotoreceptors.

D'altra banda, es va analitzar la vida mitjana d'NR2E3 WT i NR2E3 123 amb la inhibició de la síntesi proteica mitjançant l'addició de cicloheximida (CHX). Les quantificacions de tres replicats independents a diferents temps van mostrar una

disminució de la quantitat de proteïna molt semblant per a les dues formes d'NR2E3, que presenta una vida mitjana propera a les 12 h en cultius cel·lulars, per la qual cosa es va concloure que la mutació de les tres lisines tampoc té implicacions en l'estabilitat de la proteïna.

Així doncs, aquests resultats van descartar que les possibles diferències funcionals entre NR2E3 WT i 123 en interaccions proteïques o en la seva capacitat de conjugació amb SUMO fossin degudes a canvis en l'estabilitat o expressió del factor de transcripció.

2.2. INTERACCIÓ DIMÈRICA D'NR2E3 WT I NR2E3 123

Igual que la majoria de receptors nuclears de tipus 2, NR2E3 actua en forma d'homodímer en la regulació de la transcripció. Per aquest motiu, es va considerar l'estudi de la seva dimerització mitjançant la tècnica de BRET, combinant les proteïnes WT i 123, per comprovar si la mutació de les lisines sumoïlables alterava la seva capacitat d'interacció homodimèrica. De fet, la dimerització d'NR2E3 ja havia estat objecte d'estudi d'altres grups, que també s'havien basat en la tècnica de BRET per a quantificar la interacció, treballant amb mutacions causants de diverses distròfies de retina, localitzades principalment en els dominis d'unió a DNA (DBD) i a lligand (LBD)^{132,181}. Per algunes d'elles es van mostrar diferències en els nivells d'interacció, contribuint així a l'aprofundiment i millor coneixement dels mecanismes patològics d'algunes d'aquestes distròfies.

No obstant, els resultats de les interaccions d'NR2E3 WT i 123 van donar alts nivells d'interacció per ambdues formes del factor de transcripció, sense diferències estadísticament significatives entre elles, i es va concloure que la privació de la sumoïlació d'NR2E3 no alterava la seva capacitat per a homodimeritzar (Figura 48). Així, igual que l'heterogeneïtat clínica de les diverses mutacions d'NR2E3 no s'explica només amb l'afectació de la seva dimerització, altres mecanismes potencials, com els nivells d'expressió de la proteïna, la seva unió al DNA o la seva interacció amb altres proteïnes i complexos transcripcionals, podrien veure's compromesos en el cas de la seva sumoïlació.

2.3. INTERACCIÓ D'NR2E3 WT I NR2E3 123 AMB PIAS3

La interacció de la E3 lligasa de SUMO PIAS3 amb NR2E3 ja havia estat demostrada prèviament, pel que es va prendre com a control positiu de la tècnica de BRET. Per

DISCUSSIÓ

aquest motiu, primerament es va estudiar la seva interacció amb la proteïna de ratolí d'NR2E3. El resultat del BRET va mostrar una interacció clara (comparant amb el control negatiu), però amb uns nivells més baixos en relació als obtinguts en l'estudi de la dimerització, evidenciant l'elevada afinitat dels monòmers i la facilitat per a la unió dimèrica del factor de transcripció, la qual cosa pot ser rellevant per a la seva activitat transcripcional.

A continuació, es va realitzar l'estudi de la interacció d'NR2E3 WT i 123 humà amb PIAS3, el qual va revelar diferències entre les dues formes en el valor màxim de BRET, o saturació de la interacció. Així, PIAS3 té una major capacitat d'interacció amb NR2E3 WT que amb el seu mutant no sumoïlable (123) (Figura 48). En canvi, el pendent inicial de la corba que descriuen totes dues interaccions és relativament similar, pel que no semblaria tractar-se d'una menor afinitat. És a dir que, per algun motiu, tot i que PIAS3 és capaç d'unir-se d'igual forma a NR2E3 WT i 123, aquesta unió triga més en saturar-se en la interacció amb la forma WT que en la forma no sumoïlable.

Els estudis previs havien demostrat com PIAS3 actua com a proteïna d'unió d'NR2E3 i CRX en els promotors dels gens específics de fotoreceptors, facilitant l'assemblatge de complexos transcripcionals a aquests promotors. Alhora, PIAS3 també actua com a E3 lligasa de SUMO, modificant així NR2E3 i convertint-la en un fort repressor dels gens específics de cons¹³⁷. Cal recordar, que el mecanisme d'acció de les E3 lligases es basa en el seu paper de mediadores -o *scaffold*- en la unió entre l'enzim E2 conjugador UBC9 carregat amb SUMO (UBC9~SUMO) i la proteïna diana. Aquest reconeixement es dona per tres mecanismes no excloents i sovint simultanis: i) interacció de SUMO amb la proteïna diana a través d'un SIM, ii) interacció d'UBC9 amb la proteïna diana a través d'un motiu consens, o iii) interacció de la E3 lligasa amb la proteïna diana a través d'una regió específica. Tenint en compte que les lisines mutades es troben dins de motius consens, podria ser que una part de la interacció de PIAS3 amb NR2E3 depengués del reconeixement del motiu consens per part d'UBC9. Així doncs, la mutació de les tres lisines evitaria aquesta interacció, i reduiria la interacció de PIAS3 amb NR2E3 123 respecte del WT. No obstant, aquesta interacció només representaria una part del total de la interacció entre la lligasa i el factor de transcripció, que també s'unirien a través del reconeixement d'una regió específica d'NR2E3 per part de PIAS3. Aquesta interacció mostraria una afinitat major que la dependent d'UBC9, fet que explicaria perquè les corbes d'interacció tindrien pendents equiparables.

2.4. INTERACCIÓ D'NR2E3 WT I NR2E3 123 AMB HDAC4

Estudis previs havien demostrat la importància de la E3 lligasa de SUMO HDAC4 en la regulació de la supervivència neuronal a la retina^{140,182}, gràcies a un petit domini dins de la regió N-terminal capaç de preservar els fotoreceptors i restablir la funció visual en la retinosi pigmentària (RP)¹⁵⁰. Considerant que HDAC4 podria ser un bon candidat com a SUMO E3 lligasa de NR2E3 a retina, paral·lelament a la construcció mPIAS3-Rluc, es va utilitzar mHDAC4-Rluc per a l'estudi de la possible interacció de la deacetilasa amb NR2E3 WT i 123, mitjançant la tècnica de BRET. Els resultats obtinguts van permetre detectar una nova interacció entre la deacetilasa i el factor de transcripció, amb uns valors de BRET semblants als de la interacció de PIAS3 però que, a diferència d'aquesta, no variava en mutar les tres lisines sumoïlables d'NR2E3 (Figura 48).

Per tal de confirmar les interaccions proteiques entre NR2E3 i HDAC4 detectades amb el BRET, es van realitzar coimmunoprecipitacions (CoIPs) en cèl·lules HEK293 transfectades amb les construccions hNR2E3 WT i mHDAC4-Rluc, utilitzant, tant els anticossos contra les proteïnes, com els anticossos contra els respectius epítops. Les immunodeteccions creuades de les dues proteïnes van donar suport a la interacció observada amb el BRET. A més, es va realitzar el mateix estudi sobre extractes de retines madures de ratolí (P60), per tal de detectar la interacció de les dues proteïnes endògenes en el context fisiològic. D'aquesta manera, es va poder detectar NR2E3 a partir de la IP d'HDAC4, confirmant la interacció entre les dues proteïnes en retina.

Alguns estudis previs ja havien suggerit la interacció d'NR2E3 amb deacetilases desconegudes en promotors de gens específics de cons, que serien reclutades pel factor de transcripció juntament amb altres corepressors. Aquest reclutament es donaria per efecte de la sumoïlació d'NR2E3, que actuaria en forma de dímer silenciant l'expressió d'aquests gens¹⁸³. D'una banda, HDAC4 podria estar afavorint aquesta sumoïlació d'NR2E3, actuant com a lligasa de SUMO. De l'altra, podria estar actuant en contextos de repressió de la transcripció, condensant la cromatina a través de la deacetilació de les histones i afavorint la capacitat repressora d'NR2E3. No obstant, l'acció de les deacetilases no sempre està lligada a la repressió transcripcional. De fet, la seva activitat es necessària per a l'expressió de gens de fotoreceptors crítics, com ho són *Nrl* i *Crx*¹⁸⁴.

DISCUSSIÓ

Per aprofundir més en l'estudi d'aquesta interacció, es va disposar de dues construccions amb els fragments N- i C-terminals de la deacetilasa, així com de la construcció amb la forma no sumoïlable d'HDAC4 (K559R). La CoIP a partir del factor de transcripció va revelar, d'una banda, que la deacetilasa interaccionava amb NR2E3 en la seva regió C-terminal, corresponent al seu domini d'activitat deacetilasa. Per contra, la fracció amb l'activitat lligasa de SUMO no va poder ser detectada per CoIP, pel que es va concloure que no hi havia interacció de la regió N-terminal amb NR2E3. A més, la interacció d'HDAC4 K559R (mutant catalític de la deacetilasa) amb NR2E3 123 (mutant no sumoïlable) no va variar en comparació amb la seva forma WT, ja que es van poder coimmunoprecipitar totes dues formes.

Els primers estudis que van relacionar HDAC4 amb SUMO, van descriure com la regió N-terminal d'HDAC4 interaccionava i sumoïlava el factor de transcripció MEF2 en el seu DBD, transformant-lo així en un repressor transcripcional. A més, es va descriure com la pròpia sumoïlació d'HDAC4 en K559 reprimia aquesta activitat E3 lligasa de SUMO⁵⁷.

Així doncs, tot i que no són totalment concloents, els resultats obtinguts allunyen la hipòtesi d'HDAC4 com a possible lligasa de SUMO per a NR2E3, pel que la seva interacció podria ser independent de la seva capacitat sumoïladora. Una interacció que, de totes maneres, continuaria essent rellevant per a la regulació d'NR2E3 i per a l'expressió gènica en fotoreceptors. De fet, una interacció molt semblant va ser descrita entre el domini DBD del factor de transcripció NR2C1/TR2, molt semblant a NR2E3, i les deacetilases HDAC3 i HDAC4¹⁸⁵. Aquesta interacció provocava la deacetilació del factor de transcripció, promovent així la seva activitat repressora, que va ser demostrada per a altres DBDs de diversos receptors nuclears¹⁸⁶. Algun fenomen similar podria explicar la funció fisiològica de la interacció entre NR2E3 i HDAC4.

2.5. INTERACCIÓ D'NR2E3 WT I 123 AMB CBX4

De forma no planejada *a priori*, la interacció de CBX4 amb NR2E3 no va ser demostrada per BRET, sinó per mitjà de l'assaig BioID, utilitzant la construcció CBX4-BirA*, on es va poder obtenir NR2E3 WT a partir de la precipitació de les proteïnes biotinitilades. Per contra, la forma NR2E3 123 no va poder ser detectada, però atès el baix rendiment de la tècnica en aquest assaig, amb molt poca eficiència de recuperació, no es pot descartar totalment la interacció de CBX4 amb NR2E3 123, pel que caldria optimitzar la tècnica i repetir-la, així com realitzar altres assajos

complementaris (com podria ser el BRET). En canvi, donada l'astringència de la tècnica (amb 16 rentats amb 6 *Wash Buffers* diferents, contenint alguns 8 M urea), sí que es pot afirmar que NR2E3 WT i CBX4 interaccionen (Figura 48).

Considerant que CBX4 és una E3 lligasa de SUMO i, alhora, una proteïna Polycomb (Pc) i repressora de la transcripció, calen nous estudis funcionals que revelin el paper d'aquesta interacció en la regulació d'NR2E3 i en la fisiologia de la retina i els fotoreceptors.

La Figura 48 sintetitza en diagrames els resultats obtinguts respecte les interaccions d'NR2E3 WT i NR2E3 123 d'aquest treball.

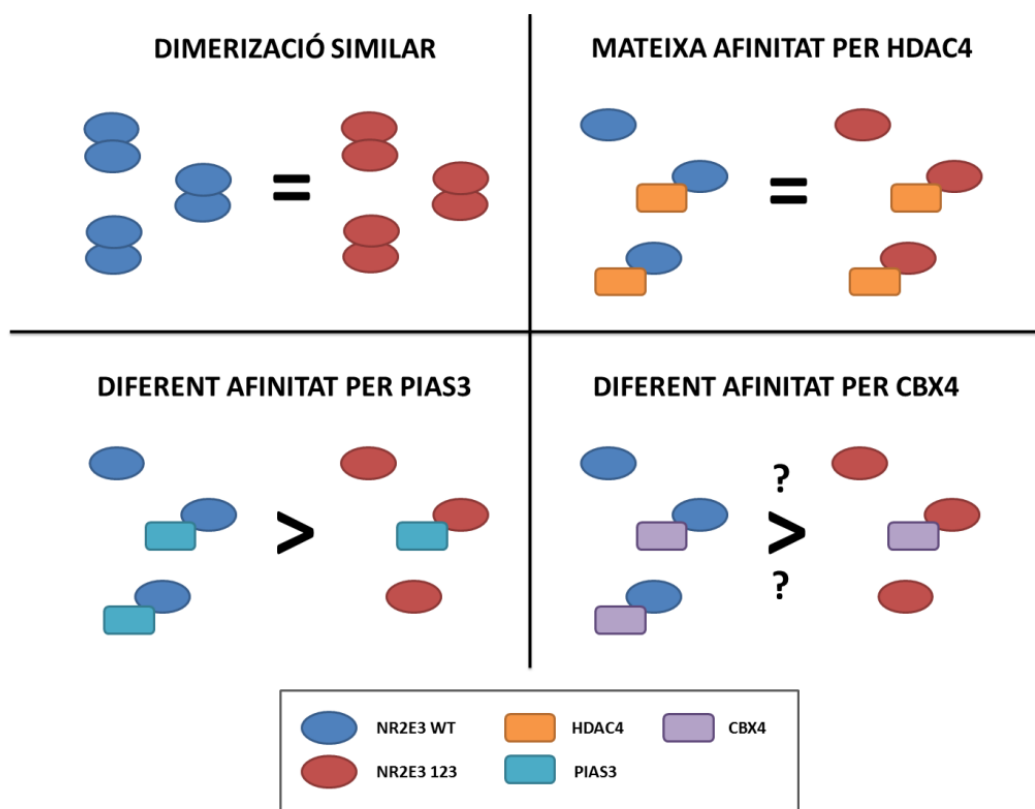


FIGURA 48. INTERACCIONS D'NR2E3. Esquema comparatiu del factor de transcripció NR2E3 en les seves formes WT o mutada no sumoïlable (123), representant la seva interacció dimèrica, o amb les E3 lligases de SUMO HDAC4, PIAS3 i CBX4. La dimerització del factor de transcripció va donar similar per a les dues formes, essent una interacció molt freqüent donats els alts nivells de senyal de BRET. La nova interacció amb HDAC4, menor en comparació, tampoc va donar diferències per a les formes WT i 123. En canvi, la interacció ja coneguda amb PIAS3 va resultar ser menor amb NR2E3 123, segons l'estudi de BRET. Aquest efecte podria estar passant també en la interacció d'NR2E3 amb CBX4, tot i que només es tenen resultats preliminars (indicat amb ?). El requadre inferior recull la llegenda de la figura.

2.6. ESTUDI DEL CONJUNT D'INTERACCIONS D'NR2E3 WT I 123

Tot i que la tècnica del BioID és molt semblant a la immunoprecipitació (IP), ofereix diverses avantatges molt importants. D'una banda, l'especificitat, que en una IP depèn sempre de la capacitat de l'anticòs emprat alhora de detectar exclusivament la proteïna d'estudi. Això fa que es depengui alhora de la disponibilitat d'un anticòs comercial, fet que no sempre és possible. En canvi, el BioID utilitza l'alta afinitat entre la biotina i la streptavidina (o, alternativament, la neutravidina) per aconseguir la màxima especificitat, major que la d'un anticòs per un epítot proteic. L'altre punt a favor és l'astringència que ofereix la tècnica, degut a l'elevada estabilitat de la conjugació covalent d'una biotina a un substrat proteic. En una IP es treballa normalment en condicions no desnaturalitzants i poc astringents, per tal d'aconseguir precipitar les proteïnes que es troben interaccionant amb la proteïna d'interès, sense que aquestes se separin. Alhora, això implica que les proteïnes han d'estar unides en el moment de l'obtenció de la mostra, perdent així altres proteïnes que tinguin una interacció dinàmica i puntual. Per contra, el BioID utilitza l'activitat biotiniladora de l'enzim BirA* fusionat a la proteïna d'interès, per marcar amb biotina qualsevol proteïna que estigui interaccionant amb un radi molt proper. Encara que aquesta s'uneixi de forma esporàdica i dinàmica, ja quedarà modificada per biotina. A més, les condicions de precipitació de les proteïnes biotinilades poden ser molt astringents, ja que la biotina es conjuga de forma covalent.

Per aquest motiu es va decidir utilitzar el BioID per a realitzar un estudi més ampli del conjunt d'interactors d'NR2E3, i de les possibles conseqüències de la mutació de les lisines sumoïlables del factor de transcripció. Per tal de treballar en un context fisiològic real, es va decidir electroporar explants de retines de raolins P0, després de posar a punt la tècnica en cèl·lules HEK293 transfectades. Desafortunadament, no es va aconseguir obtenir uns resultats prou convincents com per enviar les mostres a analitzar per espectrometria de masses. Un dels problemes principals va ser l'entrada de biotina a les cèl·lules dels explants de retina que, segurament a causa de la morfologia, mida i composició de les membranes dels diversos tipus de neurones, són poc transfectables. Un altre problema va ser la baixa eficiència en la recuperació de les proteïnes biotinilades, ja que se'n perdien moltes, que no s'unien a la resina amb neutravidina. Per tot plegat, no es va poder obtenir resultats a partir d'aquesta tècnica. No obstant, la seva posada a punt permetrà analitzar més àmpliament les diferències en les interaccions proteiques d'NR2E3 WT i NR2E3 123, permetent la descoberta

d'interactors comuns i diferencials, i aprofundint en la rellevància fisiològica de la sumoïlació d'aquest factor de transcripció a la retina.

2.7. SUMOÏLACIÓ D'NR2E3

Amb l'anàlisi de l'expressió proteica de les diferents formes mutants d'NR2E3 per a les seves lisines sumoïlables (combinacions 1, 12, 13 i 123), obtingudes per mutagènesi directa a partir de la seva forma WT, es va observar una banda diferencial ~20 kDa major a la d'NR2E3 (indicada amb <). Aquesta només es detectava en els extractes amb la construcció WT, pel que depenia necessàriament de la presència de la primera lisina (K185). En afegir SUMO2-HA en cotransfecció amb la construcció d'NR2E3 WT, es va observar una banda lleugerament major a l'anterior, que coincidia amb la diferència de pes molecular entre la proteïna SUMO2 endògena i la fusionada a l'epítotop HA (indicada amb *). La IP d'NR2E3 i posterior detecció amb α -HA, va demostrar que la banda detectada corresponia a la conjugació de SUMO2-HA en NR2E3. A més, una segona banda amb un doble increment en pes (~40 kDa) va ser detectada únicament en NR2E3 WT (referida com a 1). En afegir SUMO2-HA es van obtenir dues bandes mirall superiors (bandes 2 i 3), amb una diferència de mida igual a la observada entre la banda de sumoïlació endògena i la de SUMO2-HA (< i *, respectivament). No obstant, aquestes bandes no van poder ser observades en la IP d'NR2E3. Per contra, cap banda va ser detectada amb l'expressió de SUMO1-HA, pel que es va descartar que estigués conjugada al factor de transcripció.

En conclusió, el factor de transcripció humà de fotoreceptors NR2E3 se sumoïla en la seva lisina K185, per mitjà de la conjugació d'una proteïna SUMO2 (Figura 49). Atès que les dues bandes de monosumoïlació (l'endògena <, i la de SUMO2-HA *) tenien la mateixa intensitat, la quantitat de SUMO2 (sobrexpressat en el cas de SUMO2-HA) no deu ser l'únic factor limitant en la sumoïlació del factor de transcripció. Així, segurament alguns components de la maquinària de SUMO també són essencials per a determinar la quantitat de sumoïlació del total de proteïna disponible. A més, aquesta monosumoïlació del factor de transcripció podria no ser la única modificació amb SUMO2, ja que les bandes de major pes observades podrien correspondre a una disumoïlació d'NR2E3 amb SUMO2, que tant es podria donar sobre la mateixa lisina K185, com en combinació d'aquesta amb K330 o K337 (Figura 49). No obstant, aquests darrers resultats no són concloents, pel que caldria realitzar noves aproximacions experimentals centrades en la identificació de formes de polisumoïlació d'NR2E3.

DISCUSSIÓ

Aquests resultats contradiuen els que s'havien descrit prèviament, que demostraven que la conjugació d'NR2E3 es donava en forma de di- i tri-sumoïlació amb SUMO1¹³⁷. Els experiments realitzats van ser els mateixos que els del present treball, amb la única diferència que l'article en qüestió va utilitzar la forma d'NR2E3 de ratolí tant WT com 123. Tot i que aquest fet no justifica les discrepàncies entre estudis, sí que obre una porta al debat.

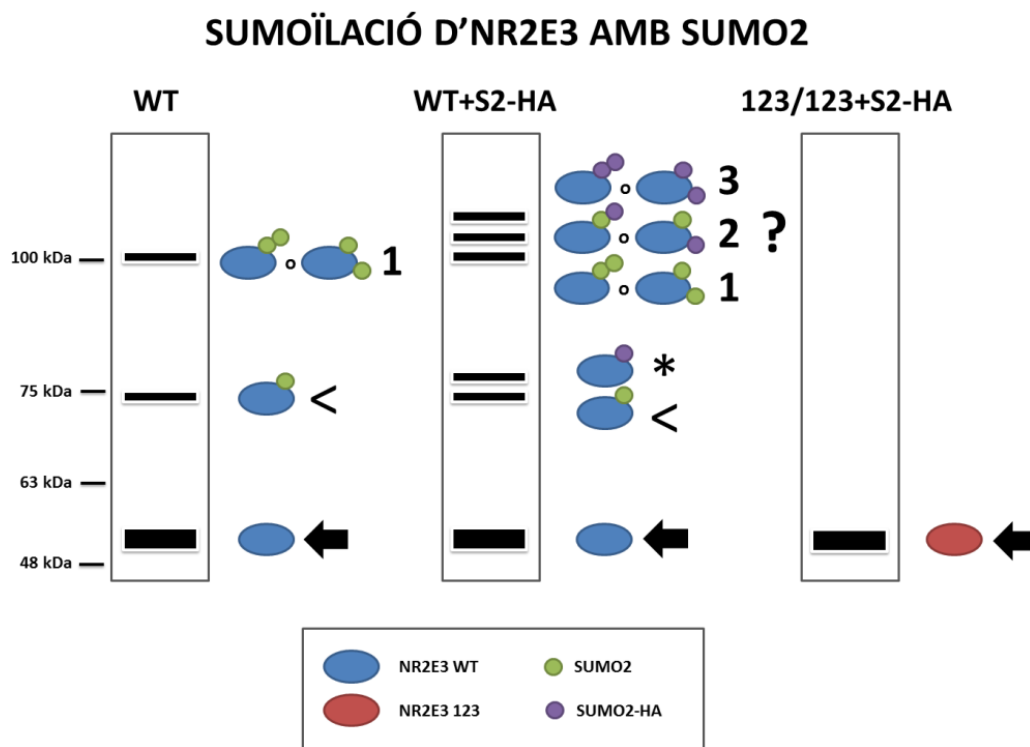


FIGURA 49. SUMOÏLACIÓ D'NR2E3. Esquema de la sumoïlació del factor de transcripció NR2E3 per a les seves formes WT i no sumoïlable (123). Els tres requadres verticals indiquen les bandes obtingudes en l'anàlisi per WB dels lisats de cèl·lules HEK293 transfectades amb les construccions hNR2E3 WT (WT), hNR2E3 123 (123) i SUMO2-HA (S2-HA), en diferents combinacions indicades a la part superior. Les figures a la dreta de cada panell indiquen la forma lliure (fletxa negra), monosumoïlada (< i *) o disumoïlada (1, 2 i 3) del factor de transcripció. La monosumoïlació es dona en la lisina K185, mentre que la disumoïlació podria ser exclusiva de K185 o en combinació amb K330 o K337. A més, els resultats són preliminars en el cas de la disumoïlació, pel que el model no està confirmat (indicat amb ?). A l'esquerra de la figura s'indiquen els pesos moleculars corresponents al marcador de pes molecular. El requadre inferior recull la llegenda de la figura.

2.8. E3 LLIGASES DE SUMO PER NR2E3

Per tal d'estudiar el possible paper de les E3 lligases de SUMO en la conjugació de SUMO2 en NR2E3, es van cotransfectar hNR2E3 WT, SUMO2-HA i alguna de les tres lligases que interaccionen amb el factor de transcripció (CBX4, HDAC4 o PIAS3).

No obstant, no es van poder detectar increments en les bandes de monosumoïlació d'NR2E3, pel que es va decidir incorporar l'enzim E2 conjugador UBC9, amb la intensió d'incrementar els nivells d'expressió de la maquinària de SUMO necessària per a la seva conjugació.

Contràriament al que s'esperava, es va observar una reducció en els nivells d'NR2E3 per a les condicions amb CBX4 i HDAC4. Aquesta reducció va ser equivalent per a la proteïna lliure i la sumoïlada en el cas d'HDAC4. En canvi, la coexpressió de CBX4 va provocar una davallada major de les formes sumoïlades respecte de la forma lliure d'NR2E3. Tenint en compte que en les transfeccions s'anivellen les quantitats de DNA transfectat amb la construcció buida pcDNA3, la baixada en els nivells d'NR2E3 observada amb la coexpressió de totes dues lligases no s'expliquen amb una menor eficiència de transfecció. A més, els promotors de les construccions són constitutius i *a priori* no depenen de factors de transcripció introduïts exògenament en l'assaig que puguin alterar l'expressió de les proteïnes que hi contenen. Per aquest motiu no hi ha una explicació clara del decrement dels nivells de proteïna NR2E3.

Pel que fa a la reducció de la sumoïlació del factor de transcripció amb l'expressió de CBX4, es va estudiar si aquesta estava relacionada amb una menor estabilitat proteica i un increment de la degradació via proteasoma. Els estudis amb MG132 ho van descartar, ja que tot i que es va incrementar la fracció d'NR2E3 lliure, els nivells de la seva sumoïlació no van augmentar proporcionalment. Així doncs, una altra possible explicació seria que la interacció de CBX4 amb NR2E3 es donés en la regió del factor de transcripció que conté la lisina K185, evitant així la seva sumoïlació. Aquest model explicaria també la major interacció de CBX4 amb NR2E3 WT que amb la seva forma mutant 123 (resultats obtinguts del BioID de CBX4). No obstant, cal tenir en compte que aquests resultats només s'obtenen en la coexpressió amb UBC9, pel que aquest enzim hauria d'afavorir la unió de la E3 lligasa de SUMO CBX4 amb el factor de transcripció NR2E3 WT.

2.9. LOCALITZACIÓ CEL·LULAR D'NR2E3, CBX4 I HDAC4

L'estudi de la localització d'NR2E3 en cèl·lules transfectades no va donar diferències en les seves formes WT i mutant 123. En ambdós casos, el factor de transcripció es va localitzar majoritàriament en el nucli de les cèl·lules transfectades. No obstant, aquesta localització subnuclear va mostrar diferents intensitats i, en ocasions, diferents distribucions dins del nucli, més uniformes o granulades. D'altra banda, CBX4 es va

DISCUSSIÓ

localitzar sempre a nucli i de forma molt uniforme, mentre que HDAC4 va mostrar diversos patrons de localització subcel·lulars, citoplasmàtica i nuclear, aquesta última amb diferents distribucions.

D'aquesta manera, es van poder colocalitzar el factor de transcripció NR2E3 WT i NR2E3 123 amb les lligases CBX4 i HDAC4 en el nucli de les cèl·lules transfectades, recolzant així les noves interaccions descrites a partir dels resultats anteriors.

L'estudi de sincronització de cèl·lules HEK293 amb un doble bloqueig de timidina, després de la seva transfecció, va permetre localitzar el factor de transcripció NR2E3, tant WT com 123, i les E3 lligases de SUMO CBX4 i HDAC4, en diferents fases del cicle cel·lular. Una d'aquestes fases d'estudi va ser la mitosi (fase M), detectada gràcies al marcatge de la cromatina condensada amb PPH3. Durant aquest moment del cicle, en el que la membrana nuclear es desintegra, es va observar una localització de les proteïnes d'estudi en tot el compartiment cel·lular, colocalitzant així les dues formes del factor de transcripció amb cadascuna de les E3 SUMO lligases. Per contra, no es van detectar les proteïnes en l'espai ocupat per la cromatina condensada.

Així doncs, en fase de divisió cel·lular o mitosi, tant el factor de transcripció NR2E3 en la seva forma WT o no sumoïlable (123), com les dues E3 lligases de SUMO, CBX4 i HDAC4, van presentar un patró de localització ubic en tot el compartiment cel·lular, a excepció del lloc ocupat per la cromatina condensada. Segurament, atès que durant la compactació i divisió cel·lular la transcripció queda interrompuda, la presència de les proteïnes d'estudi (d'una banda, factors de transcripció, i de l'altra, remodeladors de la cromatina durant la transcripció) es deuen veure expulsats del material genètic, quedant així en la resta del compartiment de la cèl·lula.

En resum, la sumoïlació és un procés de modificació posttraduccional rellevant a la retina, en el que cal aprofundir per a entendre el seu paper en el complex procés de desenvolupament i diferenciació neuronal d'aquest òrgan tan especialitzat. D'altra banda, l'estudi del factor de transcripció NR2E3 ha obert més preguntes que respostes. El treball conclou que NR2E3 és sumoïlable per SUMO2, i que aquest factor interacciona amb diverses E3 lligases de SUMO en un context fisiològic, algunes d'elles possibles repressores transcripcionals. No obstant, encara cal demostrar la rellevància funcional d'aquestes interaccions sobre la regulació transcripcional diferencial en gens diana de fotoreceptors, a partir de l'estudi de la forma WT i no sumoïlable d'NR2E3.



CONCLUSIONS



Respecte l'objectiu de **caracteritzar l'expressió dels gens de la via de SUMO a retina** a ratolí adult:

1. Tots els gens de la via de SUMO s'expressen a la retina de ratolí adult amb nivells que varien, relativament entre ells, en dos ordres de magnitud.
2. Dins la via metabòlica de SUMO, els gens que codifiquen les proteïnes de SUMO1-3 són els que s'expressen a nivell més elevat
3. Els gens *Sae1* i *Sae2* tenen nivells d'expressió equiparables, en concordança amb la seva funció heterodimèrica.
4. Els gens que codifiquen les E3 lligases i proteases de SUMO presenten nivells molt variables d'expressió
5. Els nivells d'mRNA dels factors de transcripció *Crx*, *Nrl* i *Nr2e3* són més alts en comparació amb la maquinària de SUMO, essent *Nrl* el més elevat.
6. El gen *Rho* té els nivells d'expressió més alts de tot l'estudi, equiparables als del gen de referència *Gapdh*, i amb concordança amb la seva funció fisiològica.
7. Comparant les diferents condicions de llum/foscor, es van poder establir patrons d'expressió diferencials per a alguns dels gens de la via de SUMO i alguns específics de fotoreceptors, com ara *Sae1*, *Senp2*, *Rho*, *Cbx4*, *Desi1*, *Nr2e3* i *Sumo2*.
8. L'expressió dels gens de la via de SUMO a la retina adulta de ratolí es va poder localitzar al llarg de les diferents capes, amb intensitats i patrons concrets per a cadascun dels gens. Tots ells s'expressen al segment intern (IS) dels fotoreceptors.

Respecte l'objectiu d'**estudiar la sumoïlació del factor de transcripció retinal NR2E3**:

9. La mutació de les tres lisines sumoïlables del factor de transcripció humà de fotoreceptors NR2E3 (NR2E3 123) no alteren l'expressió, estabilitat o vida mitjana de la proteïna en comparació amb la seva forma WT (NR2E3 WT).
10. La sumoïlació de la forma humana d'NR2E3 es dona en la lisina K185 amb SUMO2. Podria ser que aquesta conjugació no fos únicament monomonèrica, i que es poguessin trobar formes de polisumoïlació amb SUMO2 o, fins i tot, en combinació amb SUMO1.

CONCLUSIONS

11. La dimerització d'NR2E3 no es veu afectada per la mutació de les tres lisines sumoïlables (123).
12. La interacció de la forma mutant no sumoïlable d'NR2E3 amb la E3 lligasa de SUMO PIAS3 disminueix respecte NR2E3 WT.
13. A més de la interacció ja descrita amb PIAS3, NR2E3 interacciona amb dues E3 lligases de SUMO: CBX4 i HDAC4 en cultius cel·lulars. Podria ser que aquesta interacció amb CBX4 disminuís per la mutació de les lisines sumoïlables, fet que no es dona en el cas d'HDAC4.
14. NR2E3 interacciona amb HDAC4 a la retina adulta de ratolí.
15. L'expressió exògena d'NR2E3, CBX4 i l'enzim E2 conjugador UBC9 provoca una disminució de la fracció monosumoïlada amb SUMO2 del factor de transcripció.
16. Les formes d'NR2E3 WT i mutant per a les tres lisines sumoïlables no presenten diferències de localització subcel·lular, eminentment nuclear en tots dos casos.
17. L'expressió d'NR2E3 colocalitza en el nucli amb CBX4 i HDAC4. Aquestes localitzacions varien depenent del moment del cicle cel·lular.
18. Durant la fase de divisió cel·lular, o mitosi, NR2E3 comparteix localització amb CBX4 i HDAC4, en tot el compartiment cel·lular excloent la cromatina condensada.



BIBLIOGRAFIA



1. Consortium, I. H. G. S. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. TL - 431. *Nature* **431** VN-, 931–945 (2004).
2. Ayoubi, T. a & Van De Ven, W. J. Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J.* **10**, 453–460 (1996).
3. Hershko, a & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–79 (1998).
4. Ha, B. H. & Kim, E. E. Structures of proteases for ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *BMB Rep.* **41**, 435–443 (2008).
5. Boddy, M. N., Howe, K., Etkin, L. D., Solomon, E. & Freemont, P. S. PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* **13**, 971–82 (1996).
6. Shen, Z., Pardington-Purtymun, P. E., Comeaux, J. C., Moyzis, R. K. & Chen, D. J. UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* **36**, 271–279 (1996).
7. Okura, T. *et al.* Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* **157**, 4277–4281 (1996).
8. Matunis, M. J., Coutavas, E. & Blobel, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **135**, 1457–1470 (1996).
9. Bayer, P. *et al.* Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J. Mol. Biol.* **280**, 275–286 (1998).
10. Tanaka, K. *et al.* Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8660–72 (1999).
11. Giaever, G. *et al.* Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387–391 (2002).
12. Lomelí, H. & Vázquez, M. Emerging roles of the SUMO pathway in development. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 4045–64 (2011).

BIBLIOGRAFIA

13. Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. & Melchior, F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97–107 (1997).
14. Lapenta, V. *et al.* SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics* **40**, 362–6 (1997).
15. Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Fukuda-Kamitani, T. & Yeh, E. T. H. Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 11349–11353 (1998).
16. Wei, W. *et al.* A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 454–459 (2008).
17. Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H. & Owerbach, D. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* **279**, 27233–27238 (2004).
18. Owerbach, D., McKay, E. M., Yeh, E. T. H., Gabbay, K. H. & Bohren, K. M. A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 517–520 (2005).
19. Tatham, M. H. *et al.* Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.* **276**, 35368–74 (2001).
20. Matic, I. *et al.* In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics* **7**, 132–144 (2008).
21. Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. & Melchior, F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109–120 (2002).
22. Sampson, D. A., Wang, M. & Matunis, M. J. The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* **276**, 21664–21669 (2001).
23. Wilkinson, K. a & Henley, J. M. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem. J.* **428**, 133–45 (2010).

24. Pichler, A. & Melchior, F. Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* **3**, 381–387 (2002).
25. Wilson, V. G. & Rangasamy, D. Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp. Cell Res.* **271**, 57–65 (2001).
26. Hayashi, T. *et al.* Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp Cell Res* **280**, 212–221 (2002).
27. Seufert, W., Futcher, B. & Jentsch, S. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* **373**, 78–81 (1995).
28. Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J. & Blobel, G. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J.* **16**, 5509–5519 (1997).
29. Gong, L., Li, B., Millas, S. & Yeh, E. T. H. Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett.* **448**, 185–189 (1999).
30. Johnson, E. S. & Blobel, G. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J. Biol. Chem.* **272**, 26799–26802 (1997).
31. Gong, L., Kamitani, T., Fujise, K., Caskey, L. S. & Yeh, E. T. H. Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. *J. Biol. Chem.* **272**, 28198–28201 (1997).
32. Desterro, J. M. P., Thomson, J. & Hay, R. T. Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett.* **417**, 297–300 (1997).
33. Schwarz, S. E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M. & Jentsch, S. The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 560–4 (1998).
34. Saitoh, H. *et al.* Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr. Biol.* **8**, 121–124 (1998).
35. Lee, G. W. *et al.* Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. *J. Biol. Chem.* **273**, 6503–6507 (1998).
36. Rodriguez, M. S., Dargemont, C. & Hay, R. T. SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting. *J. Biol.*

BIBLIOGRAFIA

- Chem.* **276**, 12654–12659 (2001).
37. Flotho, A. & Melchior, F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 357–85 (2013).
 38. Kahyo, T., Nishida, T. & Yasuda, H. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol. Cell* **8**, 713–718 (2001).
 39. Schmidt, D. & Müller, S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2872–7 (2002).
 40. Kotaja, N., Karvonen, U., Jänne, O. a & Palvimo, J. J. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5222–5234 (2002).
 41. Nishida, T. & Yasuda, H. PIAS1 and PIASx?? function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 41311–41317 (2002).
 42. Sachdev, S. *et al.* PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* **15**, 3088–3103 (2001).
 43. Yunus, A. A. & Lima, C. D. Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 Ligase Siz1 and Determinants Required for SUMO Modification of PCNA. *Mol. Cell* **35**, 669–682 (2009).
 44. Rytinki, M. M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jääskeläinen, T. & Palvimo, J. J. PIAS proteins: Pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 3029–3041 (2009).
 45. Weger, S., Hammer, E. & Heilbronn, R. Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* **579**, 5007–5012 (2005).
 46. Braschi, E., Zunino, R. & McBride, H. M. MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep.* **10**, 748–54 (2009).
 47. Zhao, X. & Blobel, G. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4777–82 (2005).
 48. Potts, P. R. & Yu, H. Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for

- DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7021–32 (2005).
49. Andrews, E. A. *et al.* Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 185–96 (2005).
 50. Rajendra, R. *et al.* Topors functions as an E3 ubiquitin ligase with specific E2 enzymes and ubiquitinates p53. *J. Biol. Chem.* **279**, 36440–36444 (2004).
 51. Kagey, M. H., Melhuish, T. A. & Wotton, D. The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* **113**, 127–137 (2003).
 52. Yang, S. & Sharrocks, A. D. The SUMO E3 ligase activity of Pc2 is coordinated through a SUMO interaction motif. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2193–2205 (2010).
 53. Merrill, J. C. *et al.* A role for non-covalent SUMO interaction motifs in Pc2/CBX4 E3 activity. *PLoS One* **5**, (2010).
 54. MacPherson, M. J., Beatty, L. G., Zhou, W., Du, M. & Sadowski, P. D. The CTCF insulator protein is posttranslationally modified by SUMO. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 714–725 (2009).
 55. Li, B. *et al.* Polycomb protein Cbx4 promotes SUMO modification of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *Biochem. J.* **405**, 369–378 (2007).
 56. Ismail, I. H. *et al.* CBX4-mediated SUMO modification regulates BMI1 recruitment at sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5497–5510 (2012).
 57. Grégoire, S. & Yang, X.-J. Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2273–2287 (2005).
 58. Lee, J. H. *et al.* Differential SUMOylation of LXRA and LXRB Mediates Transrepression of STAT1 Inflammatory Signaling in IFN- α -Stimulated Brain Astrocytes. *Mol. Cell* **35**, 806–817 (2009).
 59. Gao, C. *et al.* Histone deacetylase 7 promotes PML sumoylation and is essential for PML nuclear body formation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5658–67 (2008).
 60. García-Gutiérrez, P., Juárez-Vicente, F., Gallardo-Chamizo, F., Charnay, P. & García-Domínguez, M. The transcription factor Krox20 is an E3 ligase that sumoylates its Nab coregulators. *EMBO Rep.* **12**, 1018–23 (2011).

BIBLIOGRAFIA

61. Subramaniam, S., Sixt, K. M., Barrow, R. & Snyder, S. H. Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science* **324**, 1327–30 (2009).
62. Oh, S.-M. *et al.* Ebp1 sumoylation, regulated by TLS/FUS E3 ligase, is required for its anti-proliferative activity. *Oncogene* **29**, 1017–30 (2010).
63. Morita, Y., Kanei-Ishii, C., Nomura, T. & Ishii, S. TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Mol Biol Cell* **16**, 5433–5444 (2005).
64. Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T. K. & Melchior, F. The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 984–991 (2004).
65. Reverter, D. & Lima, C. D. Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* **435**, 687–692 (2005).
66. Li, S. J. & Hochstrasser, M. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**, 246–251 (1999).
67. Drag, M. & Salvesen, G. S. DeSUMOylating enzymes—SENPs. *IUBMB Life* **60**, 734–742 (2008).
68. Hickey, C. M., Wilson, N. R. & Hochstrasser, M. Function and regulation of SUMO proteases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 755–66 (2012).
69. Hay, R. T. SUMO-specific proteases: a twist in the tail. *Trends in Cell Biology* **17**, 370–376 (2007).
70. Mukhopadhyay, D. & Dasso, M. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 286–295 (2007).
71. Yeh, E. T. H. SUMOylation and De-SUMOylation: Wrestling with life's processes. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 8223–8227 (2009).
72. Gong, L., Millas, S., Maul, G. G. & Yeh, E. T. Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J. Biol. Chem.* **275**, 3355–3359 (2000).
73. Hang, J. & Dasso, M. Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J. Biol. Chem.* **277**, 19961–19966 (2002).
74. Zhang, H., Saitoh, H. & Matunis, M. J. Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol. Cell. Biol.* **22**,

- 6498–6508 (2002).
75. Nishida, T., Tanaka, H. & Yasuda, H. A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6423–6427 (2000).
 76. Di Bacco, A. *et al.* The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4489–4498 (2006).
 77. Gong, L. & Yeh, E. T. H. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J. Biol. Chem.* **281**, 15869–15877 (2006).
 78. Mukhopadhyay, D. *et al.* SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J. Cell Biol.* **174**, 939–949 (2006).
 79. Shen, L. N., Geoffroy, M. C., Jaffray, E. G. & Hay, R. T. Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase. *Biochem J* **421**, 223–230 (2009).
 80. Mikolajczyk, J. *et al.* Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO)-specific proteases: Profiling the specificities and activities of human SENPs. *J. Biol. Chem.* **282**, 26217–26224 (2007).
 81. Shin, E. J. *et al.* DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep* **13**, 339–346
 82. Schulz, S. *et al.* Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO reports* **13**, 930–938 (2012).
 83. Matic, I. *et al.* Site-Specific Identification of SUMO-2 Targets in Cells Reveals an Inverted SUMOylation Motif and a Hydrophobic Cluster SUMOylation Motif. *Mol. Cell* **39**, 641–652 (2010).
 84. Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. a, Krontiris, T. G. & Chen, Y. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14373–14378 (2004).
 85. Gareau, J. R. & Lima, C. D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 861–71 (2010).
 86. Kerscher, O. SUMO junction-what's your function? New insights through

BIBLIOGRAFIA

- SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep.* **8**, 550–5 (2007).
87. van Wijk, S. J. L., Müller, S. & Dikic, I. Shared and unique properties of ubiquitin and SUMO interaction networks in DNA repair. *Genes Dev.* **25**, 1763–1769 (2011).
88. Kagey, M. H., Melhuish, T. a, Powers, S. E. & Wotton, D. Multiple activities contribute to Pc2 E3 function. *EMBO J.* **24**, 108–119 (2005).
89. Hecker, C. M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. & Dikic, I. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J. Biol. Chem.* **281**, 16117–16127 (2006).
90. Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135–141 (2002).
91. Papouli, E. *et al.* Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol. Cell* **19**, 123–133 (2005).
92. Pfander, B., Moldovan, G.-L., Sacher, M., Hoegel, C. & Jentsch, S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* **436**, 428–433 (2005).
93. Geiss-friedlander, R. & Melchior, F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 947–956 (2007).
94. Wu, S.-Y. & Chiang, C.-M. Crosstalk between sumoylation and acetylation regulates p53-dependent chromatin transcription and DNA binding. *EMBO J.* **28**, 1246–59 (2009).
95. Pichler, A. *et al.* SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 264–269 (2005).
96. Krumova, P. *et al.* Sumoylation inhibits α -synuclein aggregation and toxicity. *J. Cell Biol.* **194**, 49–60 (2011).
97. Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. & Schär, P. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J.* **21**, 1456–1464 (2002).
98. Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N. & Elledge, S. J. The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1

- modification of DNA topoisomerase II. *Mol. Cell* **9**, 1169–1182 (2002).
99. Bergink, S. & Jentsch, S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* **458**, 461–467 (2009).
 100. Liu, J. *et al.* Small ubiquitin-related modifier 1 is involved in hepatocellular carcinoma progression via mediating p65 nuclear translocation. **7**, (2016).
 101. Lin, X. *et al.* Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol. Cell* **11**, 1389–1396 (2003).
 102. Sobko, A., Ma, H. & Firtel, R. A. Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev. Cell* **2**, 745–756 (2002).
 103. Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C. D. Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 172–183 (2003).
 104. Iñiguez-Lluhí, J. A. For a healthy histone code, a little SUMO in the tail keeps the acetyl away. *ACS Chem. Biol.* **1**, 204–206 (2006).
 105. Gill, G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: Different functions, similar mechanisms? *Genes and Development* **18**, 2046–2059 (2004).
 106. Chymkowitz, P., Ngu, P. A. & Enserink, J. M. SUMO-regulated transcription: Challenging the dogma. *BioEssays* **37**, 1095–1105 (2015).
 107. Girdwood, D. *et al.* p300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol. Cell* **11**, 1043–1054 (2003).
 108. Shin, E. J. *et al.* DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep.* **13**, 339–46 (2012).
 109. Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. & Hay, R. T. SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol. Cell* **2**, 233–239 (1998).
 110. Denuc, A. & Marfany, G. SUMO and ubiquitin paths converge. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 34–39 (2010).
 111. Klenk, C., Humrich, J., Quitterer, U. & Lohse, M. J. SUMO-1 controls the protein stability and the biological function of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **281**, 8357–8364 (2006).
 112. Steffan, J. S. *et al.* SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* **304**, 100–104 (2004).

BIBLIOGRAFIA

113. Xie, Y. *et al.* The yeast Hex3·Slx8 heterodimer is a ubiquitin ligase stimulated by substrate sumoylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 34176–34184 (2007).
114. Prudden, J. *et al.* SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *EMBO J.* **26**, 4089–101 (2007).
115. Sun, H., Levenson, J. D. & Hunter, T. Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *EMBO J.* **26**, 4102–12 (2007).
116. Uzunova, K. *et al.* Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *J. Biol. Chem.* **282**, 34167–34175 (2007).
117. Guo, C. *et al.* Ubiquitin-Binding Motifs in REV1 Protein Are Required for Its Role in the Tolerance of DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8892–8900 (2006).
118. Hay, R. T. SUMO: A history of modification. *Molecular Cell* **18**, 1–12 (2005).
119. Swaroop, A., Kim, D. & Forrest, D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 563–76 (2010).
120. Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M. & Ezzeddine, D. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 589–595 (1996).
121. Hendrickson, A. *et al.* Rod photoreceptor differentiation in fetal and infant human retina. *Exp. Eye Res.* **87**, 415–426 (2008).
122. Carter-Dawson, L. D. & LaVail, M. M. Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine. *J. Comp. Neurol.* **188**, 263–72 (1979).
123. Cheng, H. *et al.* Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1563–1575 (2004).
124. Chen, J., Rattner, A. & Nathans, J. The rod photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 represses transcription of multiple cone-specific genes. *J. Neurosci.* **25**, 118–129 (2005).
125. Peng, G. H., Ahmad, O., Ahmad, F., Liu, J. & Chen, S. The photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 interacts with Crx and exerts opposing effects

- on the transcription of rod versus cone genes. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 747–764 (2005).
126. Cheng, H., Khan, N. W., Roger, J. E. & Swaroop, A. Excess cones in the retinal degeneration rd7 mouse, caused by the loss of function of orphan nuclear receptor Nr2e3, originate from early-born photoreceptor precursors. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4102–4115 (2011).
 127. Haider, N. B., Naggert, J. K. & Nishina, P. M. Excess cone cell proliferation due to lack of a functional NR2E3 causes retinal dysplasia and degeneration in rd7/rd7 mice. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1619–1626 (2001).
 128. Corbo, J. C. & Cepko, C. L. A hybrid photoreceptor expressing both rod and cone genes in a mouse model of enhanced S-cone syndrome. *PLoS Genet.* **1**, 0140–0153 (2005).
 129. Haider, N. B. *et al.* Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nat. Genet.* **24**, 127–131 (2000).
 130. Gerber, S. *et al.* The photoreceptor cell-specific nuclear receptor gene (PNR) accounts for retinitis pigmentosa in the Crypto-Jews from Portugal (Marranos), survivors from the Spanish Inquisition. *Hum. Genet.* **107**, 276–84 (2000).
 131. Mangelsdorf, D. J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835–839 (1995).
 132. Roduit, R., Escher, P. & Schorderet, D. F. Mutations in the DNA-binding domain of NR2E3 affect in vivo dimerization and interaction with CRX. *PLoS One* **4**, (2009).
 133. Escher, P. *et al.* Mutations in NR2E3 can cause dominant or recessive retinal degenerations in the same family. *Hum Mutat* **30**, 342–351 (2009).
 134. Kanda, A. & Swaroop, A. A comprehensive analysis of sequence variants and putative disease-causing mutations in photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3. *Mol. Vis.* **15**, 2174–84 (2009).
 135. Tan, M. H. E. *et al.* The Crystal Structure of the Orphan Nuclear Receptor NR2E3/PNR Ligand Binding Domain Reveals a Dimeric Auto-Repressed Conformation. *PLoS One* **8**, (2013).

BIBLIOGRAFIA

136. Roger, J. E., Nellissery, J., Kim, D. S. & Swaroop, A. Sumoylation of bZIP transcription factor NRL modulates target gene expression during photoreceptor differentiation. *J. Biol. Chem.* **285**, 25637–44 (2010).
137. Onishi, A. *et al.* Pias3-dependent SUMOylation directs rod photoreceptor development. *Neuron* **61**, 234–246 (2009).
138. Wright, A. F. *et al.* Mutation analysis of NR2E3 and NRL genes in Enhanced S Cone Syndrome. *Hum Mutat* **24**, 439 (2004).
139. Chakarova, C. F. *et al.* Mutations in TOPORS cause autosomal dominant retinitis pigmentosa with perivascular retinal pigment epithelium atrophy. *Am J Hum Genet* **81**, 1098–1103 (2007).
140. Chen, B. & Cepko, C. L. HDAC4 regulates neuronal survival in normal and diseased retinas. *Science* **323**, 256–259 (2009).
141. Chen, Y. *et al.* Expression of human FUS protein in Drosophila leads to progressive neurodegeneration. *Protein Cell* **2**, 477–486 (2011).
142. Brooks, M. J., Rajasimha, H. K., Roger, J. E. & Swaroop, A. Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and Nrl(-/-) retinal transcriptomes. *Mol. Vis.* **17**, 3034–54 (2011).
143. Blackshaw, S. *et al.* Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol.* **2**, (2004).
144. Dütting, E., Schröder-Kress, N., Sticht, H. & Enz, R. SUMO E3 ligases are expressed in the retina and regulate SUMOylation of the metabotropic glutamate receptor 8b. *Biochem. J.* **435**, 365–371 (2011).
145. Onishi, A., Peng, G.-H., Chen, S. & Blackshaw, S. Pias3-dependent SUMOylation controls mammalian cone photoreceptor differentiation. *Nat. Neurosci.* **13**, 1059–1065 (2010).
146. Fischle, W., Kiermer, V., Dequiedt, F. & Verdin, E. The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochem Cell Biol* **79**, 337–348 (2001).
147. Vega, R. B. *et al.* Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* **119**, 555–566 (2004).
148. Gr??goire, S. *et al.* Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 4423–4433 (2006).

149. Kirsh, O. *et al.* The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J.* **21**, 2682–2691 (2002).
150. Guo, X. *et al.* A short N-terminal domain of HDAC4 preserves photoreceptors and restores visual function in retinitis pigmentosa. *Nat. Commun.* **6**, 8005 (2015).
151. Wang, Z., Qin, G. & Zhao, T. C. HDAC4: mechanism of regulation and biological functions. *Epigenomics* **6**, 139–50 (2014).
152. Rajaratnam, S. M. W. & Arendt, J. Health in a 24-h society. *Lancet* **358**, 999–1005 (2001).
153. Roenneberg, T., Daan, S. & Meroow, M. The art of entrainment. *J. Biol. Rhythms* **18**, 183–194 (2003).
154. Reppert, S. M. & Weaver, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935–41 (2002).
155. Berson, D. M., Dunn, F. A. & Takao, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (80-.)*. **295**, 1070–1073 (2002).
156. Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M. & Yau, K. W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science (80-.)*. **295**, 1065–1070 (2002).
157. Sekaran, S., Foster, R. G., Lucas, R. J. & Hankins, M. W. Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons. *Curr. Biol.* **13**, 1290–1298 (2003).
158. Do, M. T. H. & Yau, K.-W. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Physiol. Rev.* **90**, 1547–81 (2010).
159. Hankins, M. W., Peirson, S. N. & Foster, R. G. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends in Neurosciences* **31**, 27–36 (2008).
160. Schmidt, T. M. *et al.* Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function. *J Neurosci* **31**, 16094–16101 (2011).
161. Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M. & Reppert, S. M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**, 697–706 (1995).
162. Hughes, S., Jagannath, A., Hankins, M. W., Foster, R. G. & Peirson, S. N. Photic

BIBLIOGRAFIA

- regulation of clock systems. *Methods Enzymol.* **552**, 125–43 (2015).
163. Cardone, L. *et al.* Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* **309**, 1390–4 (2005).
 164. Lee, J. *et al.* Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6056–65 (2008).
 165. Li, S. *et al.* CLOCK is a substrate of SUMO and sumoylation of CLOCK upregulates the transcriptional activity of estrogen receptor- α . *Oncogene* **32**, 4883–91 (2013).
 166. von Schantz, M., Lucas, R. J. & Foster, R. G. Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **72**, 108–14 (1999).
 167. Goldman, A. I., Teirstein, P. S. & Brien, P. O. The role of ambient lighting in circadian disc shedding in the rod outer segment of the rat retina. **19**, 1257–1267 (1980).
 168. Krigel, A., Felder-Schmittbuhl, M.-P. & Hicks, D. Circadian-clock driven cone-like photoreceptor phagocytosis in the neural retina leucine zipper gene knockout mouse. *Mol. Vis.* **16**, 2873–81 (2010).
 169. Bobu, C. & Hicks, D. Regulation of retinal photoreceptor phagocytosis in a diurnal mammal by circadian clocks and ambient lighting. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 3495–502 (2009).
 170. Liu, X., Zhang, Z. & Ribelayga, C. P. Heterogeneous Expression of the Core Circadian Clock Proteins among Neuronal Cell Types in Mouse Retina. *PLoS One* **7**, e50602 (2012).
 171. Ciruela, F. & Fernández-Dueñas, V. GPCR oligomerization analysis by means of BRET and dFRAP. *Methods Mol. Biol.* **1272**, 133–141 (2015).
 172. Pirone, L., Xolalpa, W., Mayor, U., Barrio, R. & Sutherland, J. D. in *SUMO: Methods and Protocols* (ed. Rodriguez, S. M.) 161–169 (Springer New York, 2016). doi:10.1007/978-1-4939-6358-4_12
 173. Nishiguchi, K. M. *et al.* Recessive NRL mutations in patients with clumped pigmentary retinal degeneration and relative preservation of blue cone function.

- PNAS* **101**, 17819–17824 (2004).
174. Kassardjian, A. *et al.* The Transcription Factor YY1 Is a Novel Substrate for Aurora B Kinase at G2/M Transition of the Cell Cycle. *PLoS One* **7**, 23–25 (2012).
 175. Abad-Morales, V., Domènech, E. B., Garanto, A. & Marfany, G. mRNA expression analysis of the SUMO pathway genes in the adult mouse retina. *Biol. Open* **4**, (2015).
 176. Siddiqui, S., Cong, W. N., Daimon, C. M., Martin, B. & Maudsley, S. BRET biosensor analysis of receptor tyrosine kinase functionality. *Frontiers in Endocrinology* **4**, (2013).
 177. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. & Burke, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **196**, 801–810 (2012).
 178. Selamat, W. *et al.* TLS interaction with NMDA R1 splice variant in retinal ganglion cell line RGC-5. *Neurosci. Lett.* **450**, 163–166 (2009).
 179. Liu-Yesucevitz, L. *et al.* Local RNA Translation at the Synapse and in Disease. *Journal of Neuroscience* **31**, 16086–16093 (2011).
 180. Psakhye, I. & Jentsch, S. Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* **151**, 807–820 (2012).
 181. von Alpen, D. *et al.* Differential Dimerization of Variants Linked to Enhanced S-Cone Sensitivity Syndrome (ESCS) Located in the NR2E3 Ligand-Binding Domain. *Hum. Mutat.* **36**, 599–610 (2015).
 182. Mielcarek, M., Zielonka, D., Carnemolla, A., Marcinkowski, J. T. & Guidez, F. HDAC4 as a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases: a summary of recent achievements. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 42 (2015).
 183. Schorderet, D. F. & Escher, P. NR2E3 mutations in enhanced S-cone sensitivity syndrome (ESCS), Goldmann-Favre syndrome (GFS), clumped pigmentary retinal degeneration (CPRD), and retinitis pigmentosa (RP). *Hum Mutat* **30**, 1475–1485 (2009).
 184. Chen, B. & Cepko, C. L. Requirement of histone deacetylase activity for the expression of critical photoreceptor genes. *BMC Dev. Biol.* **7**, 78 (2007).

BIBLIOGRAFIA

185. Franco, P. J., Farooqui, M., Seto, E. & Wei, L. N. The orphan nuclear receptor TR2 interacts directly with both class I and class II histone deacetylases. *Mol Endocrinol* **15**, 1318–1328 (2001).
186. Franco, P. J., Li, G. & Wei, L.-N. Interaction of nuclear receptor zinc finger DNA binding domains with histone deacetylase. *Mol. Cell. Endocrinol.* **206**, 1–12 (2003).



ANNEX 1



PUBLICACIÓ 1

TÍTOL

“mRNA expression analysis of the SUMO pathway genes in the adult mouse retina.”

AUTORS

Abad-Morales, Víctor, Domènech, Elena B, Garanto, Alejandro, Marfany, Gemma.

REFERÈNCIA

Abad-Morales, V., Domènech, E. B., Garanto, A. & Marfany, G. mRNA expression analysis of the SUMO pathway genes in the adult mouse retina. *Biol. Open* **4**, (2015).

APORTACIÓ PERSONAL A LA PUBLICACIÓ

L'aportació personal a aquesta publicació ha estat la planificació i el disseny dels d'experiments presentats, la seva realització (a excepció de l'estudi de les variacions proteiques en explants retinals, Figura 5 de la publicació), l'anàlisi de les dades obtingudes i l'escriptura del manuscrit.

RESEARCH ARTICLE

mRNA expression analysis of the SUMO pathway genes in the adult mouse retina

Victor Abad-Morales¹, Elena B. Domènech¹, Alejandro Garanto^{1,*} and Gemma Marfany^{1,2,3,‡}

ABSTRACT

Sumoylation is a reversible post-translational modification that regulates different cellular processes by conjugation/deconjugation of SUMO moieties to target proteins. Most work on the functional relevance of SUMO has focused on cell cycle, DNA repair and cancer in cultured cells, but data on the inter-dependence of separate components of the SUMO pathway in highly specialized tissues, such as the retina, is still scanty. Nonetheless, several retinal transcription factors (TFs) relevant for cone and rod fate, as well as some circadian rhythm regulators, are regulated by sumoylation. Here we present a comprehensive survey of SUMO pathway gene expression in the murine retina by quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization (ISH). The mRNA expression levels were quantified in retinas obtained under four different light/dark conditions, revealing distinct levels of gene expression. In addition, a SUMO pathway retinal gene atlas based on the mRNA expression pattern was drawn. Although most genes are ubiquitously expressed, some patterns could be defined in a first step to determine its biological significance and interdependence. The wide expression of the SUMO pathway genes, the transcriptional response under several light/dark conditions, and the diversity of expression patterns in different cell layers clearly support sumoylation as a relevant post-translational modification in the retina. This expression atlas intends to be a reference framework for retinal researchers and to depict a more comprehensive view of the SUMO-regulated processes in the retina.

KEY WORDS: SUMO, sumoylation, *In situ* hybridization, mRNA expression levels, retina, light cycle

INTRODUCTION

Sumoylation, the covalent conjugation of a small ubiquitin-like modifier (SUMO) to a target protein, is a cell signalling mechanism involved in the regulation of essential cellular and developmental processes such as nucleus-cytoplasm shuttling, apoptosis or transcription (Hayashi et al., 2002; Pichler and Melchior, 2002; Seufert et al., 1995; Wilson and Rangasamy,

2001). This posttranslational reversible process conjugates SUMO by forming an isopeptide bond between the SUMO C-terminus glycine residue and a lysine residue within a consensus motif of the target substrate (Sampson et al., 2001), although non-consensus motif attachments have also been reported (Wilkinson and Henley, 2010).

In mammals there are four SUMO paralogues (SUMO1 to SUMO4). SUMO2 and SUMO3 are almost identical (they differ from each other by only three N-terminal residues), and are able to form chains on substrate proteins through internal lysine residues (Tatham et al., 2001). Contrarily, SUMO1 is attached as a monomer, or acts as a chain terminator on SUMO2/3 polymers (Matic et al., 2008; Okura et al., 1996; Tatham et al., 2001). Finally, SUMO4 isoform has been predicted from genomic data but has not been identified *in vivo* yet (Wei et al., 2008).

Briefly, sumoylation starts with an inactive SUMO precursor that is cleaved at the C-terminus by a SENP (sentrin/SUMO-specific protease) enzyme. The E1 ligase, consisting of a heterodimer of SAE1 (SUMO-activating enzyme E1) and SAE2, activates the SUMO cleaved peptide in an ATP-dependent manner, and transfers it to the active site of UBC9 (ubiquitin-conjugating 9), the unique E2 ligase. This modified UBC9 can directly conjugate SUMO to the consensus sumoylation motif on a target protein, although usually it interacts with an E3 ligase, which will then recognize the final substrate. The E3 ligases act as scaffolds bringing together the SUMO-loaded UBC9 with the target proteins and allowing the conjugation (Flotho and Melchior, 2013). So far, up to 15 different E3 ligases have been identified in mammal genomes (Wilkinson and Henley, 2010). SUMO deconjugation is performed by a family of cysteine proteases, generically named as SENPs. Six SENP members were first described (Wilkinson and Henley, 2010) and very recently three new members, DES1, DES2 and USPL1, have been added to the group of SUMO deconjugating enzymes (Schulz et al., 2012; Shin et al., 2012).

The attachment of SUMO moieties to their substrate targets regulates many relevant physiological processes by modulating enzyme activity, activating transcription factors (TFs), shifting protein subcellular localizations, and eventually, determining their substrate fate. Therefore, a detailed expression map of the genes involved in the metabolism of SUMO is fundamental to understand the cellular role of this small peptide in any tissue. Several groups have previously studied the expression levels of some SUMO metabolism enzymes, particularly in neural tissues, and several E3 ligases related to the regulation of neurotransmitter receptors have been shown to be expressed in the retina (Dütting et al., 2011). Global transcriptome analysis by microarray and next generation sequencing have been also reported for the developing mouse retina, mainly focused on the expression differences in comparison with mutant defective

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. ³Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain.

*Present address: Department of Human Genetics, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands; and Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands.

‡Author for correspondence (gmarfany@ub.edu)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

strains (Blackshaw et al., 2004; Brooks et al., 2011). However, no exhaustive and comprehensive analysis has been reported for the SUMO pathway genes in the retina to date. On the other hand, several regulatory circadian rhythm genes, as well as transcription factors (TFs) relevant for cone and rod differentiation, such as *NR2E3* and *NRL*, are regulated by sumoylation (Onishi et al., 2009; Roger et al., 2010; Wright et al., 2004), indicating that the SUMO pathway is important in retinal physiological function. Other examples of the SUMO regulatory roles in vision are illustrated by the fact that mutations in the dual Ubiquitin/SUMO E3 ligase *TOPORS* gene cause retinitis pigmentosa in human (Chakarova et al., 2007) (RetNet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>); and the SUMO ligases HDAC4 and TLS have been also involved in photoreceptor survival or apoptosis (Chen and Cepko, 2009; Chen et al., 2011). These cases are probably the tip of the iceberg concerning the function of SUMO in retina.

In this context, we aimed to analyze the mRNA levels and spatial expression pattern of the complete list of SUMO and SUMO pathway enzymes in the mouse retina, as a means to provide an expression atlas, a reference framework for researchers working in retinal diseases and/or SUMO enzymes. This expression map will give useful clues on the function of SUMO during retinal development and physiology, retinal response to light and oxidative stress and the regulation of the retinal circadian clock genes as well as pinpoint new candidate genes for visual disorders.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

All procedures in mice were performed according to the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, as well as the regulations of the Animal Care facilities (Estabulari de la Facultat de Farmàcia) at the Universitat de Barcelona (UB). All procedures were evaluated and approved by the Animal Research Ethics Committee (Comité Ètic d'Experimentació Animal, CEEA) of the UB (Permit numbers from the Generalitat de Catalunya DAAM 6562 and 7185).

Animal handling, tissue dissection and preparation of samples

Murine retina samples were obtained from P60 C57BL/6J animals. Animals were euthanized by cervical dislocation (with all efforts made to minimize animal suffering) at four different time points and light conditions (as specified in Fig. 1) and retinas were dissected and immediately frozen. Housing under 12:12 h light/dark cycle (LD) is usually considered normal conditions. For conditions 1 and 4, animals were kept in the dark and their retinas were collected in a dark chamber with dim red light, as mice lack the opsins capable to detect this wavelength (L-cones). For *in situ* hybridization, retinas were obtained from animals reared under normal LD cycle and after 6 h of exposition to light (condition 3 of Fig. 1A), collected and treated as described elsewhere (Garanto et al., 2012).

RNA extraction and cDNA generation

For each of the four conditions, three independent samples were analyzed, and each sample contained three frozen retinas (of two different animals). Thus, per condition, nine retinas were analyzed in a total of three different samples. The retinas were homogenized using a Polytron PT1200E homogenizer (Kinematica, AG, Lucerne, Switzerland). For total RNA extraction, the High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) was used, following the manufacturer's instructions with minor modifications (longer treatment with DNaseI). Reverse transcription reactions were carried out using the qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD).

qRT-PCR

Quantitative reverse transcription PCR was performed using the LightCycler® 480 SYBR Green I Master and a LightCycler® 480

Multiwell Plate 384 (Roche Applied Science) in a final reaction volume of 10 µl. Raw data were analyzed with the LightCycler® 480 software using the Advanced Relative Quantification method. *Gapdh* expression was used to normalize the levels of expression. *Rho* and *Cerkl* were considered as reference genes with high and low levels of expression in the mouse retina, respectively. Given that RT-PCR is a very sensitive technique, three technical replicates of the same sample were performed for each gene to minimize procedure errors. The specific gene primers used are listed in supplementary material Table S1. The error bars correspond to the s.d. of the expression levels detected in the three biological samples, depicted in Fig. 1B,C. After testing for equal s.d. and normal distribution in the different conditions (Bartlett and Shapiro Wilk tests, respectively), a multiple comparison analysis of the means in the different conditions was performed using a Tukey-Kramer test to assess statistical significance.

In situ hybridization

For *in situ* hybridization, cDNA fragments (400–500 bp) of each gene were subcloned into pGEM-T® Easy Vector (Promega), and sense/antisense riboprobes were generated from the flanking T7 or SP6 RNAPol promoters. Eighteen micrometre sections were recovered on either custom made poly-lysine covered slides, or commercial Superfrost Plus glass slides (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), dried 1 h at RT, rinsed three times for 10 min with phosphate-buffered saline (PBS), treated with 2 µg/ml proteinase K for 15 min at 37°C, washed twice for 5 min with PBS, and postfixed with 4% PFA. Acetylation with 0.1 M triethanolamine-HCl (pH 8.0) containing first 0.25%, and then 0.5% acetic anhydride, was performed for 5 min each. Hybridization was carried out overnight at 55°C with digoxigenin-labeled riboprobes (2 µg/ml) in 50% formamide, 1×Denhardt's solution, 10% dextran-sulfate, 0.9 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM NaH₂PO₄, and 1 mg/ml yeast tRNA.

After hybridization, slides were washed in 2× SSC for 20 min at 55°C, equilibrated in NTE (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA) at 37°C, and then treated with 10 µg/ml RNase A in NTE at 37°C for 30 min. Subsequently, sections were washed at 37°C in NTE for 15 min, twice in 2× SSC and 0.2× SSC for 15 min each, equilibrated in Buffer 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), and blocked in Blocking Buffer (1% BSA and 0.1% Triton X-100 in buffer 1) for 1 h. An anti-digoxigenin-AP conjugate antibody (1:1000; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) in Blocking Buffer was incubated overnight at 4°C. Sections were then washed twice in Buffer 1 for 15 min, Buffer 2 (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 150 mM NaCl), and Buffer 2 supplemented with 50 mM MgCl₂ for 5 min each, prior to exposure to BM Purple AP Substrate (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Reactions were stopped by washing in 1× PBS. Sections were cover-slipped with Fluoprep (Biomérieux, France) and photographed using a Leica DFC Camera connected to a Leica DM IL optic microscope (Leica Microsystems, Germany).

Retinal explants

Freshly enucleated eyes from mice were manipulated in Leibovitz L15 media, and the retinas were dissected from the pigmented epithelium and other ocular structures. Careful cuts at the edges were performed to flatten the tissue and each retina was separately placed with the photoreceptors upside in a 6 well plate with Neurobasal media (plus 1% penicillin/streptomycin, 2% L-glutamine, 7.46% glucose, 16.66% NaH₂CO₃, 2% B27) on top of a 0.4 µm transwell membrane (30 mm Diameter, Millicell® Cell Culture Inserts). All retinas were kept overnight at 37°C and 5% CO₂ in the dark. One retina from each individual (n=6) was exposed to light for 1.5 h while the other remained in the dark (conditions 2 and 1, respectively). After the treatment, all retina explants were individually frozen in liquid nitrogen.

Protein lysates and immunodetection by western blot

Each retinal explant was separately homogenized in RIPA buffer (Desoxycolate 0.25% w/v, NP40 1% v/v, Tris pH 7.5 1 M, EDTA 500 mM, NaCl 5 M and protease inhibitor). Protein lysates were loaded

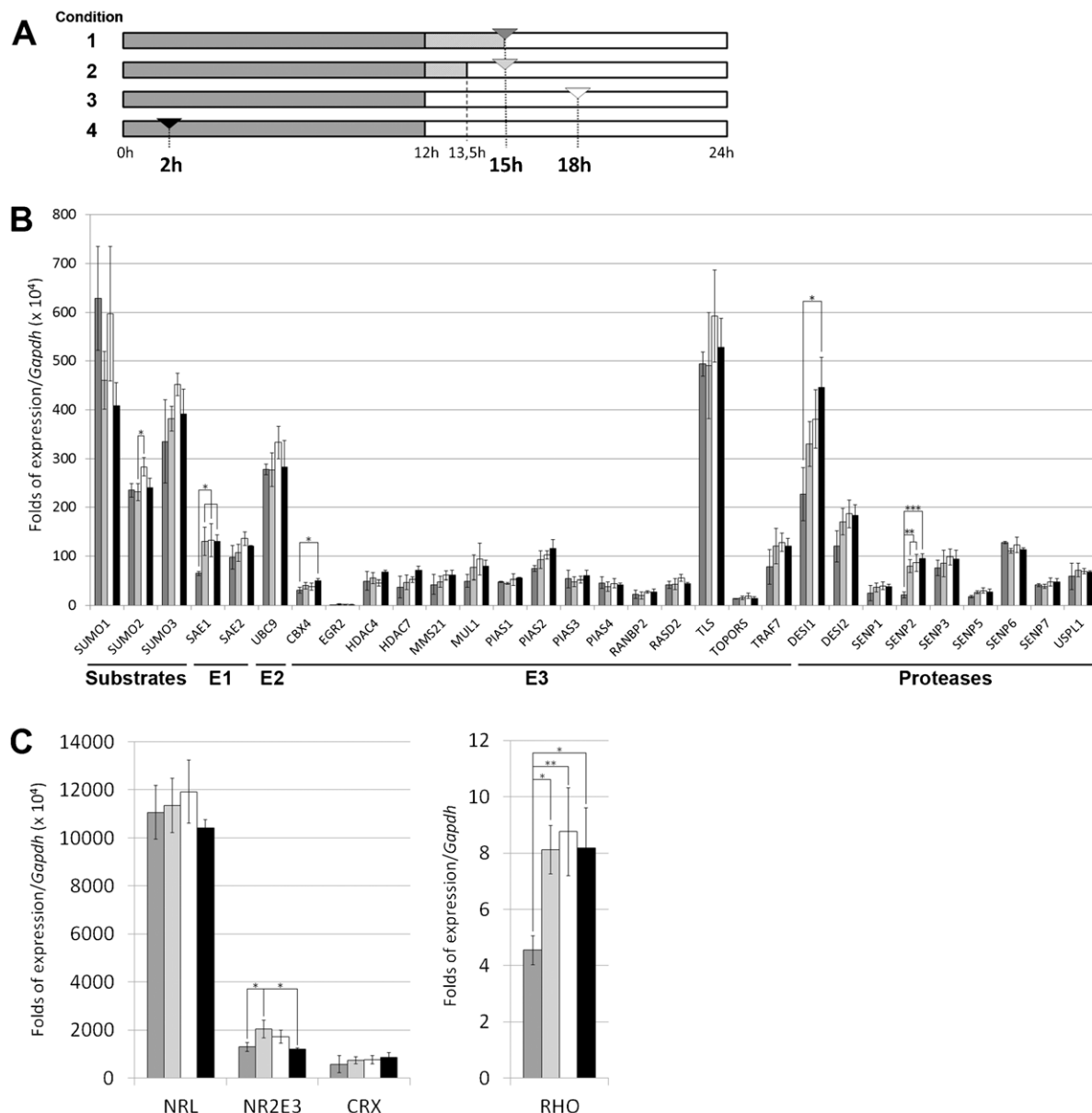


Fig. 1. Quantitative relative expression of genes encoding SUMO substrates, SUMO metabolism and other retinal enzymes in the mouse retina. (A) Scheme showing the four conditions of light/dark cycle (grey versus light blocks, respectively) plus the timing of the retinas dissection, which is indicated by an arrowhead: condition 1 (dark grey) – last dark phase lengthened by 3 h (retinas obtained in the dark); condition 2 (light grey) – last dark phase lengthened by 1.5 h plus 1.5 h of exposition to light (retinas obtained under light); condition 3 (white) – retinas obtained in normal light/dark cycle after 6 h of exposition to light; condition 4 (black) – retinas obtained in normal light/dark cycle after 2 h of exposition to dark. (B) Transcriptional levels of SUMO substrate and SUMO metabolism enzyme genes. Levels are obtained as a ratio with *Gapdh* expression (used for normalization) per 10^4 . (C) Transcriptional levels of some relevant retinal genes. *Rhodopsin* levels (right panel) are as high as *Gapdh*, and the ratio is directly represented, whereas the ratio of transcription factors (left panel) is multiplied per 10^4 , as in B. All bars in B and C are coloured indicating the condition under which the retinas were obtained (as explained in A). Three independent retinal cDNA samples (each sample containing 3 different retinas) were analyzed for each of the four conditions. Thus, per each condition 9 retinas from at least 5 different animals and divided in three different samples, were used. Gene expression values are the average of these three samples per condition, and the s.d. bars indicated the variability of expression in the different individuals. The Tukey-Kramer test was used for the multiple comparisons of the condition means. Asterisks (*, ** or ***) show a statistical significant variation ($p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively). The units of expression are directly comparable among genes, except for *Rho*.

on 10–12.5% SDS-PAGE gels, transferred onto PVDF membranes and blocked with 5% BSA in PBST for 1 h. Primary antibodies (1:500 dilution) against TLS (Biorbyt, Cambridge, UK), CRX (Abnova, Taiwan) and NR2E3 (Abcam, Cambridge, UK) were incubated overnight at 4°C, and then with secondary antibodies (dilution 1:2000) for 1 h. For normalization and quantification, immunodetection (dilution 1:1000)

against either GAPDH (Abcam, Cambridge, UK) or α -Tubulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used. The ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>) was used for quantification of the bands, followed by statistical analysis according to a Student's *t*-test applied after testing for equal s.d. and normal distribution (Bartlett and Shapiro-Wilk tests, respectively).

RESULTS

Expression levels of SUMO and SUMO pathway enzymes in the mouse retina

Given that mouse is one of the animal models of choice to study the retina, and that the human SUMO pathway genes have orthologues in mouse, we aimed to assess the relative mRNA expression levels of all known SUMO metabolism enzymes and provide a preliminary map of their expression pattern in the adult murine retina. Considering that the SUMO pathway is relevant for the regulation of the circadian rhythm, we also addressed whether exposure to light or to darkness caused a transcriptional effect (induction or repression) in the genes of this pathway. We analyzed three independent retinal samples per condition and each sample contained three retinas from different P60 mice reared in 12:12 h LD. In total, per each condition we used 9 retinas from at least 5 different animals, divided in three different samples. The four conditions considered were (Fig. 1A) namely: condition 1 – after 15 h of dark phase (in normal conditions the animals would already have been exposed to daylight for 3 h); condition 2 – after 13.5 h of dark phase followed by 1.5 h of light (to detect quick transcriptional activation/inhibition peaks due to light exposition and compare directly with the previous case); condition 3 – in normal daylight phase (after 6 h of daylight), and finally, condition 4 – in normal dark phase (after 2 h of darkness, to detect transcriptional activation/inhibition due to darkness exposure or darkness circadian phase). In order to distinguish differences in gene expression due to direct light exposition from those generated by circadian rhythmicity, we compared retinas obtained at the same time of the day, after 1.5 h of light exposition (condition 2) compared to the retinas obtained in sibling mice kept during all this time in the dark after the night cycle (condition 1). In these circumstances, any gene whose expression appears modified in the light versus the dark (condition 2 compared to 1) might reflect the effect of light exposition irrespective of the circadian rhythm (which will be the same for the retinas in these two conditions). Conditions 3 and 4 were considered as normal light/dark cycle time-points to illustrate transcriptional values under circadian rhythmicity.

Quantitative RT-PCRs were performed to assess the expression levels for the analysis of 30 genes (the designed primer pairs are listed in supplementary material Table 1), including the reported SUMO E1, E2, E3 ligases and proteases, plus the SUMO substrates (Fig. 1B). Moreover, we also analyzed a highly expressed retinal gene that has been reported to show circadian rhythmicity (*Rho*) (von Schantz et al., 1999), plus three transcription factors that are relevant for cone-rod fate and function and might be sensitive to light/dark conditions (Fig. 1C). Two relevant genes involved in retinal dystrophies, the previously mentioned *Rho* and *Cerkl*, were also included as internal reference threshold values for high and low levels of gene expression in the retina, respectively.

All the values were normalized with respect to the expression of *Gapdh* and multiplied per 10^4 (except for *Rho*, which is expressed four to five orders of magnitude higher), and thus, the relative values of expression can be directly compared. Fig. 1 shows the mean value and the s.d. of three different biological samples per gene and condition, where each sample contained at least 3 retinas. Per gene and sample, every value was obtained by triplicate (average of three technical replicates) to increase data robustness.

The three genes encoding the SUMO1, SUMO2 and SUMO3 substrates were highly expressed. Notably, the gene for the only

E2 enzyme (*Ubc9*) was more highly expressed than the genes coding for the two components of the E1 ligase heterodimer (*Sae1* and *Sae2*). Taken together, the group of E3 ligases and SUMO proteases showed a higher variability in the levels of expression. The most highly expressed E3 ligase gene was *Tls*, in contrast to the basal expression of *Egr2* (around two orders of magnitude lower). Among the deconjugating enzymes, *Desi1* was the most highly expressed, whereas *Senp1* and *Senp5* showed low levels of expression. Concerning the analysis of relevant retinal genes, *Rho* was the most highly expressed, directly comparable to *Gapdh*, followed by *Nrl* and finally *Nr2e3* and *Crx*.

Although most of the gene transcription levels remained unaltered in the different light/dark conditions, a few of them were consistently and significantly altered. As shown in Fig. 2, *Sae1*, *Senp2* and *Rho* (pattern I) showed a quick activation peak when exposed to light (condition 1 versus 2) sustained during the light and early dark phase (conditions 3 and 4). Similarly, *Cbx4* and *Desi1* (pattern II) had a constant increase of expression from condition 1 to 4. The retinal transcription factor *Nr2e3* (pattern III) showed a sharp peak in response to light exposition (condition 2) that steadily decreased to the initial levels (condition 4 and 1). Finally, the expression of *Sumo2* (pattern IV) increased during daylight (third condition) and was slightly lower in the rest of conditions. Although some other behaviour patterns could be observed, the expression values were too variable to be statistically significant (e.g. *Crx* showed a lower transcript level in condition 1 for some samples compared to the rest of conditions, suggesting transcriptional activation when exposed to light).

Spatial expression pattern of the SUMO pathway genes

In order to localize the expression of SUMO substrates and enzymes in the mouse retina, we resorted to *in situ* hybridization as a means to obtain a comprehensive atlas of expression irrespective of the availability of specific and sensitive commercial antibodies for all the set of proteins. Antisense riboprobes (with their corresponding sense riboprobes) were generated for each gene and hybridized on adult (P60) retinal sections obtained during light time (condition 3 of Fig. 1A). *Rhodopsin*, a highly expressed gene in the inner segment (IN) of rod photoreceptors, was used as a positive control. For each gene, the ISH of antisense and sense (negative control) riboprobes were processed in parallel so that the signal obtained was considered

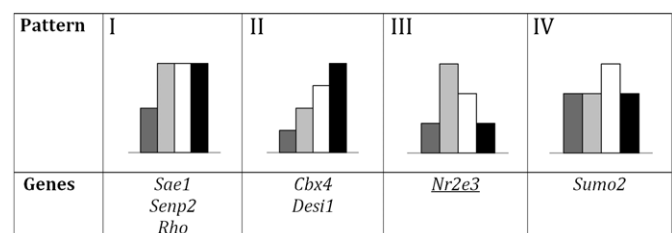


Fig. 2. Classification of the SUMO-pathway and other retinal genes according to their pattern of expression activation/inhibition in mouse under several light-dark conditions. Some SUMO metabolism and other relevant retinal genes were grouped with statistical significance by the similarity in their patterns of expression, according to the qRT-PCR. Note that the first three patterns show an activation by light exposition (condition 1 versus 2) that is further increased (I), maintained (II) or decreased (III) in the following conditions (3 and 4), while pattern IV showed an isolated increase in the third condition. Histogram colouring is as in Fig. 1.

specific for the mRNA localization of every assayed gene, and the relative intensity of the mRNA detection within the same retina for each gene is comparable. Representative *in situ* hybridization images for all the genes are shown in Fig. 3. In addition, a qualitative schematic summary of the mRNA localization data per layer and gene, grouped by expression pattern, is shown in Fig. 4.

The expression of *Sumo1*, *Sumo2* and *Sumo3* was rather ubiquitous, although some differences could be observed. *Sumo1* was highly expressed in the photoreceptors inner segment and in the plexiform layers, and not detected in the GCL, where *Sumo2* showed a high signal; while *Sumo3* expression was not detected in the nuclear layers. Consistent with their instrumental function in the SUMO pathway, the E1 ligase genes, *Sae1* and *Sae2*, and the unique E2 *Ubc9* shared a similar ubiquitous pattern, although *Ubc9* showed a stronger signal in the GCL.

Not unexpectedly, the proteases and E3 ligases showed a wide variety of expression patterns (Figs 3 and 4). The inner segment of photoreceptors showed expression signal for all genes. The signal is particularly high for *Cbx4*, *Desi2*, *Mull1*, *Pias1*, *Pias4*, *Rasd2*, *Senp1*, *Senp7*, *Tls* and *Usp11*. Notably, both outer and inner nuclear layers showed a very similar pattern of hybridization, and perinuclear signal was observed for most genes. *Pias1*, *Senp6* and *Senp7* produced a stronger signal in both ONL and INL, whereas *Tls* only did in the INL. On the contrary, *Pias2* and *RanBP2* produce nearly undetectable signal in both nuclear layers. Remarkably, high mRNA localization signal for most genes was observed in the two plexiform layers, particularly in the outer plexiform layer, in clear contrast with the corresponding sense riboprobes (negative controls). Of note, the GCL rendered a very distinctive pattern of mRNA hybridization, in clear contrast to that observed in the photoreceptor inner segment. The GCL showed high expression of *Cbx4*, *Hdac4*, *Pias3*, *Senp2*, *Senp6*, *Tls* and *Topors*, whereas no – or weak – signal was observed for *Mms21*, *Pias2*, *Pias4*, *RanBP2*, *Rasd2* and *Senp3*.

Considering the pattern produced per genes (Fig. 4), *Pias2* and *RanBP2* mRNA localization was extremely weak in the retina layers with a significant number of nuclei (ONL, INL, GCL). *Tls* mRNA followed a unique pattern and was strongly expressed and localized in the photoreceptors (inner segment), the INL and GCL (Figs 3 and 4). Finally, it might be relevant to note that *Senp2* mRNA was localized nuclear/perinuclearly in some cells at the GCL, a localization that was not observed for any other SUMO-pathway gene mRNA (see black arrows in amplified section in Fig. 3). We selected several genes to perform *in situ* hybridizations in mouse retinas obtained in conditions 1 (dark) and 2 (exposure to light) to compare them with those obtained in condition 3 (light). No detectable changes in the mRNA localization in the retinal cell layers were apparent for the tested genes (data not shown).

Differential gene expression induced by light exposition

To further investigate the possible effect of light induction in gene expression, retinal explants from several individuals were performed, in which after the night cycle one of the retinas remained in the dark (condition 1) while the other was exposed to light for 1.5 h (condition 2). The lysates from the two retinas per animal were electrophoresed and immunodetected simultaneously for direct comparison. The protein levels of TLS (the most highly expressed gene of the SUMO pathway) as well as the transcription factors CRX and NR2E3, which showed a transcriptional activation after light exposition by qRT-PCR,

were analyzed (Fig. 5A). Note that these three proteins produce at least one weak mirror band of higher molecular weight size when immunodetected by Western blot, compatible with post-translational modifications, such as sumoylation (arrowheads in Fig. 5A). In fact, sumoylation of NR2E3 has already been reported (Onishi et al., 2009).

According to our results in retinal explants (n=6 animals), the protein levels of CRX and NR2E3 were different in the dark and light conditions. Remarkably, CRX levels were 1.5 fold higher in the light and NR2E3, 1.8 fold (statistical significance of $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively). TLS instead showed a high variability in the protein expression levels, but no statistically significant differences were found comparing the explants in the two conditions (Fig. 5B). The fold values obtained from comparing the protein levels in the explants of light and dark per animal were also consistent with these results (Fig. 5C), pointing to light induction.

DISCUSSION

Most work on the functional relevance of SUMO has focused on cell cycle, DNA repair and cancer in cultured cells, and data on the inter-dependence of separate components of the SUMO pathway in highly specialized tissues are largely absent. Therefore, reports on the relevance of SUMO in retina are scanty and most of the published findings relate to sumoylation of particular substrates, such as TFs, neurotransmitter receptors or circadian clock regulators. Thus, a systematic descriptive analysis of the SUMO metabolism gene expression in the retina was missing. The present work aims to fill this void, and by reporting mRNA expression profiles and localization in the different adult mouse retinal layers – under four different conditions at several times of the light/dark cycle – provide a useful picture in which to locate the modifier of a protein of interest concerning the complex circuitry of the vision process.

The qRT-PCR detected the expression of all the SUMO substrates and enzymes in the mouse retina. As expected, the genes encoding the substrates, *SUMO1* to 3, showed high expression levels due to their central role in sumoylation. The genes coding for the two E1 ligases, *Sae1* and *Sae2*, known to act as a heterodimer, were comparably expressed; and *Ubc9*, encoding the unique E2 conjugating enzyme, showed one of the highest levels of expression among the analyzed genes. The wide expression range for SUMO E3 ligases and proteases suggest different retinal roles/relevance, as these enzymes display target specificity and in most cases, non-redundancy. The least and the highest expressed SUMO pathway genes were among the E3 ligases: *Egr2* (also known as the transcription factor *Krox20*) and *Tls*, respectively (approximately 3 orders of magnitude difference in mRNA expression levels, arbitrary units, Fig. 1B). In this context, it is worth noting that *Tls* (one of the genes causing amyotrophic lateral sclerosis in human) had been already the focus of previous works in the retina, given that its overexpression led to progressive photoreceptor degeneration in *Drosophila* (Chen et al., 2011), and that TLS is involved in the regulation of the receptor of the NMDA neurotransmitter in rat ganglion retinal cells (Selamat et al., 2009). Other genes previously reported to play relevant roles in this tissue showed comparable medium-low level of expression: *Hdca4*, a promoter of retinal cells survival (Chen and Cepko, 2009); *Topors*, a causative gene of retinitis pigmentosa in humans (Chakarova et al., 2007), and *Pias3*, encoding the SUMO E3 ligase that regulates the repressor function of NR2E3 in mouse cone genes

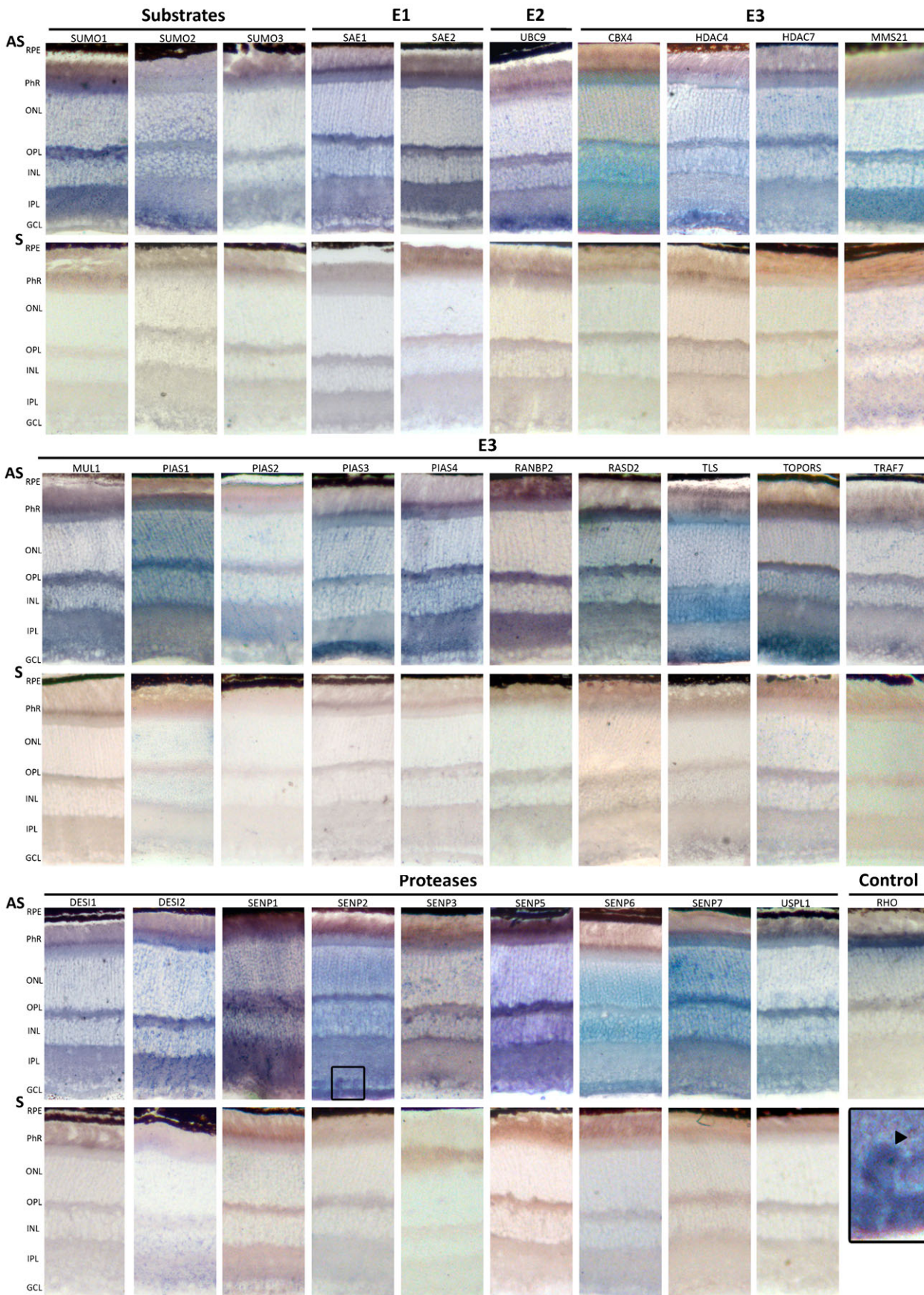


Fig. 3. See next page for legend.

Fig. 3. *In situ* hybridization on murine retina cryosections of the genes encoding SUMO substrates and SUMO E1, E2, and E3 ligases, and proteases. Representative images obtained after the *in situ* hybridization of Antisense (AS) and Sense (S) digoxigenin-labelled riboprobes, stained for the same period of time per each gene. Antisense riboprobes reflect the pattern of gene expression, whereas the sense probes are the corresponding negative controls. The antisense *Rhodopsin* probe, which strongly labels the inner photoreceptor segment, was used as a positive control for the assay. RPE, Retinal Pigment epithelium; PhR, Photoreceptor cell layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, Outer plexiform layer; INL, Inner nuclear layer, IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. The boxed region at the bottom right is an amplification of the *Senp2* *in situ* hybridization at the GCL level. The black arrowheads indicate nuclear/perinuclear mRNA localization.

(Onishi et al., 2009). Finally, the SUMO proteases were more homogeneously expressed, with differences in expression not larger than one order of magnitude. Notably, the more highly expressed proteases corresponded to two newly incorporated genes, *Desi1* and *Desi2* (Shin et al., 2012), indicating that their function might be important in the retina.

Focusing on the three TFs relevant for photoreceptor fate, their levels of expression were higher than the genes of the SUMO pathway, probably due to their central role in regulating genes for photoreceptor function and maintenance. *Crx* and *Nr2e3* showed similar levels of expression, whereas *Nrl* (one of the genes controlling rod fate) was the most highly expressed (around ten folds the expression of *Crx*), consistent with the high number of rods in the murine retina.

Gene expression in the mouse retina had been previously profiled either during embryonic and postnatal retinal

development using serial analysis of gene expression (SAGE) and microarrays (Blackshaw et al., 2004), or comparing the retinal transcriptome of wild-type and *Nrl*^{-/-} mice by next generation sequencing (NGS) (Brooks et al., 2011). These reports focused on the identification of upregulated or downregulated genes during these processes or genetic conditions and, except for *Pias1* and *Pias3* during retinal development, no SUMO pathway gene showed any major difference in its expression. These apparent stasis may be explained by maintenance of the transcription levels during retinal development for most of the SUMO pathway enzymes, or probably, that subtle differences (less than two fold, for instance) might be missed in high-throughput analysis due to very stringent cut-off values, and might stand out in smaller scale and more targeted transcriptional studies, such as the work presented here. Indeed, the regulation of SUMO genes function might also rely on mechanisms other than transcription, such as protein stability or activity regulation by post-translational modifications (e.g. many SUMO pathway enzymes show retroactive and crosstalk regulation by SUMO and ubiquitin (Denuc and Marfany, 2010)).

When focusing on the expression in the four different light/dark conditions, SUMO machinery seemed to remain mainly unaltered. Only *Sumo2*, *Sae1*, *Cbx4*, *Desi1* and *Senp2* showed statistical significant differences in the expression levels in some of the four conditions. SAE1 is known to act as a heterodimer together with SAE2, and the induction of *Sae1* observed after light exposition might reflect a different regulation for these two genes. In the entire set of ligase genes only *Cbx4* showed significant variations, with maximum level of transcription at

Gene	PhR	ONL	OPL	INL	IPL	GCL
PIAS1	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SENP7	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
DESI2	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
MUL1	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SAE2	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SENP1	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
PIAS4	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SUMO1	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
CBX4	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SAE1	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
USPL1	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
RASD2	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
TLS	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SUMO3	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SENP6	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SENP5	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
MMS21	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SENP2	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
DESI1	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
HDAC7	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
PIAS3	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SUMO2	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
UBC9	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
HDAC4	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
SENP3	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
RANBP2	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
TOPORS	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
TRAF-7	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange
PIAS2	Blue	Purple	Green	Red	Grey	Orange

Fig. 4. Summarized graphic representation of the mRNA pattern of the SUMO pathway genes as revealed by *in situ* hybridization on murine retina cryosections. Colour intensity in this figure reflects *in situ* hybridization signal intensity per each gene by direct comparison of the signal rendered in different layers in the same retinal preparation. Intensities are not directly comparable among different genes, as each *in situ* hybridization required different incubation times. For each gene, sense (negative control) and antisense riboprobes were always processed in parallel and following the same incubation times. This graphic interpretation depicts the mRNA positive signal per gene and layer after deducting the corresponding negative signal (if any). Phr, Photoreceptor cell layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, Outer plexiform layer; INL, Inner nuclear layer, IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer.

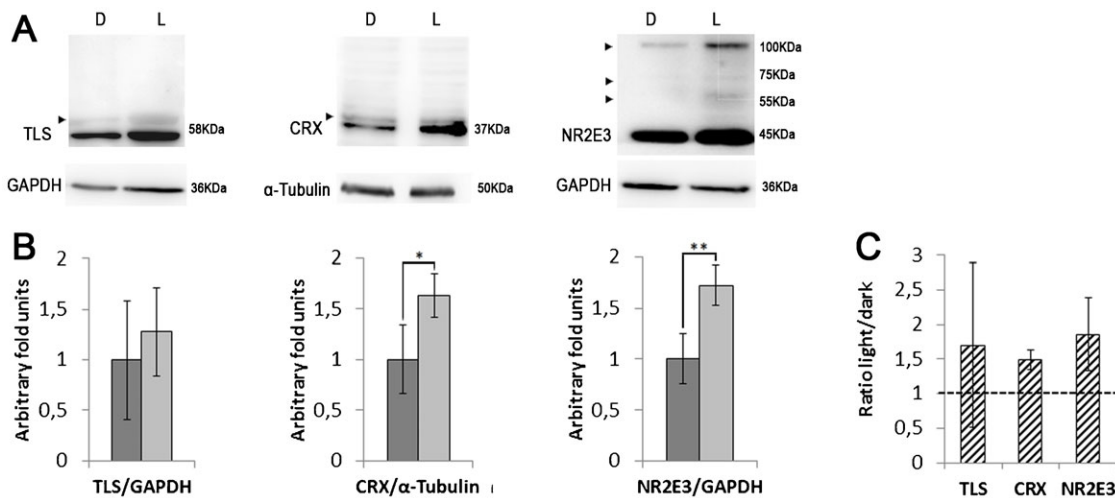


Fig. 5. Immunodetection of several proteins in retinal explants under dark or light conditions. (A) Western blots of TLS, CRX, and NR2E3 in retinal explants of single individuals in which one retina was maintained in the dark (D, condition 1), while the other counterpart was exposed to light for 90 min after dark (L, condition 2). This is a representative image of $n=6$. Immunodetection of GAPDH or α -tubulin was used as a normalization control. Arrowheads indicate higher molecular weight bands compatible with post-translational modifications, such as sumoylation. (B) Protein level quantification of the retinal explants in dark (1) and light (2) conditions (dark and light grey, respectively). Bars indicate s.d. ($n=6$). Fold-induction is in arbitrary units, considering the mean value of the protein level in the dark as 1. Statistical significance is indicated by * ($p<0.05$) and ** ($p<0.01$) according to a Student's t-test, assuming normality (after Bartlett and Shapiro-Wilk tests). (C) Fold induction of the protein expression levels between the light vs dark conditions in the retinal explants from the same animal. For each pair of explants, the expression level in the dark was arbitrarily considered as the unity to allow direct comparison.

night (condition 4), while in the protease group, formed by fewer genes, *Desi1* and *Senp2* were the only ones to show differential expression levels in light versus dark conditions. In summary, four different patterns of expression emerged. One possible explanation for these results would be that sumoylation as a posttranslational modification could be regulating (or regulated by) the response to light exposition.

As the analyzed TFs are direct transcriptional regulators of downstream target genes, the differences in expression due to light exposition might be relevant. A small increase or decrease in their mRNA and protein levels, even their interaction in activating or inhibiting complexes might cause a significant cascade effect for the physiology of the retina. In this context, it is worth noting that the increase in mRNA levels after light exposition has been confirmed for *Crx* and *Nr2e3* by their protein relative levels in retinal explants. The differences in transcription were amplified in both cases at the protein level (for instance *Nr2e3* transcript levels were increased 1.4 fold when comparing condition 2 (light) to 1 (dark), while the protein levels were 1.8 fold higher). On the other hand, no apparent difference in the sumoylation state of the protein NR2E3 could be observed between these two conditions. Further work may reveal the relevance of this increase of expression when the retinas are exposed to light. Finally, *Rho* (whose expression is regulated by the above transcription factors) follows circadian rhythmicity and has been reported to show a sharp transcriptional peak at the starting time of the dark phase (von Schantz et al., 1999). Conditions 3 and 4 in this work overlapped this exact timing and did not exactly coincide with this sharp transcriptional induction. We cannot discard that a similar sharp transcriptional response during daily light/dark cycling went undetected by our analysis in any of the studied genes.

Concerning mRNA localization, *in situ* hybridization is not a direct quantitative assay, nonetheless several signal intensities (high, low and non-detectable signal) were visible for each gene

in the retinal layers (Fig. 4). Most genes showed a ubiquitous signal, including plexiform and nuclear layers, pointing to a basal function in most cells. Notably, all the analyzed genes were expressed in photoreceptors, and the mRNA mainly localized in the inner segment, where most of the translational machinery resides. More remarkable was the detection of high levels of mRNA expression in the plexiform layers, pointing to localization in the synaptic processes and buds (the low resolution of *in situ* hybridization did not allow a more accurate assignment). Although these results should be with some caution until further work refine this localization and its physiological relevance, there are increasing evidences of specific mRNA localization along the axons and in the synapses, forming ribonucleoprotein complexes (RNPs, P-bodies, stress granules, etc.) (Liu-Yesucevitz et al., 2011). The E3 ligase *Pias3* is one of the few SUMO pathway genes previously studied in the retina, and previous reports detected high *Pias3* mRNA expression in developing photoreceptors whereas the signal seemed to decrease in the adult retina (Blackshaw et al., 2004). On the other hand, other reports detected the PIAS3 protein in the GCL and in the photoreceptor outer segment in the mature retina (Dütting et al., 2011), in accordance to its role as a NR2E3 regulator. In this work, we also detected *Pias3* mRNA in the adult retina (P60) throughout all retinal layers but more strongly at the GCL (Figs 3 and 4).

In summary, the wide expression of the SUMO pathway genes and the diversity of detected expression patterns in the different retinal cell layers and light/dark conditions in mouse – added to other previous reports on particular genes and targets – clearly supports sumoylation as a relevant post-translational modification in this tissue. Since one of the emerging concepts is the requirement for simultaneous SUMO conjugation/deconjugation of multiple protein targets involved in the same biological process, within dynamic post-translational complexes (Flotho and Melchior, 2013; Psakhye and Jentsch, 2012), this mRNA expression atlas intends to be a reference framework for retinal

researchers and may contribute to depict a more comprehensive view of the SUMO-regulated processes in the retina.

Acknowledgements

We are indebted to Dr. C. Arenas for advice on data statistical analysis and to M. Esquerdo for technical support.

Competing interests

The authors have no competing or financial interests to declare.

Author contributions

V.A-M., A.G. and G.M. conceived and designed the experiments. V.A-M., E.B.D. performed the experiments. V.A-M., A.G. and G.M. analyzed the data. V.A-M., A.G. and G.M. wrote the paper.

Funding

This study was supported by grants BFU2010-15656 (MICINN); SGR2014-0932 (Generalitat de Catalunya); SAF2013-49069-C2-1-R (MINECO) to G.M. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Blackshaw, S., Harpavat, S., Trimarchi, J., Cai, L., Huang, H., Kuo, W. P., Weber, G., Lee, K., Fraioli, R. E., Cho, S. H. et al. (2004). Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol.* **2**, e247.
- Brooks, M. J., Rajasimha, H. K., Roger, J. E. and Swaroop, A. (2011). Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and *Nrl(-/-)* retinal transcriptomes. *Mol. Vis.* **17**, 3034-3054.
- Chakarova, C. F., Papaioannou, M. G., Khanna, H., Lopez, I., Waseem, N., Shah, A., Theis, T., Friedman, J., Maubaret, C., Bujakowska, K. et al. (2007). Mutations in TOPORS cause autosomal dominant retinitis pigmentosa with perivascular retinal pigment epithelium atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 1098-1103.
- Chen, B. and Cepko, C. L. (2009). HDAC4 regulates neuronal survival in normal and diseased retinas. *Science* **323**, 256-259.
- Chen, Y., Yang, M., Deng, J., Chen, X., Ye, Y., Zhu, L., Liu, J., Ye, H., Shen, Y., Li, Y. et al. (2011). Expression of human FUS protein in *Drosophila* leads to progressive neurodegeneration. *Protein Cell* **2**, 477-486.
- Denuc, A. and Marfany, G. (2010). SUMO and ubiquitin paths converge. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 34-39.
- Dütting, E., Schröder-Kress, N., Sticht, H. and Enz, R. (2011). SUMO E3 ligases are expressed in the retina and regulate SUMOylation of the metabotropic glutamate receptor 8b. *Biochem. J.* **435**, 365-371.
- Flotho, A. and Melchior, F. (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 357-385.
- Garanto, A., Vicente-Tejedor, J., Riera, M., De la Villa, P., González-Duarte, R., Blanco, R. and Marfany, G. (2012). Targeted knockdown of *Cerkl*, a retinal dystrophy gene, causes mild affection of the retinal ganglion cell layer. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1258-1269.
- Hayashi, T., Seki, M., Maeda, D., Wang, W., Kawabe, Y., Seki, T., Saitoh, H., Fukagawa, T., Yagi, H. and Enomoto, T. (2002). Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp. Cell Res.* **280**, 212-221.
- Liu-Yesucevitz, L., Bassell, G. J., Gitler, A. D., Hart, A. C., Klann, E., Richter, J. D., Warren, S. T. and Wolozin, B. (2011). Local RNA translation at the synapse and in disease. *J. Neurosci.* **31**, 16086-16093.
- Matic, I., van Hagen, M., Schimmel, J., Macek, B., Ogg, S. C., Tatham, M. H., Hay, R. T., Lamond, A. I., Mann, M. and Vertegaal, A. C. (2008). In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 132-144.
- Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C. F., Chang, H. M. and Yeh, E. T. (1996). Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J. Immunol.* **157**, 4277-4281.
- Onishi, A., Peng, G. H., Hsu, C., Alexis, U., Chen, S. and Blackshaw, S. (2009). Pias3-dependent SUMOylation directs rod photoreceptor development. *Neuron* **61**, 234-246.
- Pichler, A. and Melchior, F. (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* **3**, 381-387.
- Psakhye, I. and Jentsch, S. (2012). Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* **151**, 807-820.
- Roger, J. E., Nellisery, J., Kim, D. S. and Swaroop, A. (2010). Sumoylation of bZIP transcription factor NRL modulates target gene expression during photoreceptor differentiation. *J. Biol. Chem.* **285**, 25637-25644.
- Sampson, D. A., Wang, M. and Matunis, M. J. (2001). The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* **276**, 21664-21669.
- Schulz, S., Chachami, G., Kozaczekiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P., Hofmann, K., Urlaub, H., Ova, H., Wittbrodt, J. et al. (2012). Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep.* **13**, 930-938.
- Selamat, W., Jamari, I., Wang, Y., Takumi, T., Wong, F. and Fujii, R. (2009). TLS interaction with NMDA R1 splice variant in retinal ganglion cell line RGC-5. *Neurosci. Lett.* **450**, 163-166.
- Seufert, W., Fitcher, B. and Jentsch, S. (1995). Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* **373**, 78-81.
- Shin, E. J., Shin, H. M., Nam, E., Kim, W. S., Kim, J. H., Oh, B. H. and Yun, Y. (2012). DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep.* **13**, 339-346.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H. and Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.* **276**, 35368-35374.
- von Schantz, M., Lucas, R. J. and Foster, R. G. (1999). Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **72**, 108-114.
- Wei, W., Yang, P., Pang, J., Zhang, S., Wang, Y., Wang, M. H., Dong, Z., She, J. X. and Wang, C. Y. (2008). A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 454-459.
- Wilkinson, K. A. and Henley, J. M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem. J.* **428**, 133-145.
- Wilson, V. G. and Rangasamy, D. (2001). Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp. Cell Res.* **271**, 57-65.
- Wright, A. F., Reddick, A. C., Schwartz, S. B., Ferguson, J. S., Aleman, T. S., Kellner, U., Jurklics, B., Schuster, A., Zrenner, E., Wissinger, B. et al. (2004). Mutation analysis of NR2E3 and NRL genes in Enhanced S Cone Syndrome. *Hum. Mutat.* **24**, 439.



ANNEX 2



PUBLICACIÓ 2

TÍTOL

“Expression Atlas of the Deubiquitinating Enzymes in the Adult Mouse Retina, Their Evolutionary Diversification and Phenotypic Roles.”

AUTORS

Esquerdo, Mariona, Grau-Bové, Xavier, Garanto, Alejandro, Toulis, Vasileios, Garcia-Monclús, Sílvia, Millo, Erica, López-Iniesta, Ma José, Abad-Morales, Víctor, Ruiz-Trillo, Iñaki, Marfany, Gemma.

REFERÈNCIA

Esquerdo, M. *et al.* Expression Atlas of the Deubiquitinating Enzymes in the Adult Mouse Retina, Their Evolutionary Diversification and Phenotypic Roles. *PLoS One* **11**, e0150364 (2016).

APORTACIÓ PERSONAL A LA PUBLICACIÓ

L'aportació personal a aquesta publicació ha estat la posada a punt de les tècniques de RT-qPCR i hibridació *in situ*, tècniques que es van realitzar també en la primera publicació.

RESEARCH ARTICLE

Expression Atlas of the Deubiquitinating Enzymes in the Adult Mouse Retina, Their Evolutionary Diversification and Phenotypic Roles

Mariona Esquerdo¹, Xavier Grau-Bové^{1,2}, Alejandro Garanto^{1^{ma}}, Vasileios Toulis¹, Sílvia Garcia-Monclús^{1^{mb}}, Erica Millo¹, Ma José López-Iniesta^{1,3}, Víctor Abad-Morales¹, Iñaki Ruiz-Trillo^{1,2,4}, Gemma Marfany^{1,3,5*}

1 Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Institut de Biologia Evolutiva (CSIC- Universitat Pompeu Fabra), Barcelona, Spain, **3** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain, **4** Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain, **5** Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

^{ma} Current address: Radboud University Medical Center, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Department of Human Genetics, Nijmegen, The Netherlands

^{mb} Current address: Sarcoma research group, Molecular Oncology Lab, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

* gmarfany@ub.edu



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Esquerdo M, Grau-Bové X, Garanto A, Toulis V, Garcia-Monclús S, Millo E, et al. (2016) Expression Atlas of the Deubiquitinating Enzymes in the Adult Mouse Retina, Their Evolutionary Diversification and Phenotypic Roles. PLoS ONE 11 (3): e0150364. doi:10.1371/journal.pone.0150364

Editor: Alfred S Lewin, University of Florida, UNITED STATES

Received: November 10, 2015

Accepted: February 12, 2016

Published: March 2, 2016

Copyright: © 2016 Esquerdo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by grants BFU2010-15656 (MICINN) and SAF2013-49069-C2-1-R (MINECO) to G.M., and 2014SGR-0932 (Generalitat de Catalunya) grant (BFU-2011-23434) from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and co-funded by the Fondo Europeo de Desarrollo regional (FEDER) to I.R.-T. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Ubiquitination is a relevant cell regulatory mechanism to determine protein fate and function. Most data has focused on the role of ubiquitin as a tag molecule to target substrates to proteasome degradation, and on its impact in the control of cell cycle, protein homeostasis and cancer. Only recently, systematic assays have pointed to the relevance of the ubiquitin pathway in the development and differentiation of tissues and organs, and its implication in hereditary diseases. Moreover, although the activity and composition of ubiquitin ligases has been largely addressed, the role of the deubiquitinating enzymes (DUBs) in specific tissues, such as the retina, remains mainly unknown. In this work, we undertook a systematic analysis of the transcriptional levels of DUB genes in the adult mouse retina by RT-qPCR and analyzed the expression pattern by *in situ* hybridization and fluorescent immunohistochemistry, thus providing a unique spatial reference map of retinal DUB expression. We also performed a systematic phylogenetic analysis to understand the origin and the presence/absence of DUB genes in the genomes of diverse animal taxa that represent most of the known animal diversity. The expression landscape obtained supports the potential sub-functionalization of paralogs in those families that expanded in vertebrates. Overall, our results constitute a reference framework for further characterization of the DUB roles in the retina and suggest new candidates for inherited retinal disorders.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Ubiquitination is a dynamic regulatory mechanism that controls cell processes such as protein quality control (via proteasome degradation), cellular signalling, transcriptional regulation or DNA repair [1–3]. As ubiquitination is reversible, cells deploy a large set of enzymes to conjugate (E1, E2 and E3 ligases) and deconjugate (deubiquitinating enzymes) ubiquitin moieties [4]. The human genome contains several hundreds of ubiquitin ligases, and close to 80 deubiquitinating enzymes (DUBs), indicating that: i) ubiquitination is a highly regulated process, and ii) substrate recognition specificity is inherent to the system.

Most data on the physiological relevance of ubiquitin has focused on its role as the tag molecule to target substrates to proteasome degradation, its role in cell cycle control and cancer, as well as its involvement in the molecular basis of neurodegenerative disorders [5,6]. Besides, a number of high-throughput approaches have focused on finding substrates for either ligases [7] or deubiquitinating enzymes (DUBs) [8]. Nonetheless, most high-throughput studies have been performed *in vitro* using mammalian cell cultures, and only recently, systematic assays in animal models have indicated the relevance of the ubiquitin pathway in the development, differentiation and maintenance of tissues and organs [9,10].

One of the tissues that requires a tight gene and protein regulation is the retina. The retina consists of structured layers of highly specialized neurons in the eye that capture and process light stimuli enabling vision [11]. Such a fine architecture turns retinal differentiation into an extremely complex mechanism that must be accurately regulated [12], and in which ubiquitin and ubiquitination play a relevant role. In fact, mutations in the genes encoding the E3 ligases TOPORS [13–15] and KLHL7 [16,17]; and in PRPF8, which belongs to the JAB1-MPN--MOV34 (JAMM) family of DUBs, are causative of the most prevalent retinal hereditary dystrophy, retinitis pigmentosa (RP). Moreover, protein homeostasis via the ubiquitin-proteasome system is also relevant to other retinal diseases and specific altered protein degradation has been associated to Stargardt's disease, age-related macular degeneration, glaucoma, diabetic retinopathy, and retinal inflammation (reviewed in [18]).

Lately, DUBs are becoming the focus of attention given that their specificity in substrate selection makes them key checkpoints of protein degradation and fate. Moreover, their fewer numbers (compared to E2 and E3 ligases) makes their functional analysis more feasible. An increasing number of reports propose DUBs as pharmacological targets in disease: cancer [19–21] and neurodegenerative diseases [6]. DUBs are classified into five different subfamilies depending on their catalytic domains [22]: Machado-Joseph Disease protein domain proteases (MJD), Ovarian Tumor proteases (OTU), Ubiquitin C-Terminal Hydrolases (UCH) and Ubiquitin-Specific Proteases (USP) are cysteine proteases, whereas JAB1/MPN/MOV34 family proteases (JAMM) are Zn²⁺ metalloproteases; overall adding up to 90 genes in the human genome, of which only 79 are predicted to be functional [1].

A recent review compiled the gathered knowledge of the functional roles of individual DUBs, focusing on their subcellular localization, levels of expression in human tissues, and gene mutation phenotype in human and model organisms [23], yet a comprehensive study on the expression pattern of DUBs in highly specialized tissues, such as the retina, has not been performed. Besides, previous comparisons of DUB mutant phenotypes in different model organisms attempt to directly assign, without a phylogenetic framework, orthology and function between invertebrate and vertebrate genes. Some of these assignments may need revision under robust phylogenetic data, since ubiquitin ligase and protease families have expanded in eukaryotes [24], and subfunctionalization and neofunctionalization are known to occur after gene expansion.

Thus, we here aimed to draw an expression pattern map for DUB genes in the mouse retina, by using RT-qPCR, *in situ* hybridization and immunohistochemistry. We have also applied comparative genomics to infer the basic protein domain architecture within the DUB subfamilies and illustrate their diversification within metazoans. These data combined with the reported phenotypes will help to identify relevant retinal genes and potential new candidates for retinal diseases. Overall, we provide a comprehensive reference framework on DUB function and their roles in neuronal tissues that will be useful for future functional and evolutionary studies.

Material and Methods

Ethics statement

All procedures in mice were performed according to the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, as well as the regulations of the Animal Care facilities at the Universitat de Barcelona. The protocols and detailed procedures were evaluated and approved by the Animal Research Ethics Committee (CEEA) of the Universitat de Barcelona (our institution), and were submitted and also approved by the Generalitat de Catalunya (local Government), with the official permit numbers DAAM 6562 and 7185.

Animal handling, tissue dissection and preparation of samples

Murine retina samples and eye slides were obtained from 2 month-old C57BL/6J (wild-type) and CD-1 (albino) animals. Animals were euthanized by cervical dislocation. Some retinas were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen, while the rest were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 2 h at room temperature (RT), washed, cryoprotected overnight in acrylamide at 4°C, embedded in O.C.T. (Tissue-Tek, Sakura Finetech, Torrance, CA), frozen in liquid nitrogen and sectioned at -17°C.

RNA extraction and cDNA synthesis

For each sample, retinas from three different animals were pooled. Therefore, up to 9 animals in three independent replicates were analyzed. Retinas were homogenized using a Polytron PT 1200 E homogenizer (Kinematica, AG, Lucerne, Switzerland). Total RNA was extracted using the High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) following the manufacturer's instructions with minor modifications (increasing the DNase I incubation step). Reverse transcription reactions were carried out using the qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta Biosciences) following the manufacturer's protocol.

RT-qPCR

Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was performed using the LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science) and a LightCycler[®] 480 Multiwell Plate 384. The final reaction volume was 10 μ l. Raw data was analyzed with the LightCycler[®] 480 software using the Advanced Relative Quantification method. *Gapdh* expression was used to normalize the levels of expression. *Rho* and *Cerkl* were considered as reference genes with high and low levels of expression, respectively, in the mouse retina. Three independent samples replicates were analyzed for each gene. Differences in gene expression levels within the same sample and between the samples were directly compared by their Z-score values. The mean and standard deviation of the Z-scores are plotted in [Fig 1](#). The name and sequence of all the primers used for RT-qPCR and *in situ* hybridization are listed in [S1 Table](#).

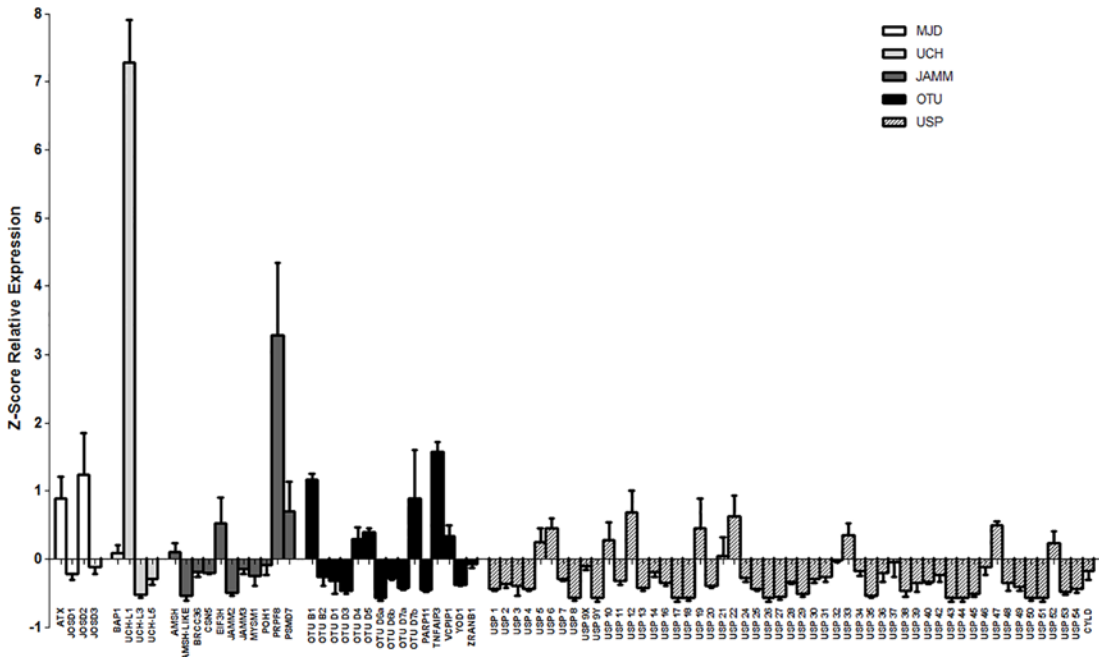


Fig 1. Relative expression levels of the five subfamilies of DUB enzymes. Gene expression values are the average of three independent samples (measured in three replicates), each sample contained retinas from three individuals. The expression levels are obtained as a ratio with *Gapdh* expression (used for normalization) per 10^4 . The Z-score has been calculated for the whole set of genes per each sample, and mean and standard deviation has been obtained, so that the results can be directly compared among them. Negative values indicate when genes are expressed below the global mean of the gene expression obtained in the analysis, and positive values when genes are more highly expressed. To simplify the comparison, the graph starts at the negative values, being 0 the mean value of gene expression for the whole set of genes (87 in total) in each sample. **JAMM**- JAB1/MPN/MOV34 motif proteases; **MJD**- Machado-Joseph Disease protein domain proteases; **UCH**- Ubiquitin C-Terminal Hydrolases; **OTU**- Ovarian Tumor proteases; **USP**- Ubiquitin-Specific Proteases.

doi:10.1371/journal.pone.0150364.g001

In situ hybridization

For *in situ* hybridization (ISH), 16–18µm sections were recovered on commercial Superfrost Plus glass slides (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), dried 1 h at RT, rinsed three times for 10 min with phosphate-buffered saline (PBS), treated with 2 µg/ml proteinase K for 15 min at 37°C, washed twice for 5 min with PBS, and fixed with 4% PFA. Acetylation with 0.1 M triethanolamine-HCl (pH 8.0) containing first 0.25%, and then 0.5% acetic anhydride, was performed for 5 min each. Hybridization was carried out overnight at 55°C with digoxigenin-labelled riboprobes (2 µg/ml) in 50% formamide, 1 x Denhardt's solution, 10% dextran-sulfate, 0.9 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM NaH_2PO_4 , and 1 mg/ml yeast tRNA. For each gene, cDNA fragments generated by RT-PCR of approximately 400-700bp were subcloned into the pGEM-T[®] Easy Vector (Promega) and sense and antisense riboprobes were generated from the flanking T7 RNAPol promoter. The name and sequence of all the primers used for RT-qPCR and *in situ* hybridization are listed in [S1 Table](#).

After hybridization, the slides were washed in 2x SSC for 20 min at 55°C, equilibrated in NTE (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA) at 37°C, and then treated with 10 µg/ml RNase A in NTE at 37°C for 30 min. Subsequently, the sections were washed at 37°C in NTE for 15 min, twice in 2x SSC and 0.2x SSC for 15 min each, equilibrated in Buffer 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), and blocked in Blocking Buffer (1% BSA and 0.1% Triton X-100 in buffer 1) for 1 h at RT. An anti-digoxigenin-AP conjugate antibody (1:1000; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) in Blocking Buffer was incubated overnight at 4°C. The sections were then washed twice in Buffer 1 for 15 min, once in Buffer 2 (100 mM Tris-HCl pH

9.5, 150 mM NaCl), and once in Buffer 2 supplemented with 50 mM MgCl₂ (5 min each) prior to adding the BM Purple AP Substrate (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). For each gene, antisense and sense ISH staining reactions were processed in parallel. The reaction was stopped in 1x PBS. Sections were cover-slipped with Fluoprep (Biomérieux, France) and photographed using a Leica DFC Camera connected to a Leica DM IL optic microscope (Leica Microsystems, Germany).

Fluorescent immunohistochemistry

For retina immunofluorescence, 16 μm sections were recovered on commercial Superfrost Plus glass slides (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), dried 30–45 min at RT, washed 10 min with PBS and blocked for 1 h with Blocking Buffer (2% Sheep Serum and 0.3% Triton X-100, in PBS 1x). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C with Blocking Buffer. After incubation, slides were washed with PBS (3 x 10 min) and treated with DAPI (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) (1:300) and with secondary antibodies conjugated to either Alexa Fluor 488 or 561 (Life Technologies, Grand Island, NY) (1:300). After secondary antibody incubation slides were washed again in PBS (3 x 10min). Sections were mounted in Fluoprep and analyzed by confocal microscope (SP2, Leica Microsystems).

Primary antibodies and dilutions used were: 1:50 Rabbit anti-JOSD2 (Aviva Systems Biology); 1:50 Rabbit anti-JOSD3 (Aviva Systems Biology), 1: 50 Rabbit anti-ATXN3 (in house, a gift from Dr. S. Todi); 1:20 Rabbit anti-BAP1 (Abcam); 1:100 Rabbit anti-OTUD4 (Abcam ab106368), 1:100 Rabbit anti-PRPF8 (Abcam ab79237), 1:100 Rabbit anti-TNFAIP3 (Abcam ab74037), 1:100 Rabbit anti-UCHL3 (Abcam ab126703), 1:100 Rabbit anti-USP9X (Abcam ab19879), 1:100 Rabbit anti-USP13 (Abcam ab109264), 1:50 Rabbit anti-USP16 (Abcam ab135509), 1:100 Rabbit anti-USP22 (Abcam ab4812), 1:300 Rabbit anti-USP25 (in house), 1:250 Rabbit anti-USP28 (ABGEN AP2152b). 1:500 for Mouse anti-Rhodopsin (Abcam, Cambridge, UK). Antibodies against AMSH (Biorbyt orb101007), JAB1 (Abcam ab12323), OTUB1 (Abcam ab76648), OTUD1 (Abcam ab122481), POH1 (Abcam ab8040), USP5 (Abcam ab154170) and USP45 (Novusbio H00085015) did not produce reproducible results.

Phylogenetic analyses

Protein sequences from each enzyme group were queried in complete genome sequences of 14 animal taxa (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Danio rerio*, *Petromyzon marinus*, *Branchiostoma floridae*, *Saccoglossus kowalevskii*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Drosophila melanogaster*, *Daphnia pulex*, *Caenorhabditis elegans*, *Lottia gigantea*, *Capitella teleta*, *Nematostella vectensis* and *Acropora digitifera*) using the HMMER 3.1 algorithm. For each analyzed enzyme family (USP, UCH, OTU, MJD and JAMM) we searched all proteins containing the Hidden Markov motifs of their catalytic region as defined in Pfam (UCH/UCH_1, Peptidase_C12, OTU/Peptidase_C65, Josephin and JAB domains, respectively). Protein domain architectures of each retrieved protein were then computed using Pfamscan 1.5 and Pfam 27 database [25] of protein domains.

We aligned the catalytic region of each enzyme family using Mafft 7 L-INS-i [26] (optimized for local sequence homology), and inspected each alignment matrix manually. The most suitable evolutionary model for the analyses, selected with ProtTest 3.4 [27], was LG+ Γ. We used RaxML 8.1.1 [28] to infer Maximum Likelihood trees of each family, with 100 bootstrap replicates as statistical supports. Complete sequences, alignments and phylogenies are provided in [S1–S3 Files](#). Manual inspection of the trees allowed us to identify subfamilies, named after their human orthologs, based on their bootstrap support and conservation of protein domain architectures.

Results

Expression level of deubiquitinating enzymes in the mouse retina

A RT-qPCR was performed on mouse neuroretinas to assess the expression levels of the whole set of 87 mouse genes that encode the deubiquitinating enzymes belonging to the five aforementioned families (11 JAMM, 4 MJD, 15 OTU, 4 UCH, and 53 USP genes). Two reference genes, *Rhodopsin* and *Cerkl*, were included in the analysis due to their previously reported high and low levels of expression in the mouse retina, respectively [29]. The relative expression levels have been normalized to the expression of *Gapdh*, and the Z-score was calculated for the whole set of genes per each sample, so that they could be directly compared among them and between different samples. The results (mean and standard deviation of the Z-scores per each gene) are plotted in Fig 1, ordered by DUB family. A Z-score of zero indicates the mean value of expression for all the DUBs analyzed in the retina. Thus, genes with positive values have an expression above the mean, whereas genes with negative values show less expression than the mean (e.g. most USP genes).

The results showed that *Prpf8* was the highest expressed gene from the JAMM subfamily, followed by *Eif3h* and *Psmc7*. Both *Atxn3* and *Josd2* rendered the highest expression levels within the MJD subfamily. Concerning the OTU subfamily, *Otub1* and *Tnfaip3* produced the higher expression levels, followed by *Otud7b*, *Vcpi1*, *Otud4* and *Otud5*; whereas the levels of *Otud6a* were considered as negligible. *Uchl1* was the most highly expressed gene from the UCH family (and also with respect to all DUB genes), while *Uchl3* and *Uchl5* are lowly expressed in the retina. Finally, the genes from the large USP subfamily showed the lowest level of expression among all the DUB genes. Some USPs (20%) were highly expressed and showed positive Z-scores (*Usp5*, *Usp6*, *Usp10*, *Usp12*, *Usp19*, *Usp21*, *Usp22*, *Usp33*, *Usp47* and *Usp52*) whereas 25% of the USPs showed lower levels than the mean (*Usp8*, *Usp9Y*, *Usp17*, *Usp18*, *Usp26*, *Usp27*, *Usp29*, *Usp35*, *Usp43*, *Usp44*, *Usp45*, *Usp50*, and *Usp51*) (Fig 1).

Expression map of the DUBs in the mouse retina

Once the expression levels of all the DUB family members were assessed, we characterized and compared their expression pattern within the different layers of the mouse retina. We first decided to detect gene expression by mRNA localization using *in situ* hybridization (ISH) and then performed fluorescent immunohistochemistry of selected proteins.

For ISH, antisense (AS) riboprobes against a large group of DUBs were used on mouse retinal cryosections (Fig 2). As negative controls, the corresponding sense riboprobes (S) of each gene were generated and hybridized in parallel using the same conditions (see S1 Fig). The staining time was adjusted for each set of antisense/sense riboprobes so that a maximum signal was obtained in the antisense retinal sections with minimum background in the sense counterparts (for instance, *Prpf8* and *Tnfaip3* in situ stained in much less time than *Uchl5*, *Usp8* and *Usp18*, which required half a day). *Rhodopsin* was used as a positive control because of the reported high expression in the retina and its well-known localization in the inner segment of the photoreceptors. The large USP subfamily contains 57 members in the mouse genome but only a set of genes was considered for ISH. Representative ISH results are displayed in Fig 2. Our selection criteria included genes with relevant ocular phenotypes in systematic knockdown analyses of DUBs in *Drosophila* [9] and zebrafish [30].

Most DUBs are expressed ubiquitously throughout the layers of the murine retina, which would be compatible with a general role in the neuronal cell metabolism and regulation and thus, not restricted to particular retinal neurons. Nonetheless, specific patterns of expression were detected for particular DUBs. For instance, a strong hybridization signal in the plexiform

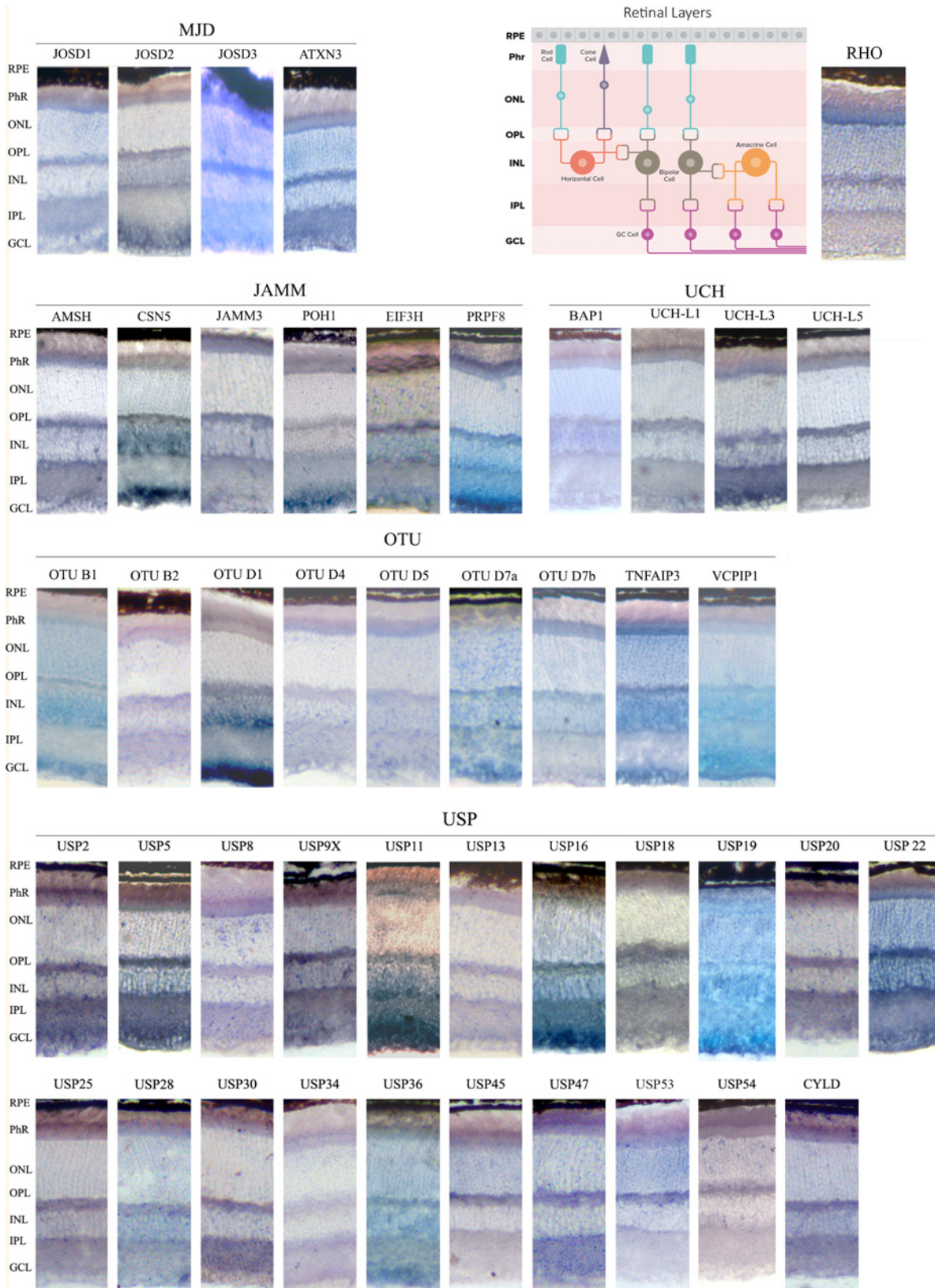


Fig 2. *In situ* hybridization of genes encoding DUB enzymes on retinal cryosections. Sections from wild-type C57BL/6J mouse retinas were hybridized using digoxigenin-labelled antisense riboprobes. Their corresponding sense riboprobes (negative controls) stained for the same length of time (lower panels in each row) are in the [S1 Fig](#). The antisense *Rhodopsin* probe, which strongly labels the inner photoreceptor segment, was used as a positive control for the assay. **RPE**- Retinal pigmented epithelium; **Phr**- Photoreceptor cell layer; **ONL**- Outer nuclear layer; **OPL**- Outer plexiform layer; **INL**- Inner nuclear layer, **IPL**- Inner plexiform layer; **GCL**- Ganglion cell layer.

doi:10.1371/journal.pone.0150364.g002

layers was observed for *Uchl3*, *Uchl5*, *Usp2*, *Usp9X*, including in some cases the inner segment of the photoreceptor layer, as detected for *Amsh*, *Josd3*, *Atxn3* and *Usp47*. Some DUBs appear to be highly expressed in the GCL (*Csn5*, *Poh1*, *Prpf8*, *Josd2*, *Otud1*, *Vcpip1*, *Usp11*, *Usp5* and *Usp19*) in contrast to the pattern generated by *Usp8*, *Usp13*, *Usp30*, *Usp45* and *Usp54*, which yielded virtually no mRNA localization signal in the ganglion cells.

Several DUB genes of the USP family (*Usp5*, *Usp13*, *Usp19* and *Usp34*) were previously reported to be differentially expressed in the Retinal Pigmented Epithelium (RPE) by transcriptome analysis [31]. To assess their specific pattern of expression, and given that pigmented cells mask positive hybridization signals, we also performed ISH on albino retinas from CD-1 mice ([S2 Fig](#)). Although these four genes are expressed in this non-neuronal layer, their expression is not restricted to the RPE. In fact, *Usp5* and *Usp19* are very highly expressed throughout the retina ([Fig 2](#)). Comparison of the retinal expression pattern for these four genes did not show any detectable difference between C57BL/6J (wild-type black) and CD-1 (albino) mice strains.

Several genes, namely *Amsh-like*, *Brcc36*, *Jamm2*, *Mysm1* and *Psmc7* (JAMM group) and *Otud3*, *Yod1*, *Zranb1* (OTU group), did not render reproducible and reliable ISHs, even though several riboprobes spanning different gene regions were used. In most cases (e.g. *Amsh-like*, *Brcc36*, *Jamm2*, *Mysm1*, and *Otud3*) we obtained very low levels of expression and the signal was too faint to be distinguished from the negative control (sense riboprobe), or the sense and antisense riboprobes both produced signals of similar intensity. The ISH results of these genes are not included here.

Taking the ISH results together, we drew an atlas of expression for DUBs in the retina of adult mouse. In general, all analyzed genes except *Otud1* are expressed in the photoreceptors, and their mRNAs are localized in a wide range of intensities in the inner segment (perinuclearly) and the outer plexiform layer. Among layers, the GCL showed the most different pattern of gene expression. Notably, some DUBs, such as *Usp45*, *Usp53* and *Usp54*, are only detected in photoreceptors (PhR -inner segments, ONL (photoreceptor nuclei and perinuclei) and OPL (photoreceptor synapsis), whereas nearly no hybridization could be detected in the rest of retinal layers, which would suggest specific roles for these DUBs in this highly specialized photosensitive cells.

These ISH results prompted us to confirm and define more accurately protein localization within the retinal cell layers by fluorescent immunohistochemistry, since in cells with a highly specialized morphology, mRNA and protein localization might be different (e.g. the mRNA of rhodopsin is localized in the ribosome-rich photoreceptor inner segment whereas the protein is highly abundant in the membranous disks of the outer segment). We selected a group of DUBs for immunohistochemistry based on: i) particular ISH patterns, ii) relevance for eye phenotype in animal models, iii) putative functional diversification in phylogenetically closely related enzymes (see next section), and iv) antibody commercial availability and affinity. We selected 21 DUBs (the list of genes is detailed in the Material and Methods), of which 14 immunodetections rendered a reproducible and reliable signal ([Fig 3](#) and [S3 Fig](#)).

Overall, the immunodetection confirms the ISH results since protein is detected in the same retinal cells than mRNA ([Fig 3](#)). Comparing RT-qPCR to ISH and immunohistochemistry results, high levels of retinal expression correlated with a ubiquitous expression pattern.

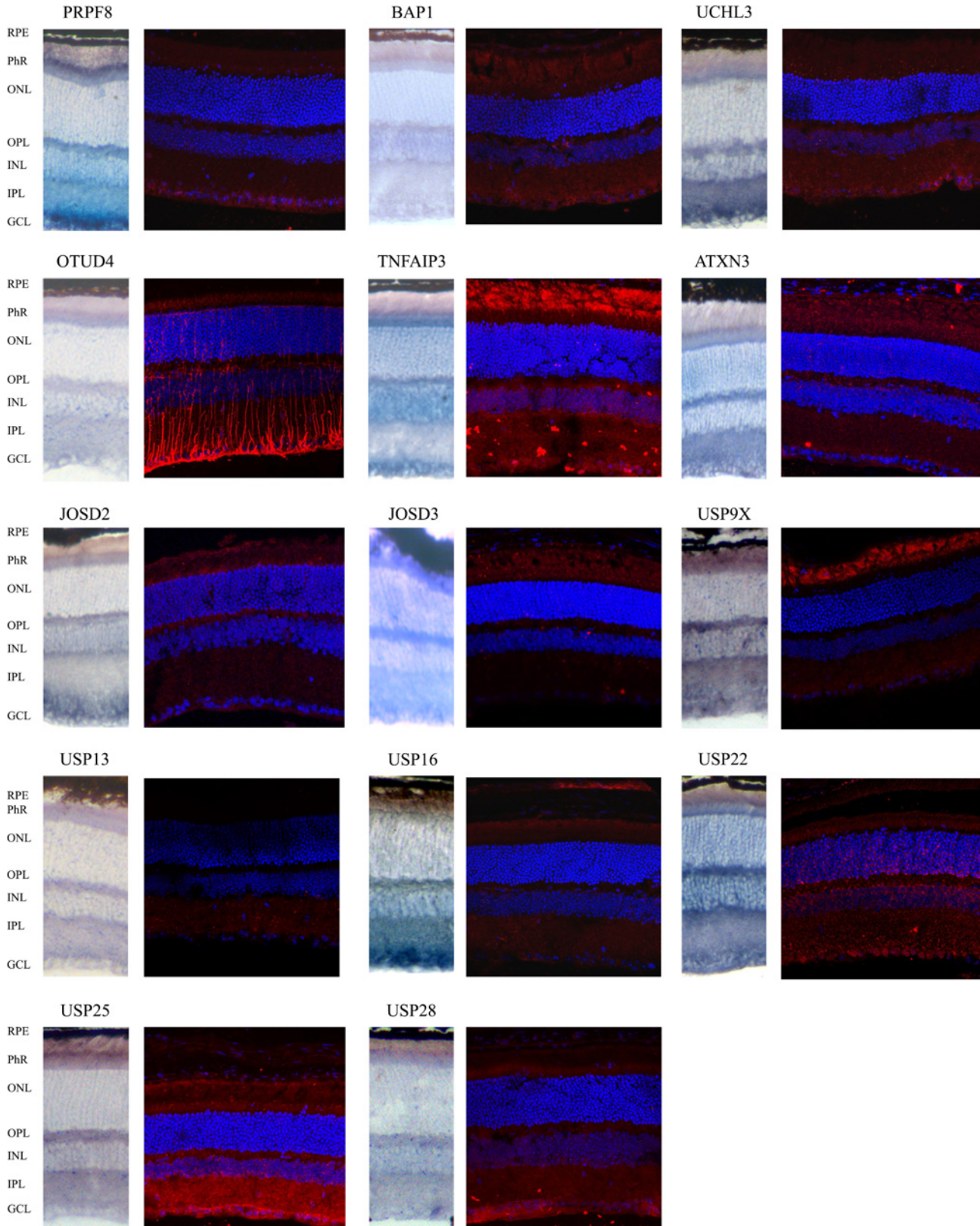


Fig 3. Comparison of mRNA and protein immunodetection of selected DUBs in mouse retinal cryosections. Most analyzed genes render a consistent expression pattern when comparing mRNA and protein localization in the wild type mouse retina. The merge immunohistochemistry show DUBs immunodetected in red, and nuclei counter-staining with DAPI (in blue). Details in [S3 Fig](#). **RPE**- Retinal pigmented epithelium; **Phr**- Photoreceptor cell layer; **ONL**- Outer nuclear layer; **OPL**. Outer plexiform layer; **INL**- Inner nuclear layer, **IPL**- Inner plexiform layer; **GCL**- Ganglion cell layer.

doi:10.1371/journal.pone.0150364.g003

Besides, some protein locations are worth mentioning as indicative of distinct functions in specific cellular compartments. For instance, OTUD4 is strongly detected in the axonal processes of bipolar and other retinal cells, supporting its involvement in neurodegeneration in human [32]. USP25 is mainly detected in the inner plexiform and ganglion cell layer; while USP9X and TNFAIP3 are particularly detected (but not exclusively) at the outer photoreceptor segment. Besides, USP22 is localized in the nucleus of ganglion cells, and perinuclearly in the rest of retinal neurons. For details, merge and separate immunodetection images, see [S3 Fig](#).

DUB phylogenetic analysis, protein domain architecture and neuronal phenotypes

To provide a rational framework for gene expression patterns in extended families, it is crucial to have an understanding of the origin and phylogenetic closeness between the different DUB genes. Therefore, we performed a bioinformatic survey of DUB protein sequences across animal taxa. A recent phylogenetic analysis of the ubiquitin system across eukaryotes already showed that a massive expansion of ubiquitin ligases and proteases, which involves innovation and incorporation of new protein domains, occurred at the origin of animal multicellularity [24]. This was likely associated with the diversity of proteins and protein roles in different cell types. We here provide a comprehensive picture of the DUB families during the diversification of metazoans, related to previously described neuronal function, with an emphasis on eye and retinal phenotype.

Completely sequenced genomes from 14 species (from cnidarians to vertebrates) were queried with the catalytic region of each enzyme family (as defined in Pfam) in search of orthologs. Phylogenetic trees were generated using the retrieved sequences, and the statistical support for each node is also indicated ([Fig 4A, 4B, 4C, 4D and 4E](#)). For the sake of clarity, protein nomenclature is according to human DUBs. Highly similar sequences that expanded recently (during the pre-vertebrate/vertebrate expansion) and clustered together appear collapsed. The presence of an identified ortholog in each species/clade is represented with a black dot. Vertebrate species that present all the paralogs in a collapsed branch are circled in black. White dots mark the presence of homologs that could not be confidently assigned to a characterized DUB type, either because they are sister-group to various known DUB paralogs (and therefore represent the pre-duplication homolog), or because statistical support is too low to confidently cluster them with a specific ortholog. Question marks represent statistically supported clades that cannot be assigned to any known DUB (or group of paralogous DUBs). Protein motifs (as defined in Pfam) including the catalytic domain are drawn next to each branch to illustrate the diversity/conservation in protein architecture within each family. For detailed and complete phylogenetic trees, see [S3 File](#).

Notably, the phylogenetic distribution of OTU DUBs reveals two different groups that appeared at the origin of eukaryotes OTUs with peptidase C65 domains (OTUB1 and OTUB2 in animals) and those with OTU domain [24] ([Fig 4D](#)). Given that i) these two catalytic domains diverged long before the origin of metazoans, ii) OTUB1/B2 protein domain architectures are clearly different from the other OTUs, iii) OTUB homologs are present in all metazoan clades, and iv) this split does not occur in any other family of DUBs, a new classification might be in order to acknowledge a new subfamily of DUBs.

Fig 4. Phylogenetic analysis of DUB genes and neuronal/retinal phenotype. Protein sequences from the catalytic region of each enzyme group were queried in complete genome sequences of 14 animal taxa and aligned. The protein domain architectures including the catalytic and accessory domain motifs are represented next to each DUB member (A, JAMM; B, MJD; C, OTU; D, UCH; and D, USP). Black dots indicate presence of the ortholog, whereas white dots indicate homologs that cannot be confidently assigned to a DUB type (see [Results](#)). Question marks represent statistically supported clades of uncharacterized DUBs. DUB sequences that are highly similar and cluster closely together appear collapsed under a common name. In general, invertebrates have a single representative member of the collapsed branch, whereas vertebrate genomes show one member of each paralog (species circled in black). *Acropora digitifera* USP homologs were excluded from the analysis as they impaired the resolution of the USP phylogeny. Genes reported to produce an abnormal neuronal phenotype when mutated are circled in magenta, whilst genes producing abnormal eye or retinal phenotype are circled in green. Genes whose mutation is lethal during developmental stages are circled in blue. A schematic summary of the DUB mRNA localization in the mouse retina (from ISH) is also presented next to the corresponding family. The intensity of the color indicates hybridization signal intensity. Retinal layers appear indicated as in [Fig 2](#).

doi:10.1371/journal.pone.0150364.g004

The JAMM family has clear sequence assignment in all the analyzed animals, even though some species have secondarily lost some DUB members, e.g. *Acropora* (cnidarian), *C. elegans* (nematode), *Drosophila* (insect) *Saccoglossus* (hemichordate), and *Petromyzon* (sea lamprey, an early-branching vertebrate). These species also show specific gene loss for other DUB families, pointing to a divergent evolution in their lineages.

On the other hand, a clear expansion within each DUB family has occurred in the vertebrate lineage (Figs 4 and 5). When these duplicated members have rapidly diverged, the DUB protein sequences are in separate branches, but the common ancestry becomes evident since a single ancestral ortholog is present in the rest of clades (white dots in [Fig 4](#)). This is the case within the UCH (UCHL1 and UCHL3) and MJD families (JOSD1 and JOSD2). When the duplicated sequences have diverged but still branch closely together in the phylogenetic tree, the vertebrate paralogs have been collapsed into a single branch (black circles in [Fig 4](#)). This is particularly evident for USPs, where we can identify a single ancestral sequence in all invertebrate clades whereas several members are present in vertebrates (e.g. USP4/11/15. . .). Note that in the case of USP 18/41, a duplication event occurred only in the case of humans; as it is a single-species case, we have not included any black box on the figure. The *ATXN3* gene deserves specific mention, since its close paralog, *ATXN3L*, is a retrogene, that is, a gene generated by a very late retrotransposition event within the primate lineage.

The DUB gene expansion in animal phylogeny is visually summarized in the heat map of [Fig 5](#). Color intensity reflects the number of genes per genome. It becomes evident that a burst of gene expansion within all DUB families was at the basis of the vertebrate lineage. Nonetheless, the innovation in the protein architectures with the acquisition of new domains accompanying the DUB catalytic signatures, pre-dates the origin of vertebrates in all the analyzed families, as vertebrate-like domain arrangements are often identified in other animal clades.

To complement our DUB expression study in the retina and in order to suggest relevant genes for hereditary visual disorders, we have compared the reported DUB mutant phenotypes of several animal models and human diseases, and viewed them under our new phylogenetic framework. We have specifically searched for early developmental lethality, neuronal phenotype and retinal alterations when available ([Fig 4A, 4B, 4C, 4D and 4E](#)). In the cases of neuronal phenotype, there is an accompanying alteration in the eye. However, most phenotypic assessment in the eye report only gross alterations, but a detailed retinal study has not yet been described for most animal models. For a detailed phenotypic trait list, see [S2 Table](#) and references therein.

In general, we observe that families with ancestral genes that have not been expanded in vertebrates (particularly the JAMMs) have a ubiquitous expression profile in the retina, suggesting a basic cell function. Moreover, mutations of these real orthologs produce consistent phenotypes through the analyzed taxa, arguing in favor of functional and evolutionary conservation. In contrast, for close paralog DUB genes arisen by duplication events in the vertebrate lineage,

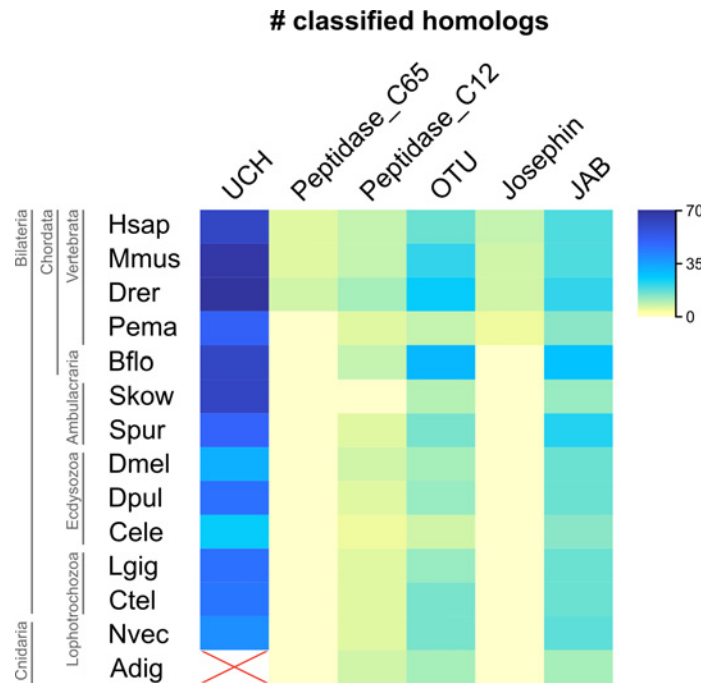


Fig 5. Counts of classified DUB homologs. Heatmap representing the number of classified genes in each analyzed genome. Increasing intensity reflects increasing number of genes. Only orthologs marked with black dots in Fig 4 are considered. *Acropora digitifera* USP homologs, excluded from the phylogenetic classification, are marked as not analyzed (NA).

doi:10.1371/journal.pone.0150364.g005

different patterns of retinal gene expression are often observed. A good example is OTUD7A/B (with one ancestral gene in most animals, and expanded in vertebrates), where OTUD7A is more highly expressed in the GCL and plexiform layers, whereas OTUD7B is more expressed in the photoreceptors. Similarly, UCHL3 and UCHL1 (both specific to vertebrates and associated to neuronal phenotypes) are expressed differently. Notably, UCHL3 (detected in the GCL and photoreceptors by ISH and immunodetection) produces eye specific retinal alterations, supporting subfunctionalization of these two paralogs. Other examples are included in the discussion.

Discussion

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is currently viewed as one of the most dynamic and versatile cell regulators in eukaryotes. Perturbations of this system are known to be at the basis of many human disorders, particularly cancer and neurodegeneration [5,33]. Due to their ability to deconjugate ubiquitin, DUBs play a major regulatory role in the UPS. The disruption of DUB genes has dramatic consequences for the animal taxa analyzed, either during development or in adult stages, as shown by reports of the systematic DUB knockdown in zebrafish embryos and flies [9,30].

In mammals, several comprehensive surveys of DUBs have been reported resulting in: *in silico* inventories of the DUBs in the human genome [22,34]; identification of protein interactors by cell-based proteomics analysis [8]; studies of subcellular localization [1]; functional involvement in maintaining genome integrity in cells [35]. A recent review reported the expression levels of DUBs in human organs and the disease phenotypes associated to DUB mutations in humans and animal models [23]. Despite their importance, detailed expression and functional

analysis for most DUBs on particular tissues or organs, such as the retina, is still missing. We here aimed to fill this gap and produced a descriptive landscape of the expression of the complete set of DUBs in the mouse retina by combining mRNA and protein localization. We have also delineated a detailed evolutionary history of the different DUB families using phylogenetic analysis. We compared their protein domain architectures, and considered the neuronal and retinal phenotypes associated to each gene mutation/knockdown. We thus provide a reference framework for researchers interested in this visual tissue, either in physiological or in disease conditions, and suggest new avenues of research in DUBs as excellent candidates for retinal/visual hereditary disorders.

Differential levels of DUB gene expression in the adult mouse retina

Some genes that are barely expressed in the mouse retina (e.g. *Brcc36*, *Poh1*, *Bap1*, *Otub2*, and *Usp44*) are reported to be induced in replicative cells instead, being recruited to DNA damage sites where they regulate DNA repair and mitosis checkpoints [35]. These results are consistent with the fact that the adult retina is mostly formed by differentiated cells.

Among the genes highly expressed in the adult retina, *Uchl1*, *Atxn3*, *Otub1*, *Usp6*, *Usp22* and *Usp33* are also highly expressed in the brain [23]. In fact, *Uchl1*, *Otub1* and *Atxn3* are involved in neurodegenerative diseases in human, namely Parkinson's disease and cerebellar ataxia [6,36], thus indicating a relevant role in neurodegeneration. Our ISH results showed ubiquitous mRNA localization through all the retinal layers for these three genes, supporting a possible basal function in the retina. On the other hand, other DUB genes that are highly expressed in the brain [23], such as *Mysm1*, *Usp26*, *Usp29*, *Usp35* and *Usp51*, were barely expressed in the adult mouse retina; and genes that showed very low levels of expression when analyzed by qPCR within this work such as *Usp2*, *Usp25*, *Usp45*, *Usp53* and *Usp54* rendered eye phenotype when knocked-down in zebrafish [30]. Note that we performed RT-qPCR in whole adult neuroretinas at P60, and the role of these genes during development might be more relevant than in the adult stage. It is also worth noting that *Usp45*, *Usp53* and *Usp54* did show layer specificity, as they were mainly expressed in the photoreceptors (PhR inner segment, ONL and OPL), suggesting a specific role for these genes in photoreceptors and underscoring their role as potential candidates for visual disorders.

Immunohistochemical localizations also point to specific functions for some DUBs, e.g. OTUD4 is highly localized in axons; TNFAIP3 is highly expressed in the photoreceptor outer segment and GCL, and USP22 protein localization is mainly nuclear and perinuclear, thus suggesting that these genes may be good candidates for particular retinal phenotypes.

Phenotypic comparison of DUB mutants and gene expression profiles under the new evolutionary framework

Animal models have been generated by gene disruption (mouse) or knockdown (*Drosophila*, zebrafish) for some DUBs. When the DUB function is extremely relevant for cell cycle or cell differentiation, a lethal/early and extensive neuronal phenotype is consistently apparent in different organisms, as it is the case for most JAMMs and several USPs (see Fig 4 and S2 Table). In vertebrates, when some mutants show neuronal/brain affectation, a retinal/eye phenotype is also one of the accompanying phenotypic traits (examples are found in all the families). In fact, multiple vertebrate USP genes are present in paralogs (probably arising from the several rounds of genome duplication at the base of their lineage), whereas their invertebrate relatives have a single homolog (black boxes in Fig 4). Therefore, it is not surprising that most USP knockdowns are lethal in *Drosophila* (where only a single member is present), whereas in vertebrates, the mutant phenotype mostly affect specific tissues, probably related to the larger

panoply of USP members and a higher functional diversification. For instance, in zebrafish the knockdown of *Usp33* (whose close relative homolog is *Usp20*) alters the nervous system development including the eye [9], which is consistent with a reported subcellular localization associated to microtubules and centrosomes; whereas the knockdown of the only member USP20/33 in *Drosophila* is lethal. Something very similar occurs with the knockdown of *Usp53* (whose close relative homolog is *Usp54*), which affects brain and eye development in zebrafish, whereas the knockdown of the single USP53/54 member is lethal in *Drosophila* (Fig 4B and S2 Table). For all the DUB families, orthologs share both high sequence similarities and consistent mutant phenotypes in vertebrates; overall, pointing to their functional conservation and supporting mouse and zebrafish models for assessing DUB roles in the human retina.

The knockdown phenotypes in different species are sometimes partially overlapping between neuronal and retinal alterations, probably due to subfunctionalization of different paralogs due to duplication events. For instance, *Usp5* and *Usp13* (encoding enzymes that expanded and diverged in the vertebrate lineage, and sharing 59.5% amino acid identities in human) showed a distinct pattern of expression in the mouse retina, with *Usp5* being highly expressed in the GCL in contrast to *Usp13*, which is barely expressed in this layer and the protein is mostly localized in the inner plexiform layer, thus indicating different roles despite sequence similarity. The knockdown of any of them severely alters zebrafish embryonic development and causes neurodegeneration (even though only the *Usp5* knockdown showed a clear eye phenotype), whereas in *Drosophila* the disruption of the single member *Usp5/13* alters eye development by increasing photoreceptor apoptosis, thus recapitulating neurodegeneration and retinal phenotype. Similarly, the close paralogs *Usp16* and *Usp45* have a contrasting expression pattern, with the former in GCL and plexiform layers, and the latter restricted to the photoreceptor cell layer, supporting again subfunctionalization or neofunctionalization of the vertebrate paralogs. Of note, the knockdown of *Usp45* in zebrafish shows reduced eyes. Interestingly, *fat facets* (the ortholog of *Usp9X*, involved in endocytosis in the Notch pathway) limits the number of photoreceptors in *Drosophila* [37], while the human homolog *USP9X* has been involved in neurodegeneration, mental retardation, epilepsy and autism, as well as in cancer [38], but not yet in visual disorders. Nonetheless, the strong immunodetection in the outer segment of photoreceptors would indicate that it is also a good candidate for retinal dystrophies.

Finally, the only DUB-related gene that has been directly involved in human inherited retinal degeneration and causative of autosomal dominant Retinitis Pigmentosa is *PRPF8*, the JAMM-family member with the highest level of expression in the retina. Notably, *PRPF8* (which is not properly a DUB since it is catalytically inactive) forms part of the splicing machinery [39]. Even though *PRPF8* is a housekeeping gene, its haploinsufficiency might cause a shift in the splicing patterns, which in turn alters the highly sensitive photoreceptors and triggers their apoptosis. Knock-in mice bearing human missense mutations also display retinal degeneration, thus strengthening the significance of this JAMM-gene in the retina [40].

Conclusions

In summary, our results show that data on the expression of the deubiquitinating enzyme gene family cannot be directly extrapolated between tissues or organs since cell requirements might be completely different, particularly in highly specialized and structured tissues, such as the retina. Therefore, in large families of seemingly redundant enzymes (such as DUBs) the integration of systematic expression maps together with a robust phylogenetic analysis and available phenotypic information provides an insightful reference framework for further functional characterization. This framework may be helpful for researchers working in the ubiquitin-

related field as well as for those working in the molecular bases of neurological and retinal disorders.

Supporting Information

S1 Fig. *In situ* hybridization of genes encoding DUB enzymes on mouse retina cryosections, with the comparison between antisense and sense riboprobes.

(PDF)

S2 Fig. *In situ* hybridization of genes encoding DUB enzymes on CD-1 (albino) mouse retina cryosections.

(PDF)

S3 Fig. Fluorescent immunohistochemistry of selected DUBs.

(PDF)

S1 File. Zip file containing the DUB catalytic domain sequences (per family) used for the phylogenetic analysis in FASTA format.

(ZIP)

S2 File. Zip file containing the sequence alignments obtained per each DUB family.

(ZIP)

S3 File. Zip file containing the complete phylogenetic trees with their corresponding bootstraps.

(ZIP)

S1 Table. Sequences of the primer pairs used in the reverse transcriptase Real Time qPCR and *in situ* hybridization.

(PDF)

S2 Table. Mutant neuronal and retinal phenotypes in different animal models and human listed per DUB family and gene.

(PDF)

Acknowledgments

We are grateful to D. Vystavělová and N. Peña-Auladell for technical support. We are also indebted to Dr. C. Arenas for advice on data statistical analysis. This study was supported by grants BFU2010-15656 (MICINN) and SAF2013-49069-C2-1-R (MINECO) to G.M., and 2014SGR-0932 (Generalitat de Catalunya) grant (BFU-2011-23434) from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and co-funded by the Fondo Europeo de Desarrollo regional (FEDER) to I.R.-T. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AG GM. Performed the experiments: ME XG-B AG VT SG-M EM MJL-I VA-M. Analyzed the data: ME XG-B AG VT SG-M EM MJL-I VA-M IR-T GM. Contributed reagents/materials/analysis tools: GM XG-B IR-T. Wrote the paper: ME GM. Revised the final text: GM ME XG-B AG VT SG-M EM MJL-I VA-M IR-T.

References

1. Clague MJ, Coulson JM, Urbé S. Cellular functions of the DUBs. *J Cell Sci.* 2012; 125: 277–86. doi: [10.1242/jcs.090985](https://doi.org/10.1242/jcs.090985) PMID: [22357969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22357969/)
2. Duncan LM, Piper S, Dodd RB, Saville MK, Sanderson CM, Luzio JP, et al. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J.* 2006; 25: 1635–1645. doi: [10.1038/sj.emboj.7601056](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601056) PMID: [16601694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16601694/)
3. Hunter T. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Mol Cell.* 2007; 28: 730–738. doi: [10.1016/j.molcel.2007.11.019](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.019) PMID: [18082598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18082598/)
4. Clague MJ, Urbé S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell.* 2010; 143: 682–5. doi: [10.1016/j.cell.2010.11.012](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.012) PMID: [21111229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111229/)
5. Dantuma NP, Bott LC. The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Front Mol Neurosci.* 2014; 7: 70. doi: [10.3389/fnmol.2014.00070](https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00070) PMID: [25132814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25132814/)
6. Ristic G, Tsou W-L, Todi S V. An optimal ubiquitin-proteasome pathway in the nervous system: the role of deubiquitinating enzymes. *Front Mol Neurosci.* 2014; 7: 72. doi: [10.3389/fnmol.2014.00072](https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00072) PMID: [25191222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25191222/)
7. Kim TY, Siesser PF, Rossman KL, Goldfarb D, Mackinnon K, Yan F, et al. Substrate Trapping Proteomics Reveals Targets of the β TrCP2/FBXW11 Ubiquitin Ligase. *Mol Cell Biol.* 2014; doi: [10.1128/MCB.00857-14](https://doi.org/10.1128/MCB.00857-14)
8. Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell.* 2009; 138: 389–403. doi: [10.1016/j.cell.2009.04.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.042) PMID: [19615732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19615732/)
9. Tsou W-L, Sheedlo MJ, Morrow ME, Blount JR, McGregor KM, Das C, et al. Systematic analysis of the physiological importance of deubiquitinating enzymes. *PLoS One.* 2012; 7: e43112. doi: [10.1371/journal.pone.0043112](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043112) PMID: [22937016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22937016/)
10. Kang N, Won M, Rhee M, Ro H. Siah ubiquitin ligases modulate nodal signaling during zebrafish embryonic development. *Mol Cells.* 2014; 37: 389–98. doi: [10.14348/molcells.2014.0032](https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0032) PMID: [24823357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24823357/)
11. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong ROL. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2014; 42C: 44–84. doi: [10.1016/j.preteyeres.2014.06.003](https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.003)
12. Swaroop A, Kim D, Forrest D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11: 563–76. doi: [10.1038/nm2880](https://doi.org/10.1038/nm2880) PMID: [20648062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20648062/)
13. Schob C, Orth U, Gal A, Kindler S, Chakarova CF, Bhattacharya SS, et al. Mutations in TOPORS: a rare cause of autosomal dominant retinitis pigmentosa in continental Europe? *Ophthalmic Genet.* 2009; 30: 96–8. doi: [10.1080/13816810802695543](https://doi.org/10.1080/13816810802695543) PMID: [19373681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19373681/)
14. Bowne SJ, Sullivan LS, Gire AI, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively JR, et al. Mutations in the TOPORS gene cause 1% of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2008; 14: 922–7. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2391085&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> PMID: [18509552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18509552/)
15. De Sousa Dias M, Hernan I, Pascual B, Borrás E, Mañé B, Gamundi MJ, et al. Detection of novel mutations that cause autosomal dominant retinitis pigmentosa in candidate genes by long-range PCR amplification and next-generation sequencing. *Mol Vis.* 2013; 19: 654–64. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3611935&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> PMID: [23559859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23559859/)
16. Hugosson T, Friedman JS, Ponjavic V, Abrahamson M, Swaroop A, Andréasson S. Phenotype associated with mutation in the recently identified autosomal dominant retinitis pigmentosa KLHL7 gene. *Arch Ophthalmol.* 2010; 128: 772–8. doi: [10.1001/archophthalmol.2010.98](https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2010.98) PMID: [20547956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20547956/)
17. Wen Y, Locke KG, Klein M, Bowne SJ, Sullivan LS, Ray JW, et al. Phenotypic characterization of 3 families with autosomal dominant retinitis pigmentosa due to mutations in KLHL7. *Arch Ophthalmol.* 2011; 129: 1475–82. doi: [10.1001/archophthalmol.2011.307](https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2011.307) PMID: [22084217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22084217/)
18. Campello L, Esteve-Rudd J, Cuenca N, Martín-Nieto J. The ubiquitin-proteasome system in retinal health and disease. *Mol Neurobiol.* 2013; 47: 790–810. doi: [10.1007/s12035-012-8391-5](https://doi.org/10.1007/s12035-012-8391-5) PMID: [23339020](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23339020/)
19. Ramatenki V, Potlapally SR, Dumpati RK, Vadija R, Vuruputuri U. Homology modeling and virtual screening of ubiquitin conjugation enzyme E2A for designing a novel selective antagonist against cancer. *J Recept Signal Transduct Res.* 2014; 1–14. doi: [10.3109/10799893.2014.969375](https://doi.org/10.3109/10799893.2014.969375)
20. Crosas B. Deubiquitinating enzyme inhibitors and their potential in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2014; 14: 506–16. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25088039> PMID: [25088039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25088039/)

21. D'Arcy P, Brnjic S, Olofsson MH, Fryknäs M, Lindsten K, De Cesare M, et al. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat Med*. 2011; 17: 1636–40. doi: [10.1038/nm.2536](https://doi.org/10.1038/nm.2536) PMID: [22057347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22057347/)
22. Nijman SMB, Luna-Vargas MP a, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AMG, Sixma TK, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. 2005; 123: 773–86. doi: [10.1016/j.cell.2005.11.007](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.007) PMID: [16325574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16325574/)
23. Clague MJ, Barsukov I, Coulson JM, Liu H, Rigden DJ, Urbé S. Deubiquitylases from genes to organism. *Physiol Rev*. 2013; 93: 1289–315. doi: [10.1152/physrev.00002.2013](https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2013) PMID: [23899565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23899565/)
24. Grau-Bové X, Sebé-Pedrós A, Ruiz-Trillo I. The eukaryotic ancestor had a complex ubiquitin signaling system of archaeal origin. *Mol Biol Evol*. 2015; 32: 726–39. doi: [10.1093/molbev/msu334](https://doi.org/10.1093/molbev/msu334) PMID: [25525215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25525215/)
25. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42: D222–30. doi: [10.1093/nar/gkt1223](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1223) PMID: [24288371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24288371/)
26. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013; 30: 772–80. doi: [10.1093/molbev/mst010](https://doi.org/10.1093/molbev/mst010) PMID: [23329690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23329690/)
27. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 2011; 27: 1164–5. doi: [10.1093/bioinformatics/btr088](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088) PMID: [21335321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21335321/)
28. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014; 30: 1312–3. doi: [10.1093/bioinformatics/btu033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033) PMID: [24451623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24451623/)
29. Abad-Morales V, Domènech EB, Garanto A, Marfany G. mRNA expression analysis of the SUMO pathway genes in the adult mouse retina. *Biol Open*. 2015; doi: [10.1242/bio.201410645](https://doi.org/10.1242/bio.201410645)
30. Tse WKF, Eisenhaber B, Ho SHK, Ng Q, Eisenhaber F, Jiang Y-J. Genome-wide loss-of-function analysis of deubiquitylating enzymes for zebrafish development. *BMC Genomics*. 2009; 10: 637. doi: [10.1186/1471-2164-10-637](https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-637) PMID: [20040115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20040115/)
31. Strunnikova N V, Maminishkis a, Barb JJ, Wang F, Zhi C, Sergeev Y, et al. Transcriptome analysis and molecular signature of human retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 2468–86. doi: [10.1093/hmg/ddq129](https://doi.org/10.1093/hmg/ddq129) PMID: [20360305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20360305/)
32. Margolin DH, Kousi M, Chan Y-M, Lim ET, Schmähmann JD, Hadjivassiliou M, et al. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N Engl J Med*. 2013; 368: 1992–2003. doi: [10.1056/NEJMoa1215993](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215993) PMID: [23656588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23656588/)
33. Hussain S, Zhang Y, Galardy PJ. DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors. *Cell Cycle*. 2009; 8: 1688–97. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448430> PMID: [19448430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19448430/)
34. Komander D, Clague MJ, Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 550–63. doi: [10.1038/nrm2731](https://doi.org/10.1038/nrm2731) PMID: [19626045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19626045/)
35. Nishi R, Wijnhoven P, le Sage C, Tjeertes J, Galanty Y, Forment J V, et al. Systematic characterization of deubiquitylating enzymes for roles in maintaining genome integrity. *Nat Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2014; 16: 1016–26, 1–8. doi: [10.1038/ncb3028](https://doi.org/10.1038/ncb3028) PMID: [25194926](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25194926/)
36. Puschmann A. Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013; 19: 407–15. doi: [10.1016/j.parkreldis.2013.01.020](https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.01.020) PMID: [23462481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23462481/)
37. Cadavid AL, Ginzel A, Fischer JA. The function of the Drosophila fat facets deubiquitinating enzyme in limiting photoreceptor cell number is intimately associated with endocytosis. *Development*. 2000; 127: 1727–36. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725248> PMID: [10725248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10725248/)
38. Murtaza M, Jolly LA, Gecz J, Wood SA. La FAM fatale: USP9X in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2015; doi: [10.1007/s00018-015-1851-0](https://doi.org/10.1007/s00018-015-1851-0)
39. Pena V, Liu S, Bujnicki JM, Lührmann R, Wahl MC. Structure of a multipartite protein-protein interaction domain in splicing factor prp8 and its link to retinitis pigmentosa. *Mol Cell*. 2007; 25: 615–24. doi: [10.1016/j.molcel.2007.01.023](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.023) PMID: [17317632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17317632/)
40. Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, Deramandt BM, Zhang Q, Nandrot EF, et al. Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52: 190–8. doi: [10.1167/iovs.10-5194](https://doi.org/10.1167/iovs.10-5194) PMID: [20811066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20811066/)