

Tesis Doctoral

# La proteína rica en serinas y argininas SF2/ASF regula la conjugación de sumo

Pelisch, Federico

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pelisch, Federico. (2010). La proteína rica en serinas y argininas SF2/ASF regula la conjugación de sumo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pelisch, Federico. "La proteína rica en serinas y argininas SF2/ASF regula la conjugación de sumo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

## **LA PROTEÍNA RICA EN SERINAS Y ARGININAS SF2/ASF REGULA LA CONJUGACIÓN DE SUMO**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el área de Ciencias Biológicas

**Federico Pelisch**

Director de Tesis: Anabella Srebrow

Consejero de estudios: Alberto R. Kornblihtt

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, IFIBYNE-CONICET, FCEyN-UBA

Buenos Aires, 2010

## RESUMEN

### LA PROTEÍNA RICA EN SERINAS Y ARGININAS SF2/ASF REGULA LA CONJUGACIÓN DE SUMO

La modificación post-traduccionaL de proteíNAS por la conjugación de SUMO (del inglés, *Small Ubiquitin-related Modifier*) está involucrada en diversas funciones biológicas tales como regulación de la transcripción, localización sub-celular, respuesta a estrés, reparación del daño al DNA y remodelado de la cromatina. En el presente trabajo, mostramos que la proteína rica en serinas y argininas (SR), SF2/ASF, un factor involucrado en la regulación del *splicing* y otros procesos relacionados con el metabolismo del ARN, es un regulador de la vía de SUMOilación. Su sobre-expresión estimula, mientras que la disminución de su expresión inhibe la conjugación de SUMO. SF2/ASF actúa en dos niveles en la cascada de SUMOilación. Primero, interacciona con Ubc9 y aumenta la SUMOilación de sustratos específicos, funcionando como una E3 ligasa de la vía de SUMO. Por otro lado, SF2/ASF interacciona con la conocida E3 ligasa de SUMO, PIAS1, regulando su función en los patrones globales de SUMOilación. Todos estos efectos dependen de la presencia del motivo de reconocimiento al ARN 2 (RRM2) de SF2/ASF. Más aún, SF2/ASF juega un papel importante en la SUMOilación estimulada por el estrés térmico. Estos resultados agregan un nuevo componente a la vía de SUMOilación y también un nuevo rol a la proteína SR multifuncional SF2/ASF.

Palabras clave: SF2/ASF, proteínas SR, spliceosoma, SUMO, E3 ligasa, RRM

## **SUMMARY**

### **THE SERINE-ARGININE RICH PROTEIN SF2/ASF REGULATES SUMO CONJUGATION**

Post-translational protein modification by conjugation of small ubiquitin-related modifier (SUMO) is involved in diverse biological functions such as transcription regulation, sub-cellular partitioning, stress response, DNA damage repair and chromatin remodeling. In the present work, we show that the serine/arginine-rich (SR) protein SF2/ASF, a factor involved in splicing regulation and other RNA metabolism-related processes, is a regulator of the SUMOylation pathway. Its over-expression stimulates while its knockdown inhibits SUMO conjugation. SF2/ASF acts at two different levels in the SUMO pathway. First, it interacts with Ubc9 and enhances SUMOylation of specific substrates, functioning as a SUMO E3 ligase. Second, SF2/ASF interacts with the SUMO E3 ligase PIAS1, regulating PIAS1-induced overall protein SUMOylation. All these effects are dependent on SF2/ASF RNA recognition motif 2 (RRM2). Moreover, SF2/ASF has an important role in heat shock-induced SUMOylation. These results add a new component to the SUMOylation pathway and also a new role for the multifunctional SR protein SF2/ASF.

Keywords: SF2/ASF, SR proteins, spliceosome, SUMO, E3 ligase, RRM

# INDICE

---

<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>7</b>
<b>1.1.  PROTEÍNAS SR</b>	<b>7</b>
1.1.1.  GENERALIDADES	7
1.1.2.  PROTEÍNAS SR Y NMD	11
1.1.3.  PROTEÍNAS SR Y TRANSPORTE DE ARNm	12
1.1.4.  PROTEÍNAS SR Y TRADUCCIÓN	12
1.1.5.  PROTEÍNAS SR Y ESTABILIDAD GENÓMICA	13
1.1.6.  FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS SR	15
1.1.7.  SF2/ASF: LA PROTEÍNA SR PROTOTÍPICA	16
1.1.8.  SF2/ASF, <i>SPECKLES</i> Y GRÁNULOS DE ESTRÉS NUCLEARES	17
<b>1.2.  MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL POR SUMO</b>	<b>19</b>
1.2.1.  UN POCO DE HISTORIA – LA FAMILIA DE PROTEÍNAS TIPO UBIQUITINA	19
1.2.2.  LA FAMILIA SUMO	20
1.2.3.  MECANISMO DE CONJUGACIÓN	21
1.2.4.  SECUENCIAS BLANCO DE SUMOILACIÓN	24
1.2.5.  PROTEASAS ESPECÍFICAS DE SUMO	25
1.2.6.  CONSECUENCIAS DE LA SUMOILACIÓN	25
1.2.7.  SUMOILACIÓN Y ESTRÉS CELULAR	27
<b>1.3.  ANTECEDENTES DEL GRUPO</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>2.1.  GENERAL</b>	<b>30</b>
<b>2.2.  ESPECÍFICOS</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>31</b>
<b>3.1.  CULTIVO CELULAR</b>	<b>31</b>

3.1.1.	LÍNEAS CELULARES	31
3.1.2.	TRANSFECCIONES CON ADN	32
3.1.3.	TRANSFECCIONES CON ARN	32
3.1.4.	ENSAYOS DE LUCIFERASA	33
3.1.5.	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA: nSBs I	34
3.1.6.	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA: nSBs II	34
<b>3.2.</b>	<b>PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CONJUGADAS A 6XHIS-SUMO1</b>	<b>35</b>
<b>3.3.</b>	<b>PLÁSMIDOS PROVISTOS POR OTROS LABORATORIOS</b>	<b>36</b>
<b>3.4.</b>	<b>TÉCNICAS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA</b>	<b>36</b>
3.4.1.	INMUNOPRECIPITACIÓN	36
3.4.2.	ENSAYOS DE <i>GST PULL-DOWN</i>	37
<b>3.5.</b>	<b>PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y ENSAYOS <i>IN VITRO</i></b>	<b>37</b>
3.5.1.	PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BACTERIAS	37
3.5.2.	PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS HEK293T	39
3.5.3.	SUMOILACIÓN <i>IN VITRO</i> DE Sp100 y p53	41
3.5.4.	SUMOILACIÓN <i>IN VITRO</i> DE TOPOISOMERASA I	41
3.5.5.	ENSAYOS DE FORMACIÓN DE ENLACE TIOESTER	42
3.5.6.	REACCIONES DE TRANSFERENCIA DE SUMO	42
3.5.7.	REACCIONES DE FORMACIÓN DE CADENAS DE SUMO3	42
<b>3.6.</b>	<b><i>WESTERN BLOT</i> Y ANTICUERPOS UTILIZADOS</b>	<b>43</b>
<b>3.7.</b>	<b>PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS</b>	<b>43</b>
3.7.1.	TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS	43
3.7.2.	PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS A PEQUEÑA ESCALA O <i>MINIPREPS</i>	44
3.7.3.	PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS A GRAN ESCALA O <i>MAXIPREPS</i>	44
3.7.4.	CUANTIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS	44
<b>3.8.</b>	<b>ARN, RT &amp; PCR</b>	<b>45</b>
3.8.1.	PURIFICACIÓN DE ARN	45
3.8.2.	TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)	46
3.8.3.	PCR: MINIGENES REPORTEROS DE <i>SPLICING</i> DE EDI, CFTR Y E1A	46

3.8.4. PCR: COMPONENTES DE LA MAQUINARIA DE SUMOILACIÓN	47
<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
4.1. GÉNESIS	49
4.2. SF2/ASF REGULA LA SUMOILACIÓN GLOBAL DE PROTEÍNAS <i>IN VIVO</i>	50
4.3. EL DOMINIO RRM2 DE SF2/ASF ES NECESARIO Y SUFICIENTE PARA ESTIMULAR LA SUMOILACIÓN	57
4.4. ACTIVIDADES DE SF2/ASF: <i>SPLICING</i> & SUMOILACIÓN	61
4.5. SF2/ASF INTERACCIONA CON UBC9	66
4.6. SF2/ASF ESTIMULA LA SUMOILACIÓN <i>IN VITRO</i>	68
4.7. SF2/ASF ESTIMULA LA SUMOILACIÓN DE TOPOISOMERASA I <i>IN VIVO</i>	70
4.8. SF2/ASF ESTIMULA LA SUMOILACIÓN DE P53 <i>IN VITRO</i>	71
4.9. SF2/ASF REGULA LA SUMOILACIÓN Y LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE p53 <i>IN VIVO</i> .	75
4.10. SF2/ASF TIENE CARACTERÍSTICAS DE UNA E3 LIGASA DE SUMO	77
4.11. SF2/ASF INTERACCIONA CON PIAS1	80
4.12. SF2/ASF REGULA LA ACTIVIDAD DE PIAS1	81
4.13. SF2/ASF ESTÁ INVOLUCRADA EN LA ESTIMULACIÓN DE LA SUMOILACIÓN DESENCADENADA POR ESTRÉS HIPERTÉRMICO	84
4.14. SF2/ASF REGULA LA SUMOILACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL ARN	89
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>91</b>
5.1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	91
5.2. SF2/ASF TIENE ACTIVIDAD DE E3 LIGASA DE SUMO	91
5.3. LAS MÚLTIPLES CARAS DEL DOMINIO RRM2 DE SF2/ASF	93
5.4. LA ACTIVIDAD DE SF2/ASF EN EL PROCESO DE SUMOILACIÓN ES INDEPENDIENTE DEL ARN	94
5.5. SF2/ASF & P53: EL COMIENZO DE UNA NUEVA RELACIÓN?	95
5.6. SF2/ASF & TOPOISOMERASA I: REGULACIÓN MUTUA	96
5.7. SF2/ASF & PIAS1	97
5.8. UBIQUITINA/UBLS Y METABOLISMO DEL ARN	98

<b>5.9. SF2/ASF, SUMOILACIÓN Y NSBS: REFORZANDO LA RELACIÓN ENTRE SUMO Y PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ARN</b>	<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>103</b>



## ABREVIATURAS

---

ARNm: ARN mensajero

Clk/Sty: Cdc2-like kinase

DSBs: Double stranded DNA breaks

E1: Enzima activadora de Ub/Ubl

E2: Enzima conjugadora de Ub/Ubl

E3: Ligasa de Ub/Ubl

EJC: Exon Junction Complex

GST: Glutathione S-transferase

HAP: hnRNP A1-interacting protein

HECT: Homologous to E6AP C-terminus

hnRNP A1: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1

HSF1: Heat Shock Factor 1

NDSM: Negatively charged aminoacid-dependent SUMOylation motif

NMD: Nonsense-mediated RNA decay

nSBs: Nuclear stress bodies

Pc2: Polycomb group 2

PDSM: Phosphorylation-dependent SUMOylation motif

PIAS: Protein inhibitor of activated Stat

PML: Promyelocytic leukemia

RanBP2: Ran binding protein 2

RanGAP1: Ran GTPase activating protein 1

RING: Really interesting gene

RRM: RNA recognition motif

RS: dipéptido arginina-serina

SAE: SUMO Activating Enzyme

SatIII: Satellite III

SC35: Spliceosome Component 35

SF2/ASF: Splicing Factor 2/Alternative Splicing Factor

SF3A120: Splicing Factor 3, subunit A, 120 KDa

SIM: SUMO-interacting motif

siRNA: small interfering RNA

snRNA: small nuclear RNA

snRNP: small nuclear Ribonucleoprotein Particle

SRPK: SR protein kinase

SUMO: Small Ubiquitin-Related Modifier

SV40: Simian Virus 40

Topo I: Topoisomerasa I

Topors: Topo I-binding, RS domain-containing protein

U2AF: U2 Auxiliary Factor

Ub: Ubiquitina

Ubc: Ubiquitin conjugating enzyme

Ubc9~S~SUMO: Ubc9 y SUMO unidos por un enlace tioester

UBD: Ubiquitin binding domain

Ubl: Ubiquitin-like protein

ICAD: Inhibitor of Caspase-Activated DNase

# INTRODUCCION

---

## 1.1. PROTEÍNAS SR

---

### 1.1.1. GENERALIDADES

---

La remoción de intrones de los precursores de ARNm (pre-ARNm) se conoce como *splicing*. Este proceso fue descubierto hacia fines de la década del 70, cuando se demostró que los genes eucarióticos contienen secuencias que no están presentes en los mensajeros maduros (ARNm) (Berget et al., 1977, Chow et al., 1977). Resultados posteriores demostraron que los intrones son removidos por un complejo macromolecular ribonucleoproteico denominado spliceosoma y descubierto inicialmente en levaduras (Brody y Abelson, 1985). El spliceosoma está compuesto por cinco ARNs pequeños nucleares (en inglés, snRNAs) y un número creciente de factores asociados. Una estimación reciente del número de proteínas que componen al spliceosoma asciende a más de 300 (Butcher y Brow, 2005, Jurica y Moore, 2003, Smith et al., 2008), entre las cuales se encuentran proteínas involucradas no sólo en la reacción de *splicing* sino también en otros pasos de la expresión génica.

La remoción de los intrones de un pre-ARNm y la concomitante unión de los exones son dirigidas por secuencias especiales presentes en las juntas exón/intrón denominadas sitios de *splicing* (Black, 2003). El sitio de *splicing* 5' marca la junta exón/intrón en el extremo 5' del intrón (Figura I1). Este incluye el dinucleótido GU en el extremo del intrón presente dentro de una secuencia consenso menos conservada. En el otro extremo del intrón, la región del sitio 3' de *splicing* que delimita la junta intrón/exón, posee tres secuencias conservadas consecutivas: el sitio de ramificación o *branch-point* (BP), un trecho de polipirimidinas (Py) y el dinucleótido AG en el extremo 3' del intrón. El *spliceosoma* se ensambla sobre estas secuencias y cataliza las dos reacciones de transesterificación que comprende el *splicing* (Figura I1). En la primera transesterificación, el grupo hidroxilo-2' del residuo de adenina conservado en el *branch-point* ataca al fosfato del sitio de *splicing* 5'. Esto lleva al corte del exón 5' y a la

unión concertada del extremo 5' del intrón con el hidroxilo-2' del *branch-point*. Este paso produce dos intermediarios de reacción: un exón 5' libre y un fragmento intrón/exón-3' en una configuración de lazo o *lariat* que contiene una adenosina ramificada en el *branch-point*. En la segunda transesterificación el hidroxilo-3' del exón libre ataca al fosfato en el extremo 3' del intrón produciendo la unión de los dos exones y la liberación del intrón en la forma de lazo (Figura I1). El ensamblado del *spliceosoma* se realiza a partir de los cinco snRNAs asociados a factores proteicos formando ribonucleoproteínas pequeñas (snRNPs) y proteínas accesorias (Staley y Guthrie, 1998) (Figura I1). Dicho ensamblado comienza con la asociación del snRNP U1 al sitio 5' de *splicing* a través de apareamiento de bases entre el snRNA U1 y el sitio de *splicing*. El sitio de *splicing* 3' es reconocido por otro grupo de proteínas. Entre ellas, SF1 es una proteína de unión al *branch-point* (BBP en levaduras). La subunidad de 65 kDa del factor dimérico U2AF (factor auxiliar de U2) se une al trecho de polipirimidinas y, en algunos casos, la subunidad de 35 kDa de U2AF se une al dinucleótido AG en la juntura intrón/exón. El primer complejo definido durante el ensamblado del *spliceosoma* es el complejo E (del inglés *early*) y contiene a U1 y U2AF unidos a ambos extremos del intrón (Das et al., 2000). Al complejo E luego se une el snRNP U2, cuyo snRNA aparea con el *branch-point* originando el complejo A. En un paso posterior, se une un complejo formado por los tres snRNPs U4/U5/U6 (tri-snRNP U4/U6-U5) dando lugar al complejo B en el cual se pierde el snRNP U1. El complejo B sufre finalmente una serie de rearrreglos y da lugar al complejo C, en el cual la interacción del snRNP U1 con el sitio 5' de *splicing* es reemplazada por el snRNP U6, y el snRNP U4 se pierde del complejo. El complejo C es el que cataliza las dos reacciones de transesterificación (Figura I1)

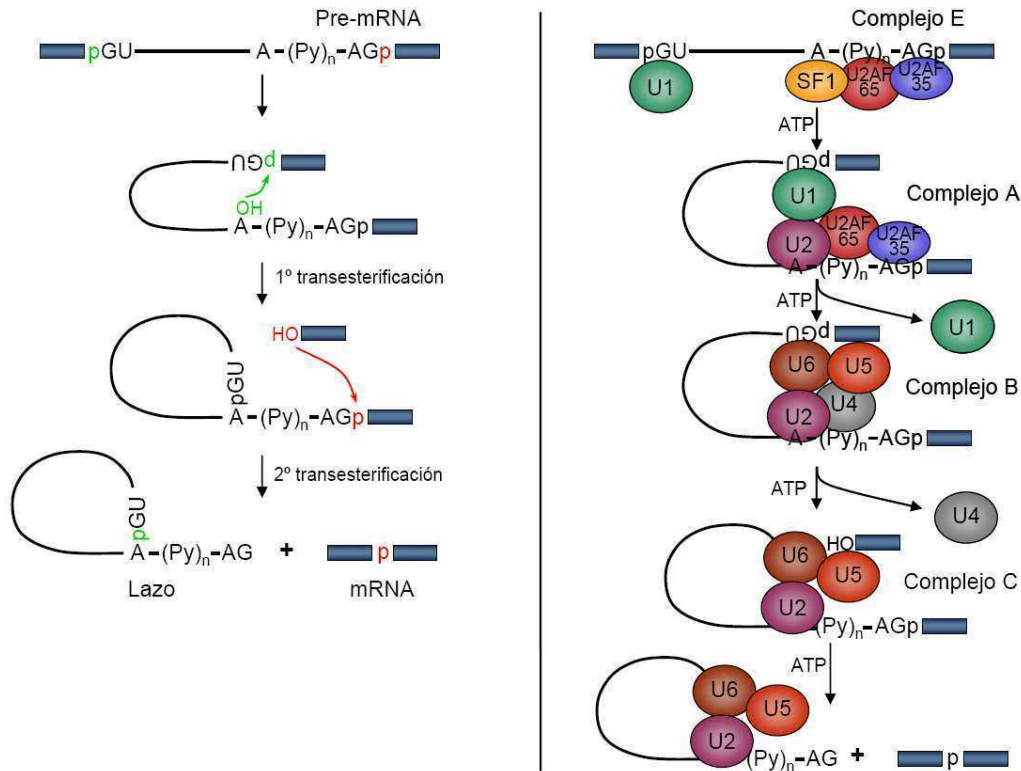


Figura I1 | **Mecanismo de *splicing*.** (Izquierda) El *splicing* ocurre a través de dos reacciones de transesterificación. En verde, primera transesterificación; en rojo, segunda transesterificación. (Derecha) Ensamblado del spliceosoma.

Hacia principios de los años 90 se describía una familia de proteínas capaz de regular el *splicing* promoviendo el reclutamiento del spliceosoma a los sitios consenso en el ARN: las proteínas SR (Zahler et al., 1992). Un dominio proteico rico en dipéptidos de arginina y serina, dominio RS, había sido originalmente descubierto en los reguladores del *splicing*, SWAP (Chou et al., 1987), Tra (Boggs et al., 1987) y Tra-2 (Amrein et al., 1988). La identificación posterior de los factores SF2/ASF [del inglés *Splicing Factor 2/Alternative Splicing Factor* (Ge et al., 1991, Krainer et al., 1991)] y SC35 [del inglés *Spliceosomal Component 35* (Fu y Maniatis, 1990)] reveló que estas proteínas, como así también el componente del snRNP U1, U1-70K contenían dominios RS (Spritz et al., 1987, Theissen et al., 1986). El término “proteínas SR” fue acuñado luego de la identificación de otras proteínas que contienen dominios RS que son reconocidas por el anticuerpo monoclonal mAb104, el cual se une a sitios de activa transcripción por la ARN polimerasa II (Roth et al., 1990). Posteriormente se identificaron las proteínas SRp20, SRp40, SRp55 y SRp75, nombradas así de acuerdo a su peso molecular aparente

en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (Zahler et al., 1992). Otras proteínas SR como 9G8 y SRp30c siguieron enriqueciendo la lista (Long y Caceres, 2009). Las proteínas SR están caracterizadas por una estructura modular que consiste en un dominio RS C-terminal y uno o dos dominios de reconocimiento o unión al ARN, ubicados hacia el extremo N-terminal y denominados RRM (del inglés *RNA Recognition Motif*) (Graveley, 2000). En la Figura I2 se esquematiza la estructura modular de varios miembros de la familia SR.

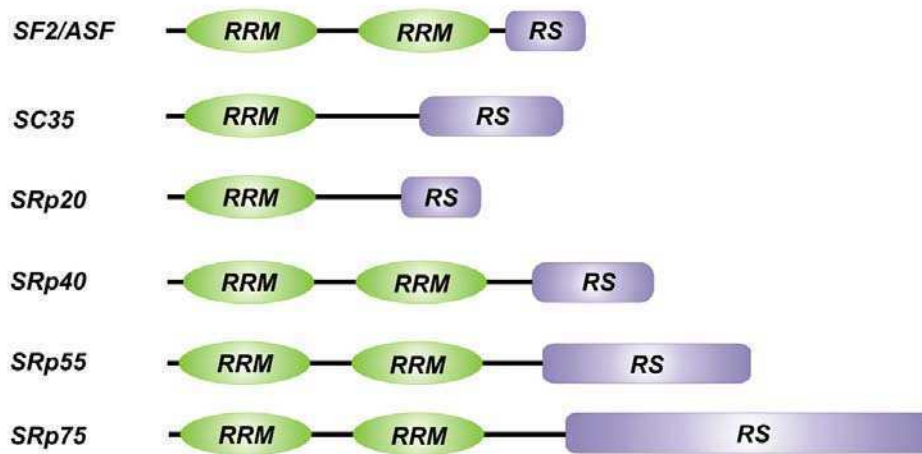


Figura I2 | **Esquema de algunos miembros de la familia de proteínas SR.** Se muestra la estructura modular de esta familia de proteínas. Pueden observarse los dominios RRM en verde y los dominios RS en violeta. Tomado de (Zhong et al., 2009).

Si bien los dominios RS de dichas proteínas fueron primeramente identificados como plataformas de interacción proteína-proteína, fue luego demostrado que los mismos también contactan el ARN en forma directa (Shen y Green, 2004, Shen et al., 2004). A su vez, los dominios RRM originalmente reportados como responsables del contacto con el ARN, son capaces de mediar interacciones proteína-proteína (Michlewski et al., 2008). Dada la abundante evidencia existente apoyando la naturaleza co-transcripcional del *splicing* (Kornblihtt, 2007, Kornblihtt et al., 2004, Moore y Proudfoot, 2009, Proudfoot et al., 2002), es ampliamente aceptado que las proteínas SR promueven el ensamblado del spliceosoma en ARNs nacientes para catalizar la remoción de los intrones antes del fin de la transcripción. Esto explica la asociación de las proteínas SR con genes activos *in vivo* (Bjork et al., 2009). Mientras que en conjunto las proteínas SR son esenciales para el

*splicing*, distintos miembros de la familia muestran cierto grado de redundancia funcional, dado que pueden sustituirse unas por otras en ensayos *in vitro* (Graveley, 2000, Lin y Fu, 2007, Long y Caceres, 2009, Manley y Tacke, 1996).

Un estudio a escala genómica en metazoos identificó un gran número de proteínas conteniendo dominios RS, con roles conocidos no sólo en *splicing*, sino también en procesos como remodelado de la cromatina, transcripción y progresión del ciclo celular (Boucher et al., 2001). Estas proteínas contienen un dominio RS pero carecen de un RRM definido y se las denomina SR-rp (del inglés *SR-related proteins*). El hecho de encontrar proteínas relacionadas con las SR cumpliendo diversas funciones en la célula plantea el interrogante si las mismas proteínas SR son capaces de llevar a cabo funciones celulares más allá del *splicing*. De hecho, la función de las proteínas SR “clásicas” excede la regulación del proceso de *splicing*. Actualmente sabemos que miembros de esta familia proteica regulan la transcripción (Lin et al., 2008), la exportación del ARNm al citoplasma (Huang et al., 2004), la estabilidad del ARNm (Lemaire et al., 2002, Zhang y Krainer, 2004), la traducción (Blaustein et al., 2005, Blaustein et al., 2009, Sanford et al., 2005, Sanford et al., 2004) e incluso la estabilidad genómica (Li y Manley, 2005, Li et al., 2005).

---

### 1.1.2. PROTEÍNAS SR Y NMD

---

En células de mamífero, errores en la ejecución del proceso de *splicing* frecuentemente resultan en la inclusión de codones de terminación prematuros en los transcritos maduros. Dichos transcritos son rápidamente eliminados por la vía NMD (del inglés *nonsense-mediated RNA decay*). Esta vía de “vigilancia” del ARNm es disparada por el complejo de juntura de exones, EJC (del inglés *exon junction complex*), presente luego de un codón de terminación, que no es removido por un ribosoma durante la denominada ronda “pionera” de la traducción (Lejeune y Maquat, 2005). Varias proteínas conteniendo dominios RS se han identificado como parte del EJC (Le Hir et al., 2000). En particular, se ha reportado que algunas proteínas SR clásicas regulan el proceso de NMD, estimulando o estabilizando la deposición del EJC (Zhang y Krainer, 2004).

---

### 1.1.3. PROTEÍNAS SR Y TRANSPORTE DE ARNm

---

La mayor parte de las proteínas SR, con la excepción de SC35, es capaz de trasladarse rápidamente entre el núcleo y el citoplasma (Caceres et al., 1998, Sapra et al., 2009). Esta capacidad es fundamental para el rol que cumplen las proteínas SR en la exportación del ARNm al citoplasma (Huang y Steitz, 2001, 2005). Esta función se ha asociado a la habilidad de ciertas proteínas SR de interactuar directamente con el factor de exportación de ARN, TAP. En particular, TAP interacciona preferencialmente con las proteínas SR en estado hipofosforilado (Huang et al., 2003). Dado que la fosforilación de las proteínas SR (ver “Fosforilación de proteínas SR”) es esencial para el ensamblado del spliceosoma mientras que su de-fosforilación es esencial para la progresión hacia la catálisis (las transesterificaciones del proceso del *splicing*), esto implicaría que las proteínas SR podrían tener un rol en integrar los procesos de *splicing* y exportación del ARN de manera concertada (Zhong et al., 2009).

---

### 1.1.4. PROTEÍNAS SR Y TRADUCCIÓN

---

Las proteínas SR capaces de trasladarse entre el núcleo y el citoplasma, en particular SF2/ASF, también son capaces de estimular la síntesis proteica promoviendo la entrada de los ARNm a polisomas (Sanford et al., 2005, Sanford et al., 2004). Recientemente se ha reportado que SF2/ASF estimula la iniciación de la traducción interactuando directamente con la proteína quinasa mTOR (Michlewski et al., 2008). Cabe aclarar que es improbable que este aumento traduccional en el citoplasma explique el requerimiento de esta proteína para la supervivencia celular, dado que al fusionarle a SF2/ASF una señal de retención nuclear se le inhibe la capacidad de traslocar al citoplasma pero no se afecta la viabilidad (Lin et al., 2005). Vale la pena remarcar que las proteínas SR fueron descritas como reguladoras de la exportación de un ARNm sin intrones (Huang y Steitz, 2001) y su rol en traducción también fue estudiado con reporteros sin intrones (Sanford et al., 2005, Sanford et al., 2004), de modo que las proteínas SR pueden llevar a cabo estas funciones de una manera *splicing*-independiente.



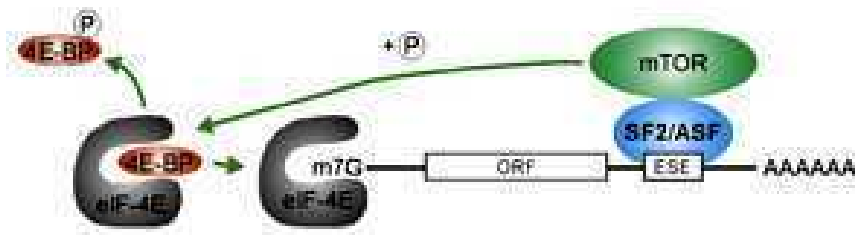


Figura 13 | **Rol de la proteína SF2/ASF en la traducción del ARNm.** SF2/ASF interacciona, vía su dominio RRM2, con la kinasa mTOR, lo que lleva a la fosforilación de la proteína 4E-BP1 y el consecuente aumento en la traducción. Tomado de (Michlewski et al., 2008).

### 1.1.5. PROTEÍNAS SR Y ESTABILIDAD GENÓMICA

La depleción de SF2/ASF en las células de pollo DT40 induce rupturas de la doble cadena de ADN, DSBs (del inglés *double-stranded DNA breaks*) y eventos groseros de recombinación (Li y Manley, 2005). De manera similar, la ausencia de SC35 en fibroblastos embrionarios de ratón desencadena DSBs (Xiao et al., 2007). Cómo la depleción de las proteínas SR causa inestabilidad genómica es una pregunta importante que comenzó a ser respondida por el laboratorio de James Manley, uno de los dos investigadores que varios años atrás había identificado a SF2/ASF<sup>1</sup>. En el complejo elongador de la ARN polimerasa II se forma una “burbuja” transcripcional referida como *R-loop*, una configuración en la cual el ARN naciente se asocia a la hebra codificante del ADN, desplazando a la no codificante (Drolet et al., 2003). Normalmente, esas estructuras se resuelven a medida que el complejo elongador avanza a lo largo del ADN. Sin embargo, un bloqueo en la transcripción puede resultar en un *R-loop* que permanece formado por más tiempo, permitiendo que el ADN simple cadena quede expuesto a nucleasas o deaminasas. Estos daños de ADN simple cadena pueden ser posteriormente convertidos a DSBs (Harrison y Haber, 2006). La formación de las partículas ribonucleoproteicas (ARNm en complejo con proteínas, RNPm) juega un rol vital en la prevención de la formación de *R-loops*, desde bacterias hasta mamíferos (Li y Manley,

<sup>1</sup> De hecho, J. Manley bautizó como *Alternative Splicing Factor* (ASF), mientras que Adrián Krainer caracterizó a la misma proteína como factor de *splicing* constitutivo y lo bautizó *Splicing Factor 2* (SF2). A partir de allí, la proteína es conocida como SF2/ASF o ASF/SF2.

2006, Luna et al., 2005). La proteína SR SF2/ASF juega un rol directo en la prevención de la formación de *R-loops* (Li y Manley, 2005) y, notablemente, el efecto se observa en genes sin intrones, reforzando la idea de otro rol *splicing*-independiente para las proteínas SR.

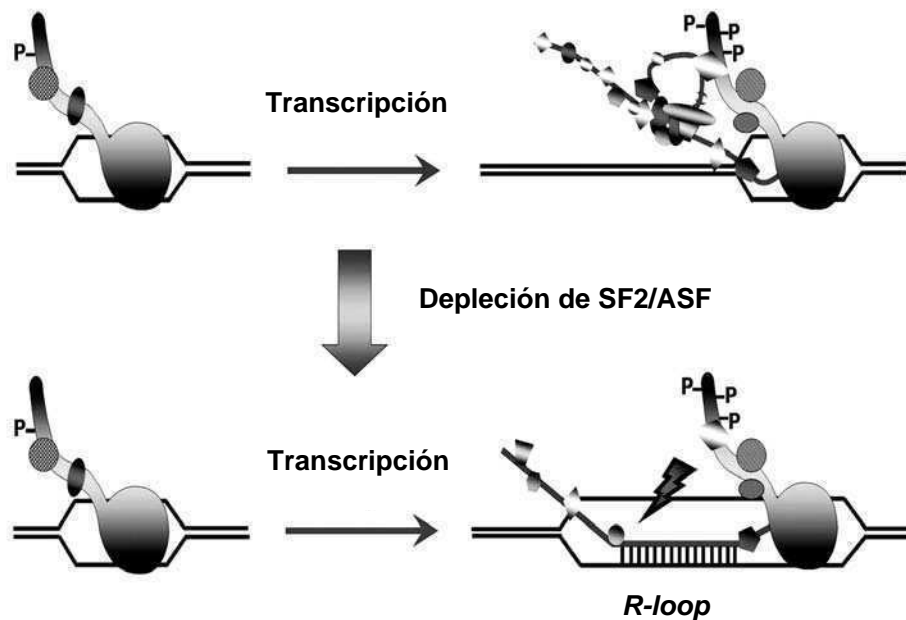


Figura 14 | Rol de la proteína SF2/ASF en la prevención de *R-loops*. Modelo elaborado por el laboratorio de James Manley sobre la formación de *R-loops* luego de la depleción de SF2/ASF. El conocido rol de SF2/ASF en la formación del complejo RNP mensajero y en el *splicing* co-transcripcional, naturalmente previene que los transcritos nacientes re-hibriden con el ADN templado. La depleción de SF2/ASF resulta en defectos en el empaquetado y/o *splicing* del ARN lo que permite que los transcritos nacientes re-hibriden con el ADN templado, formando un *R-loop*. Tomado de (Li & Manley, 2005).

Existe otra arista respecto de la relación proteínas SR/*R-loops*/elongación transcripcional. La elongación transcripcional induce superenrollamientos por delante y por detrás del *R-loop* los cuales, si no fueran removidos, retardarían al complejo elongador de la ARN polimerasa II. Una enzima clave involucrada en la remoción de los superenrollamientos del ADN es la Topoisomerasa I (Champoux, 2001). Es interesante que la Topoisomerasa I interacciona con y fosforila a SF2/ASF (Rossi et al., 1996). La actividad quinasa de la Topoisomerasa I es inhibida cuando está asociada al ADN y, de

manera inversa, la actividad isomerasa del ADN es inhibida cuando está asociada a SF2/ASF en estado hipofosforilado (Andersen et al., 2002).

---

### **1.1.6. FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS SR**

---

Los dominios RS de las proteínas SR son extensamente fosforilados. Mientras que la fosforilación en el dominio RS es esencial para la importación nuclear de las proteínas SR y para su función en mediar el ensamblado del spliceosoma (Lai et al., 2001, Roscigno y Garcia-Blanco, 1995, Xiao y Manley, 1997, Yeakley et al., 1999, Yun y Fu, 2000), la defosforilación parcial de las proteínas SR es crítica para la progresión del spliceosoma ensamblado hacia la catálisis (Cao et al., 1997, Mermoud et al., 1994) y, como se menciona más arriba, para una serie de eventos como la interacción con la maquinaria de transporte del ARNm y el control traduccional mediado por proteínas SR (Huang et al., 2004, Lin et al., 2005, Sanford et al., 2005)

Varias quinasas han sido implicadas en la fosforilación de las proteínas SR. Dentro de esta lista, las quinasas de las familias SRPK y Clk/Sty son las mejores caracterizadas. El análisis enzimático ha demostrado que las SRPKs utilizan un mecanismo procesivo para fosforilar una región bien definida en el dominio RS de las proteínas SR (Aubol et al., 2003, Ngo et al., 2008), y Clk/Sty puede fosforilar los sitios restantes en dicho dominio (Ngo et al., 2005, Velazquez-Dones et al., 2005), dando lugar a la posibilidad de que estas quinasas catalicen una fosforilación cooperativa para modular la función de las proteínas SR en distintos eventos bioquímicos y/o en distintas localizaciones sub-celulares (Hagopian et al., 2008, Ngo et al., 2005). Esta última idea es consistente con las localizaciones sub-celulares de las quinasas de proteínas SR: mientras que miembros de la familia Clk/Sty residen predominantemente en el núcleo (Colwill et al., 1996, Nayler et al., 1998), miembros de la familia de quinasas SRPK son detectados tanto en el núcleo como en el citoplasma (Ding et al., 2006, Wang et al., 1998). Sumándose a la lista de quinasas de proteínas SR, se encuentran AKT y Topoisomerasa I. El descubrimiento de AKT como quinasa de proteínas SR fue reportado por nuestro grupo utilizando a SF2/ASF y 9G8 como sustratos (Blaustein et al., 2005), y por otros utilizando la proteína SRp40 (Patel et al., 2005). Por otro lado, si bien la proteína Topoisomerasa I carece de

motivo de unión a ATP canónico, se ha demostrado que tiene actividad quinasa hacia proteínas SR, en particular SF2/ASF (Malanga et al., 2008, Rossi et al., 1996).

### 1.1.7. SF2/ASF: LA PROTEÍNA SR PROTOTÍPICA

El factor de *splicing* SF2/ASF es un miembro prototípico de la familia de proteínas SR, identificado como la actividad necesaria para complementar el extracto de células HeLa S100 que es deficiente en actividad de *splicing* (Krainer et al., 1990). También fue purificado de células HEK293 como un factor capaz de alterar la selección de sitios de *splicing* 5' alternativos de un pre-ARNm del virus SV40 (Ge y Manley, 1990). De este modo, SF2/ASF funciona como un regulador del *splicing*, tanto constitutivo como alternativo (Ge y Manley, 1990, Krainer et al., 1990). Con el tiempo se fue expandiendo la lista de ARNs cuyo *splicing* es regulado por SF2/ASF. En particular, recientemente se ha caracterizado a SF2/ASF como un proto-oncogén y este efecto está mediado por su acción como factor de *splicing* de ciertos ARNs (Karni et al., 2007). Otro estudio, en este caso del laboratorio de Giuseppe Biamonti, demostró elegantemente cómo los niveles de SF2/ASF regulan la motilidad celular y el proceso de transición epitelio-mesenquimal, ambos procesos cruciales en la transformación maligna, a través de la regulación del *splicing* alternativo del pre-ARNm del gen RON (Ghigna et al., 2005). En cuanto a las funciones de SF2/ASF más allá del *splicing*, la primera identificada fue en el proceso de traducción y fue reportada por el laboratorio de Javier Cáceres (Sanford et al., 2004). El mismo grupo indagó profundamente en los mecanismos moleculares subyacentes a dicha regulación, describiendo cómo la fosforilación de SF2/ASF afecta su rol en la regulación traduccional (Sanford et al., 2005) y demostrando que SF2/ASF interacciona directamente vía su segundo RRM (RRM2) con el regulador traduccional mTOR (Michlewski et al., 2008). Al mismo tiempo, como se menciona más arriba, se publicaban los reportes que asignaban a SF2/ASF un rol clave en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Li y Manley, 2005, 2006) como así también en el proceso de NMD (Zhang y Krainer, 2004). Cabe remarcar que si bien la regulación de estos procesos por SF2/ASF es independiente de su actividad como factor de *splicing*, todos ellos están relacionados con el metabolismo del ARNm y, en particular, con la capacidad de SF2/ASF de unirse directamente al mismo. De hecho, el rol de SF2/ASF como proto-oncogén es mediado por cambios en los patrones de *splicing* de los genes BIN1, MNK2 y S6K1 (Karni et al., 2007), mientras que participa en la fragmentación del ADN asociada a la apoptosis

regulando el patrón de *splicing* del gen ICAD (del inglés *Inhibitor of caspase-associated DNase*) (Li y Manley, 2006, Li et al., 2005).

### 1.1.8. SF2/ASF, SPECKLES Y GRÁNULOS DE ESTRÉS NUCLEARES

El núcleo de las células de mamíferos es una estructura altamente dinámica y comprende un número de dominios especializados (Misteli, 2001, Spector, 2001). Las proteínas SR, si bien muchas de ellas son capaces de trasladarse al citoplasma, residen preferencialmente en el núcleo y específicamente en regiones discretas denominadas *splicing speckles* (Figura I5) (Fu y Maniatis, 1990, Huang y Spector, 1991, Spector et al., 1991).

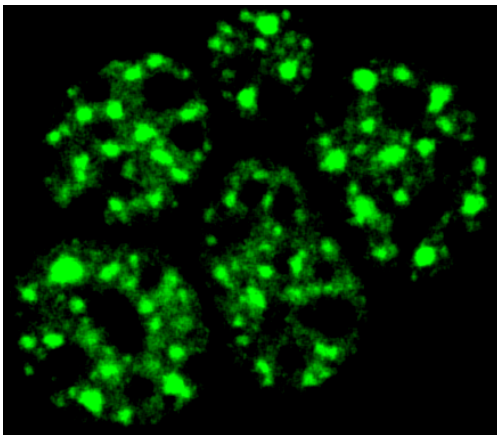


Figura I5 | **Localización sub-nuclear de las proteínas SR.** Los *speckles* son estructuras sub-nucleares enriquecidas en factores de procesamiento del pre-ARNm. Al microscopio de fluorescencia, aparecen como estructuras puntuadas irregulares de distinta forma y tamaño. Los *speckles* son estructuras dinámicas y sus componentes proteicos y complejos RNA-proteína pueden trasladarse continuamente entre los *speckles* y otros sitios nucleares. Imagen de

microscopía confocal de GFP-SF2/ASF obtenida en nuestro laboratorio.

Los gránulos de estrés nucleares, nSBs (del inglés *nuclear stress bodies*) fueron identificados originalmente como los sitios de acumulación del *heat-shock factor 1* (HSF1) en células estresadas (Sarge et al., 1993). Los nSBs aparecen en células humanas sujetas a un leve estrés por calor y también se los denomina *SAM68 nuclear bodies*, gránulos de HSF1 o gránulos de HAP (por *hnRNPA1-associated protein*) (Biamonti, 2004). Posteriormente se demostró que los nSBs son inducidos en células humanas no sólo luego del estrés por calor sino también por estrés químico e hipertónico y que son sitios de acumulación de factores de procesamiento del ARNm (Denegri et al., 2001). En particular, tres miembros de la familia de las proteínas SR, SF2/ASF, 9G8 y SRp30c, son reclutados a los nSBs. Los nSBs son ensamblados en regiones cromatínicas que

consisten en una serie de elementos de ADN repetitivo específico de humanos, *Satellite III* (SatIII), encontrado en regiones pericentroméricas heterocromáticas de algunos cromosomas humanos incluyendo el cromosoma 9 (Denegri et al., 2002, Jolly et al., 2002). Luego del estrés térmico, hay una reorganización de la cromatina que lleva a la transcripción mediada por HSF1 de ARNs SatIII, los cuales permanecen en los sitios de transcripción y juegan un rol primordial en la biogénesis de los nSBs (Jolly et al., 2004). El reclutamiento de las proteínas SR SF2/ASF y SRp30c a los nSBs depende de la presencia de los transcritos SatIII (Metz et al., 2004, Valgardsdottir et al., 2005) y, como se observa en la Figura 16, el reclutamiento de SF2/ASF a los nSBs es mediado por su RRM2 (Chiodi et al., 2004). De este modo, se ha propuesto que los nSBs son capaces de regular el *splicing* durante el estrés, secuestrando un conjunto de factores de *splicing* en una región sub-nuclear donde se unen a transcritos SatIII (Biamonti, 2004). En particular, se propone que el mencionado "secuestro" de los factores de *splicing* sería responsable de la inhibición global del *splicing* luego del estrés térmico (Biamonti y Caceres, 2009, Yost et al., 1990).

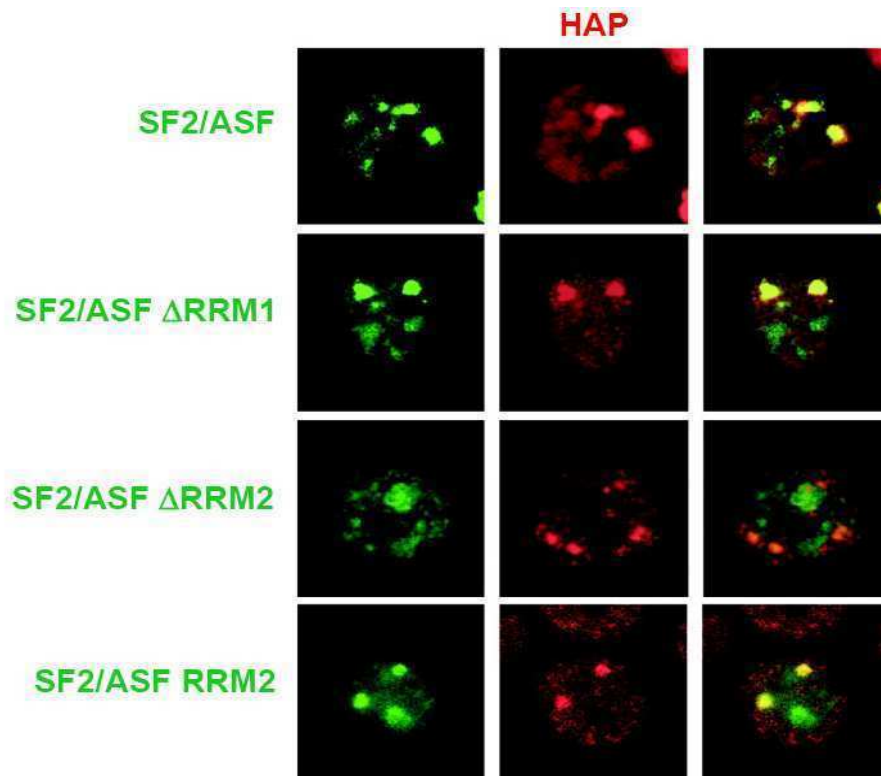


Figura 16 | **SF2/ASF es dirigida a los nSBs en respuesta a estrés por calor.** En respuesta al estrés hipertérmico, SF2/ASF (en verde) se re-localiza en los nSBs, lo que se evidencia por la co-localización con el marcador de estas estructuras sub-nucleares, la proteína HAP (en rojo). Como puede apreciarse, el dominio RRM2 es necesario y suficiente para esta re-localización. Tomado de (Chiodi et al., 2004).

## 1.2. MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL POR SUMO

### 1.2.1. UN POCO DE HISTORIA - LA FAMILIA DE PROTEÍNAS TIPO UBIQUITINA

La proteína ubiquitina (Ub) (Ciechanover et al., 1984, Hershko y Ciechanover, 1986, Schwartz y Ciechanover, 2009) y los miembros de su familia – las proteínas del tipo Ub [Ubls, del inglés *ubiquitin-like proteins* (Hochstrasser, 2009)] son conjugadas a proteínas, alterando las propiedades de estas últimas y aumentando enormemente la complejidad del proteoma en células eucariotas (Hay, 2005). En humanos se han identificado varias Ubls (Tabla I1), destacándose NEDD8 (Xirodimas, 2008), ISG15 (Andersen y Hassel, 2006, Pitha-Rowe y Pitha, 2007, Ritchie y Zhang, 2004), FAT10 (Groettrup et al., 2008), Atg8 y Atg12 (Geng y Klionsky, 2008), y SUMO (Hochstrasser, 2009).

Ubl	Identidad con Ub	Enzima activadora de Ubl	Enzima conjugadora de Ubl
<b>Ubiquitina</b>	100	Uba1	Muchas
<b>NEDD8</b>	55	Uba3-Ula1	Ubc12
<b>FAT10</b>	32 y 40 <sup>¶</sup>	UBA6	No identificada
<b>ISG15</b>	32 y 37 <sup>¶</sup>	UBE1L	Ubch8
<b>Smt3 (SUMO)</b>	<b>18</b>	<b>Uba2-Aos1 (SAE1/SAE2)</b>	<b>Ubc9</b>
<b>Atg8</b>	No determinada	Atg7	Atg3
<b>Atg12</b>	No determinada	Atg7	Atg10

Tabla I1 | **Lista de Ubls conocidas.** Se detallan las proteínas Ubl descritas hasta la fecha junto con su % de identidad de secuencia aminoacídica y las enzimas E1 y E2 específicas para la conjugación de cada Ubl (ver "Mecanismo de conjugación" más abajo). Tomado de Hochstrasser, 2009. <sup>¶</sup>Los porcentajes de identidad corresponden a los dos dominios de tipo Ub.

Recientemente, se han reportado un número creciente de proteínas que son modificadas por la adición o conjugación de SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*). El proceso

conocido como SUMOilación es una rápida y reversible modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente de la proteína denominada SUMO a una proteína blanco, en forma similar a la conjugación de Ub (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007, Hay, 2005, Johnson, 2004, Melchior, 2000, Melchior et al., 2003, Schwartz y Hochstrasser, 2003). El gen de SUMO (Smt3 en levaduras) fue inicialmente identificado en *Saccharomyces cerevisiae* en un estudio cuyo objetivo era la búsqueda de supresores de la proteína centromérica Mif2 (Meluh y Koshland, 1995). La caracterización inicial de la proteína proviene de tres estudios que reportaron a SUMO como proteína capaz de interactuar con RAD51 y RAD52 (Shen et al., 1996), FAS (Okura et al., 1996) y PML (Boddy et al., 1996). Finalmente se demostró la unión covalente entre SUMO y RanGAP1 (del inglés *Ran GTPase-activating protein 1*) (Mahajan et al., 1997, Matunis et al., 1996).

---

### 1.2.2. LA FAMILIA SUMO

---

Algunos organismos como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, tienen un solo gen de SUMO. Otros organismos como plantas y vertebrados poseen varios genes de SUMO (Melchior, 2000). Existen cuatro isoformas de SUMO en mamíferos: SUMO1, SUMO2, SUMO3 y SUMO4. Las proteínas SUMO tienen un peso molecular de ~10 KDa y se asemejan en estructura tridimensional a la Ub (Bayer et al., 1998, Mossessova y Lima, 2000). Todas las proteínas SUMO contienen una seguidilla de 10-25 aminoácidos no estructurados en su N-terminal que no se encuentra en otras proteínas Ubl. Todas las proteínas SUMO se expresan en una proforma inmadura, conteniendo un segmento carboxilo (C-)terminal de largo variable (2-11 aminoácidos) luego del dipéptido glicina-glicina que es invariable y marca el extremo C-terminal de la proteína madura (ver más abajo "Proteasas específicas de SUMO"). Las formas maduras de SUMO2 y SUMO3 comparten 97% de identidad de secuencia aminoacídica y ambas comparten sólo un 50% de identidad con SUMO1.

Se cree que SUMO1 y SUMO2/3 tienen funciones distintas *in vivo* porque son conjugadas a diferentes proteínas blanco (Rosas-Acosta et al., 2005, Vertegaal et al., 2006). Como la ubiquitinación, la SUMOilación resulta en la formación de una unión isopeptídica entre la glicina C-terminal de SUMO y el grupo amino  $\epsilon$  de una lisina en la proteína blanco



(Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). Si bien la SUMOilación requiere una cascada enzimática similar a la ubiquitinación, no hay superposición entre las enzimas utilizadas en cada cascada (Tabla I1).

### 1.2.3. MECANISMO DE CONJUGACIÓN

Las Ubls se conjugan a sus proteínas blanco por una cascada enzimática que involucra una enzima activadora de Ubl (E1), una enzima conjugadora de Ubl (E2) y, típicamente, una enzima ligasa de Ubl (E3) (Hochstrasser, 2000, 2009, Kerscher et al., 2006, Schwartz y Hochstrasser, 2003). En cuanto a la conjugación de SUMO específicamente, el primer paso consiste en la activación de SUMO por la enzima activadora E1 específica de SUMO, un heterodímero de las proteínas SAE1-SAE2 en mamíferos (Uba2-Aos1 en levaduras) (Desterro et al., 1999, Gong et al., 1999, Johnson et al., 1997). Esta reacción utiliza ATP para la formación de un intermediario SUMO-adenilato, en el que el extremo C-terminal de SUMO está covalentemente unido a AMP. La ruptura de la unión SUMO-AMP es seguida de la formación de un enlace tioester entre el grupo carboxilo del C-terminal de SUMO y el grupo -SH de la cisteína catalítica en SAE2 (C173). En el segundo paso de la reacción, SUMO es transferido desde SAE2 a la enzima conjugadora E2, Ubc9, formando un nuevo enlace tioester, esta vez entre la cisteína catalítica de Ubc9 (C93) y el grupo carboxilo de la glicina C-terminal de SUMO (Desterro et al., 1997, Johnson y Blobel, 1997). Una característica que diferencia a Ubc9 de las enzimas E2 del resto de las Ubls es su capacidad de reconocer al sustrato proteico directamente. De esta manera, el complejo entre SUMO y Ubc9 unidos mediante un enlace tioester (Ubc9~S~SUMO) cataliza la formación de la unión isopeptídica entre SUMO y sustrato (Capili y Lima, 2007, Desterro et al., 1997, Lin et al., 2002, Reverter y Lima, 2005, Yunus y Lima, 2006). Esta serie de pasos enzimáticos se resumen, en forma de esquema, en la Figura I7.

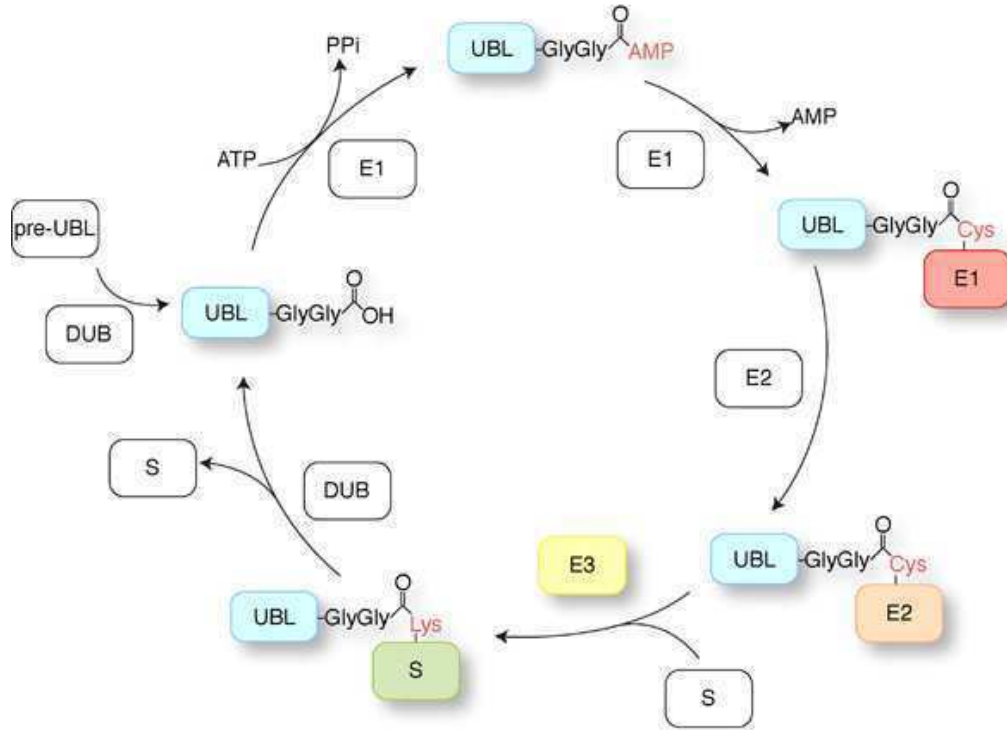


Figura 17 | **Visión esquemática de los pasos involucrados en la conjugación de Ubis.** Se esquematizan los pasos implicados en la conjugación de Ubis a proteínas blanco. Pre-UBL, Ubl inmaduro; DUB, *de-ubiquitinating enzymes*; S, sustrato.

Si bien Ubc9 es capaz de transferir a SUMO directamente al sustrato *in vitro*, este proceso es facilitado *in vivo* por E3 ligasas de SUMO (Hay, 2005, Hochstrasser, 2001). Las E3 ligasas facilitan la transferencia de SUMO a la proteína blanco, regulan la selección de sustrato y el grado de SUMOilación *in vivo* (Melchior et al., 2003). Las E3 ligasas de SUMO caracterizadas hasta la fecha incluyen a miembros de la familia Siz/PIAS (del inglés *Protein Inhibitor of Activated Stat*), la proteína del complejo del poro nuclear RanBP2 (del inglés *Ran binding protein 2*), Pc2 (del inglés *Polycomb group 2*) y la proteína Topors (del inglés *Topoisomerase I-binding, RS domain-containing protein*). Las proteínas Siz identificadas en levaduras poseen actividad de E3 ligasas de SUMO *in vitro* y la depleción de los genes Siz1 y Siz2 elimina casi toda la conjugación de SUMO *in vivo* (Johnson y Gupta, 2001, Takahashi et al., 2001, Takahashi et al., 2001). En eucariotas superiores, las proteínas PIAS son homólogas de las proteínas Siz y también funcionan como E3 ligasas de SUMO (Kotaja et al., 2002, Palvimo, 2007, Rytinki et al., 2009). Las proteínas de la familia Siz/PIAS son similares a la familia de las E3 ligasas de Ub que

contienen dominios RING, las cuales funcionan como adaptadores que aproximan al sustrato y a la E2 cargada con Ub (Deshaies y Joazeiro, 2009, Joazeiro y Weissman, 2000). Las E3 ligasas RanBP2 y Pc2 no están relacionadas con ninguna E3 ligasa de Ub (Kagey et al., 2003, Pichler et al., 2002, Pichler et al., 2004). RanBP2 es parte del complejo del poro nuclear y cataliza la transferencia de SUMO1 a los sustratos Sp100 y HDAC4 (Kirsh et al., 2002, Pichler et al., 2002). Mientras que RanBP2 y Siz/PIAS actúan como verdaderos catalizadores (Pichler et al., 2002, Pichler et al., 2004, Yunus y Lima, 2009), no está claro si ese también es el caso de Pc2 (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). Recientemente se ha identificado a la proteína Topors como una E3 ligasa de SUMO específica para los sustratos p53 y Topoisomerasa I (Hammer et al., 2007, Weger et al., 2005). Llamativamente, esta proteína contiene un dominio RING y un dominio RS. Al igual que Pc2, se desconoce el mecanismo mediante el cual Topors aumenta la SUMOilación.

A pesar del gran avance reciente en el campo de la SUMOilación de proteínas, la regulación de este proceso es aún escasamente conocida. Es difícil concebir que un número tan limitado de componentes identificados hasta la fecha puedan dar cuenta de la compleja regulación de este proceso (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). En este aspecto, ha sido recientemente reportado que la proteína RSUME, la cual contiene un motivo RWD, es capaz de estimular la SUMOilación mediante la promoción de la interacción entre las enzimas E1 y E2, la formación del enlace tioéster entre SUMO y Ubc9, la interacción no covalente entre SUMO y Ubc9 y la transferencia de SUMO a proteínas blanco específicas (Carbia-Nagashima et al., 2007). Estos resultados contribuyen a la idea de que la lista de reguladores de la vía de SUMOilación es aún incompleta y que no estaría restringida a las clásicas enzimas E1, E2 y E3. Es concebible que proteínas accesorias (por ejemplo co-factores) participen en la regulación de este proceso tal como ocurre con los complejos proteicos que funcionan como E3 ligasas de Ub (Joazeiro y Weissman, 2000). En este sentido, se ha descrito un gran complejo de varias sub-unidades con actividad de E3 ligasa de SUMO en *S. pombe* (Andrews et al., 2005).

#### 1.2.4. SECUENCIAS BLANCO DE SUMOILACIÓN

Originalmente se consideraba que la proteína blanco de SUMOilación tiene que cumplir dos requisitos para que ocurra esta modificación: i) tiene que contener una secuencia consenso para la conjugación de SUMO definida como  $\Psi$ KXD/E donde  $\Psi$  es un aminoácido grande e hidrofóbico, K es la lisina blanco de la reacción, X es cualquier aminoácido, D es ácido glutámico y E, ácido aspártico; y ii) tiene que contener una señal de localización nuclear (Rodriguez et al., 2001). Sin embargo, el número de proteínas SUMOiladas reportadas que se desvían de la secuencia consenso o que no poseen tal secuencia está en continuo crecimiento (Andersen et al., 2009, Vertegaal et al., 2006, Vertegaal et al., 2004), de modo que actualmente no existen métodos confiables de predicción de secuencias blanco de SUMOilación. En cuanto al requerimiento de localización nuclear, se ha descartado como generalidad dado que depende de cada caso específico y de las redes de interacciones de cada proteína (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

Dos extensiones del consenso han sido recientemente identificadas: la primera es un sitio de SUMOilación dependiente de fosforilación, PDSM (del inglés *Phosphorylation-Dependent SUMOylation Motif*) (Hietakangas et al., 2006). Este motivo consiste en el motivo convencional mencionado anteriormente seguido de un número variable de entre 2 y 5 aminoácidos cualquiera, seguidos de una serina fosforilada y una prolina ( $\Psi$ KXD/EX<sub>2-5</sub>pSP) (Hietakangas et al., 2006). Se especula que la carga negativa del grupo fosfato podría estimular la interacción entre Ubc9 y el sustrato (Mohideen et al., 2009). En términos más generales, un rol importante para residuos cargados negativamente en posiciones hacia el extremo carboxilo de la lisina aceptora ha sido revelado por el análisis de secuencias de muchos sustratos de SUMOilación (Blomster et al., 2009). Esto llevó a la identificación de un segundo motivo extendido, NDSM (del inglés *Negatively charged amino-acid-Dependent SUMOylation Motif*). Ambos motivos tienen en común el hecho de que una carga negativa cerca del sitio consenso mínimo estimula la SUMOilación. Esto se debe a que una región básica de la enzima Ubc9 debe interaccionar con una región ácida de la proteína blanco (Mohideen et al., 2009, Yang et al., 2006).

### 1.2.5. PROTEASAS ESPECÍFICAS DE SUMO

Debido a la acción de proteasas específicas, la SUMOilación es una modificación reversible. Hasta la fecha, se ha descrito una sola familia génica que codifica para las cisteín-proteasas específicas de SUMO (Drag y Salvesen, 2008, Kim y Baek, 2009, Mukhopadhyay y Dasso, 2007, Yeh, 2009). En humanos existen seis proteasas específicas de SUMO (SEN1-3 y SEN5-7). Aparte de su función como isopeptidasa, las SENPs poseen actividad de hidrolasa C-terminal, necesaria para la maduración de las proteínas SUMO recién traducidas (Drag y Salvesen, 2008). Distintos miembros de la familia de las SENPs difieren en su actividad isopeptidasa e hidrolasa y también difieren en su selectividad respecto de los distintos SUMO (Mukhopadhyay y Dasso, 2007).

### 1.2.6. CONSECUENCIAS DE LA SUMOILACIÓN

Las consecuencias de la SUMOilación son variadas y dependientes del sustrato o proteína blanco. Esta modificación puede alterar la localización sub-celular, la actividad y/o la estabilidad de la proteína blanco. A nivel molecular, es importante destacar que la estructura tridimensional de la Ub y de las Ubls, en particular, la de SUMO está altamente conservada (Bayer et al., 1998, Vijay-Kumar et al., 1987, Vijay-Kumar et al., 1987) (Figura I8).

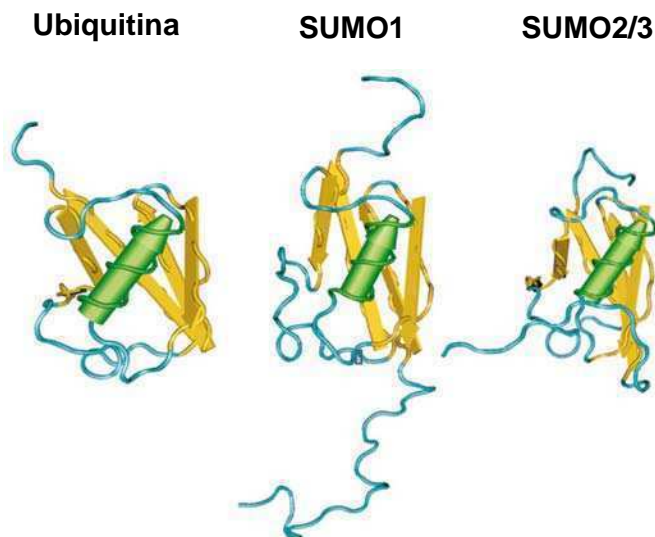


Figura I8 | **Estructura tridimensional de Ub y SUMO.**

Esquema comparativo de las estructuras tridimensionales de Ub, SUMO1 y SUMO3. Tomado de (Martin et al., 2007).

En los últimos años, se ha establecido un rol para Ub en la regulación de interacciones proteína-proteína más allá del etiquetado para la degradación, debido principalmente a la existencia de distintos motivos capaces de reconocer la Ub o cadenas de la misma (Hurley et al., 2006). De hecho, vale la pena citar un trabajo en el que demuestran que la mono-ubiquitinación de un factor esencial de *splicing* es indispensable para el ensamblado del tri-snRNP U4-U5/U6 (Bellare et al., 2008). De manera análoga, la SUMOilación modifica superficies proteicas o estructuras tridimensionales, pudiendo alterar interacciones con otras macromoléculas (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). Recientemente, ha sido identificado un motivo aminoacídico corto y de naturaleza hidrofóbica en proteínas que interactúan con SUMO en forma no-covalente. Este motivo se denomina SIM (del inglés *non-covalent SUMO-Interaction Motif*) (Perry et al., 2008, Seu y Chen, 2009). Se ha establecido un rol para los motivos SIM en el mecanismo básico de SUMOilación. Ubc9 es sustrato de SUMOilación y se ha demostrado que esto aumenta su afinidad –y por ende, su capacidad de conjugar SUMO- por un conjunto de sustratos, los cuales poseen dominios SIM (Knipscheer et al., 2008). De este modo, dichos sustratos se independizarían de la actividad de E3 ligasas, cuya función sería reemplazada por la interacción SIM-SUMO-Ubc9 (Knipscheer et al., 2008). También se ha demostrado que la actividad E3 ligasa de la proteína Pc2 depende de motivos SIM (Merrill et al., 2010). A nivel funcional, las consecuencias de la conjugación de SUMO pueden ser variadas (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). A diferencia de la conjugación de Ub que, en la mayoría de los casos, lleva a degradación por el proteasoma, la SUMOilación no lleva a sus proteínas blanco a un destino específico. La conjugación de SUMO altera la superficie de una proteína de manera tal que la misma puede perder o ganar interacciones (Figura I9).

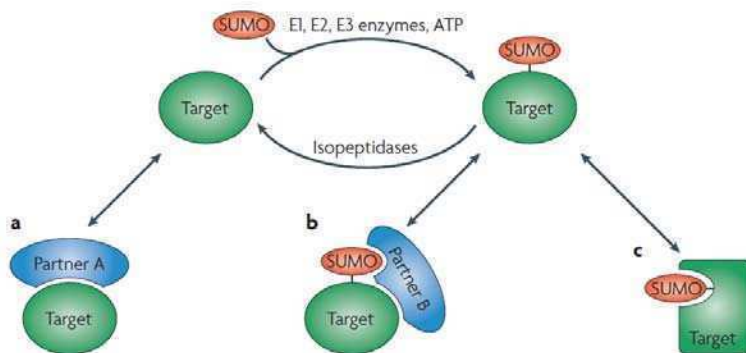


Figura I9 | **Consecuencias moleculares de la conjugación de SUMO.** Se toma como ejemplo una proteína blanco de SUMOilación (*Target*) que interactúa con la proteína A (*Partner A*) cuando no se encuentra

conjugada a SUMO (a). Al SUMOilarse, la proteína blanco puede cambiar el repertorio de proteínas con las que interactúa (b) y/o cambiar su conformación y, eventualmente, su función (c). Tomado de (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

A su vez, la conjugación de SUMO puede competir con otras modificaciones post-traduccionales que tengan como blanco al aminoácido lisina, como lo son la ubiquitinación y la acetilación. Si bien queda mucho por aprender acerca del mecanismo mediante el cual la conjugación de SUMO altera la función proteica, está claro que la SUMOilación regula la actividad y/o localización sub-celular de proteínas modificando, principalmente, interacciones proteína-proteína (Gill, 2004). El número de procesos celulares reportados que son regulados por la SUMOilación está en aumento e incluyen: transcripción (Sapetschnig et al., 2002, Savare et al., 2005, Valin y Gill, 2007, Verger et al., 2003, Yang y Sharrocks, 2004), estructura de la cromatina (Ouyang y Gill, 2009), reparación del ADN y estabilidad genómica (Heideker et al., 2009, Lee y O'Connell, 2006, Zhao y Blobel, 2005), vías de señalización celulares (Miyazono et al., 2008, Yang et al., 2003) y función neuronal (Dorval y Fraser, 2007, Martin et al., 2007, Navascues et al., 2008, Wilkinson et al., 2008). Para una descripción completa y detallada de los mecanismos y roles diversos de la SUMOilación, el artículo de revisión de una investigadora pionera en el campo, Frauke Melchior, es una excelente guía y posee una lista muy completa de referencias bibliográficas (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

---

### **1.2.7. SUMOILACIÓN Y ESTRÉS CELULAR**

---

La observación inicial de la regulación de la conjugación de SUMO por estrés, provino del trabajo pionero de Saitoh y Hinchey, quienes reportaron que varios tipos de estrés (osmótico, oxidativo, térmico) aumentaban la SUMOilación a nivel global por SUMO2/3 y, en mucha menor medida, por SUMO1 (Saitoh y Hinchey, 2000). En la misma línea, fue demostrado que el estrés oxidativo y el tratamiento con etanol aumentan la SUMOilación en levaduras (Zhou et al., 2004). La situación no parece ser tan sencilla a nivel de sustratos particulares, y suele depender de la intensidad y duración del estrés (Tempe et al., 2008). De los mencionados, el estrés por calor es el que lleva a cambios más abruptos en la conjugación de SUMO. El estrés por calor aumenta drásticamente la SUMOilación de HSF1, lo que resulta en una mayor afinidad por el ADN y consecuente actividad transcripcional (Hong et al., 2001). Por el contrario, la SUMOilación de Topoisomerasa I se ve reducida en respuesta al estrés por calor (Mo et al., 2002). ¿Es importante la SUMOilación para la respuesta celular al estrés por calor? Esta pregunta no tenía respuesta hasta el año 2009, cuando el grupo del Dr. Ron Hay se embarcó en un estudio proteómico de los cambios en SUMOilación inducidos por el estrés térmico

(Golebiowski et al., 2009). En primer lugar, los autores demostraron que la depleción de SUMO2 y SUMO3 por medio de siRNA disminuye la capacidad de las células de sobrevivir al estrés hipertérmico. En cuanto a la regulación de la SUMOilación en respuesta al estrés, detectaron aumentos de hasta 100 veces y disminuciones de hasta 20 veces. Particularmente, los autores identificaron las E3 de SUMO, PIAS1-4, RanBP2 y Topors, las cuales no sólo estimulan la transferencia de SUMO a sustratos sino que ellas mismas se SUMOílan (Pichler et al., 2002, Schmidt y Muller, 2002, Weger et al., 2003). El estrés térmico aumentó la SUMOilación de todas estas E3 ligasas de SUMO (Golebiowski et al., 2009). Dos puntos más resultan de particular interés para el presente trabajo de Tesis: i) tal como se había reportado previamente (Vertegaal et al., 2004), este trabajo demuestra que al agrupar las proteínas blanco de SUMOilación de acuerdo a su función biológica, sobresalen transcripción y procesamiento del ARN, y remodelado de la cromatina (Golebiowski et al., 2009) y ii) llamativamente, los autores realizaron un mapa de las redes de interacciones proteína-proteína de los sustratos de SUMOilación regulados por el estrés hipertérmico y, si bien SF2/ASF no es sustrato de SUMOilación, se encuentra en el centro de dicho mapa. Esto indica que SF2/ASF interacciona con muchas proteínas que participan en el metabolismo del ARN cuya SUMOilación es regulada por el estrés térmico (Golebiowski et al., 2009).



---

### **1.3. ANTECEDENTES DEL GRUPO**

---

Dentro del grupo liderado por la Dra. Srebrow el tema de investigación desde el año 2000 se basó en la regulación del proceso de *splicing* alternativo por vías de transducción de señales (Blaustein et al., 2004, Blaustein et al., 2007, Blaustein et al., 2005, Pelisch et al., 2005). Trabajos recientes, también de nuestro grupo de investigación, apuntan a las proteínas SR como los mediadores entre señales extracelulares y los procesos de *splicing* y traducción de manera conjunta (Blaustein et al., 2005, Blaustein et al., 2009). El trabajo cotidiano en el campo del *splicing* nos llevó de manera casual al descubrimiento que dio origen a esta Tesis: la proteína SR, SF2/ASF, aumenta la conjugación de SUMO a proteínas.

## **OBJETIVOS**

---

### **2.1. GENERAL**

---

El objetivo general planteado en este trabajo fue el de estudiar el posible rol de la familia de proteínas SR en la conjugación de SUMO. De este objetivo general se desprenden una serie de objetivos particulares que se detallan a continuación:

### **2.2. ESPECÍFICOS**

---

- **Evaluar si el nivel de expresión de las proteínas SR afecta la conjugación de SUMO a nivel global**
- **Evaluar si dicho rol es directo (interacción proteína-proteína) o mediante algún mecanismo que involucre su ya conocida función en la regulación del *splicing***
- **Estudiar el mecanismo molecular mediante el cual las proteínas SR ejercen su efecto**
- **Estudiar blancos específicos de SUMOilación regulados por proteínas SR**

## MATERIALES Y METODOS

---

### 3.1. CULTIVO CELULAR

---

#### 3.1.1. LÍNEAS CELULARES

---

Las células HEK293T (ATCC #CRL-11268) fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 4,5 g/L glucosa, 110 mg/L piruvato de sodio y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomina). Ocasionalmente, si se quiere utilizar el medio completo con posterioridad a las dos semanas de preparación, se agrega también L-glutamina en una concentración final de 2,9 g/L. Antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspira el medio de cultivo y se coloca 1 ml de tripsina 2,5 % p/v. Luego de incubar a 37°C unos dos o tres minutos, se detiene la reacción con 9 ml de medio completo, se re-plaquea entre 1/5 y 1/20 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se lleva a 12 ml de volumen final con medio completo. Las células son congeladas en N<sub>2</sub> líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales. Las células COS7 (ATCC #CRL-1651), HeLa (ATCC #CCL-2) y HCT-116 (ATCC #CCL-247) fueron mantenidas de la misma manera pero en medio carente de piruvato de sodio. Las células SCp2 (provistas por el laboratorio de la Dra. Mina Bissell, del Lawrence Berkeley National Laboratory) fueron mantenidas en medio DMEM:F-12 suplementado con 2% suero fetal bovino, más Insulina (5 µg/ml, Gibco) y gentamicina (50 µg/ml, Gibco). Antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspira el medio de cultivo y se coloca 1 ml de tripsina 0,05 % p/v. Luego de incubar a 37°C cinco minutos, se detiene la reacción con 9 ml de medio completo, se re-plaquea entre 1/3 y 1/6 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se lleva a 12 ml de volumen final con medio completo.

---

### 3.1.2. TRANSFECCIONES CON ADN

---

Las células HEK293T ( $5 \times 10^5$ ), SCp2 ( $3 \times 10^5$ ), COS7 ( $2 \times 10^5$ ) o HeLa ( $2,5 \times 10^5$ ) fueron transfectadas en placas de cultivo de 35 mm con  $6 \mu\text{l}$  de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 2  $\mu\text{g}$  de ADN. Brevemente, el protocolo de transfección con lipofectamina que utilizamos en nuestro laboratorio es el siguiente:

- Se coloca 2  $\mu\text{g}$  totales de ADN plasmídico en un tubo *ependorf* que contiene 250  $\mu\text{l}$  de Opti-MEM (Invitrogen).
- Se colocan 6  $\mu\text{l}$  de lipofectamina 2000 en un tubo polipropileno de 5 ml con tapa que contiene 250  $\mu\text{l}$  de Opti-MEM y se incuba por 5 min.
- Se transfiere el contenido del tubo *ependorf* al tubo con lipofectamina 2000 y se mezcla vigorosamente.
- Se incuba 20 minutos para que se formen los complejos entre el poli-cación y el ADN.
- Se lavan las células con PBS para eliminar trazas de suero y antibióticos que inhiban la transfección, y se dejan en 2 ml de Opti-MEM.
- Se agregan por goteo 500  $\mu\text{l}$  de los complejos en cada pocillo.
- Se dejan las células en el incubador durante 4 a 6 hs aproximadamente para que ocurra la transfección.
- Luego se aspira el medio para eliminar la lipofectamina 2000, que de lo contrario tiene efectos tóxicos a largo plazo, y se agrega 2 ml de medio completo por pocillo.

---

### 3.1.3. TRANSFECCIONES CON ARN

---

Para los experimentos de ARN de interferencia, las células HEK293T ( $2 \times 10^5$ ) fueron transfectadas en placas de cultivo de 35 mm con 3  $\mu\text{l}$  Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 10-25 nM siRNA. El procedimiento es el mismo que el detallado para la transfección con ADN. La secuencia de los siRNAs se detalla a continuación:

siRNA SF2/ASF: 5'-CCAAGGACAUUGAGGACGU(dT)(dT)-3'

siRNA LUC: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA(dT)(dT)-3' (Elbashir et al., 2001).

### 3.1.4. ENSAYOS DE LUCIFERASA

Las células HCT-116 (p53 +/+ y -/-) fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos ( $5 \times 10^4$  células por pocillo). Luego de 24 h fueron transfectadas con 1,2  $\mu$ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 0,4  $\mu$ g de ADN total (100 ng de la construcción reportera p21-LUC, 100 ng del vector HA-SUMO3 y 20 ng del vector T7-SF2/ASF). Brevemente, el protocolo de transfección con lipofectamina utilizado fue el siguiente:

- Se coloca 0,4  $\mu$ g totales de ADN plasmídico en un tubo *ependorf* que contiene 50  $\mu$ l de Opti-MEM (Invitrogen).
- Se colocan 1,2  $\mu$ l de lipofectamina 2000 en un tubo *ependorf* de 1,75 ml conteniendo 50  $\mu$ l de Opti-MEM y se incuba por 5 min.
- Se transfiere el contenido del tubo con el ADN al tubo con lipofectamina 2000 y se mezcla vigorosamente.
- Se incuba 20 minutos para que se formen los complejos entre el poli-cation y el ADN.
- Se lavan las células con PBS para eliminar trazas de suero y antibióticos que inhiban la transfección, y se dejan en 0,4 ml de Opti-MEM.
- Se agregan por goteo 100  $\mu$ l de los complejos en cada pocillo.
- Se dejan las células en el incubador durante 4 a 6 hs aproximadamente para que ocurra la transfección.
- Luego se aspira el medio para eliminar la lipofectamina 2000, que de lo contrario tiene efectos tóxicos a largo plazo, y se agrega 0,5 ml de medio completo por pocillo.

La actividad de Luciferasa en los lisados celulares fue medida utilizando el kit *Luciferase Assay System* (Promega). Las células se lavaron con PBS y luego fueron lisadas en 100  $\mu$ l del *reporter lysis buffer* (Promega). Luego de una centrifugación de 5 min a 12.000 g, 30  $\mu$ l del sobrenadante fueron mezclados con 70  $\mu$ l del *luciferase assay buffer II* (Promega) y la actividad de luciferasa fue medida en un luminómetro (junior luminometer, Berthold, Bad Wildbad, Germany).

---

### 3.1.5. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA: nSBs I

---

Las células HeLa fueron transfectadas con mCherry-SUMO1 o mCherry-SUMO2. Al día siguiente, las células fueron transferidas a un baño térmico a 42°C por 1 h y luego se les permitió recuperarse a 37°C por 1 h. A continuación, las células fueron fijadas en para-formaldehído 3,7% por 10 min y permeabilizadas en tritón X-100 0,5% en PBS por 7 min en hielo. Luego de bloquear por 30 min con una solución de suero de cabra 1% en PBS, las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-SF2/ASF (clon mAb103, sobrenadante de cultivo de hibridoma provisto por Adrián Krainer) diluído 1/10 en solución de bloqueo. Luego de 3 lavados con PBS, las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón (hecho en cabra) conjugado a Alexa Fluor 488 (diluído 1/600 en solución de bloqueo) por 1 h. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS y montadas en medio VECTASHIELD (Vector Labs). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio *DeltaVision Spectris wide field deconvolution microscope/Olympus IX71* con un objetivo 60x 1.42 NA. Las células fueron expuestas para dar una intensidad máxima de ~2000 cuentas (12 bit). El procesamiento y análisis se llevó a cabo con el *software* SoftWorx software (Applied Precision).

---

### 3.1.6. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA: nSBs II

---

Las células HEK293T fueron transfectadas con GFP-SUMO1 o el mutante no conjugable GFP-SUMO1(GA). Al día siguiente, las células fueron transferidas a un baño térmico a 42°C por 1 h y luego se les permitió recuperarse a 37°C por 1 h. A continuación, las células fueron fijadas en para-formaldehído 3,7% por 10 min y permeabilizadas en tritón X-100 0,5% en PBS por 7 min en hielo. Luego de bloquear por 30 min con una solución de BSA 3% en PBS, las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-Sam68 (clon 7-1, Santa Cruz Bioechnology) diluído 1/50 en solución de bloqueo. Luego de 3 lavados con PBS, las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón conjugado a Alexa Fluor 637 (diluído 1/200 en solución de bloqueo) por 1 h. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS y montadas en medio VECTASHIELD (Vector Labs).

### 3.2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CONJUGADAS A 6xHis-SUMO1

Células HEK293T ( $1 \times 10^6$ ) fueron plaquedas en placas de cultivo de 6-cm y 24 h más tarde transfectadas de acuerdo con el protocolo indicado (todas las cantidades 2X respecto del protocolo para placas de 35-mm). Luego de 48 h, las células se lavaron con PBS y se lisaron en 3 ml de *buffer* de extracción en tubos *Falcon* de 15 ml. Los lisados fueron sonicados brevemente para disminuirles la viscosidad. En este punto, una alícuota se tomó como *input* y las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA), lavadas con acetona fría y posteriormente resuspendidas en *Laemmli sample buffer 2X*. Al resto del lisado se le agregó 75  $\mu$ l de la resina  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (QIAGEN). Luego de incubarlo con rotación durante 4 h, los tubos fueron centrifugados a 5.000 g por 5 min y se descartó el *buffer*. La resina fue resuspendida en 0,75 ml de *buffer* de extracción y el contenido fue transferido a un tubo *ependorf*. Luego de 5 min de incubación con rotación, las muestras fueron centrifugadas por 10 seg a 13.000 g y se descartó el sobrenadante. Luego, se repitió este procedimiento de lavado utilizando secuencialmente los *buffers* Urea I, Urea II y Urea III. Luego, se eluyen las proteínas unidas a la resina incubando por 20 min con 75  $\mu$ l de *buffer* de elución. Luego de un *spin*, 10  $\mu$ l del sobrenadante se mezclaron con 10  $\mu$ l de *Laemmli sample buffer 2X* (Laemmli, 1970).

*Buffer* de extracción (pH 8): guanidinio-HCl 6M, Tris-HCl 10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100, imidazol 5 mM y iodoacetamida 10 mM.

*Buffer* Urea I (pH 8): Urea 8M, Tris-HCl 10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, imidazol 5 mM y iodoacetamida 10 mM.

*Buffer* Urea II (pH 6,3): Urea 8M, Tris-HCl 10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, tritón X-100 0,2%, imidazol 5 mM y iodoacetamida 10 mM.

*Buffer* Urea III (pH 6,3): Urea 8M, Tris-HCl 10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, tritón X-100 0,1%, imidazol 5 mM y iodoacetamida 10 mM.

*Buffer* de elución: Tris-HCl pH 6,7 125 mM, SDS 5%, glicerol 30%, 720 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, imidazol 200 mM.

### 3.3. PLÁSMIDOS PROVISTOS POR OTROS LABORATORIOS

---

Los plásmidos pcDNA3.1(+)-HA-SUMO1, pcDNA3.1(+)-HA-SUMO2, pcDNA3.1(+)-HA-SUMO3 y pcDNA3.1(+)-6xHis-SUMO1 fueron provistos por Ron Hay (Desterro et al., 1998, Tatham et al., 2001). Los plásmidos pCMV5-FLAG-Ubc9 y pCMV5-T7-Ubc9 fueron provistos por David Wotton (Kagey et al., 2003). Los plásmidos pcDNA3.1(+)-FLAG-HA-SEN1 y pcDNA3.1(+)-FLAG-HA-SEN1(C603S) fueron provistos por Peter O'Hare (Bailey y O'Hare, 2002, 2004). Los plásmidos pEGFP-C2-SUMO1 y pEGFP-C2-SUMO1(GA) fueron provistos por Jorma Palvimo (Poukka et al., 2000). Los plásmidos pcDNA3-HA-PIAS1 y pcDNA3-FLAG-PIAS1 fueron provistos por Cory Abate-Shen (Lee et al., 2006). Los plásmidos que codifican para las proteínas de fusión mCherry-SUMO1, mCherry-SUMO2 y GFP-HAP fueron provistos por Belinda Westman, del laboratorio de Angus Lamond. Los vectores de expresión de T7-SF2/ASF y mutantes, T7-SRp20, T7-SRp40, T7-SRp30c, T7-hnRNP A1 y el minigen reportero de *splicing* de E1a fueron provistos por Javier Cáceres. Los vectores de expresión Myc-Topoisomerasa I, GST-Topors (268-644) fueron provistos por Stefan Weger. El minigen reportero de *splicing* de CFTR fue provisto por Francisco Baralle.

### 3.4. TÉCNICAS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

---

#### 3.4.1. INMUNOPRECIPITACIÓN

---

Células HEK293T ( $3 \times 10^6$ ) fueron cocochadas en PBS frío 24-36 horas luego de ser transfectadas y resuspendidas en 1 ml de *buffer* de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%,  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM, KF 5 mM, glicerol 10%, e inhibidores de proteasas [Complete, Roche]). Luego de una incubación de 30 minutos a 4°C, las muestras se centrifugaron 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes (lisados celulares) fueron utilizados para los ensayos de co-inmunoprecipitación según se detalla a continuación. Se utilizaron 30  $\mu$ l de anti-T7-agarosa acoplado a una matriz



de agarosa (Novagen) o 1 µg de anti-HA (Covance) más 30 µl de Proteína A/G Plus agarosa (Santa Cruz Biotechnology). Luego de incubar 1-2 horas a 4°C, el *pellet* de agarosa se lavó 4 veces con *buffer* de lisis. Los inmunoprecipitados se resuspendieron en *Laemmli sample buffer 2X* (Laemmli, 1970).

---

### 3.4.2. ENSAYOS DE *GST PULL-DOWN*

---

Lisados de células HEK293T transfectadas (preparados como para los experimentos de co-inmunoprecipitación) o proteínas recombinantes (según se indica en cada Figura) fueron usados para los ensayos de *GST pull-down*. Los lisados o proteínas recombinantes fueron incubados por 1 h a 4°C en presencia de 5 µg de GST (clarificación o *pre-clear*). Posteriormente se añadieron 20 µl de resina glutatión-sefarosa 4B (GE Healthcare) y se centrifugó para eliminar del lisado las proteínas que interactúan inespecíficamente con GST. Luego, los lisados o proteínas recombinantes fueron incubados por el tiempo indicado en cada figura a 4°C en presencia de 2 µg de GST (control), GST-Ubc9 o GST-PIAS1. Luego de 3 lavados con *buffer* de lisis y 1 con PBS, las proteínas asociadas a la matriz de glutatión-sefarosa fueron resuspendidas en *Laemmli sample buffer 2X* (Laemmli, 1970).

## 3.5. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y ENSAYOS *IN VITRO*

---

---

### 3.5.1. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BACTERIAS

---

Las proteínas utilizadas y sus cepas de expresión se detallan a continuación: GST, GST-Ubc9 y GST-SUM03 en *Escherichia coli* M15(pREP4); GST-SF2/ASF, GST-Topors (268/644) en *Escherichia coli* BL21(DE3) *Rosetta*; GST-PIAS1 en *Escherichia coli* BL21(DE3)

Una alícuota de 30 ml de cultivo saturado se usó para inocular 500 ml de LB con los antibióticos apropiados. Luego de 45 minutos, la inducción se llevó a cabo con 0,5 mM IPTG por 4 horas. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad con glutatión-sefarosa. El *pellet* bacteriano fue resuspendido en un *buffer* conteniendo PBS, tritón X-100 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ l de una solución de Lisozima 10 mg/ml (Sigma) y se incubó media hora en hielo. Luego de sonicar (6 pulsos de 10 seg cada uno a un 40% de amplitud) en frío, los lisados fueron centrifugados 30 min a 15.000 g a 4°C. Los sobrenadantes fueron incubados con 500  $\mu$ l de la resina glutatión-sefarosa 4B (GE Healthcare) por 2 h a temperatura ambiente. Luego lavar la resina 2 veces con *buffer* de lisis y 2 veces más con PBS, la resina ya se puede usar para ensayos de *GST pull-down*. En ese caso, una alícuota de la resina fue corrida en *SDS-PAGE* junto con marcadores de masa (Sigma) y, luego de una tinción con *coomassie brilliant blue* (R-250, Gibco), se determinó la concentración de la proteína asociada a la resina. Para los ensayos *in vitro*, las proteínas fueron eluidas con 10 mM glutatión (Sigma) en Tris-HCl pH 8 por 30 min a temperatura ambiente. Este proceso se repitió por un total de 3 veces, juntándose, al final, el contenido de las 3 eluciones para su cuantificación. En el caso de proteínas asociadas a la resina, se conservaron a 4°C por un período no mayor a tres semanas. En el caso de proteínas eluidas, las mismas fueron cuantificadas, alícuotadas, dializadas contra un *buffer* conteniendo HEPES-KOH 20 mM pH 7,4, KAcO 100 mM, EGTA 0,2 mM, glicerol 20% y un cocktail de inhibidores de proteasas y guardadas a -80°C indefinidamente.

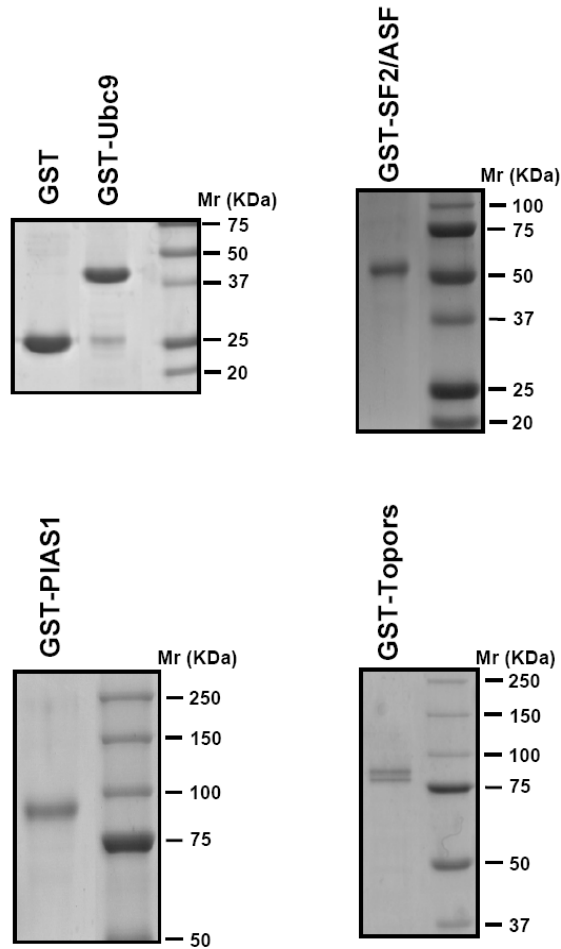


Figura M1 | Producción de proteínas recombinantes, fusionadas a GST, en bacterias. Luego del protocolo que se detalla arriba, una alícuota de cada preparación fue sometida a electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con SDS y posterior tinción con *coomassie*. Se indica el peso molecular (en KDa).

### 3.5.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS HEK293T

T7-SF2/ASF fue purificada a partir de células HEK293T mediante protocolos previamente descritos (Cazalla et al., 2005). Cuatro placas confluentes de 15-cm con células HEK293T fueron transfectadas con 42  $\mu\text{g}$  del vector de expresión pCGT7-SF2/ASF y 112  $\mu\text{l}$  de Lipofectamina 2000, cada una. Luego de transcurridas 72 h, las células fueron removidas de las placas con ayuda de un *scraper*, en PBS frío y se pasó la suspensión a un tubo falcon de 50 ml. Las células se centrifugaron y posteriormente

fueron lisadas en 20 ml de un *buffer* conteniendo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Tween-20 0,1%,  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM, KF 5 mM, más un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). Luego de sonicar (6 pulsos de 10 seg al 40% de amplitud), se centrifugaron las muestras para descartar el material insoluble y el sobrenadante fue transferido a un tubo falcon a temperatura ambiente. En paralelo, se agregaron anteriormente 2 ml de la resina de agarosa acoplada al anticuerpo anti-T7 (Novagen) a una columna cromatográfica descartable de 10 ml (Biorad). La misma fue lavada con 10 ml de *buffer* de lisis. El lisado fue pasado dos veces por la columna y, luego de un lavado con 10 ml con *buffer* de lisis, se procedió a eluir las proteínas pegadas a la resina. Para ello se fue agregando 800  $\mu\text{l}$  de *buffer* de elución (ácido cítrico 100 mM pH 2,2,  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM, KF 5 mM) y las muestras fueron colectadas en tubos eppendorf conteniendo 200  $\mu\text{l}$  de Tris base 2 M. Luego de chequear la presencia de la proteína recombinante en cada fracción, las fracciones con proteína fueron dializadas contra un *buffer* conteniendo HEPES-KOH 20 mM pH 7,4, KAcO 100 mM, EGTA 0,2 mM, glicerol 20% y un cocktail de inhibidores de proteasas.

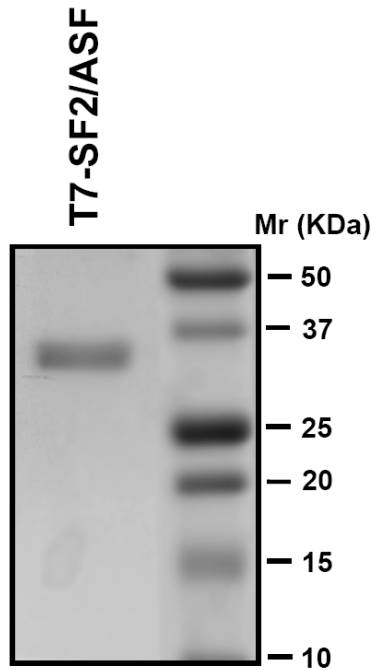


Figura M2 | **Producción de la proteína recombinante T7-SF2/SF en células HEK293T.** Luego del protocolo que se detalla arriba, una alícuota de la preparación fue sometida a electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con SDS y posterior tinción con *coomassie*. Se indica el peso molecular (en KDa).

El fragmento de fusión GST-Topoisomerasa I (1-200) (Yang et al., 2006) fue comprado a LAE Biotech. Las proteínas GST-p53, GST-RanBP2 $\Delta$ FG [correspondiente al fragmento activo de la E3 ligasa RanBP2 (Pichler et al., 2002)], GST-Sp100, Ubc9, SUMO1, SUMO3 y SAE1/SAE2 fueron compradas a BIOMOL/Enzo Life Sciences.

---

### 3.5.3. SUMOILACIÓN *IN VITRO* DE Sp100 y p53

---

Las reacciones de SUMOilación *in vitro* se llevaron a cabo en base a protocolos publicados (Pichler et al., 2004). La enzima E1 [SAE1/SAE2 (150 ng, ~ 65 nM)], la enzima E2 [Ubc9 (30 ng, ~ 80 nM)] y SUMO1 ó 3 (1  $\mu$ g, ~ 4,5  $\mu$ M) fueron incubados en *buffer* de SUMOilación (HEPES 20 mM pH 7,4, KAcO 110 mM, MgAcO<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 0,5 mM, Tween-20 0,05%, Ovalbumin 0,2 mg/ml y DTT 1mM) en un volúmen final de 20  $\mu$ l. Las reacciones se iniciaron por la adición de ATP 2 mM. Los sustratos GST-Sp100 (200 ng, ~ 252 nM) y GST-p53 (250 ng, ~ 166 nM) fueron incubados por el tiempo indicado en cada figura a 30°C. GST-SF2/ASF recombinante fue usado en la concentración indicada en cada figura (50 ng, ~ 47 nM; 100 ng, ~ 95 nM; 200 ng, ~ 190 nM). GST-PIAS1 (200 ng, ~ 102 nM), GST-RanBP2 $\Delta$ FG (10 ng, ~ 8,5 nM) y GST-Topors (268/644) (400 ng, ~ 295 nM) fueron usados como controles en las distintas reacciones. Las reacciones fueron finalizadas por adición de un volumen de *Laemmli sample buffer 2X* (Laemmli, 1970).

---

### 3.5.4. SUMOILACIÓN *IN VITRO* DE TOPOISOMERASA I

---

Un  $\mu$ g de GST-Topoisomerasa I (~ 1  $\mu$ M) fue incubado junto con 150 ng de la enzima E1, SAE1/SAE2 (~ 65 nM), 30 ng de la enzima E2, Ubc9 (~ 80 nM) y 1  $\mu$ g de SUMO1 (~ 4,5  $\mu$ M) en un *buffer* conteniendo HEPES 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 2 mM por 30 min a 37°C. Las reacciones fueron finalizadas por adición de un volumen de *Laemmli sample buffer 2X* (Laemmli, 1970).

### 3.5.5. ENSAYOS DE FORMACIÓN DE ENLACE TIOESTER

Los ensayos fueron realizados con 100 ng de E1 (~40 nM), 100 ng de E2 (~280 nM), 200 ng de SUMO1 (~0,9  $\mu$ M) y 200 ng de SF2/ASF recombinante (188 nM) según se indica en la figura. Las reacciones fueron llevadas a cabo por los tiempos indicados a 37°C en *buffer* conteniendo 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, inhibidores de proteasa y 0.1 mM DTT. Las reacciones fueron terminadas por dilución 1:1 con *buffer* de SDS-PAGE no reductor (50 mM Tris [pH 6.8], 2% SDS, 4 M urea, 10% glycerol) e incubadas por 10 minutos a 37°C.

### 3.5.6. REACCIONES DE TRANSFERENCIA DE SUMO

Se incubaron 150 ng de E1 recombinante (~ 65 nM), 300 ng de E2 (~ 833 nM) y 200 ng de SUMO (~ 0,9  $\mu$ M) por 30 minutos a 30°C en *buffer* de SUMOilación suplementado con 0,5 mM ATP. Las reacciones fueron diluídas 1/3 en el mismo *buffer* pero sin ATP y conteniendo EDTA (10 mM concentración final) para inhibir a la E1 y prevenir la subsecuente formación de complejos E2-SUMO. Los complejos E2-SUMO fueron incubados con 200 ng GST-p53 (~ 130 nM) con o sin 200 ng de GST-SF2/ASF (~ 190 nM) por el tiempo que se indica en la figura correspondiente. Las reacciones fueron frenadas agregando un volumen de *Laemmli sample buffer 2X* (Laemmli, 1970).

### 3.5.7. REACCIONES DE FORMACIÓN DE CADENAS DE SUMO3

Para el ensayo de formación de cadenas de SUMO libre, 250 ng de E1 (~ 108 nM) y 500 ng de E2 (~ 1,4  $\mu$ M) fueron incubadas con 5  $\mu$ g de GST-SUMO3 (~ 7  $\mu$ M), en presencia de un sistema regenerador de ATP (MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 2 mM, creatina fosfato 10 mM, 3.5 U/ml de creatina quinasa y 0.6 U/ml de pirofosfatasa inorgánica), por 1 ó 2 h con o sin el agregado de 200 ng de GST-SF2/ASF (~ 190 nM). Las reacciones fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* con un anticuerpo anti-SUMO2/3.

### 3.6. WESTERN BLOT Y ANTICUERPOS UTILIZADOS

Las muestras proteicas fueron corridas en geles de poliacrilamida con SDS y posteriormente transferidas a membranas de polivinilideno fluoruro (PVDF, GE Healthcare). Las membranas fueron bloqueadas por una hora en una solución que contenía 5% leche descremada en TBS más 0,1% tween-20 (TTBS). Posteriormente se agregó la dilución apropiada del anticuerpo primario, en la misma solución de bloqueo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes, acoplados a peroxidasa (Biorad) en solución de bloqueo. Luego de 4 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS, las membranas fueron incubadas con el reactivo *ECL plus* y expuestas a films *Hyperfilm ECL* (GE Healthcare). Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron: anti-SF2/ASF (mAb 103 sobrenadante de cultivo de hibridoma, provisto por Adrián Krainer), anti-HA (Covance), anti-T7 (Bethyl Laboratories and Novagen), anti-T7 acoplado a agarosa (Novagen), anti-FLAG (Sigma), anti-SUMO1 (Zymed/Invitrogen), anti-SUMO2/3 (IMGENEX), anti-Ubc9 (BD Biosciences), anti-Topo I (LAE Biotech), anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology), anti- $\alpha$ -actin (Santa Cruz Biotechnology), anti-GAPDH (Abcam), anti-p53 (clon DO-1, Santa Cruz Biotechnology o sobrenadante de cultivo de hibridoma provisto por Vanesa Gottifredi), anti-GST (Abcam), anti-Myc (Santa Cruz Biotechnology)

### 3.7. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

#### 3.7.1. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Para generar bacterias competentes se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, y un protocolo tradicional basado en CaCl<sub>2</sub> y otras sales. Con este protocolo, se generan bacterias con una eficiencia de aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/ $\mu$ g. Estas bacterias fueron transformadas según métodos convencionales basados en el protocolo de Hanahan (Hanahan, 1983).

Alternativamente, se prepararon bacterias electrocompetentes en los casos en que se necesitó una mayor eficiencia de transformación ( $1.10^7$ - $1.10^9$  UFC/ $\mu$ g DNA).

---

### **3.7.2. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS A PEQUEÑA ESCALA O MINIPREPS**

---

Se utiliza esta técnica para producir una pequeña cantidad de plásmido a partir de un cultivo bacteriano de unos pocos mililitros, con el objetivo de, por ejemplo, chequear mediante mapeo de restricción o secuenciación si los clonados realizados habían generado el plásmido de interés. Se utilizó un protocolo estándar comúnmente utilizado y cuando la aplicación subsiguiente demandaba una más alta calidad del plásmido, se utilizó un *kit* de Invitrogen (*PureLink HiPure Plasmid Miniprep*).

---

### **3.7.3. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS A GRAN ESCALA O MAXIPREPS**

---

Las columnas de intercambio aniónico de Qiagen permiten obtener unos 100  $\mu$ g de DNA plasmídico (columnas tip 100) o 500  $\mu$ g (columnas tip 500). También se utilizaron *kits* de Invitrogen (*PureLink HiPure Plasmid Maxiprep*) para la obtención de grandes cantidades de plásmido libres de endotoxinas. En todos los casos, se realizó el protocolo siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

---

### **3.7.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS**

---

Para conocer la concentración de ADN o ARN en solución se midió absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (GeneQuant). Como alternativa se midieron concentraciones por fluorimetría, utilizando el lector Qubit y los reactivos Quant-iT RNA y dsDNA BR (Invitrogen). Paralelamente, para cuantificar fragmentos de ADN se realizó una cuantificación por electroforesis, corriendo alícuotas en un gel de agarosa con bromuro de etidio y comparando con estándares de masa (*High Mass* y *Low Mass Ladders*, Invitrogen).



### 3.8. ARN, RT & PCR

#### 3.8.1. PURIFICACIÓN DE ARN

Para obtener ARN de las células transfectadas, se utiliza una adaptación del protocolo original de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987). Con este protocolo se pueden obtener aproximadamente 5-10 µg de RNA a partir de un pocillo de 35 mm de diámetro. Alternativamente, se utilizó el reactivo TRIzol (Invitrogen) o TRI Reagent (MRC), siguiendo los protocolos provistos por cada fabricante. Cabe aclarar que todos los reactivos utilizados deben estar libres de RNasas, lo que se logra autoclavando las soluciones o utilizando stocks con cuidado. Se descarta el medio de las células y se aspira bien para que no queden restos de líquido para luego agregar 500 µl de solución D, que ya contiene β-mercaptoetanol y glucógeno, a cada pocillo con células. A continuación, se levanta el lisado de células con pipeta y se las transfiere a un tubo eppendorf. Se agrega 1/10 de volumen (50 µl) de AcONa pH 4,2 2M y se mezcla por inversión. Se agrega un volumen (500 µl) de fenol ácido saturado en agua y se agita con un vortex, 1/5 de volumen (100 µl) de una mezcla 49:1 de cloroformo:alcohol isoamílico y se agita vigorosamente con un vortex. Luego de una incubación de 30 min en hielo, se centrifuga 30 min a 10.000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4°C. Se toma la fase acuosa (superior) y se la pasa a un nuevo tubo eppendorf. Se precipita con un volumen (500 µl) de isopropanol y se agita con un vortex. Luego de incubar al menos 2 hs a -20°C, se centrifuga 30 min a 10.000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4°C. Se descarta el sobrenadante por volcado y se agregan 500 µl de etanol 80% v/v y se agita con un vortex para lavar bien el precipitado. Luego de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se centrifuga 20 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente para disminuir la cantidad de sales precipitadas. Se vuelca el sobrenadante y se aspira bien para que no queden restos de etanol. Se seca el *pellet* al aire y se agregan 20 µl de agua y se congela a -20°C. Para resuspender el RNA, se descongela en un baño de agua a 50°C durante 5 min y se agita vigorosamente con un vortex. Se puede controlar la integridad del RNA extraído corriéndolo en un gel de agarosa 1% p/v, a un voltaje relativamente alto y por poco tiempo, para disminuir la degradación durante la corrida. En una preparación buena de RNA, deben observarse 3 bandas correspondientes, de mayor a menor tamaño, al rRNA 28S, al rRNA 18S y a los tRNA. Composición de la solución D: A 234 ml de H2O mQ se le agregan 200 g de isotiocianato de guanidinio, 14 ml de citrato

de sodio pH7 0,75 M y 21,2 ml de sarcosil 10%. Antes de usar se agrega 7  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol y 40  $\mu$ g de glucógeno por cada ml de solución desnaturizante.

---

### 3.8.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

---

El protocolo para la obtención de ADN copia a partir de ARN se detalla a continuación. Consiste en el protocolo provisto por el fabricante de la enzima Transcriptasa Reversa (MMLV-RT, Invitrogen) con leves modificaciones.

- Se desnaturalizan 5  $\mu$ l de RNA colocándolo 5 min a 65°C.
- Se pasa el tubo inmediatamente a hielo para impedir la re-naturalización.
- Se agregan 15  $\mu$ l de mezcla de reacción a cada tubo.

La mezcla está compuesta de la siguiente manera:

- 4  $\mu$ l de *buffer* de RT 5X.
- 2  $\mu$ l de DTT 100 mM.
- 0,25  $\mu$ l de dNTPs 25 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
- 0,5  $\mu$ l de inhibidor de RNasas 40 U/ $\mu$ l.
- 0,5  $\mu$ l de oligo dT 100  $\mu$ M (oligo de 12-18 nucleótidos).
- 1,5  $\mu$ l de enzima M-MLV RT 200 U/ $\mu$ l.
- H<sub>2</sub>O c.s.p. 15  $\mu$ l.
- Se deja 10 min a temperatura ambiente para que el oligo(dT) pueda aparearse a las colas de poli(A) de ARN mensajeros poli-adenilados.
- Se incuba 1 h a 35°C para que ocurra la reacción.
- Se detiene la reacción incubando 5 min a 95°C.

---

### 3.8.3. PCR: MINIGENES REPORTEROS DE *SPLICING* DE EDI, CFTR Y E1A

---

Se utilizan 2  $\mu$ l de reacción de RT que contiene el cDNA que será el molde para la reacción de PCR. A cada tubo de cDNA se le agregan 48  $\mu$ l de mix que estará compuesta de la siguiente manera: 5  $\mu$ l de *buffer* de PCR sin MgCl<sub>2</sub>, 3  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,5 $\mu$ l de

DMSO (dimetil sulfóxido), 2,5 µl de *primer forward* 20 µM, 2,5 µl de *primer reverse* 20 µM, 1 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,3 µl de Taq polimerasa 5 U/µl, 0,1 µl de dCTP radiactivo (10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol), H<sub>2</sub>O c.s.p. 48 µl. Los *primers* para EDI fueron:

pSV5'j: 5'-CACTGCCTGCTGGTGACTCGA-3'

pSV3'j: 5'-GCGGCCAGGGGTCACGAT-3'

La reacción de PCR consistió en: 1) 45 seg a 94°C, 2) 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 63°C y 30 seg a 72°C.

En cuanto a las PCRs de los minigenes de CFTR y E1a, las condiciones fueron tomadas de (Caceres et al., 1994, Niksic et al., 1999).

#### 3.8.4. PCR: COMPONENTES DE LA MAQUINARIA DE SUMOILACIÓN

Se utilizó 1 µl de reacción de RT que contiene el cDNA que será el molde para las reacciones de PCR. A cada tubo de cDNA se le agregan 24 µl de mix que estará compuesta de la siguiente manera: 2,5 µl de *buffer* de PCR sin MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de *primer 5'* 10 µM, 1 µl de *primer 3'* 10 µM, 1 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,3 µl de Taq polimerasa *Platinum* (Invitrogen, 5 U/µl), H<sub>2</sub>O c.s.p. 24 µl. Se utilizaron los siguientes pares de *primers* todos ellos hibridan con las regiones 5' y 3' no codificantes del respectivo ARNm:

SUMO1 5' UTR: 5'-GAGGCGTAGCGGAAGTTACTG-3'

SUMO1 3' UTR: 5'-ATGAAGCTGGTACAGACAATG-3'

SAE1 5' UTR: 5'-CACAGTATGACCGGCAGATC-3'

SAE1 3' UTR: 5'-CACAAACAGCTGTGGTTTAG-3'

SAE2 5' UTR: 5'-CCTCAAGAATCTCGTGCTCAC-3'

SAE2 3' UTR: 5'-TATGAGAACGTCATCTTGCTC-3'

Ubc9 5' UTR: 5'-AAGTCCCGAGACAAAGGGAAG-3'

Ubc9 3' UTR: 5'-GGTGACTAGTCATTGTATGGAG-3'

Las reacciones de PCR consistieron en: 1) 2 min a 94°C, 2) 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 68°C y 2 min 30 seg a 72°C. Los tamaños esperados de los productos, en pares de bases, fueron obtenidos utilizando la herramienta Primer-BLAST<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)

## RESULTADOS

---

### 4.1. GÉNESIS

---

El camino recorrido hasta llegar a este trabajo de Tesis tuvo sus particularidades. El objetivo inicial de este trabajo fue estudiar la regulación del *splicing* alternativo de un exón del ARNm de la pequeña proteína G Rac1, el exón 3b (Jordan et al., 1999, Schnelzer et al., 2000). Cuando dicho exón es incluido en el ARNm, da lugar a la variante de *splicing* Rac1b. La proteína Rac1b tiene potencial oncogénico, siendo capaz de desencadenar el fenómeno conocido como transición epitelio-mesenquimal, lo que lleva a un fenotipo celular invasivo (Fiegen et al., 2004, Matos et al., 2003, Matos y Jordan, 2005, 2008, Radisky et al., 2005, Singh et al., 2004, Srebrow y Kornblihtt, 2006). A medida que dicho trabajo fue avanzando (en colaboración con el Dr. Derek Radisky, *Mayo Clinic Cancer Center*, Jacksonville, EE.UU.), pudimos determinar que la proteína hnRNP A1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) es capaz de pegarse al ARN del exón 3b inhibiendo su inclusión en el mensajero maduro de Rac1. HnRNP A1 es una proteína multifacética involucrada en diversas funciones celulares (Del Gatto-Konczak et al., 1999, Guil y Caceres, 2007, Mayeda y Krainer, 1992, Zhang et al., 2006, Zhao et al., 2009) y es sustrato de sendas modificaciones post-traduccionales, fosforilación (Buxade et al., 2005, van der Houven van Oordt et al., 2000), metilación (Allemand et al., 2005), SUMOilación (Li et al., 2004), entre otras. Uno de los objetivos finales propuestos fue determinar el rol de dichas modificaciones post-traduccionales de hnRNP A1 en su efecto inhibitorio sobre el *splicing* del exón 3b del ARN de Rac1. En experimentos iniciales que apuntaban a establecer las técnicas necesarias para estudiar cada modificación, pudimos detectar tanto la fosforilación como la SUMOilación de hnRNP A1. Casualmente, decidimos utilizar como “control” la proteína SF2/ASF, ampliamente estudiada por nuestro y otros grupos en funciones relacionadas con el metabolismo del ARNm (Blaustein et al., 2005, Blaustein et al., 2009, Michlewski et al., 2008, Sanford et al., 2004, Zhong et al., 2009). Al analizar los niveles de SUMO, pudimos observar, para nuestra sorpresa, un notable aumento en la conjugación del mismo a proteínas celulares al sobre-expresar SF2/ASF (ver Figura R1). Si bien SF2/ASF es una proteína involucrada no sólo en la regulación del *splicing*, todos los roles asignados a esta proteína hasta la fecha están relacionados con el metabolismo del ARNm. Nos intrigó de tal forma el

hallazgo que decidimos embarcarnos en la profundización y caracterización del posible rol de SF2/ASF en la conjugación de SUMO. En resumen, es así como surgió la línea de investigación que dio origen a la presente Tesis. Por otro lado, se encuentra en preparación un manuscrito que describe cómo hnRNP A1 regula el *splicing* del exón 3b del ARN de Rac1.

Luego de realizar búsquedas bibliográficas, encontramos las siguientes evidencias que apuntan a una relación estrecha entre los fenómenos de SUMOilación/ubiquitinación y el metabolismo del ARN: i) reguladores de *splicing* y componentes de las vías Ub/*Ub-like* son encontrados juntos en complejos multiproteicos y/o comparten patrones de localización subcelular (Ihara et al., 2008, Rappsilber et al., 2002); ii) la SUMOilación regula diferentes procesos que se encuentran interconectados con el *splicing* tales como transcripción (Girdwood et al., 2004), poliadenilación de ARNm (Vethantham et al., 2007, 2008) y remodelación de cromatina (Shiio y Eisenman, 2003). De este modo, si bien el hallazgo inicial surgió de manera lateral en otro experimento, la relación entre el proceso de SUMOilación y proteínas que unen ARN resulta evidente y un número creciente de estudios refuerzan esta noción (Blomster et al., 2009, Pungalaya et al., 2007, Rappsilber et al., 2002, Vertegaal et al., 2006, Vertegaal et al., 2004).

#### **4.2. SF2/ASF REGULA LA SUMOILACIÓN GLOBAL DE PROTEÍNAS *IN VIVO***

El experimento inicial consistió en la sobre-expresión de HA-SUMO1 maduro solo o conjuntamente con SF2/ASF o hnRNP A1, en células HEK 293T. Para evaluar la conjugación de SUMO a nivel global se utilizó la técnica de *western blot*. Utilizando un anticuerpo anti-HA se puede detectar a la proteína SUMO sobre-expresada. Dado que el *tag* HA está fusionado al extremo N-terminal mientras que la proteína se conjuga vía su extremo C-terminal, se puede detectar un "chorreado" que corresponde a HA-SUMO conjugado a un número desconocido de proteínas (ver Figura R1 como ejemplo). A este patrón lo denominaremos de aquí en más "SUMOilación global". Sorprendentemente, la co-expresión de SF2/ASF estimula fuertemente la SUMOilación global de proteínas (Figura R1, calles 2 y 9). La co-expresión de HA-SUMO1 con otro conocido regulador del

*splicing*, hnRNP A1, no aumenta la SUMOilación (Figura R1, calles 2 y 5). En todos los casos, los conjugados a SUMO se pierden cuando se co-expresa SENP1, una isopeptidasa de SUMO, indicando que el patrón de bandas obtenido en el ensayo de *western blot* corresponde efectivamente a conjugados de SUMO1 (Figura R1 A, calles 3, 6 y 10). Con el objetivo de extender el análisis a otra isoforma de SUMO, elegimos SUMO3 (como se menciona en la Introducción, SUMO2 y SUMO3 son 97% idénticas).

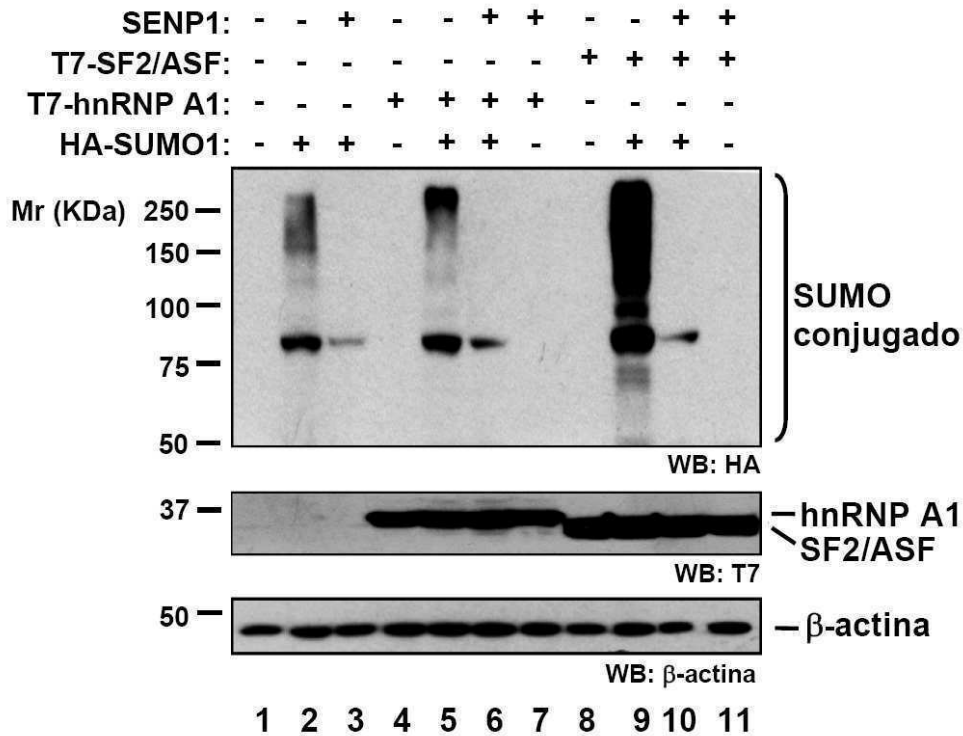


Figura R1 | **SF2/ASF estimula la SUMOilación de proteínas.** Células HEK 293T fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng) y 48 h más tarde lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

Con la finalidad de comparar el efecto de SF2/ASF con el de otra proteína de conocida actividad estimuladora de SUMOilación, expresamos la E3 ligasa PIAS1. Como puede observarse en la Figura R2, si bien los niveles de expresión de cada una de las proteínas no son comparables –por tratarse de *western blots* con anticuerpos diferentes–, el aumento de la conjugación de SUMO inducido por SF2/ASF es comparable en magnitud al inducido por PIAS1 (Figura R2, calles 2-4). Una vez más, la co-expresión de la

isopeptidasa SENP1 produce la desaparición del patrón de SUMOilación (Figura R2, calles 5-7).

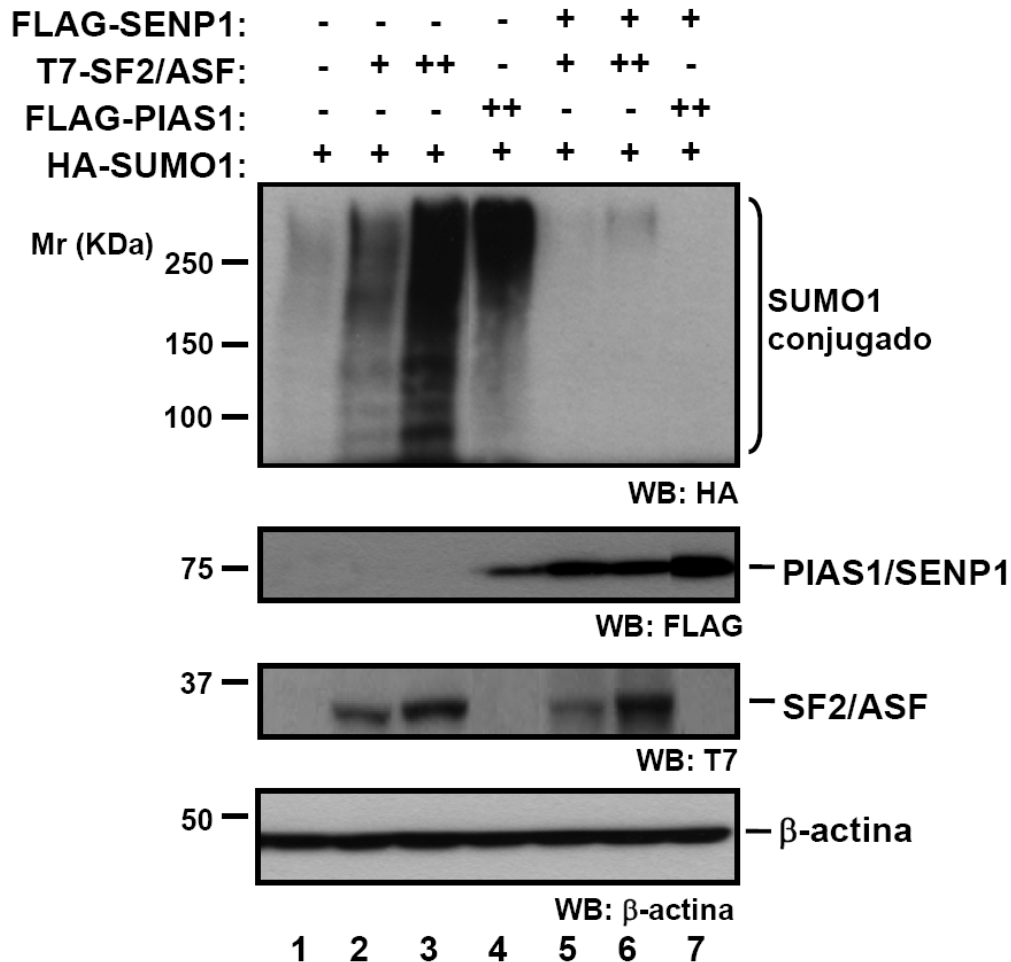


Figura R2 | Comparación del efecto de SF2/ASF con el de la E3 ligasa de SUMO, PIAS1. Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HA-SUMO1, FLAG-PIAS1 y FLAG-SENP1 (500 ng) y T7-SF2/ASF (100 o 500 ng) según se indica y 48 h más tarde lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

La disminución mediada por SENP1 en los niveles de SUMOilación global inducidos por SF2/ASF lleva a un concomitante aumento en los niveles de SUMO no conjugado (Figura R3). En este caso, para detectar la forma libre de SUMO, se corrió un gel de poliacrilamida de alto porcentaje (15%), en oposición al bajo porcentaje utilizado de rutina para observar la forma conjugada (usualmente 8%).



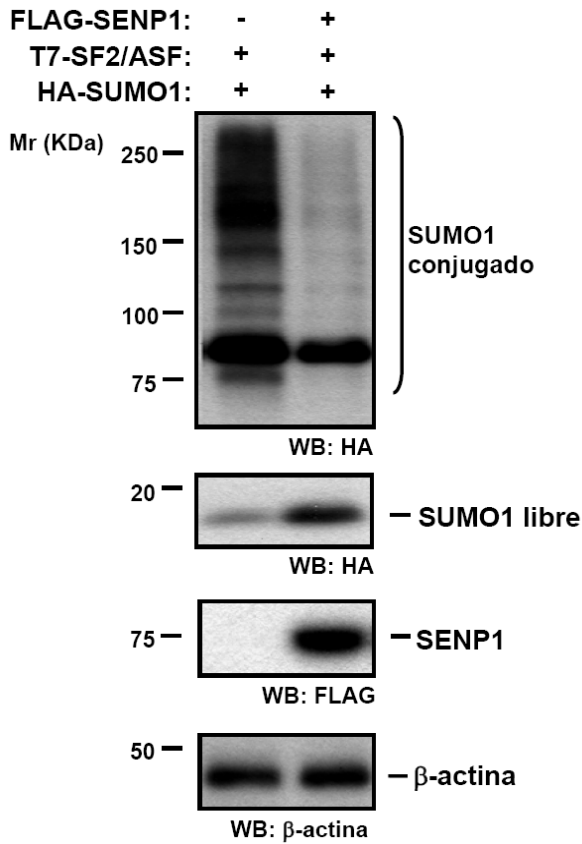


Figura R3 | La co-expresión de SF2/ASF y SENP1 aumenta la proporción SUMO libre/SUMO conjugado. Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HA-SUMO1, T7-SF2/ASF y FLAG-SENP1 (500 ng) según se indica y 48 h más tarde lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa). Los dos paneles superiores revelados contra el *tag* HA, representan corridas en porcentajes de geles diferentes, 8% y 15%, para resolver los conjugados de SUMO y la forma libre, respectivamente.

Antes de seguir adelante con este trabajo, quisimos determinar la generalidad del fenómeno estudiado. En este sentido, los resultados mostrados en la Figura R4 indican que el efecto de SF2/ASF sobre la SUMOilación es independiente de la línea celular ya que también lo observamos en la línea celular de mono COS7 (Figura R4 A) así como también en las células epiteliales mamarias murinas SCp2 (Figura R4 B).

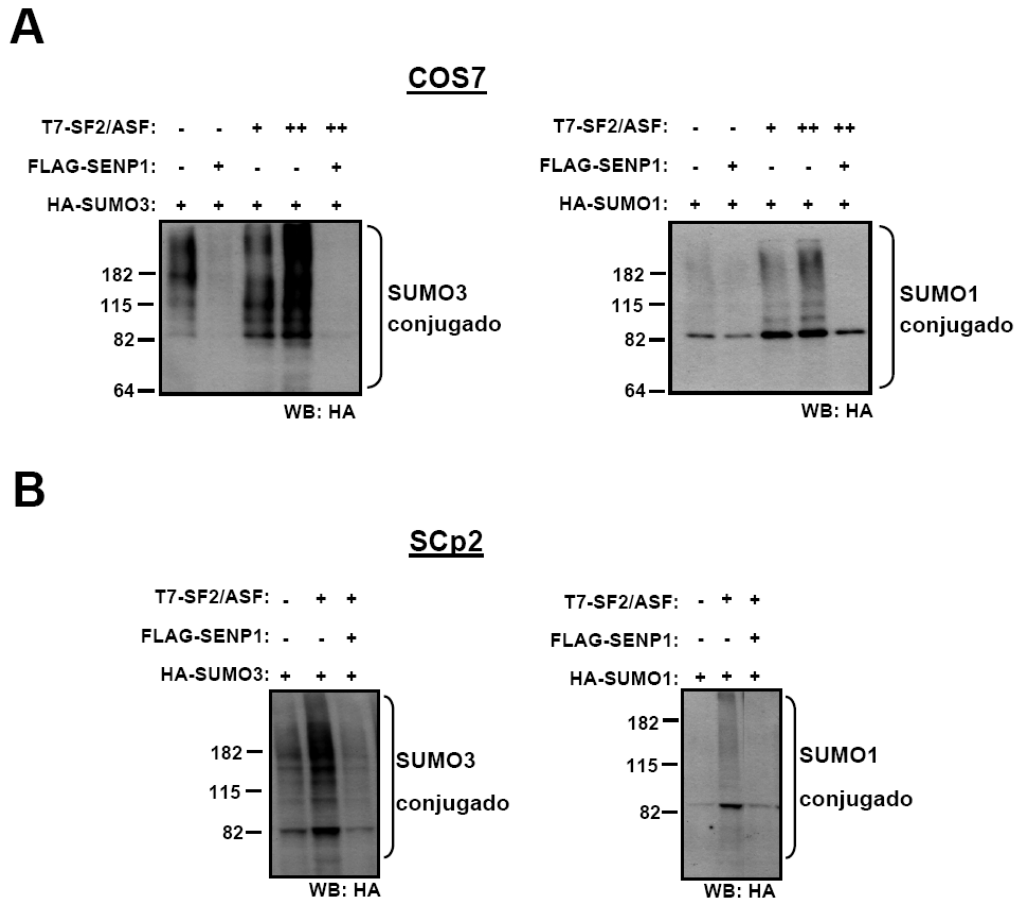


Figura R4 | **SF2/ASF estimula la SUMOilación de proteínas.** Células COS7 (A) y SCp2 (B) fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng de HA-SUMO, 500 ng de FLAG-SEN1, 250 y 500 ng de SF2/ASF) y 48 h más tarde lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en kDa).

**La sobre-expresión de SF2/ASF estimula la SUMOilación de proteínas *in vivo*.**

Dado el efecto estimulador de la sobre-expresión de SF2/ASF sobre la SUMOilación de proteínas, decidimos investigar el papel de la proteína SF2/ASF endógena en dicho proceso. Con ese fin, utilizamos la técnica de RNA de interferencia: transfectamos células en cultivo con un siRNA (*short interfering RNA*) específico contra la secuencia de SF2/ASF humano, previamente utilizado por nuestro grupo (Blaustein et al., 2005). Observamos que en células depletadas de SF2/ASF utilizando siRNA específico contra esta proteína, la conjugación de SUMO3 y de SUMO1 (Figura R5, izquierda y derecha,

respectivamente) fue drásticamente inhibida, en comparación con lo que ocurrió en células transfectadas con una siRNA control.

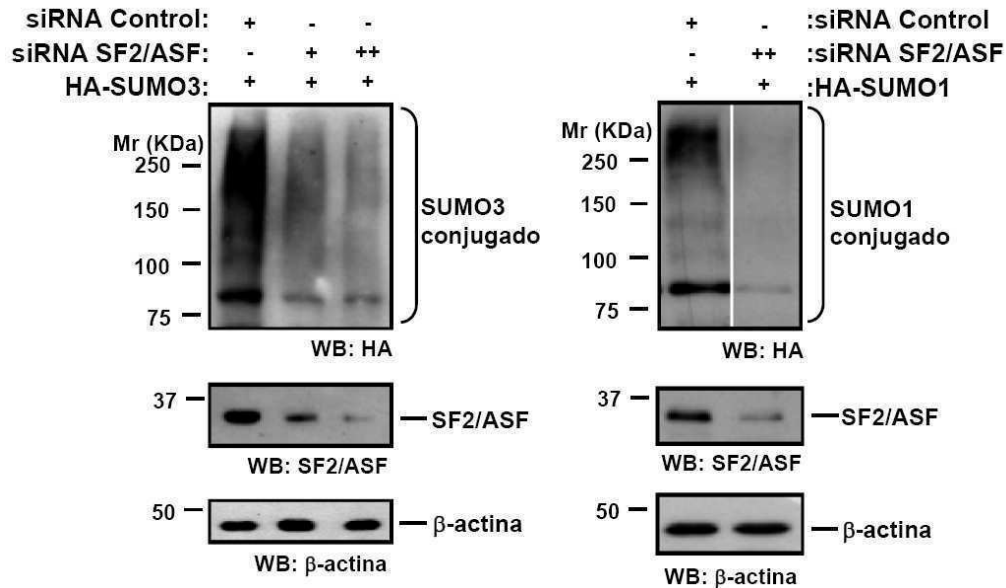


Figura R5 | La proteína SF2/ASF endógena es necesaria para mantener niveles fisiológicos de SUMOilación. Células HEK293T fueron transfectadas con un siRNA control o un siRNA específico contra SF2/ASF [12 nM (+) y o 25 nM (++)] y 24 h más tarde con 500 ng de los vectores de expresión HA-SUMO1 o HA-SUMO3. Luego de 48 h de incubación, las células fueron lisadas para ser sometidas a SDS-PAGE y western blot, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

**Los niveles de expresión normales de SF2/ASF son cruciales para el mantenimiento de la SUMOilación global.**

La SUMOilación es una modificación transitoria y reversible y usualmente sólo una pequeña fracción de proteínas blanco son modificadas *in vivo* (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007, Seeler y Dejean, 2003). Esta es la razón principal por la cual la mayoría de los estudios en este campo involucran la sobre-expresión de SUMO maduro (o procesado). Para validar los resultados descriptos anteriormente, decidimos evaluar el impacto de la sobre-expresión o depleción de SF2/ASF sobre la conjugación de SUMO endógeno. Experimentos de western blot revelados con anticuerpo anti-SUMO2/3 muestran que la disminución de los niveles de SF2/ASF por medio de siRNA inhibe la

conjugación de SUMO2/3 (Figura R6 A). Más aun, la sobre-expresión de cantidades crecientes de SF2/ASF estimulan la conjugación de SUMO 2/3 en forma dosis-dependiente. (Figura R6 B).

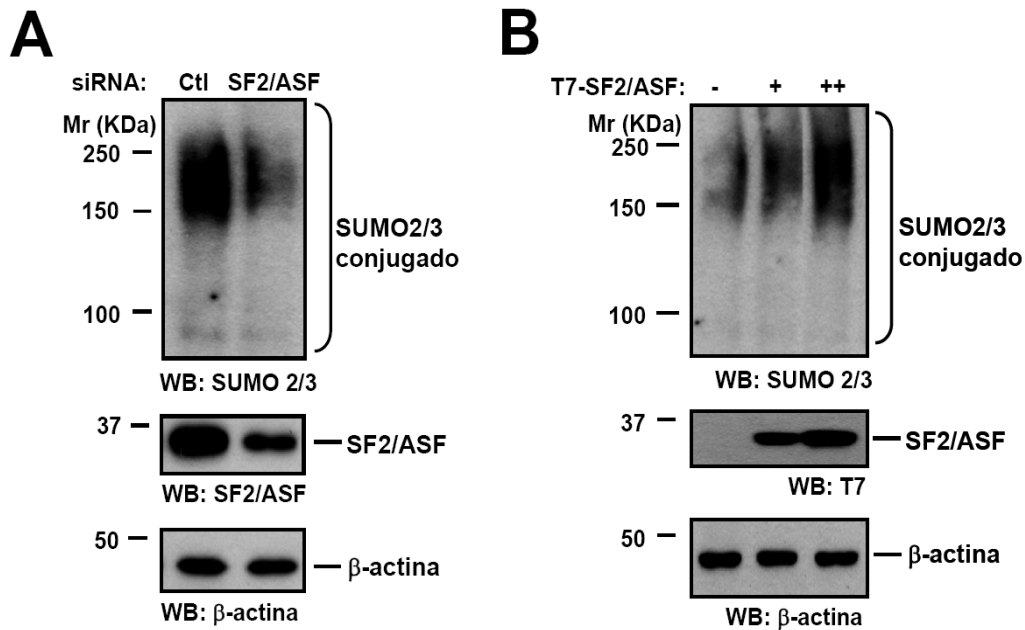


Figura R6 | **SF2/ASF regula la SUMOilación por SUMO endógeno.** (A) Células HEK293T fueron transfectadas con un siRNA control o un siRNA específico contra SF2/ASF a una concentración final de 25 nM y 72 h más tarde fueron lisadas y sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la figura. (B) Células HEK293T fueron transfectadas con el vector de expresión codificando para la proteína T7-SF2/ASF [500 ng (+) o 1  $\mu$ g (++)] y 48 h más tarde fueron lisadas y las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

**El efecto de SF2/ASF también se observa con SUMO 2/3 endógeno, demostrando que tanto el SUMO transfectado como el endógeno están sujetos a la regulación por SF2/ASF y confirmando que esta proteína afecta la SUMOilación *in vivo*.**

### 4.3. EL DOMINIO RRM2 DE SF2/ASF ES NECESARIO Y SUFICIENTE PARA ESTIMULAR LA SUMOILACIÓN

La proteína SF2/ASF está compuesta por dos dominios RRM y un dominio RS C-terminal. Decidimos usar mutantes de deleción para analizar el papel de cada uno de estos dominios en la estimulación de la SUMOilación ejercida por SF2/ASF (Figura R7).

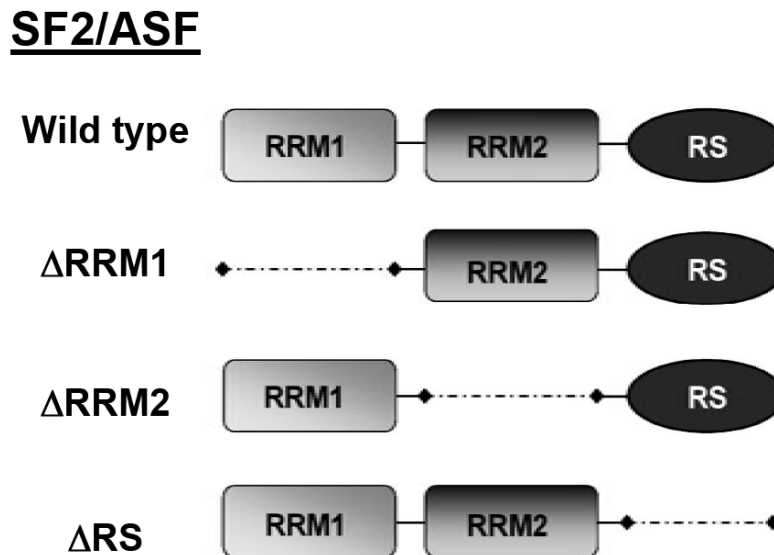


Figura R7 | **Esquema de SF2/ASF y de los mutantes utilizados.** Se esquematiza tanto la proteína SF2/ASF salvaje con sus dos dominios RRM y su dominio RS como los mutantes de deleción utilizados de aquí en adelante.

Los mutantes que carecen del dominio RRM1 ( $\Delta$ RRM1) o bien del dominio RS ( $\Delta$ RS) presentan actividad estimuladora de la SUMOilación similar a la ejercida por SF2/ASF salvaje (Figura R8, calles 1-4). Una situación claramente distinta se observa con el mutante que carece del dominio RRM2 ( $\Delta$ RRM2), el cual es incapaz de estimular la SUMOilación (Figura R8, calles 1 y 5).

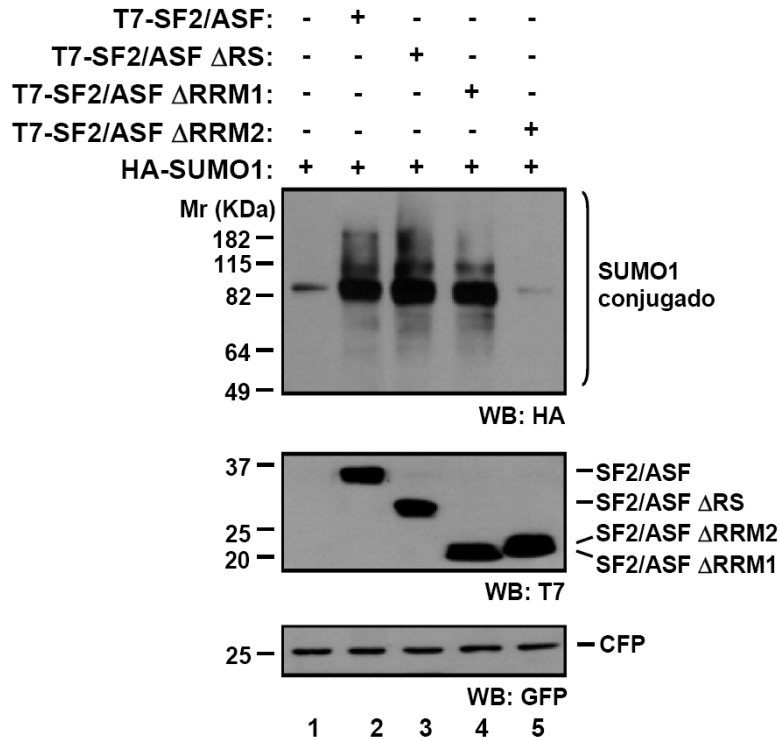


Figura R8 | El dominio RRM2 de SF2/ASF es necesario para la estimulación de la SUMOilación. Células HEK293T fueron transfectadas con 500 ng de los vectores de expresión indicados (50 ng en el caso del control de transfección pECFP) y 48 h más tarde lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

Se desprende de estos resultados que un dominio particular dentro de la proteína SF2/ASF, el dominio RRM2, es absolutamente necesario para la actividad estimuladora de la SUMOilación. Nos preguntamos entonces si este dominio, podría por si solo estimular la SUMOilación global de proteínas. Para ello transfectamos células con vectores de expresión para SF2/ASF salvaje, el mutante sin el dominio RRM2 o bien el dominio RRM2 de SF2/ASF para luego evaluar la SUMOilación global tal como se hizo en las figuras anteriores. Como se muestra en la Figura R9, la expresión del dominio RRM2 por si solo es capaz de estimular la conjugación de SUMO tanto como la proteína entera.

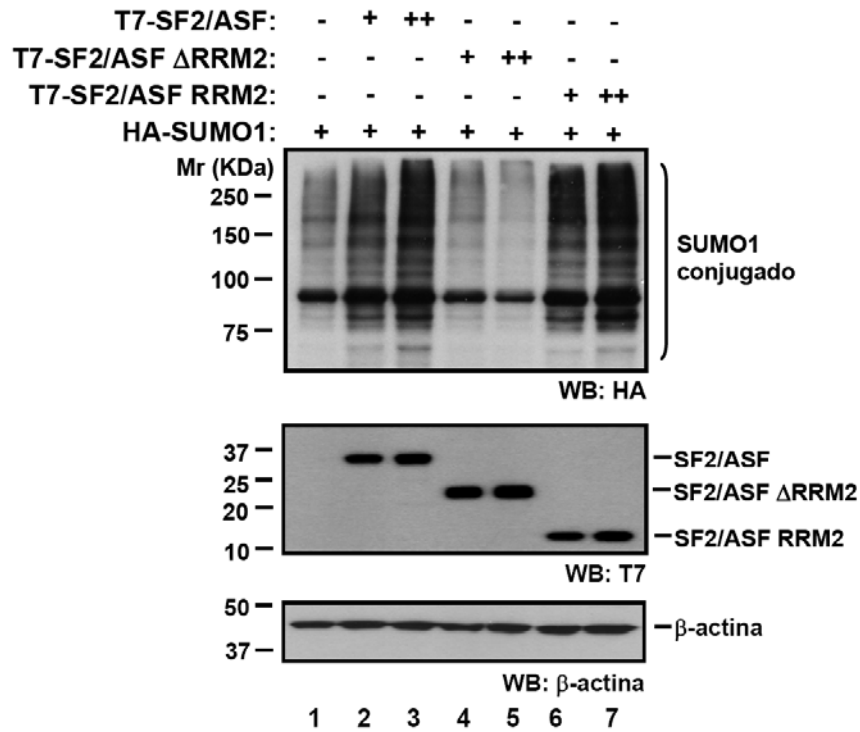


Figura R9 | El dominio RRM2 de SF2/ASF es suficiente para estimular la SUMOilación. Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng de HA-SUMO1 y 100 y 500 ng de los distintos vectores de SF2/ASF) y 48 h más tarde lisadas para ser sometidas a SDS-PAGE y western blot, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

**El dominio RRM2 de la proteína SF2/ASF no sólo es necesario sino también suficiente para producir un aumento en la conjugación de SUMO *in vivo*.**

Luego nos propusimos indagar con mayor profundidad el rol del dominio RRM2 en el proceso de SUMOilación. Para ello analizamos el efecto de otros miembros de la familia de las proteínas SR. Elegimos las proteínas SRp20, SRp30c y SRp40. En cuanto al dominio RRM2, SRp20 no posee este dominio mientras que SRp30c y SRp40 si lo hacen. Entre los dominios RRM2 de estas dos proteínas SR la diferencia radica en que el de SRp30c tiene un 72% de identidad con el de SF2/ASF, mientras que el de SRp40 solo un 37% (Figura R10 A). La sobre-expresión de SRp20 y de SRp40 no produjo un aumento en los niveles de conjugación de SUMO (Figura R10 B, calles 1, 3 y 4). Por el contrario, la

sobre-expresión de SRp30c aumentó la SUMOilación global de manera similar a SF2/ASF (Figura R10 B, calles 1, 2 y 5).

**A**

SF2/ASF **RVVVSGLPPSGSWQDLKDHMREAGDVCYADVVRD** - **GTGVVEFVRKEDMTYAVRKLDNTK**  
 SRp30c **RVLVVSGLPPSGSWQDLKDHMREAGDVCYADVQKD** - **GVGMVEYLKEDMEYALRKLDLDTK**  
 SRp40 **RLIVENLSSRVSWQDLKDFMRQAGEVTFADAHRPKLNEGVVEFASYGDLKNAIEKLSGKE**

**B**

T7-SF2/ASF:	-	+	-	-	-
T7-SRp20:	-	-	+	-	-
T7-SRp40:	-	-	-	+	-
T7-SRp30c:	-	-	-	-	+
HA-SUMO1:	+	+	+	+	+

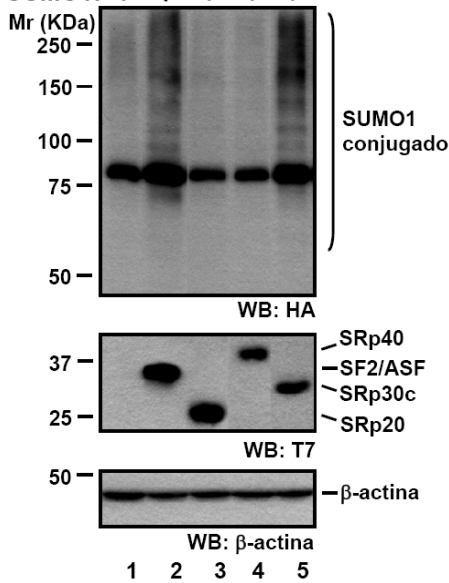


Figura R10 | Análisis comparativo de la actividad de SF2/ASF y otras proteínas SR sobre la SUMOilación global de proteínas. (A) Alineamiento de los dominios RRM2 de las proteínas SF2/ASF, SRp30c y SRp40, utilizando los *softwares* ClustalW<sup>3</sup> y BOXSHADE 3.21<sup>4</sup>. En negro se resaltan los aminoácidos idénticos y en gris los similares. (B) Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng de HA-SUMO y 100 ng de T7-SRs) y 48 h más tarde lisadas y sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en kDa).

Si bien el determinante en la actividad estimuladora de la SUMOilación se encuentra en el RRM2, no cualquiera de estos dominios es capaz de llevar a cabo esta función.

<sup>3</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

<sup>4</sup> [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)



#### 4.4. ACTIVIDADES DE SF2/ASF: *SPLICING* & SUMOILACIÓN

Con el objetivo de comparar la habilidad de SF2/ASF para regular la SUMOilación con su ya conocida actividad como regulador del *splicing*, analizamos los patrones de *splicing* de varios exones alternativos: EDI del gen de la fibronectina, exón 9 del gen CFTR y el gen E1a de adenovirus. El efecto de SF2/ASF sobre el patrón de *splicing* de estos exones ya ha sido reportado anteriormente (Buratti et al., 2007, Caceres y Krainer, 1993, Cramer et al., 1999). Lo que quisimos determinar en esta oportunidad fue el rol del dominio RRM2 en cada caso, para ver si los efectos obtenidos en la regulación del *splicing* correlacionan con los de la SUMOilación. Para ello hicimos uso de una herramienta ampliamente utilizada, minigenes reporteros de *splicing*. Éstos consisten en el exón alternativo de interés más los intrones flanqueantes, insertos en un vector de expresión de un gen heterólogo. El patrón de *splicing* alternativo de transcritos provenientes del minigen de interés se analiza mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con *primers* específicos que aparean con zonas quiméricas presentes en dichos transcritos y ausentes en los provenientes del gen endógeno.

Analizamos entonces la proporción entre las isoformas de ARNm conteniendo al exón EDI y las que carecen de dicho exón, provenientes del minigen reportero mediante ensayos de RT-PCR. En la Figura R11 A se muestra un esquema de los transcritos provenientes del minigen. Tal como muestra la Figura R11 B, la sobre-expresión de SF2/ASF o del mutante  $\Delta$ RS aumentan el cociente EDI+/EDI- (calles 1, 2 y 5). La sobre-expresión del mutante  $\Delta$ RRM2 produce el efecto opuesto, es decir disminuye el cociente EDI+/EDI- (calle 4). Por otro lado, la sobre-expresión del mutante  $\Delta$ RRM1, el cual es capaz de estimular la SUMOilación, no regula el *splicing* alternativo del exón EDI (calle 3). Lo que resulta aún más relevante es que el dominio RRM2 solo, si bien es suficiente para estimular la SUMOilación, es incapaz de regular el *splicing* alternativo (calle 6). La cuantificación de los resultados se muestra en la Figura R11 C.

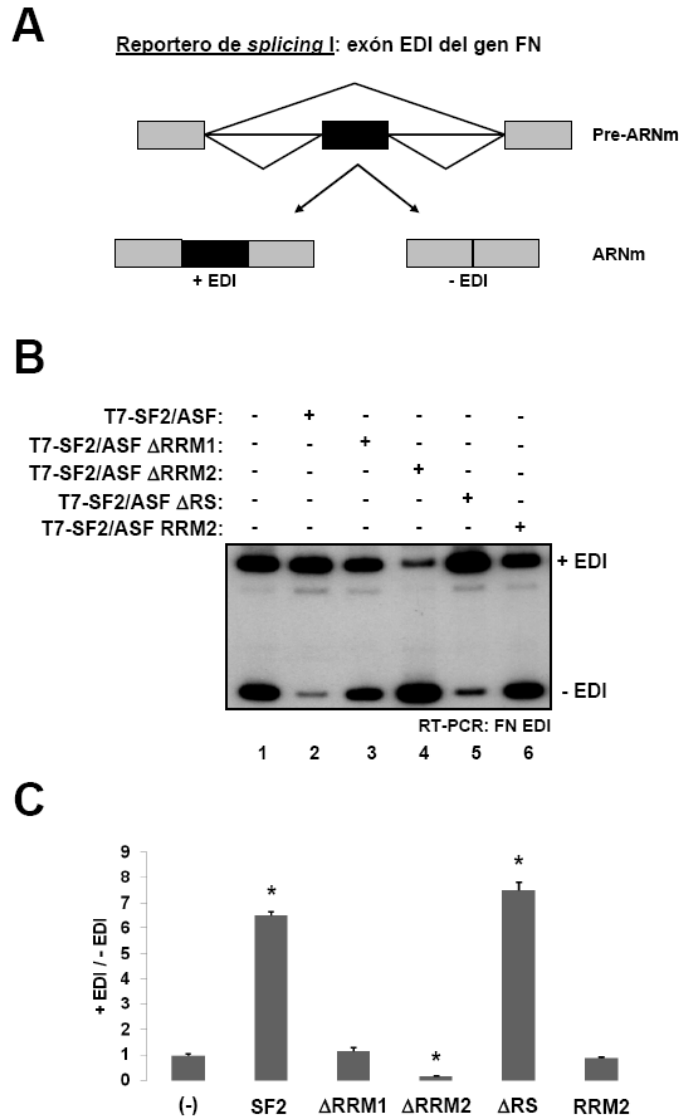


Figura R11 | Efecto de SF2/ASF y mutantes sobre el *splicing* del exón EDI de fibronectina. (A) Esquema del pre-ARNm del minigén reportero de *splicing* del exón EDI de fibronectina, junto con las dos isoformas de ARNm a las que puede dar origen el mismo pre-ARNm. (B) Células HeLa fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng de minigén de EDI y 50 ng de SF2/ASF o mutantes) y posteriormente lisadas para extraer el ARN. Luego de las reacciones de RT y PCR radioactiva, las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida nativos, los cuales fueron secados y expuestos a placas radiográficas. (C) Cuantificación de los resultados mostrados en (B). Las bandas fueron cortadas y la radioactividad fue medida por el método Cherenkov (Cramer et al., 1999). \* $p < 0,01$  (prueba t) respecto de la condición (-).

Dada la ausencia de correlación entre el efecto del dominio RRM2 en SUMOilación y en *splicing*, decidimos expandir el resultado obtenido a otros eventos de exones alternativos para determinar si el dominio RRM2 por si solo es capaz de regular el

*splicing* de exones regulados por SF2/ASF. Tal como se hizo con el exón EDI en la figura anterior, se analizó el patrón de *splicing* del exón 9 del gen CFTR (Figura R12). En concordancia con resultados ya conocidos (Buratti et al., 2007), la expresión de SF2/ASF inhibe la inclusión de este exón alternativo (Figura R12 B). En contraste y tal como ocurrió con el exón EDI, la expresión del dominio RRM2 de SF2/ASF no fue capaz de regular el *splicing* de este exón (Figura R12 B). La cuantificación de los resultados se muestra en la Figura R12 C.

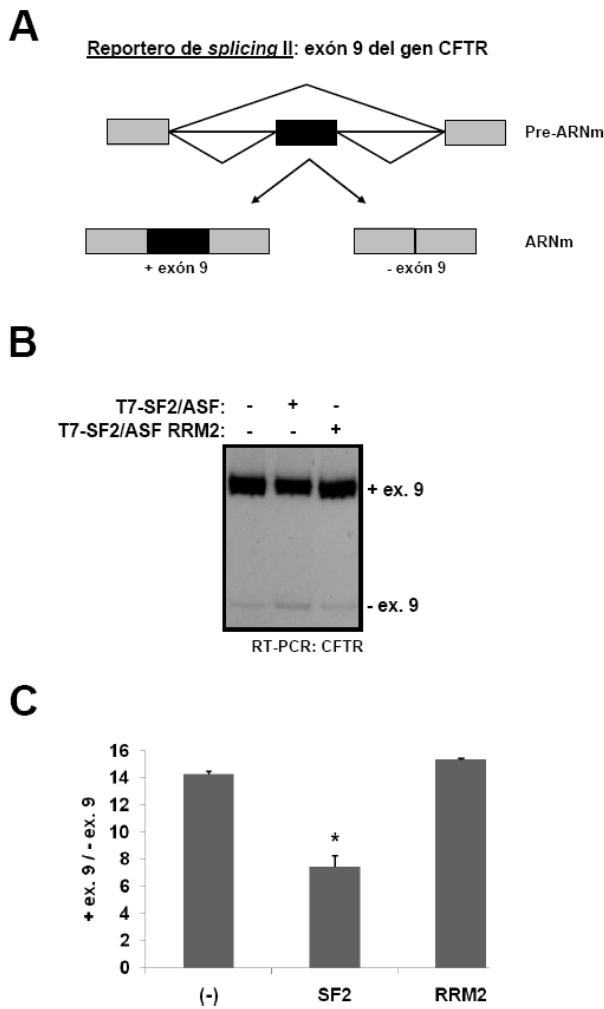


Figura R12 | Efecto de SF2/ASF y del RRM2 sobre el *splicing* del exón 9 del gen CFTR. (A) Esquema del pre-ARNm del minigén reportero de *splicing* del exón 9 del gen CFTR, junto con las dos isoformas de ARNm a las que puede dar origen el mismo pre-ARNm. (B) Células HeLa fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng de minigén de CFTR y 50 ng de T7-SF2/ASF o T7-SF2/ASF RRM2) y posteriormente lisadas para extraer el ARN. Luego de las reacciones de RT y PCR radioactiva, las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida nativos, los cuales fueron secados y expuestos a placas radiográficas. (C) Cuantificación de los resultados mostrados en (B). Las bandas fueron cortadas y la radioactividad fue medida por el método Cherenkov. \* $p < 0,01$  (prueba t) respecto de la condición (-).

Por último, elegimos el gen adenoviral E1a, el cual consta de tres sitios de *splicing* 5' alternativos (Figura R13 A) regulados por SF2/ASF (Eperon et al., 1993, Harper y Manley, 1992). De acuerdo con lo reportado previamente, la expresión de SF2/ASF

estimula la producción de la isoforma 13S (Figura R13 B) mientras que el dominio RRM2 por si solo principalmente aumentó la proporción de la isoforma 9S (Figura R13 B). La cuantificación de los resultados se muestra en la Figura R13C.

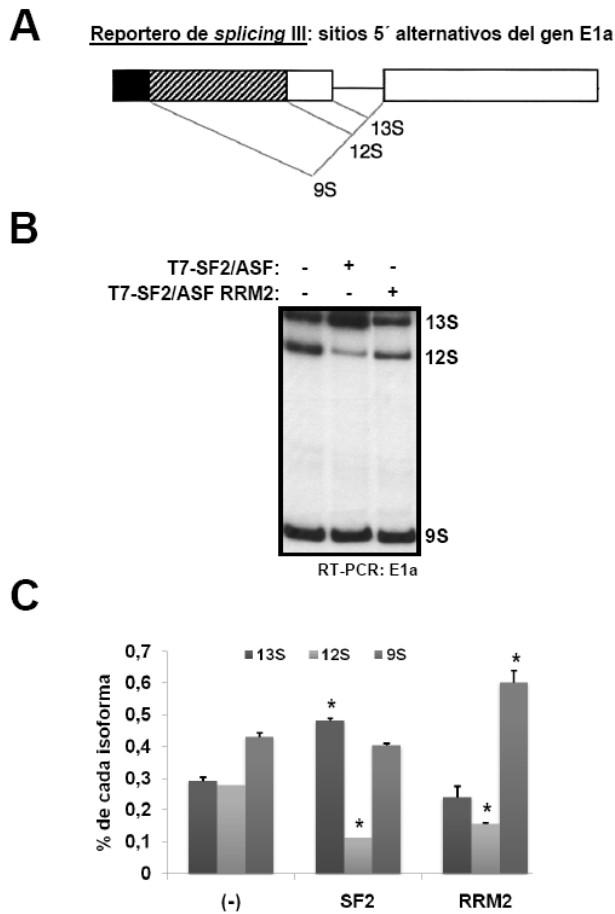


Figura R13 | Efecto de SF2/ASF y del RRM2 sobre el *splicing* del gen E1a de adenovirus. (A) Esquema del pre-ARNm del del minigén reportero de *splicing* del gen E1a. (B) Células HeLa fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng de minigén de E1a y 50 ng de T7-SF2/ASF o T7-SF2/ASF RMM2) y posteriormente lisadas para extraer el ARN. Luego de las reacciones de RT y PCR radioactiva, las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida nativos, los cuales fueron secados y expuestos a placas radiográficas. (C) Cuantificación de los resultados mostrados en (B). Las bandas fueron cortadas y la radioactividad fue medida por el método Cherenkov. \* $p < 0,01$  (prueba t) respecto de la misma isoforma en la condición (-).

**El dominio RRM2 de SF2/ASF es suficiente para regular la SUMOilación pero no para regular el *splicing*, al menos de los eventos analizados.**

Dado el conocido rol de SF2/ASF en la regulación del *splicing*, evaluamos si los niveles de SF2/ASF regulan el patrón de expresión de los ARNm de componentes de la maquinaria de SUMOilación. Para ello diseñamos oligonucleótidos específicos que hibridan en las regiones no codificantes de cada ARNm y evaluamos el patrón de expresión por RT-PCR. Como puede observarse en la Figura R14, no se detectan cambios

en el patrón de ARNm para ninguno de los componentes analizados (SAE2, panel A; SAE1, panel B; SUMO1, panel C y UBC9, panel D). En los casos de SAE1, SAE2 y SUMO1, fue detectada una sólo isoforma para cada gen, mientras que en el caso de UBC9, en concordancia con la base de datos *primer-BLAST*, fueron detectadas dos isoformas. En ningún caso la sobre-expresión de SF2/ASF (calle 2), la sobre-expresión del RRM2 de SF2/ASF (calle 3) ni el noqueo de SF2/ASF por siRNA (calle 4) alteraron el patrón de expresión ni de *splicing*.

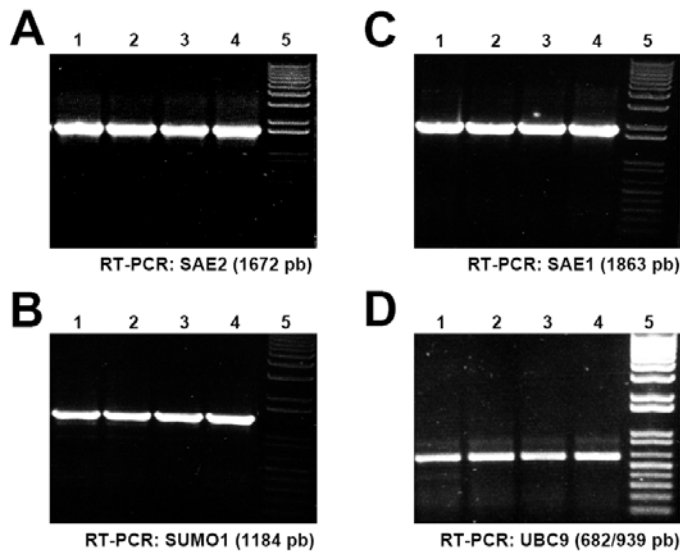


Figura R14 | **SF2/ASF no altera el patrón de expresión/*splicing* de ARNm de componentes de la vía de conjugación de SUMO.** Células HEK293T fueron transfectadas con 100 ng de los vectores de expresión codificando para T7-SF2/ASF (calle 2) o T7-SF2/ASF RRM2 (calle 3), o con 15 nM de un siRNA específico contra SF2/ASF (calle 4). Luego de 72 h, se

preparó el ARN y, luego de la reacción de transcripción reversa, se llevaron a cabo las PCRs indicadas con *primers* que hibridan en las regiones no codificantes de cada ARNm (las secuencias completas de los *primers* están detalladas en "Materiales y Métodos"). Una alícuota de las reacciones fue corrida en geles de agarosa con bromuro de etidio. Entre paréntesis se indica el peso esperado del producto en pares de bases. La calle 5 contiene el marcador de peso molecular *1 Kb Plus*.

**El efecto de SF2/ASF sobre el *splicing* no correlaciona con su efecto sobre la SUMOilación sugiriendo un papel de SF2/ASF en el proceso de SUMOilación independiente de su capacidad de regular el *splicing*.**

#### 4.5. SF2/ASF INTERACCIONA CON UBC9

Teniendo en cuenta que el efecto estimulador de SF2/ASF sobre la SUMOilación sería independiente de su actividad como factor de *splicing*, quisimos investigar en detalle el mecanismo mediante el cual SF2/ASF ejerce esta nueva función. Para ello comenzamos testeando si SF2/ASF es capaz de interactuar con la enzima conjugadora E2, Ubc9. Expresamos la proteína de fusión GST-Ubc9 en bacterias, la incubamos con extractos de células HEK 293T sobre-expresando T7-SF2/ASF salvaje o bien sus mutantes de delección (todos etiquetados con el *tag* T7) y llevamos a cabo ensayos de *pull-down* de GST con una resina de glutatión-sefarosa (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura R15 A, T7-SF2/ASF fue precipitado por GST-Ubc9 pero no por GST solo (calles 7 y 4, respectivamente). El mutante  $\Delta$ RRM2 que es incapaz de estimular la SUMOilación, es también incapaz de unirse a Ubc9 (Figura R15 A, calle 8). Otro mutante, el  $\Delta$ RS el cual es tan eficiente como SF2/ASF salvaje para estimular la SUMOilación, es también capaz de interactuar con Ubc9 (Figura R15 A, calle 9). Más aun, comprobamos que esta interacción es directa ya que GST-Ubc9 también precipita a la proteína recombinante T7-SF2/ASF purificada (Figura R15 B). De esta manera comprobamos que existe una correlación positiva entre la estimulación de la SUMOilación y la capacidad de unión a Ubc9 mediadas por SF2/ASF.

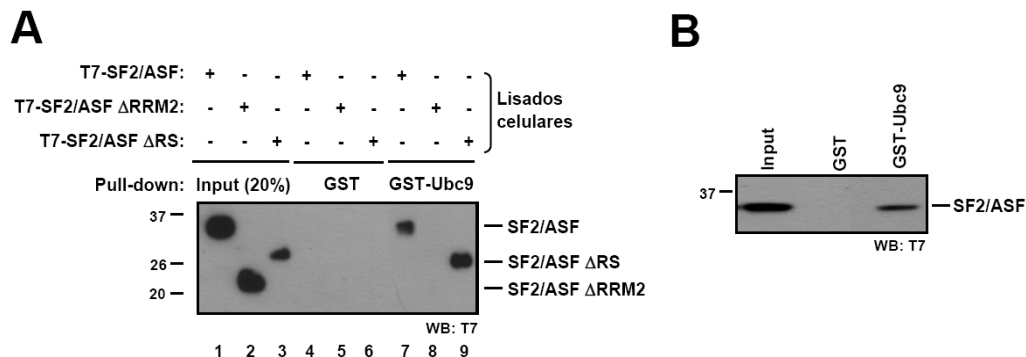


Figura R15 | SF2/ASF interactúa con la enzima E2 de la vía de SUMO, Ubc9. (A) Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión T7-SF2/ASF salvaje,  $\Delta$ RRM2 o  $\Delta$ RS y cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 90%, fueron lisadas. Luego de tomar una alícuota de los lisados como material de partida (*input*), los mismos fueron incubados con 2  $\mu$ g GST o GST-Ubc9 para realizar el ensayo de *GST pull-down*. (B) El ensayo de *GST pull-down* se llevó a cabo como en (A) pero utilizando la proteína recombinante purificada, T7-SF2/ASF (500 ng). En ambos casos el producto final fue resuelto en *SDS-PAGE* y el *western blot* fue llevado a cabo con un anticuerpo anti-T7.

Si bien la evidencia presentada en figuras anteriores apunta hacia un rol independiente del ARN en la actividad de SF2/ASF como estimulador de la SUMOilación, quisimos obtener más evidencia en este sentido. Para ello, repetimos el ensayo de GST pull-down de la Figura R15, pero agregando o no, la enzima *Benzonase* (nucleasa que degrada ADN y ARN, tanto simple como doble cadena). Como puede observarse en la Figura R16 A, GST-Ubc9, pero no GST, interacciona con T7-SF2/ASF sobre-expresada en lisados celulares aún cuando la reacción es incubada con la enzima *Benzonase*. Más aún, GST-Ubc9 es capaz de interactuar con la proteína SF2/ASF endógena, y también de una manera ARN- y ADN-independiente, ya que el ensayo de llevó a cabo con lisados tratados con *Benzonase* (Figura R16 B).

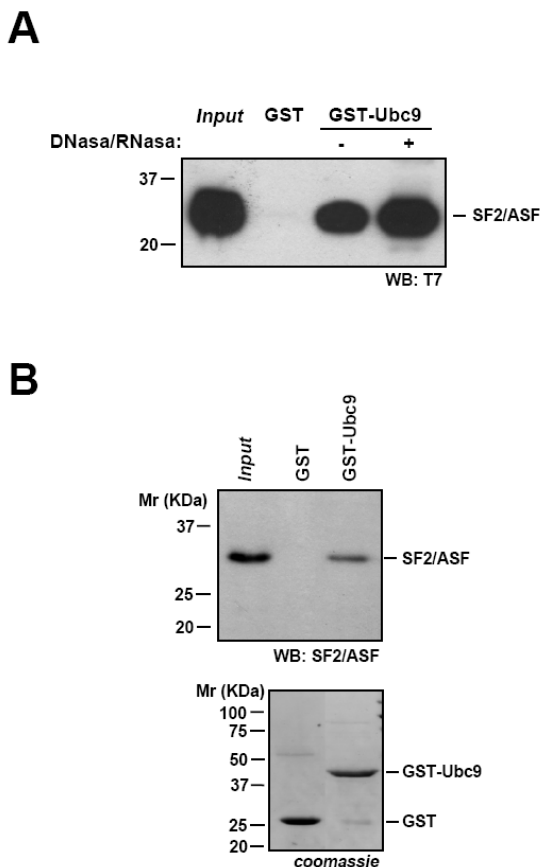


Figura R16 | SF2/ASF interacciona con Ubc9 de manera ADN- y ARN-independiente. (A) Células HEK293T fueron transfectadas con el vector de expresión T7-SF2/ASF y cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 90%, fueron lisadas. Luego de tomar una alícuota de los lisados como material de partida (*input*), los mismos fueron incubados con 2 µg GST o GST-Ubc9 para realizar el ensayo de *GST pull-down* según se detalla en “Materiales y Métodos”, agregando, donde se indica, la enzima *Benzonase*. (B) El ensayo de *GST pull-down* se llevó a cabo como en (A) pero en vez de utilizar lisados de células transfectadas, se utilizaron lisados sin transfectar (en todos los casos tratados con la enzima *Benzonase*, para luego detectar a la proteína SF2/ASF endógena. En ambos casos el producto final fue resuelto en *SDS-PAGE* y el *western blot* fue realizado con los anticuerpos anti-T7 (A) o anti-SF2/ASF (B).

**SF2/ASF interacciona con la enzima conjugadora de SUMO, Ubc9 de manera ADN- y ARN-independiente**

#### 4.6. SF2/ASF ESTIMULA LA SUMOILACIÓN *IN VITRO*

A continuación decidimos testear si el efecto estimulador de la SUMOilación desencadenado por SF2/ASF podía reproducirse en un sistema libre de células, un sistema de SUMOilación *in vitro* con una proteína blanco de SUMOilación específica.

Enzimas recombinantes E1 y E2 fueron combinadas con SUMO1 e incubadas con un fragmento de la proteína Topoisomerasa I (Topo I, aminoácidos 1-200) como sustrato de SUMOilación, en presencia o ausencia de SF2/ASF purificada. Elegimos Topo I debido a que se sabe que interacciona con SF2/ASF (Kowalska-Loth et al., 2005). A diferencia de los geles en los cuales se estudia la SUMOilación global, al estudiar sustratos específicos, lo que se observa son bandas con una menor migración electroforética. La cantidad de bandas y el patrón de corrida de las mismas está determinado por la cantidad de lisinas modificadas, como así también por el número de moléculas de SUMO conjugadas en cada sitio. En particular, se sabe que SUMO1 es capaz de formar cadenas en Topo I (poli-SUMOilación) y, a su vez, Topo I posee tres sitios principales de SUMOilación [multi-SUMOilación, (Yang et al., 2006)]. Observamos que Topo I es SUMOilada en bajo nivel al incubarse con E1, SUMO1 y cantidad limitante de E2 en presencia de ATP (Figura R17, calle 3). Más importante aún, SF2/ASF estimula la SUMOilación de Topo I (Figura R17, calle 4). Es importante mencionar que SF2/ASF no estimula la SUMOilación de Topo I en ausencia de E2 (Ubc9), descartando una posible actividad de SF2/ASF como enzima E2 conjugadora (Figura R17, calle 2). La E3 ligasa de SUMO, Topors, se usó como control positivo dado que ya se ha reportado que estimula la SUMOilación de Topo I [Figura R17, calle 6, (Hammer et al., 2007)]. Por otro lado, la SUMO E3 ligasa específica de la proteína Sp100, RanBP2, se usó como control negativo (Figura R17, calle 5).



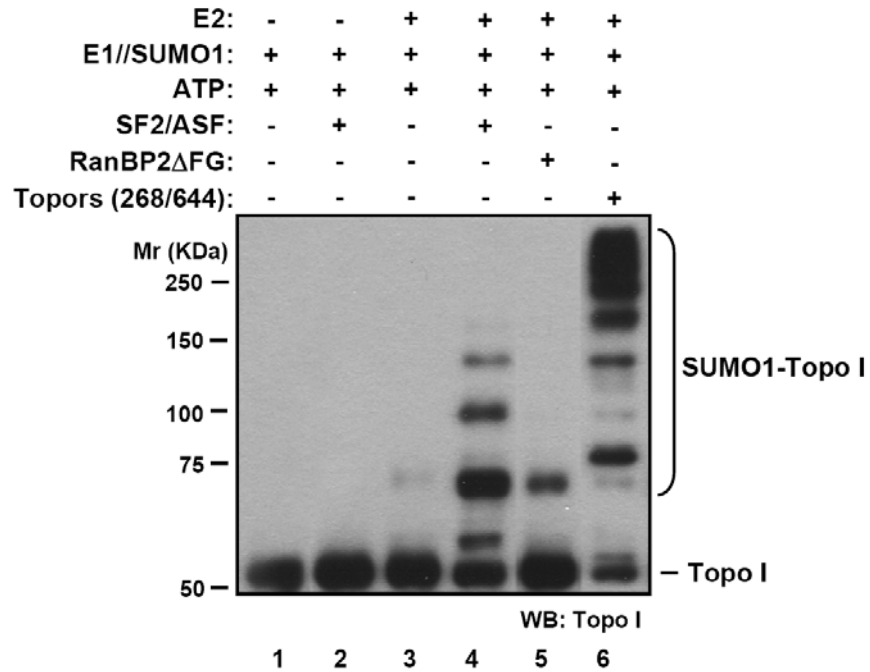


Figura R17 | **SF2/ASF estimula la SUMOilación de Topoisomerasa I *in vitro*.** Las reacciones de SUMOilación *in vitro* se llevaron a cabo utilizando como sustrato 1  $\mu$ g de un fragmento comercial de Topoisomerasa I, conteniendo los tres sitios de SUMOilación descritos (residuos 1-200), fusionado a GST. El fragmento GST-Topoisomerasa I ("Topo I") fue incubado con 150 ng de la enzima activadora de SUMO, E1, 30 ng de la enzima conjugadora de SUMO, E2 y 1  $\mu$ g de SUMO1. Además se agregaron 200 ng de T7-SF2/ASF, 10 ng de GST-RanBP2 $\Delta$ FG (fragmento activo de la E3 ligasa RanBP2) ó 400 ng de GST-Topors (268-644) según se indica. Las reacciones fueron frenadas luego de 30 min de incubación. Luego de *SDS-PAGE*, la SUMOilación de Topo I se midió por *western blot* con un anticuerpo anti-Topo I.

**SF2/ASF afecta directamente a la maquinaria de SUMOilación, interacciona con la enzima conjugadora Ubc9 y promueve la SUMOilación de un sustrato específico.**

### 4.7. SF2/ASF ESTIMULA LA SUMOILACIÓN DE TOPOISOMERASA I *IN VIVO*

Con el objetivo de estudiar si SF2/ASF es capaz de regular la SUMOilación de Topoisomerasa I *in vivo*, se transfectaron células HEK 293T con un vector de expresión mamífero de Topoisomerasa I (con el *tag* Myc) junto con un vector que codifica para la proteína de fusión GFP-SUMO1. La función principal de la adición de GFP a SUMO es la de lograr que la conjugación de SUMO produzca un desplazamiento en la corrida electroforética mayor a ~10 KDa (aproximadamente 35 KDa), importante al analizar la SUMOilación de una proteína de ~100 KDa. Como se puede ver en la Figura R18 A, SF2/ASF interacciona con Topoisomerasa I *in vivo*. Por otro lado, la sobre-expresión de SF2/ASF aumenta mientras que el noqueo por siRNA disminuye los niveles de Topoisomerasa I SUMOilada (Figura R18 B y C, respectivamente).

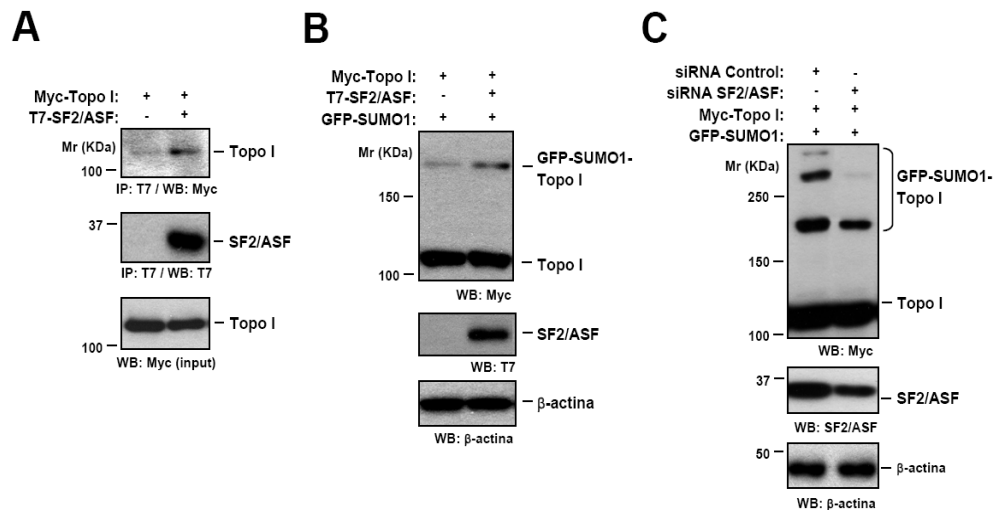


Figura R18 | **SF2/ASF regula la SUMOilación de Topoisomerasa I *in vivo*.** (A) Células HEK293T fueron transfectadas con 6  $\mu$ g de los vectores de expresión Myc-Topo I y T7-SF2/ASF según se indica y se llevó a cabo un ensayo de co-inmunoprecipitación. (B) Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng de Myc-Topo I, 50 ng de GFP-SUMO1 y 500 ng de T7-SF2/ASF) y lisadas 48 h más tarde para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. (C) Células HEK293T fueron transfectadas con siRNA control o un siRNA contra SF2/ASF (a una concentración final de 15 nM). Luego de 24 h, las células fueron retransfectadas con Myc-Topo I y GFP-SUMO1 (500 ng de cada plásmido). Las células fueron lisadas 48 h más tarde para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda de cada panel se indica el peso molecular (en KDa).

**4.8. SF2/ASF ESTIMULA LA SUMOILACIÓN DE p53 *IN VITRO***

Para comprender más profundamente el mecanismo mediante el cual SF2/ASF estimula la SUMOilación, elegimos continuar trabajando con dos sustratos de SUMOilación muy bien caracterizados, Sp100 (Pichler et al., 2002, Sternsdorf et al., 1999) y p53 (Melchior y Hengst, 2002, Muller et al., 2000, Stehmeier y Muller, 2009). En primer lugar, determinamos que SF2/ASF es capaz de interactuar directamente con p53 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación con ambas proteínas purificadas (Figura R19).

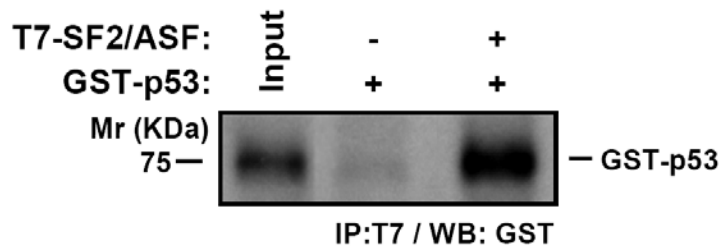


Figura R19 | **SF2/ASF interacta con p53 *in vitro***. Las proteínas recombinantes GST-p53 y T7-SF2/ASF (1 µg de cada una) fueron incubadas por una hora a 4°C. Luego de la adición de 30 µl de la resina anti-T7 acoplada a agarosa, la incubación continuó por una hora más. Luego de lavar la resina, las muestras fueron resueltas en *SDS-PAGE* y analizadas por *western blot* utilizando un anticuerpo anti-GST.

A continuación, realizamos reacciones de SUMOilación *in vitro* con GST-p53 recombinante y su conjugación a SUMO fue analizada mediante ensayos de western blot revelados con un anticuerpo específico contra p53, de manera análoga a lo realizado con Topo I. Como se observa en la Figura R20, SUMO es conjugado a p53 en forma dependiente de E2. A bajas cantidades de Ubc9, la conjugación de SUMO1 a p53 fue casi indetectable y el agregado de proteína SF2/ASF recombinante incrementa dicha conjugación (Figura R20 A, calles 2-4). Resultados similares fueron obtenidos al utilizar SUMO3 en vez de SUMO1 (Figura R20 B).

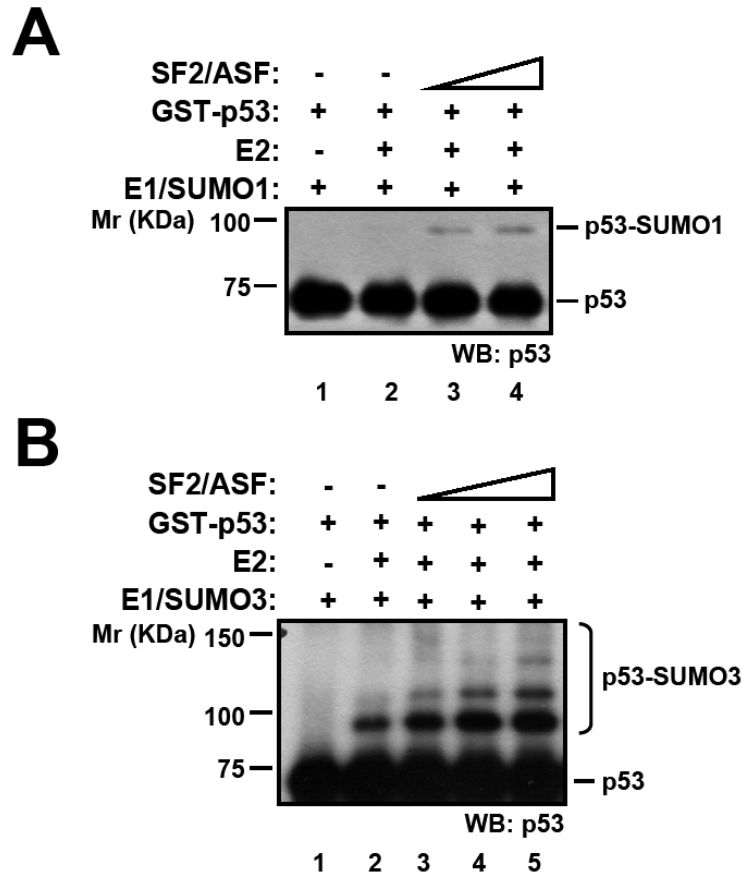


Figura R20 | **SF2/ASF estimula la SUMOilación de p53 *in vitro***. (A) GST-p53 (250 ng) fue incubado con las enzimas E1 (150 ng) y E2 (30 ng) y SUMO1 (1  $\mu$ g), con o sin el agregado de GST-SF2/ASF (100 y 200 ng) por 60 min. (B) GST-p53 (250 ng) fue incubado con las enzimas E1 (150 ng) y E2 (30 ng) y SUMO3 (1  $\mu$ g), con o sin el agregado de GST-SF2/ASF (50, 100 y 200 ng) por 60 min. Las reacciones fueron frenadas agregando *buffer* de siembra de *SDS-PAGE* y analizadas posteriormente por *western blot* con un anticuerpo específico anti-p53 (clon DO-1).

A continuación realizamos reacciones de SUMOilación *in vitro* de p53 como en la Figura R20 pero en esta ocasión, alícuotas de las reacciones fueron tomadas a distintos tiempos. Como se observa en la Figura R21, el efecto estimulador de SF2/ASF sobre la SUMOilación de p53 es visible a los 30 minutos de reacción, cuando con estas cantidades de Ubc9, la SUMOilación basal es baja (Figura R21, calles 2 y 3). Lo mismo se observa a los 60 minutos, ahora con un mayor nivel de SUMOilación basal, pero el efecto de SF2/ASF sigue siendo claro.

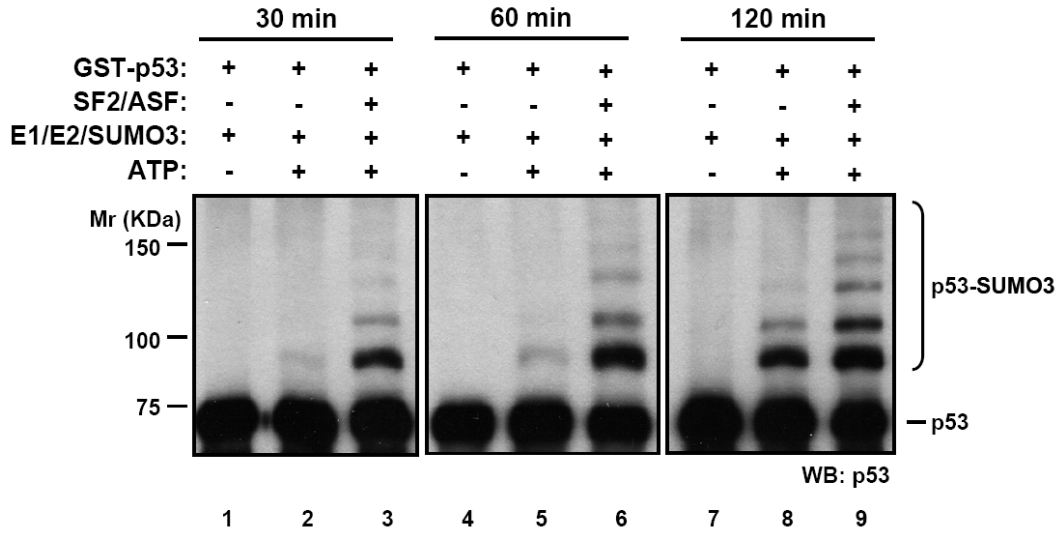


Figura R21 | Curva de tiempo del efecto estimulador de SF2/ASF sobre la SUMOilación de p53 *in vitro*. GST-p53 (250 ng) fue incubado con las enzimas E1 (150 ng) y E2 (30 ng) y SUMO3 (1  $\mu$ g), con o sin el agregado de GST-SF2/ASF (200 ng) y se fueron extrayendo alícuotas de las reacciones a los tiempos indicados. Las mismas fueron sometidas a *SDS-PAGE* y analizadas posteriormente por *western blot* con un anticuerpo específico anti-p53 (clon DO-1).

En la Figura R22 A se muestra un análisis comparativo de la actividad de SF2/ASF con otras proteínas con actividad E3 ligasa ya conocida. La magnitud del efecto de SF2/ASF es similar a aquella de las E3 ligasas de p53, PIAS1 y Topors (Figura R22 A, calles 2-5). De acuerdo con lo reportado (Pichler et al., 2004), la E3 ligasa RanBP2 no aumenta la SUMOilación de p53 (Figura R22 A, calles 2 y 6). Utilizando el sustrato de SUMOilación de RanBP2, Sp100, pudimos observar que SF2/ASF no fue capaz de estimular la conjugación de SUMO1 (Figura R22 B, calles 3-5). RanBP2 fue utilizado como control positivo (Figura R22 B, calle 6).

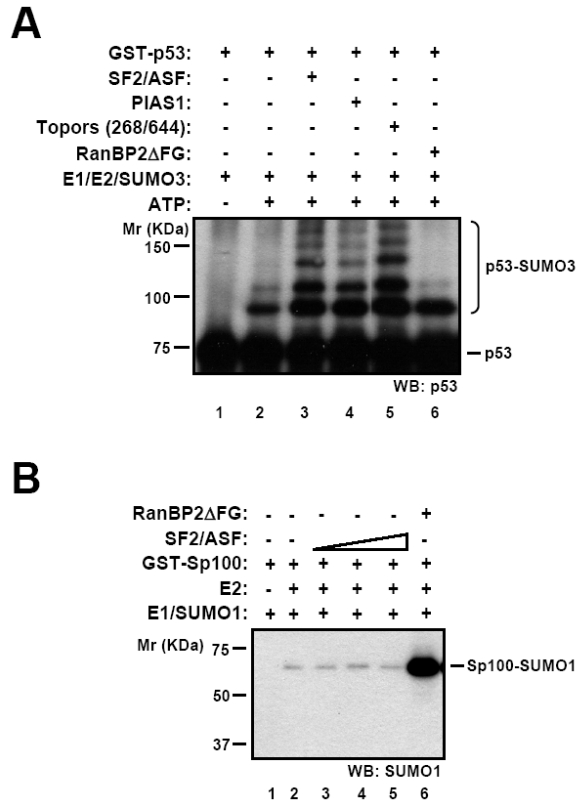


Figura R22 | La actividad estimuladora de la SUMOilación de SF2/ASF presenta especificidad de sustrato y es similar en magnitud a la de las E3 ligasas PIAS1 y Topors. (A) Las reacciones de SUMOilación *in vitro* de p53 fueron llevadas a cabo como en la Figura R20 y agregando 200 ng de GST-SF2/ASF, 200 ng de GST-PIAS1, 400 ng de Topors (268-644) o 10 ng de GST-RanBP2ΔFG. (B) Un fragmento conteniendo GST fusionado a los aminoácidos 241-360 de la proteína Sp100, incluyendo el sitio de SUMOilación en la lisina 297 (200 ng), fue incubado con las enzimas E1 (150 ng) y E2 (30 ng) y SUMO3 (1 μg), con o sin el agregado de GST-SF2/ASF (200 ng, 500 ng o 1 μg) o GST-RanBP2ΔFG (10 ng) por 30 min. Las reacciones fueron frenadas agregando *buffer* de siembra de *SDS-PAGE* y analizadas posteriormente por *western blot* con un anticuerpo específico anti-SUMO1 para detectar la forma SUMOilada del fragmento GST-Sp100.

Estos experimentos *in vitro* refuerzan los obtenidos con Topoisomerasa I, demostrando que el rol de SF2/ASF en la conjugación de SUMO es independiente de cualquier proceso relacionado con el metabolismo del ARNm.

### 4.9. SF2/ASF REGULA LA SUMOILACIÓN Y LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE p53 *IN VIVO*.

Habiendo demostrado la capacidad de SF2/ASF de interactuar directamente con p53 y estimular su SUMOilación *in vitro*, realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación para verificar si la interacción ocurre también *in vivo*. Efectivamente, SF2/ASF y p53 interactúan en lisados preparados de células en cultivo, como se observa en la Figura R23 A. Con el objetivo de estudiar si SF2/ASF es capaz de regular la SUMOilación de p53 *in vivo*, transfectamos células HEK 293T con un siRNA dirigido contra SF2/ASF. Como se puede ver en la Figura R23 B, el noqueo de SF2/ASF por siRNA disminuye los niveles de p53 endógeno SUMOilado.

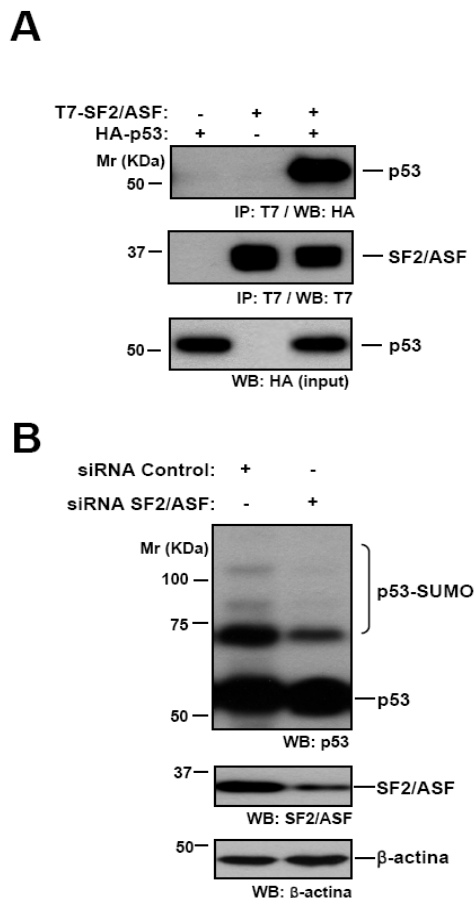


Figura R23 | **SF2/ASF regula la SUMOilación de p53 *in vivo***. (A) Células HEK293T fueron transfectadas con 6  $\mu$ g de los vectores de expresión codificando para T7-SF2/ASF y HA-p53 según se indica y 72 h más tarde fueron lisadas para ser sometidas a inmunoprecipitación con una resina de agarosa acoplada a un anticuerpo anti-T7. Luego del protocolo de inmunoprecipitación, las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa). (B) Células HEK293T fueron transfectadas con un siRNA control o específico para SF2/ASF (concentración final = 15 nM) y lisadas 72 h más tarde. Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y analizadas por *western blot* con los anticuerpos indicados en la parte inferior derecha de cada panel.

El rol de la SUMOilación sobre la actividad transcripcional de p53 es un tema de controversia (Melchior y Hengst, 2002). El problema principal con el intento de establecer unívocamente un rol para la SUMOilación de un factor específico es que al sobre-expresar cualquier componente de la maquinaria de SUMOilación, se altera la SUMOilación no sólo del factor de interés sino probablemente de co-factores que también se vean afectados por la conjugación de SUMO. Una herramienta muy útil es la mutación de la lisina blanco, de manera de ver qué ocurre cuando un determinado factor no se puede SUMOilar. En el caso de p53, el inconveniente extra está dado por el hecho de que la lisina 386 que es blanco de SUMOilación, también puede ser acetilada. A pesar de lo mencionado, decidimos analizar el rol de SF2/ASF en la actividad transcripcional de p53. Para ello, utilizamos una construcción reportera que contiene el promotor del gen blanco de p53, p21, río arriba de la región codificante del gen de la luciferasa. La sobre-expresión de SF2/ASF estimula ~3 veces la actividad transcripcional de p53 (Figura R24). La sobre-expresión de SUMO estimula marginalmente la actividad transcripcional, mientras que la co-expresión de SF2/ASF y SUMO lleva a un aumento sinérgico en la actividad transcripcional de p53. Este efecto es dependiente de p53 ya que no se observa en una línea celular isogénica pero carente de p53 (Figura R24).

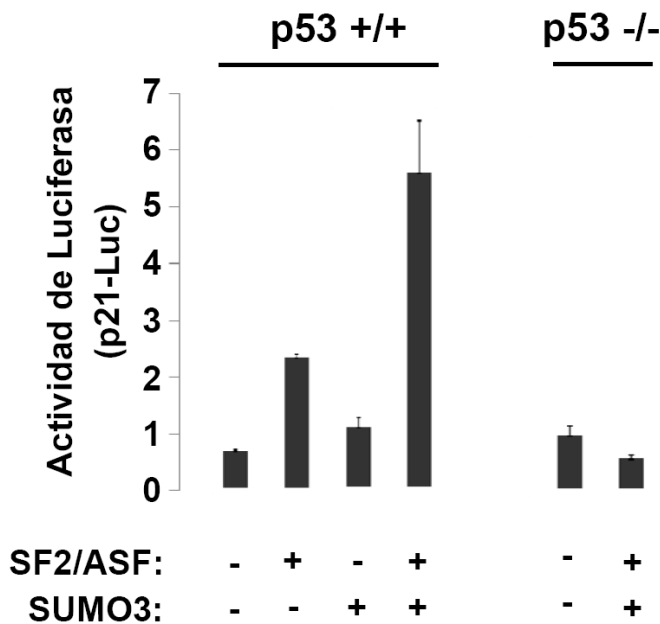


Figura R24 | SF2/ASF regula la actividad transcripcional de p53 en ensayos reporteros. Células HCT-116 con genotipo p53 +/+ o -/-, fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados junto con el reportero transcripcional de p53 p21-LUC. Luego de 24 h, las células fueron lisadas y la actividad de Luciferasa fue medida según se indica en “Materiales y Métodos”.

**SF2/ASF estimula la actividad transcripcional de p53**



#### 4.10. SF2/ASF TIENE CARACTERÍSTICAS DE UNA E3 LIGASA DE SUMO

Habiendo establecido que SF2/ASF tiene la capacidad de estimular la SUMOilación de sustratos específicos, nos preguntamos a qué nivel estaría actuando SF2/ASF para estimular la conjugación de SUMO. Dos posibilidades no mutuamente excluyentes podrían explicar este efecto: la promoción de la formación del enlace tioester entre Ubc9 y SUMO y/o la estimulación de la transferencia de SUMO desde Ubc9 al sustrato. Los enlaces tioesteres SUMO-Ubc9 (“Ubc9~S~SUMO”) pueden detectarse mediante la utilización de geles desnaturizantes con SDS no reductores seguidos de *western blot* con anticuerpos anti-Ubc9 como se muestra en la Figura R25. Estos ensayos permiten concluir que SF2/ASF no es capaz de estimular la formación de dichos enlaces (Figura R25 A, calles 1 vs. 2 y 3 vs. 4). Como es de esperar, el agregado de DTT en el *buffer* de siembra desarma completamente los enlaces tioester (Figura R25 A, calle 5). Podría ocurrir que SF2/ASF aumentara la formación de Ubc9~S~SUMO pero a tiempos tempranos. Para estudiar esta hipótesis, realizamos el mismo ensayo pero analizamos las muestras luego de 30 segundos, 1 ó 5 minutos de incubación (Figura R25 B). Se puede ver en este caso como la forma Ubc9~S~SUMO aumenta con el tiempo (Figura R25 B, calles 1, 3 y 5), sin embargo, SF2/ASF no es capaz de estimular la formación de Ubc9~S~SUMO (Figura R25 B, calles 2, 4 y 6).

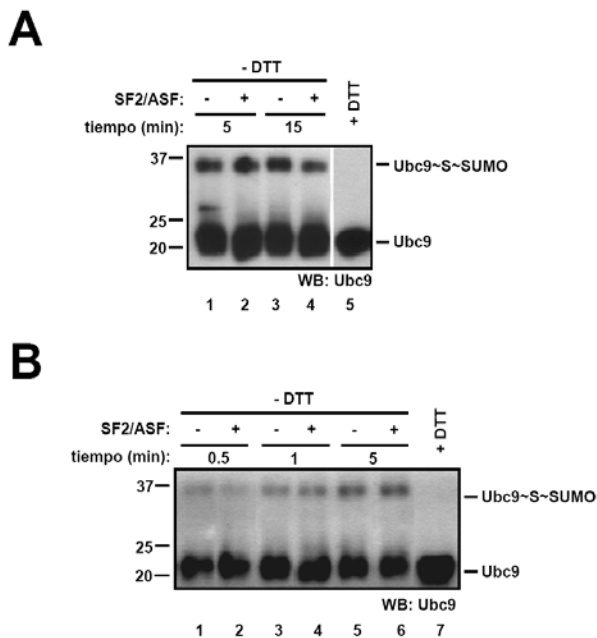


Figura R25 | **SF2/ASF no regula la formación del enlace tioester entre SUMO y Ubc9.** Las proteínas recombinantes E1 (150 ng), E2 (100 ng) y SUMO1 (200 ng) fueron incubadas con o sin el agregado de GST-SF2/ASF (200 ng) y alícuotas de las reacciones fueron tomadas en los tiempos indicados. Las reacciones fueron finalizadas mediante el agregado de un volúmen de *buffer* de siembra de *SDS-PAGE* no desnaturizante 2X (calles 1-4 en A y calles 1-6 en B). Las muestras fueron analizadas por *SDS-PAGE* y *western blot* con un anticuerpo específico anti-Ubc9.

Con el objetivo de analizar si SF2/ASF afecta la transferencia de SUMO al sustrato, utilizamos complejos Ubc9~S~SUMO preformados y medimos luego la tasa de transferencia de SUMO1 desde Ubc9 a p53 en reacciones denominadas de "single turnover". Incubamos para ello enzimas E1, E2 y SUMO1 en ausencia de sustrato, para permitir la formación de Ubc9~S~SUMO ("Primer paso"). Luego de diluir los complejos formados en *buffer* de reacción conteniendo EDTA para inhibir la actividad de E1 y por ende la formación de nuevos complejos Ubc9~S~SUMO, agregamos p53 solo o conjuntamente con SF2/ASF recombinante ("Segundo paso" ó transferencia). Tal como se muestra en la Figura R26 A, SF2/ASF estimula la transferencia de SUMO3 desde Ubc9 a p53 (calles 1-3 vs. 4-6). La E3 ligasa PIAS1 fue utilizada como control positivo (Figura R26 A, calles 7-9). SF2/ASF también estimula la transferencia de SUMO1 a p53 (Figura R26 B, calles 1, 3 y 5 vs. 2, 4 y 6). La calle 7 de la Figura R26 B muestra como al omitir el EDTA en el segundo paso se permiten múltiples ciclos de carga/descarga de Ubc9 ("multiple turnover") dando lugar a una mayor SUMOilación de p53.

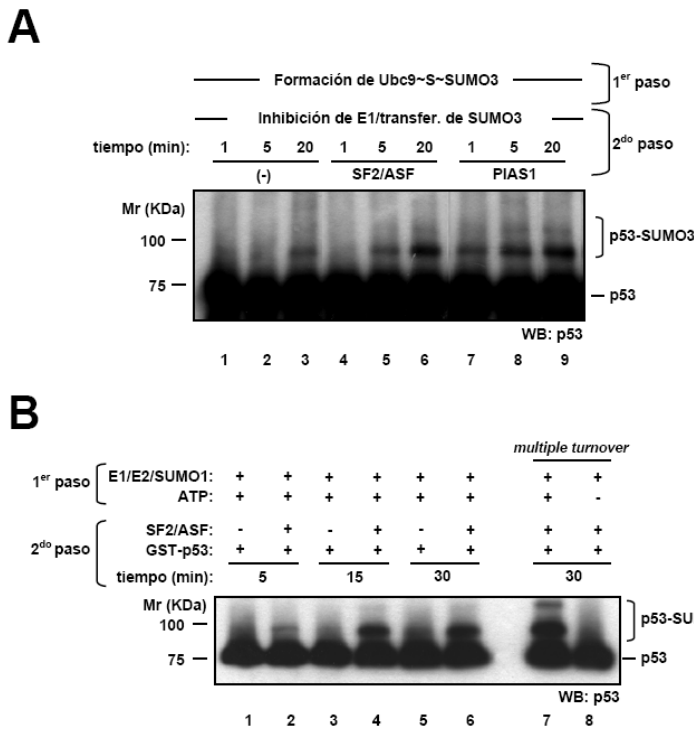


Figura R26 | **SF2/ASF estimula la transferencia de SUMO desde Ubc9 al sustrato (p53).** (A) Luego de incubar las proteínas recombinantes E1 (150 ng), E2 (300 ng) y SUMO3 (200 ng) por 30 min, las reacciones fueron diluidas en *buffer* conteniendo 10 mM EDTA para inhibir la actividad de la enzima E1. Posteriormente fue agregado GST-p53 junto con GST, GST-PIAS1 o GST-SF2/ASF (200 ng de cada uno) y las reacciones

fueron incubadas por los tiempos que se indican. Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y analizadas posteriormente por *western blot* con un anticuerpo específico anti-p53 (clon DO-1). (B) Las reacciones fueron preparadas igual que en (A), pero con SUMO1 en vez de SUMO3. Las reacciones marcadas como *multiple turnover* corresponden a muestras a las que no se les agregó EDTA entre los pasos 1 y 2, de manera que la enzima E1 siguió activa permitiendo múltiples rondas de cargado y descargado de la enzima E2.

Dos características comunes de las enzimas E3 ligasas de SUMO son: i) capacidad de formar cadenas de SUMO *in vitro* (Johnson y Gupta, 2001, Pichler et al., 2002, Ulrich, 2008) y ii) ser sustratos de SUMOilación ellas mismas (Johnson y Gupta, 2001, Kagey et al., 2005, Kagey et al., 2003, Pichler et al., 2002, Rytinki et al., 2009). Estos dos fenómenos fueron testeados *in vitro* para SF2/ASF y los resultados se muestran en la Figura R27. Como se observa en el panel A, la formación de cadenas de SUMO3 aumenta con el tiempo pero SF2/ASF no regula este proceso. Por otro lado, en las condiciones ensayadas, SF2/ASF no es sustrato de SUMOilación (panel B, p53 fue utilizado como control positivo del ensayo)

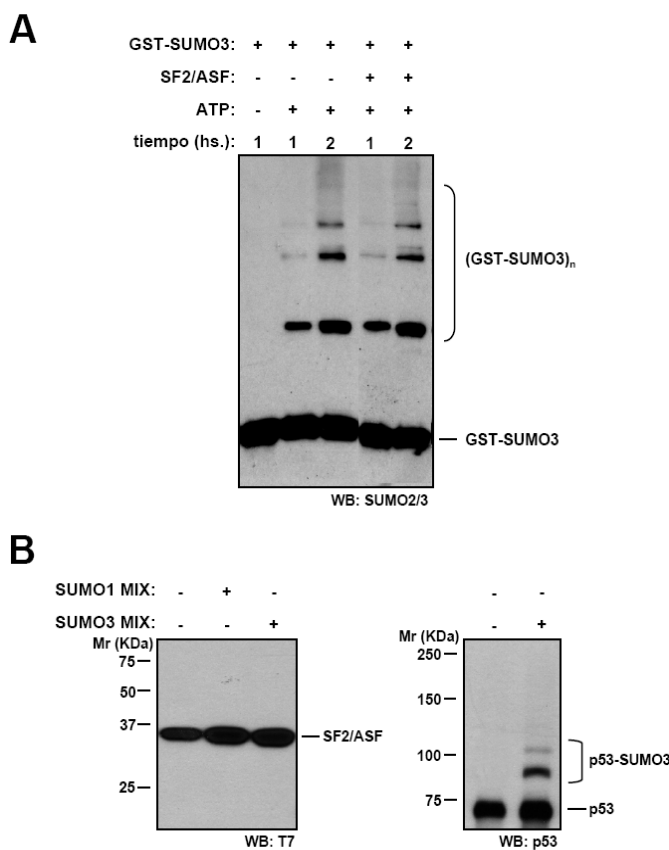


Figura R27 | **SF2/ASF no estimula la formación de cadenas de SUMO3 ni es sustrato de SUMOilación.** (A) Las enzimas E1 (250 ng) y E2 (500 ng) fueron incubadas con GST-SUMO3 (5  $\mu$ g), en presencia de un sistema regenerador de ATP, por los tiempos indicados, con o sin el agregado de GST-SF2/ASF (200 ng). Las reacciones fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* con un anticuerpo anti-SUMO2/3. (B) T7-SF2/ASF fue incubado por 2 h con las enzimas E1 (150 ng) y E2 (300 ng) y SUMO1 o 3 (1  $\mu$ g). La reacción con p53 (control) fue llevada a cabo en condiciones similares pero con 30 ng de E2.

**SF2/ASF posee características de SUMO E3 ligasa dado que interacciona con la enzima conjugadora de SUMO, Ubc9, con el sustrato y promueve la transferencia de SUMO desde Ubc9 al sustrato. Además, SF2/ASF presenta especificidad de sustrato, otra característica de las E3 ligasas.**

### 4.11. SF2/ASF INTERACCIONA CON PIAS1

Considerando que PIAS1 co-purifica con el spliceosoma (Rappsilber et al., 2002) y que se asemeja a factores denominados *scaffold-attachment factors* que se sabe interaccionan con proteínas SR (Nayler et al., 1998), hipotetizamos que SF2/ASF podría también interaccionar con PIAS1. Efectivamente, ensayos de *pull-down* de GST demuestran que SF2/ASF interacciona con PIAS1 (Figura R28 A). Más aun esta interacción depende del dominio RRM2 de SF2/ASF (Figura R28 A, calles 7 y 8) y no es mediada por ninguna otra proteína ya que SF2/ASF recombinante purificada puede también ser precipitada por GST-PIAS1 (Figura R28 B). Para verificar esta interacción *in vivo*, HA-PIAS1 y T7-SF2/ASF fueron transfectadas en células HEK 293T y posteriormente fue realizado un ensayo de co-inmunoprecipitación. Como se muestra en la Figura R28 C y en concordancia con lo observado *in vitro*, PIAS1 co-inmunoprecipita con SF2/ASF salvaje pero no con el mutante que carece del RRM2.

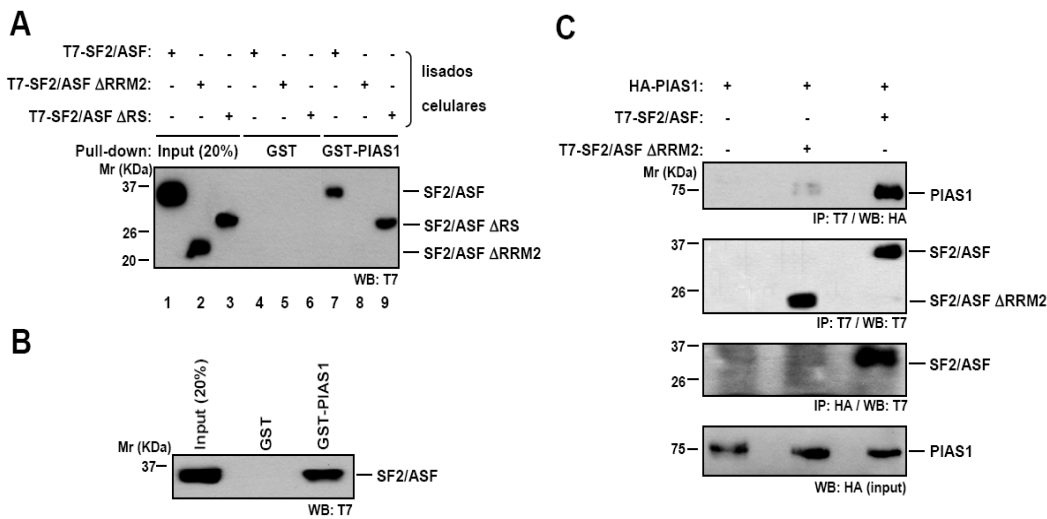


Figura R28 | SF2/ASF interacciona con la enzima E3 de la vía de SUMO, PIAS1. (A) Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados y posteriormente fueron lisadas. Luego de tomar una alícuota de los lisados como material de partida (*input*), los mismos fueron incubados con 2 µg de GST o GST-PIAS1 para realizar el ensayo de *GST pull-down*. (B) El ensayo de *GST pull-down* fue llevado a cabo como en (A) pero utilizando T7-SF2/ASF recombinante (500 ng). En ambos casos el producto final fue resuelto en *SDS-PAGE* y el *western blot* fue llevado a cabo con un anticuerpo anti-T7. (C). Luego de tomar una alícuota de cada lisado como *input*, se llevó a cabo una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-T7 o anti-HA para luego revelar la presencia de las distintas proteínas por *western blot*. En la parte inferior derecha de cada panel se indica los anticuerpos utilizados.

Estos resultados muestran que la proteína SR SF2/ASF interacciona físicamente con la E3 ligasa de SUMO, PIAS1.

#### 4.12. SF2/ASF REGULA LA ACTIVIDAD DE PIAS1

El hallazgo de que SF2/ASF interacciona con PIAS1 tanto *in vivo* como *in vitro*, nos condujo a probar una posible interacción funcional entre dichas proteínas en el proceso de SUMOilación. PIAS1 estimula la conjugación de SUMO a nivel global (Figura R29, calles 1 y 2) y, notablemente, la depleción de SF2/ASF por medio de siRNA, inhibe drásticamente el efecto estimulador de la SUMOilación ejercido por PIAS1, indicando que la actividad de PIAS como E3 ligasa de SUMO depende de la presencia de SF2/ASF (Figura R29, calles 3 y 4).

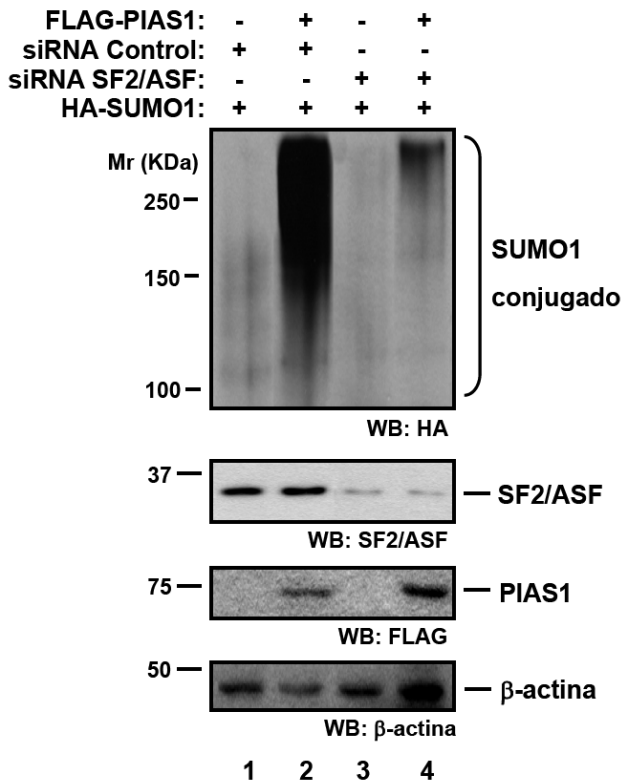


Figura R29 | Los niveles endógenos de SF2/ASF son necesarios para la actividad de PIAS1. Células HEK293T fueron transfectadas con siRNA control o siRNA específico contra SF2/ASF y 24 h más tarde re-transfectadas con los vectores de expresión indicados (HA-SUMO3 y FLAG-PIAS1, 500 ng de cada uno) y 48 h más tarde lisadas para ser sometidas a SDS-PAGE y western blot según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

La co-expresión de PIAS1 y SF2/ASF lleva a un efecto sinérgico de estimulación de la SUMOilación global de proteínas (Figura R30, calles 1-4). Este efecto es abolido al utilizar la proteína SF2/ASF que carece del dominio RRM2 (Figura R30, calles 1 y 2 vs. 5 y 6). Cuando se utilizan cantidades sub-óptimas de SF2/ASF, las cuales no son suficientes para estimular la SUMOilación, el efecto mediado por PIAS1 es potenciado (Figura R30, panel inferior), demostrando que se trata de un sinergismo funcional.

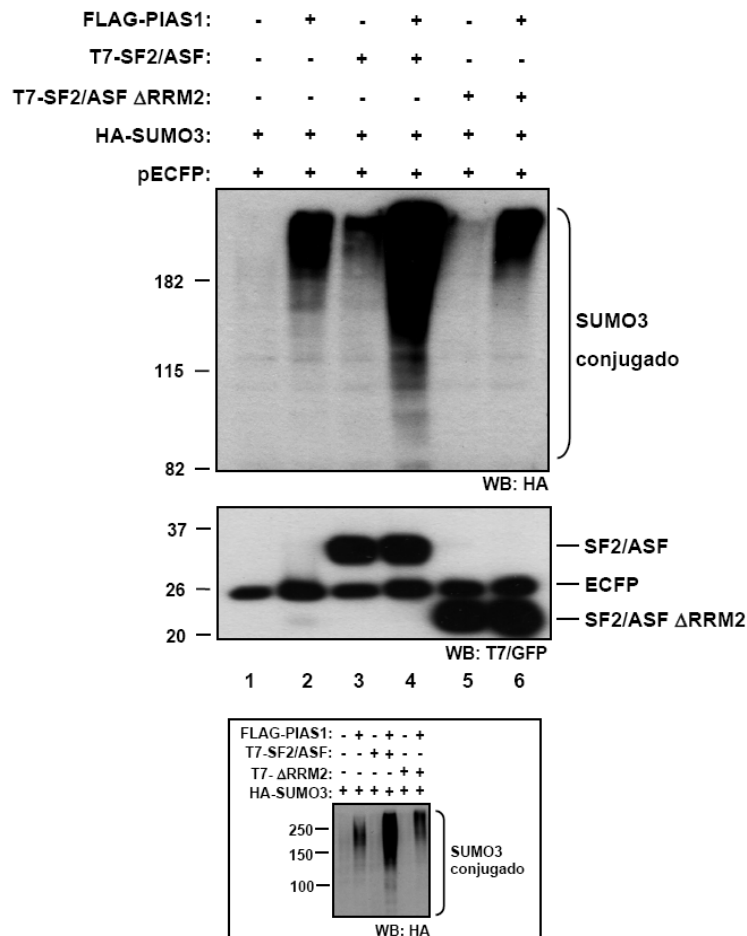


Figura R30 | **SF2/ASF estimula la actividad E3 ligasa de PIAS1 *in vivo***. Células HEK293T fueron transfectadas con vectores de expresión codificando para HA-SUMO3, FLAG-PIAS1, T7-SF2/ASF y T7-SF2/ASF ΔRRM2 (500 ng de cada uno) según se indica. En el panel inferior se muestra un experimento en el que se transfectó una cantidad limitante de los vectores que codifican para T7-SF2/ASF (50 ng). Luego de incubar 48 h, las células fueron lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en kDa).

Al usar cantidades sub-óptimas de PIAS1 (sólo capaces de estimular levemente la SUMOilación – Figura R31, calles 1 y 6), se puede observar que tanto SF2/ASF como sus mutantes  $\Delta$ RRM1 y  $\Delta$ RS tienen un efecto sinérgico sobre la actividad de PIAS1 (Figura R31, SF2/ASF: calles 2 y 7,  $\Delta$ RRM1: calles 3 y 8,  $\Delta$ RS: calles 5 y 10). En contraste, el mutante  $\Delta$ RRM2, no sólo no es capaz de estimular la SUMOilación, sino que tampoco puede aumentar el efecto de PIAS1 (Figura R31, calles 4 y 9). Es importante recalcar que si bien la co-expresión de SF2/ASF aumenta la expresión de PIAS1, esto también ocurre con los mutantes, incluido el  $\Delta$ RRM2 (Figura R31, calles 6-10), el cual no tiene efecto sobre la actividad de PIAS1, demostrando que los cambios sutiles en la expresión de PIAS1 no son suficientes para explicar la interacción funcional entre PIAS1 y SF2/ASF.

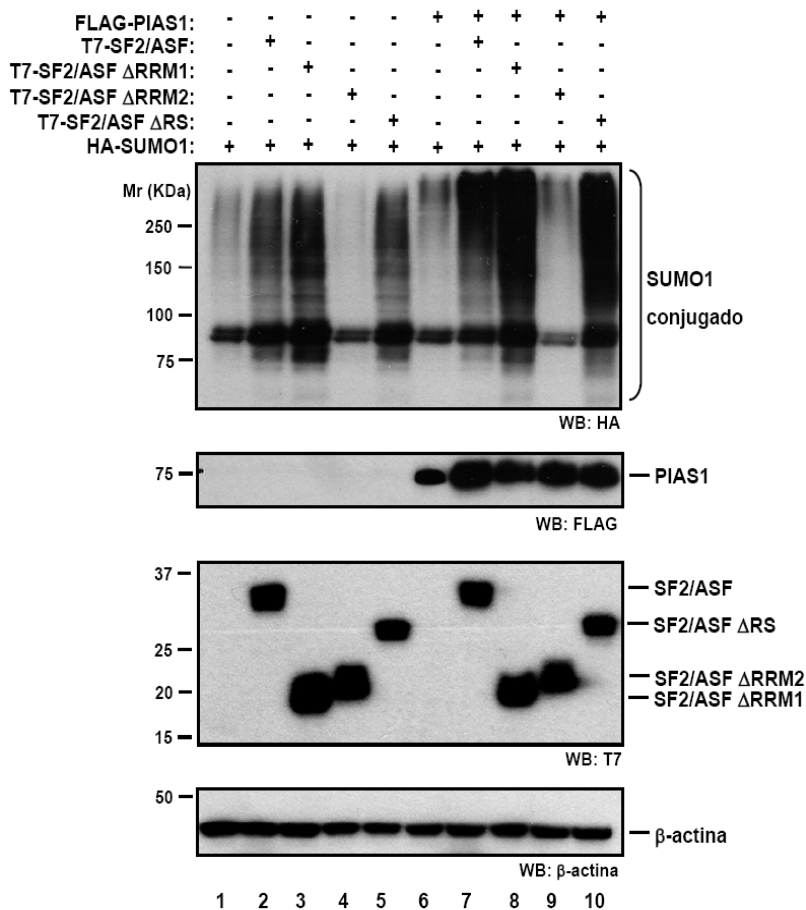


Figura R31 | El efecto estimulador de SF2/ASF sobre la actividad E3 ligasa de PIAS1 depende de su dominio RRM2. Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión que codifican para las proteínas HA-SUMO1 (500 ng), T7-SF2/ASF salvaje y mutantes (500 ng) y FLAG-PIAS1 (100 ng). Luego de incubar 48 h, las células fueron lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

Estos resultados demuestran que mas allá de la función de SF2/ASF como SUMO E3 ligasa descrita más arriba, SF2/ASF interacciona con la E3 ligasa de SUMO, PIAS1 y regula su actividad.

#### 4.13. SF2/ASF ESTÁ INVOLUCRADA EN LA ESTIMULACIÓN DE LA SUMOILACIÓN DESENCADENADA POR ESTRÉS HIPERTÉRMICO

Quisimos averiguar si SF2/ASF podría estar involucrada en alguna condición fisiológica en la cual los niveles de SUMOilación global de proteínas fuesen regulados. Para ellos estudiamos la respuesta celular al estrés térmico dado que se sabe que rápidamente estimula la conjugación de SUMO, en particular de SUMO2/3 (Tempe et al., 2008). Por otro lado, ha sido descrito que la localización sub-nuclear de SF2/ASF cambia como consecuencia del estrés térmico re-localizándose en los nSBs (Biamonti, 2004, Chiodi et al., 2004). Llamativamente, así como su efecto sobre la SUMOilación, esta re-localización depende del dominio RRM2 (Chiodi et al., 2004). Células HEK 293T fueron transfectadas según se indica y expuestas a un *shock* término de 42°C por 15 minutos (con sus respectivos controles permaneciendo a 37°C) y posteriormente analizamos la conjugación de SUMO3 mediante un ensayo de *western blot*. Tal como se esperaba, el estrés térmico produjo un aumento de la SUMOilación global de proteínas por SUMO3 (Figura R32, calles 1 y 2). Notablemente, cuando las células fueron depletadas de SF2/ASF con un siRNA, dicha estimulación de la SUMOilación fue drásticamente inhibida (Figura R32, calles 3 y 4). Más aún, la sobre-expresión del mutante de SF2/ASF que carece del dominio RRM2 también es capaz de inhibir la SUMOilación, tanto basal como aquella inducida por el estrés térmico (Figura R32, calles 5 y 6).



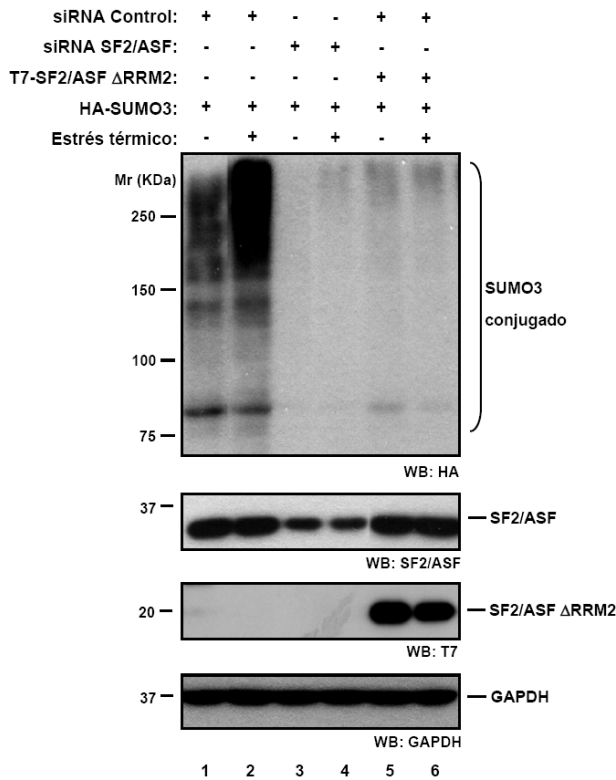


Figura R32 | **SF2/ASF y SUMOilación inducida por estrés térmico.** Células HEK293T fueron transfectadas con los siRNAs según se indica (15 nM concentración final) y 24 h más tarde fueron re-transfectadas con los vectores que codifican para HA-SUMO3 (500 ng) y T7-SF2/ASF ΔRRM2 (1 μg). Luego de 48 h, las células fueron expuestas a 42°C por 15 min o permanecieron a 37°C como control. Posteriormente, las células fueron lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

Quisimos testear la hipótesis de que los nSBs son sitios de acumulación de proteínas SUMOiladas, lo que proveería un interesante punto de contacto entre SF2/ASF, la maquinaria de SUMOilación y proteínas de unión al ARN. Para ello, transfectamos células con un vector de expresión de SUMO1 fusionado a la proteína fluorescente mCherry y otro vector codificando para la proteína marcadora de nSBs, HAP, fusionada a la proteína fluorescente verde. Las células fueron expuestas a estrés térmico para inducir la formación de nSBs de acuerdo con los protocolos reportados (Chiodi et al., 2004, Denegri et al., 2001). Como se observa en la Figura R33, a 37°C no hay co-localización de SUMO1 con HAP (paneles A-C). En contraste, en células expuestas a 42°C hay co-localización de SUMO con HAP (paneles D-F, flecha blanca), indicando que SUMO se concentra en los nSBs, lugar de residencia de un gran número de proteínas de unión a ARN (Denegri et al., 2001). Al inhibir la expresión de SF2/ASF por medio de siRNA, se puede ver que SUMO1 ya no se concentra en los nSBs (Figura R33, paneles G-J, flecha blanca).

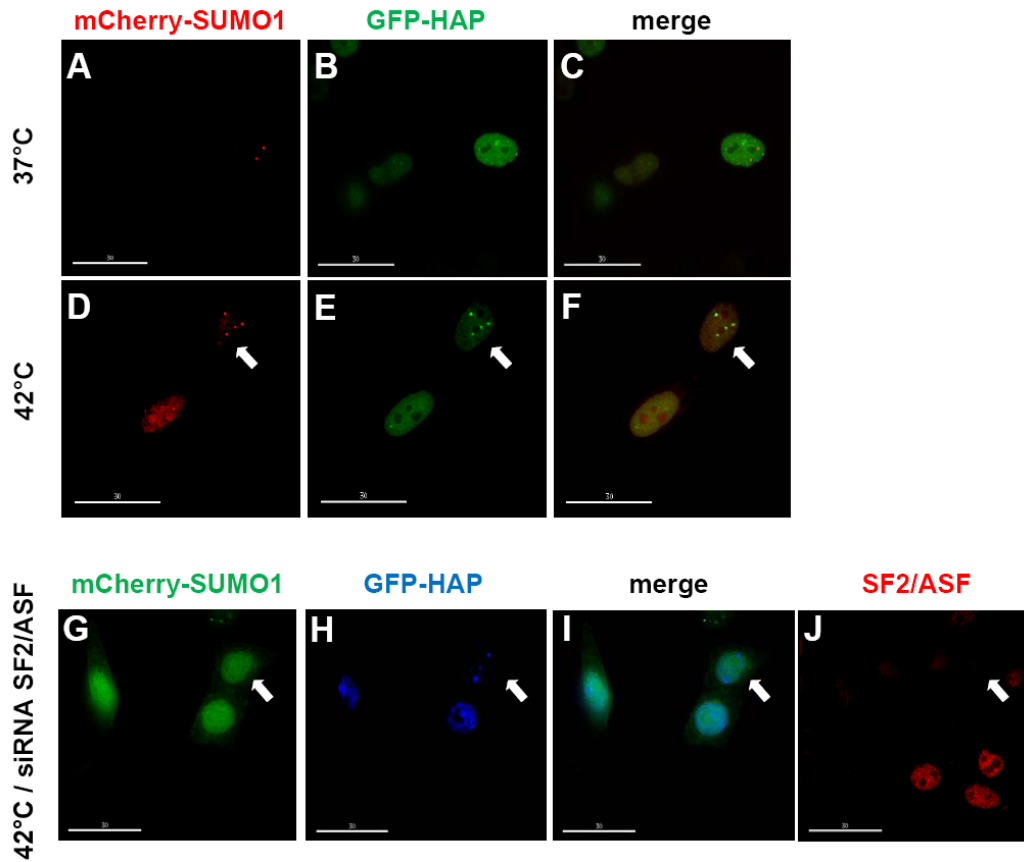


Figura R33 | **Los nSBs son sitios de acumulación de SUMO1.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones indicadas. Veinticuatro horas más tarde, las células fueron transferidas a un baño a 42°C por 1 h y luego se les permitió que recuperen del estrés por 1 h a 37°C. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas, en los casos indicados, con un anticuerpo anti-SF2/ASF (G-J). GFP-HAP fue utilizado como marcador de nSBs. La flecha blanca en los paneles G-J muestra una célula con reducida expresión de SF2/ASF. Las barras blancas corresponden a 30  $\mu\text{m}$ .

Resultados similares se obtuvieron al analizar SUMO2 en vez de SUMO1 y los mismos se muestran en la Figura R34.

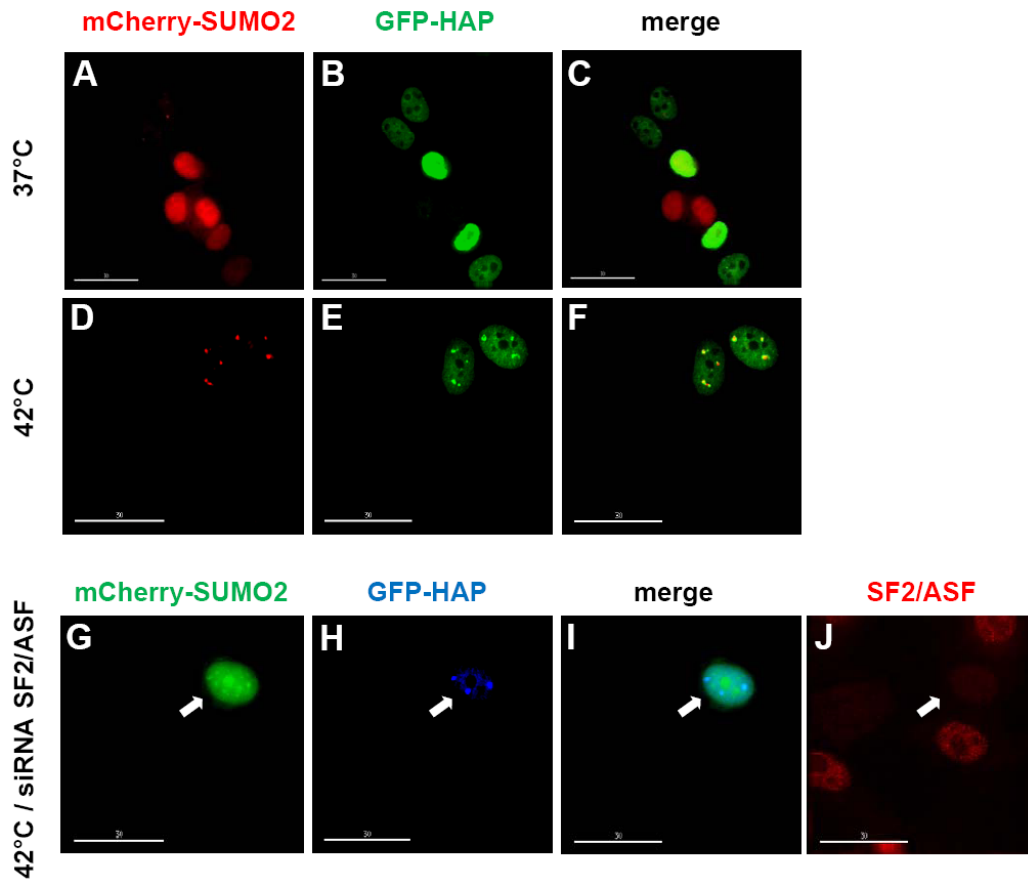


Figura R34 | **Los nSBs son sitios de acumulación SUMO2.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones indicadas. Veinticuatro horas más tarde, las células fueron transferidas a un baño a 42°C por 1 h y luego se les permitió que recuperen del estrés por 1 h a 37°C. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas, en los casos indicados, con un anticuerpo anti-SF2/ASF (G-J). GFP-HAP fue utilizado como marcador de nSBs. La flecha blanca en los paneles G-J muestra una célula con reducida expresión de SF2/ASF. Las barras blancas corresponden a 30  $\mu$ m.

Para confirmar que los cúmulos nucleares de SUMO corresponden a proteínas SUMOiladas y no a SUMO libre, hicimos uso de la proteína de fusión GFP-SUMO1 y la mutante GFP-SUMO1(GA), la cual no se puede conjugar a proteínas blanco por carecer, la proteína madura, de la glicina terminal que forma el enlace isopeptídico con el sustrato. De hecho, confirmamos esto por *western blot* de células transfectadas con una u otra construcción y, como puede observarse en la Figura R35 A, GFP-SUMO1 es capaz de conjugarse a proteínas celulares mientras que el mutante GFP-SUMO1(GA) no. Una

vez validado el uso de la mutante, realizamos ensayos de inmunofluorescencia como en las Figuras R33 y R34. Como se observa en la Figura R35 B, los gránulos de GFP-SUMO1 co-localizan con los de la proteína Sam68, marcador de los nSBs (paneles a-c). En el caso de la proteína GFP-SUMO1(GA), se observa un patrón de localización nuclear difuso, no existiendo co-localización con los nSBs (Figura R35 B).

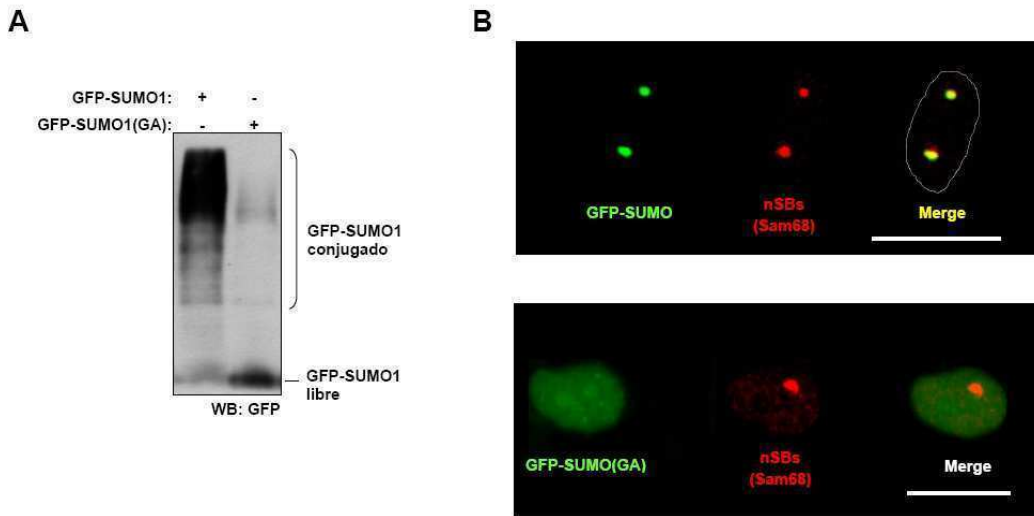


Figura R35 | **Los nSBs son sitios de acumulación de proteínas conjugadas a SUMO.** Células HEK293T fueron transfectadas con las construcciones codificando para GFP-SUMO1 o GFP-SUMO1(GA). Veinticuatro horas más tarde, las células fueron transferidas a un baño a 42°C por 1 h y luego se permitió que recuperen del estrés por 1 h a 37°C. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo anti-Sam68, como marcador de nSBs. El anticuerpo secundario utilizado estaba conjugado a Alexa Fluor 637. GFP-SUMO se muestra en verde y Sam68 en rojo. Las barras blancas corresponden a 20  $\mu$ m.

**En conjunto, estos resultados (Figuras R32-R35) demuestran que SF2/ASF participa en el aumento de la SUMOilación en respuesta al estrés térmico. Más aún, SF2/ASF sería al menos uno de los nexos entre el aumento de SUMOilación y los nSBs.**

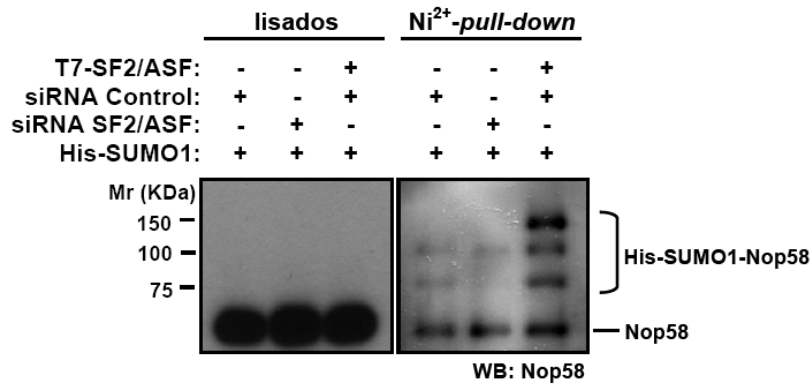
---

#### 4.14. SF2/ASF REGULA LA SUMOILACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL ARN

---

Con el objetivo de establecer una relación más directa entre la actividad estimuladora de la SUMOilación de SF2/ASF y proteínas involucradas en algún aspecto del metabolismo del ARN, elegimos dos sustratos conocidos de SUMOilación, Sam68 (Babic et al., 2006) y la proteína nucleolar Nop58 (Angus I. Lamond, comunicación personal). Sam68 es una proteína involucrada en la regulación de varios procesos celulares, entre ellos, transcripción y *splicing* (Rajan et al., 2008). Por su parte, Nop58 está involucrada en la regulación del procesamiento del ARN ribosomal (Lyman et al., 1999). SF2/ASF reside también en el nucléolo (Ahmad et al., 2009), y se les ha reportado a las proteínas SR un rol en el procesamiento del ARN ribosomal (Bubulya et al., 2004), convirtiendo a Nop58 en un sustrato de SUMOilación interesante en la búsqueda de blancos de SF2/ASF. El procedimiento utilizado para estudiar la SUMOilación de estas dos proteínas consistió en la transfección de células HEK 293T con un plásmido codificando para la proteína SUMO1 fusionada a un *tag* de hexahistidina. Este permite el enriquecimiento de proteínas SUMOiladas en una muestra mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz de Ni<sup>2+</sup>-agarosa. En el caso de Nop58 se estudió la SUMOilación de la proteína endógena mientras que en el caso de Sam68 se utilizó la proteína sobre-expresada debido a la disponibilidad de anticuerpos. Como se puede observar en la Figura R36, el noqueo de la expresión de SF2/ASF disminuye mientras que la sobre-expresión aumenta la SUMOilación tanto de Nop58 (A) como de Sam68 (B).

**A**



**B**

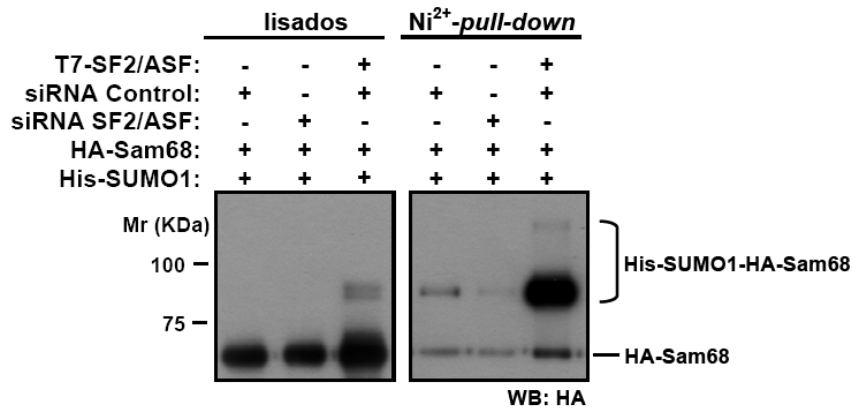


Figura R36 | **SF2/ASF estimula la SUMOilación de las proteínas Sam68 y Nop58.** Células HEK293T fueron transfectadas con los siRNAs indicados y 24 h más tarde con los vectores de expresión que se indican. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina *Ni<sup>2+</sup>-NTA* en condiciones desnaturizantes. Una fracción de los lisados (3%) fue utilizada como *input* ("lisados"). Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS. Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la izquierda se indica el peso molecular (en KDa).

**SF2/ASF participa en el aumento de la SUMOilación de proteínas relacionadas con el metabolismo del ARN.**

## DISCUSIÓN

---

### 5.1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

---

Este trabajo demuestra que la proteína SR SF2/ASF participa en la regulación de la SUMOilación de proteínas, ya que estimula la conjugación de SUMO tanto *in vivo* como *in vitro*. SF2/ASF ejerce su efecto a dos niveles diferentes. Primero, interacciona con Ubc9 promoviendo la SUMOilación de sustratos específicos *in vitro* y por ende funcionando como una nueva SUMO E3 ligasa. Segundo, regula la actividad de otra E3 ligasa de SUMO, la proteína PIAS1. La evidencia indica que este rol en el proceso de SUMOilación es ejercido por SF2/ASF independientemente de su actividad como factor de *splicing* y depende de interacciones proteína-proteína mediadas por su dominio RRM2. En cuanto a la relevancia fisiológica de la SUMOilación mediada por SF2/ASF, la conjugación de SUMO a las proteínas Topoisomerasa I, p53, Nop58 y Sam68 es regulada por esta proteína SR. Más aún, el aumento en la conjugación de SUMO y el cambio en la localización sub-nuclear de sustratos de SUMO mediado por el estrés hipertérmico parecen ser procesos regulados por SF2/ASF, quien sería un factor molecular capaz de relacionar las maquinarias de SUMOilación y del metabolismo del ARN.

### 5.2. SF2/ASF TIENE ACTIVIDAD DE E3 LIGASA DE SUMO

---

Poco se sabe en la actualidad acerca de la regulación fisiológica del proceso de SUMOilación en comparación con el vasto conocimiento bioquímico que se ha adquirido en los últimos años. El hecho de poder recapitular el proceso de SUMOilación en reacciones *in vitro* libres de células, si bien acarrea sus limitaciones en cuanto al rol fisiológico, provee una herramienta muy potente a la hora de establecer el efecto específico de una proteína en la conjugación de Ubls en general. Haciendo uso de esta herramienta pudimos determinar, en primer lugar, que la acción estimuladora de la SUMOilación ejercida por SF2/ASF ocurre río abajo de Ubc9 en la cascada de

conjugación de SUMO dado que SF2/ASF no estimula la formación del enlace tioester entre SUMO y Ubc9 (Figura R25). En segundo lugar, SF2/ASF no presenta actividad de SUMO E2, dado que no es capaz de conjugarse SUMO a Topoisomerasa I en ausencia de Ubc9 (Figura R17).

Las E3 ligasas son definidas como proteínas que facilitan la transferencia de Ub/Ubls desde la enzima E2 al sustrato. Las E3 ligasas de ubiquitina de la familia HECT forman intermediarios tioester con ubiquitina, mientras que todas las otras E3 ligasas descritas forman complejos con la E2 “cargada” (unida al Ubl mediante enlace tioester) y las proteínas blanco (Bernassola et al., 2008, Rotin y Kumar, 2009). Por otro lado, las E3 ligasas de la familia RING funcionan como adaptadores que aproximan al sustrato y a la E2 cargada con Ub (Deshaies y Joazeiro, 2009, Joazeiro y Weissman, 2000). Por los datos presentados, SF2/ASF cumple con los criterios funcionales para ser definida como una E3 ligasa (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007): i) interacciona con la enzima conjugadora E2, Ubc9; ii) interacciona con sustratos de SUMOilación; iii) aumenta la transferencia de SUMO desde la E2 hacia el sustrato. Si bien estas características hacen de SF2/ASF una proteína con actividad del tipo E3 ligasa, queda por determinarse si ejerce su rol de manera catalítica o actuando como un factor estequiométrico (factor “puente”) entre Ubc9 y el sustrato. En el caso de las E3 ligasas de SUMO reportadas hasta la fecha, sólo se ha demostrado capacidad de aumentar la transferencia para tres de ellas -RanBP2, PIAS y Pc2- y catálisis para dos de ellas -RanBP2 y PIAS- (Pichler et al., 2002, Pichler et al., 2004, Reverter y Lima, 2005, Yunus y Lima, 2009). No se ha mostrado un mecanismo catalítico para Pc2 (Kagey et al., 2003) y, en el caso de Topors, no se ha demostrado ni catálisis ni capacidad de aumentar la transferencia de SUMO al sustrato (Hammer et al., 2007, Pungalija et al., 2007, Weger et al., 2005). Si bien el establecimiento de cómo una proteína aumenta la conjugación de SUMO (o para el caso, cualquier proceso celular) es importante para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos biológicos, el hecho de que una proteína aumente la conjugación de SUMO de manera catalítica o no, no establece una jerarquía en cuanto a la importancia biológica. Dado que los grandes grupos de investigación que trabajan en SUMOilación suelen ser “descendientes” del campo de la Ub, existe un sesgo importante en el campo hacia los aspectos bioquímicos. Esto acarrea, como se menciona más arriba, una consecuencia positiva que es el gran conocimiento que se tiene en la actualidad acerca de la estructura y función de varios componentes de la vía de conjugación de SUMO en tan poco tiempo de existencia del campo. Como contrapartida, se suele restar



importancia a regulaciones en las que no hay actividad catalítica demostrada.

El papel de las SUMO E3 ligasas conocidas ha sido básicamente estudiado mediante la sobre-expresión de las mismas en células en cultivo o bien en sistemas de SUMOilación *in vitro*. Una dificultad importante de estos dos abordajes experimentales es la imposibilidad de conocer la relevancia de los niveles de expresión fisiológicos de estas ligasas. En este sentido, el uso de estrategias de RNA de interferencia nos ha permitido demostrar que los niveles fisiológicos de expresión de SF2/ASF son necesarios para mantener los niveles normales de SUMOilación global (Figuras R5 y R6). Esto se asemeja a lo observado para las E3 ligasas de levaduras Siz1 y Siz2, cuya disrupción génica anula la modificación por sumo de la mayoría de las proteínas blanco estudiadas (Johnson y Gupta, 2001).

### **5.3. LAS MÚLTIPLES CARAS DEL DOMINIO RRM2 DE SF2/ASF**

Los dominios RRM son los dominios de unión al ARN más abundantes en vertebrados, estando presente en el 0,5-1% de los genes (Venter et al., 2001). Las proteínas que contienen dominios RRM están involucradas en la mayoría de los procesos co- y post-transcripcionales de la expresión génica, procesamiento de ARN mensajero y ribosomal, exportación y estabilidad del ARN, traducción (Dreyfuss et al., 2002). Estudios estructurales y bioquímicos durante los últimos diez años, han demostrado que estos dominios no sólo están involucrados en el reconocimiento del ARN sino también en interacciones proteína-proteína (Clery et al., 2008). En cuanto a SF2/ASF, su dominio RRM2 es necesario para la regulación del *splicing* de EDI y E1a *in vivo* (Blaustein et al., 2009, Chiodi et al., 2004) y para la regulación de la traducción (Blaustein et al., 2009, Michlewski et al., 2008). En cuanto a su rol en el proceso de NMD, son necesarios sus dominios RRM2 y también el RS (Zhang y Krainer, 2004). La actividad de SF2/ASF en la conjugación de SUMO depende de su dominio RRM2 dado que la delección del mismo anula su capacidad de interactuar con Ubc9 (Figura R15) como así también de estimular la SUMOilación (Figuras R8 y R9). Más aún, este dominio RRM2 resulta ser no sólo necesario sino suficiente para la actividad estimuladora de la SUMOilación ejercida

por SF2/ASF (Figura R9). Los resultados obtenidos al comparar el efecto de SF2/ASF con el de otras proteínas SR apoyan la idea de un rol primordial para el dominio RRM2. La proteína SRp20 que carece naturalmente de un RRM2, es incapaz de estimular la SUMOilación. En el caso de SRp30c y SRp40, ambas proteínas SR poseen un RRM2 con una identidad de secuencia respecto del de SF2/ASF de 72% y 37%, respectivamente. Sólo SRp30c fue capaz de estimular la SUMOilación (Figura R10), indicando que la mera presencia de un RRM2 no es suficiente para regular la conjugación de SUMO. Un detallado análisis estructural y mutacional del dominio RRM2 de SF2/ASF podrá proveer más información acerca del mecanismo molecular por el cual SF2/ASF estimula la SUMOilación.

#### **5.4. LA ACTIVIDAD DE SF2/ASF EN EL PROCESO DE SUMOILACIÓN ES INDEPENDIENTE DEL ARN**

El rol de SF2/ASF en la vía de conjugación de SUMO es independiente de las actividades previamente descritas (*splicing*, NMD, traducción, etc. – Ver Introducción). Esta afirmación está apoyada por evidencia proveniente de distintos tipos de experimentos. En primer lugar, la actividad de SF2/ASF en el proceso de SUMOilación depende sólo de su dominio RRM2, el cual, como se menciona más arriba es necesario y suficiente para regular la SUMOilación *in vivo*. En el caso de la actividad de SF2/ASF como factor de *splicing*, el dominio RRM2 también es necesario, pero no es suficiente, al menos sobre la regulación de los tres eventos de *splicing* testeados, EDI, CFTR y E1a (Figuras R11-R13). Más aún, esta actividad de SF2/ASF en el proceso de *splicing* depende del dominio RRM1 (Figura R11), en contraste a lo que ocurre con su rol en SUMOilación. En segundo lugar, los experimentos de SUMOilación *in vitro*, al llevarse a cabo con proteínas recombinantes purificadas, demuestran fehacientemente que la actividad de SF2/ASF no depende de efectos indirectos relacionados con el metabolismo del ARN. Tercero, la interacción de SF2/ASF con la enzima conjugadora E2, Ubc9, no depende de la presencia de ARN ni ADN, apoyando la idea de que se trata de una interacción proteína-proteína directa (Figuras R15 y R16).

## 5.5. SF2/ASF & p53: EL COMIENZO DE UNA NUEVA RELACIÓN?

La proteína p53 es un supresor de tumores que responde a distintos tipos de estrés activando numerosas y diversas respuestas celulares que incluyen: arresto del ciclo celular, senescencia, apoptosis y reparación del ADN. Una función clave de p53 es la de factor de transcripción y la selección diferencial de los genes blanco parece ser crucial en los mecanismos que determinan qué respuesta será desencadenada luego de su activación (Vousden y Prives, 2009). En cuanto a modificaciones post-traduccionales en lisinas, p53 es sustrato de ubiquitinación mediada por Mdm2 (Rodriguez et al., 2000), NEDDilación mediada por Mdm2 (Xirodimas et al., 2004), acetilación mediada por p300/CBP (Gu y Roeder, 1997) y metilación mediada por Set7/9 (Chuikov et al., 2004), Smyd2 (Huang et al., 2006) y Set8 (Shi et al., 2007). En condiciones basales y luego de haber ejercido su función, la actividad de p53 se ve limitada por la acción de la proteína Mdm2, la cual es capaz de ubiquitinar a p53, funcionando como E3 ligasa, llevándolo a la degradación por el proteasoma (Haupt et al., 1997, Kubbutat et al., 1997). p53 también es blanco de SUMOilación (Rodriguez et al., 1999) y la lisina blanco, K386, es susceptible de ser no sólo SUMOilada, sino también acetilada y ubiquitinada (Carter y Vousden, 2009). La función fisiológica de la SUMOilación de p53 es, por el momento, muy controversial (Melchior y Hengst, 2002). Se ha reportado que la misma estimula (Gostissa et al., 1999, Rodriguez et al., 1999), no afecta o reprime la actividad transcripcional (Kwek et al., 2001, Muller et al., 2000, Schmidt y Muller, 2002). Agregando más niveles de complejidad, Mdm2 también es blanco de SUMOilación (Xirodimas et al., 2002). La proteasa específica de SUMO, SUSP4 regula el eje p53-Mdm2 en respuesta al daño inducido por luz UV (Lee et al., 2006). Este estímulo, induce la acumulación de SUSP4, la cual se une a Mdm2, liberando a p53 y llevando a su estabilización. La de-SUMOilación mediada por SUSP4 promovería la ubiquitinación y degradación de Mdm2 (Lee et al., 2006). Dentro de este panorama de creciente complejidad, recientemente se ha reportado una interrelación entre SUMOilación y acetilación que regula el pegado al ADN y la actividad transcripcional de p53 (Wu y Chiang, 2009). En esta Tesis, reportamos que SF2/ASF es capaz de regular la SUMOilación de p53 *in vitro* (Figuras R20-R22) e *in vivo* (Figura R23). Más aun, SF2/ASF estimula la actividad transcripcional de p53, medida con una construcción reportera conteniendo el promotor del gen respondedor a p53, p21 (Figura R24). Este aumento en la actividad transcripcional de p53 mediado por SF2/ASF es potenciado por la co-

expresión de SUMO, indicando que SF2/ASF, p53 y SUMO están conectados de alguna manera. En esta instancia resulta osado hipotetizar acerca de cómo SF2/ASF podría estar regulando la actividad transcripcional de p53. Sin embargo, es importante traer a la escena un artículo reciente que muestra que la quinasa de SF2/ASF, SRPK1 interacciona y es regulada por chaperonas moleculares, algunas de las cuales son conocidas chaperonas de p53 (Zhong et al., 2009). Dado que SF2/ASF es capaz de unirse fuertemente a SRPK1 (Koizumi et al., 1999, Ma et al., 2009), es posible que SF2/ASF forme parte de un gran complejo proteico que incluya a SRPK1, chaperonas de p53 y, probablemente, a la misma p53. Otra idea que surge de este análisis y que amerita posterior experimentación, es que las chaperonas como Hsp40, Aha1, Hsp70 y Hsp90, al regular la actividad de SRPK1, regulen el estado de fosforilación de SF2/ASF lo que, posiblemente, altere su capacidad de SUMOilar distintas proteínas blanco.

## 5.6. SF2/ASF & TOPOISOMERASA I: REGULACIÓN MUTUA

La ADN Topoisomerasa I es una enzima multifuncional, constitutivamente expresada, que localiza en sitios de activa transcripción (Juan et al., 1988, Zhang et al., 1988). Su función mejor descrita es controlar el estado topológico del ADN, aliviando la tensión que se genera luego de la separación de las hebras durante la transcripción, replicación y reparación (Pommier, 2006). El mecanismo catalítico involucra la formación de un complejo ADN-Topo I con la enzima covalentemente unida al extremo 3' de la hebra de ADN clivada. Este complejo es de vida media muy corta y su estabilización por compuestos de la familia de la camptotecina (CPT) pueden causar acumulación de roturas en la hebra de ADN y, eventualmente llevar a la muerte celular. Como se ha mencionado en esta Tesis, aparte de su función en la relajación del ADN superenrollado, Topo I es una quinasa de proteínas SR (Rossi et al., 1996). La depleción de Topo I lleva a hipofosforilación de las proteínas SR y trae defectos en la regulación del *splicing* (Soret et al., 2003). En esta misma línea, inhibición de la fosforilación de proteínas SR mediada por Topo I interfiere con el ensamblado del spliceosoma causando, eventualmente, la muerte celular (Pilch et al., 2001). Topo I puede unirse al ADN y catalizar la relajación o unirse a proteínas SR y ATP y ejercer su rol como proteína quinasa, pero ambas actividades son mutuamente excluyentes. SF2/ASF interacciona con Topo I a través de

sus dominios RRM (Kowalska-Loth et al., 2005) e inhibe la relajación del ADN mediada por Topo I (Andersen et al., 2002). El tratamiento con CPT inhibe la acción de Topo I y, al mismo tiempo, induce su SUMOilación (Mao et al., 2000). Dado, como se menciona arriba, que SF2/ASF es capaz de inhibir la actividad de Topo I, resultará interesante testear la hipótesis que SF2/ASF inhibe la actividad de Topo I induciendo su SUMOilación. Más aún, dado que ambas proteína tienen un rol en la formación/eliminación de los *R-loops* (Li y Manley, 2005, Masse y Drolet, 1999), también es tentador especular que podrían estar llevando a cabo funciones de forma concertada y una de sus relaciones moleculares podría ser la de sustrato de conjugación de SUMO-E3 ligasa (Topo I-SF2/ASF).

### 5.7. SF2/ASF & PIAS1

Nuestros resultados muestran un mecanismo de acción cooperativo entre SF2/ASF y PIAS1. La sobreexpresión de SF2/ASF potencia el efecto estimulador de PIAS1 sobre la SUMOilación de proteínas (Figuras R30 y R31). Más aun, este efecto cooperativo dependería de la interacción física entre estas proteínas ya que la mutante de SF2/ASF que carece del dominio RRM2 es incapaz de interactuar con PIAS (Figura R28) y es, a su vez, incapaz de potenciar la actividad de PIAS1 (Figuras R30 y R31). Notablemente, el noqueo de SF2/ASF bloquea el efecto estimulador de PIAS1 sobre la SUMOilación (Figura R29). De esta manera, SF2/ASF no sólo presenta una actividad intrínseca como E3 ligasa sino que también es necesaria para que otra E3 ligasa desarrolle su acción. De este modo, su papel como co-regulador de una E3 ligasa agrega un nuevo nivel de regulación a la vía de SUMOilación de proteínas, en forma semejante al caso de los complejos de ubiquitina E3 ligasa ya descritos (Deshaies y Joazeiro, 2009, Joazeiro y Weissman, 2000). Específicamente, las proteínas Bard1 (Hashizume et al., 2001), Bmi1 (Wang et al., 2004) y MdmX (Linares et al., 2003) no tienen actividad intrínseca E3 ligasa pero las tres interactúan con una segunda proteína (Brca1, Ring1b y Mdm2, respectivamente) que sí la posee y la formación de los heterodímeros estimula la actividad E3. En cuanto a la ocurrencia de complejos con actividad E3 en la vía de SUMO, se ha descrito un gran complejo de varias sub-unidades con actividad de E3 ligasa de SUMO en *S. pombe* (Andrews et al., 2005). De este modo, hipotetizamos que SF2/ASF podría ser parte de un complejo proteico formado por ella misma, PIAS1 y posiblemente

otras proteínas, funcionando en forma concertada para regular la SUMOilación. Dado que no se sabe actualmente a ciencia cierta de qué manera se logra la especificidad de sustrato *in vivo*, así como tampoco se sabe cómo se activa la SUMOilación en respuesta a distintas condiciones fisio-patológicas, es tentador especular que la formación de complejos con actividad E3 ligasa de SUMO podría aportar la versatilidad necesaria para seleccionar sustratos, *timing* e intensidad de la modificación por SUMO.

A diferencia de lo que ocurre con la ubiquitinación, en el caso de la SUMOilación no se ha encontrado un patrón estructural ni funcional en sus E3 ligasas. La actividad catalítica de PIAS1, pero no la de RanBP2, depende de un dominio denominado *RING-like*. A pesar de esta diferencia y de diferencias en las secuencias aminoacídicas entre PIAS1 y RanBP2, ambas comparten la capacidad de estimular la formación de cadenas de SUMO. RanBP2 forma cadenas de sumo sobre ella misma (Pichler et al., 2002) mientras que Siz1, homóloga de PIAS, induce la formación de cadenas de SUMO libres así como también cadenas de SUMO sobre sustratos específicos (Johnson y Gupta, 2001). El descubrimiento de Pc2 como un nuevo miembro de la familia de E3 ligasas de SUMO no hizo más que demostrar que las E3 ligasas de SUMO no poseen características estructurales en común (Kagey et al., 2005, Kagey et al., 2003). El análisis de secuencia de SF2/ASF demuestra que no contiene un dominio de tipo HECT ni RING como los de las E3 ligasas de Ub. Más aún, la comparación del dominio RRM2 de SF2/ASF contra patrones conservados generados por la herramienta bioinformática PRATT<sup>5</sup>, BLAST o psi-BLAST no dio ninguna identidad significativa con ninguna de las E3 ligasas de SUMO (PIAS, RanBP2, Pc2, Topors). Además, SF2/ASF no estimula la formación de cadenas de SUMO3 *in vitro* (Figura R27).

## **5.8. UBIQUITINA/UBLS Y METABOLISMO DEL ARN**

Distintas evidencias apuntan a una relación estrecha entre Ub y proteínas relacionadas con el metabolismo del ARN mensajero. En primer lugar, Ub y Ubls co-purifican con el spliceosoma (Makarov et al., 2002, Rappsilber et al., 2002). No sólo la conjugación o la interacción no covalente con Ub/Ubls es capaz de ejercer funciones regulatorias. Por

---

<sup>5</sup> [www.ebi.ac.uk/Tools/pratt/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/pratt/index.html)

ejemplo, el factor de *splicing* SF3A120 (del inglés *splicing factor 3A, subunit 1, 120 KDa*) posee como parte de su secuencia, en su extremo C-terminal, un dominio de tipo Ub (una secuencia con 30% de identidad de secuencia con la Ub y que presenta un plegamiento característico) (Hochstrasser, 2000). Este motivo proteico es muy común y está caracterizado por una estructura denominada  $\beta$ -*grasp*, porque las hojas  $\beta$  parecen estar envolviendo, en cierto modo, a la hélice. Este motivo de plegamiento  $\beta$ -*grasp* es característico de todas las Ubls. Las funciones regulatorias que cumplen la Ub y las Ubls requieren que el conjugado Ub/Ubl-sustrato sea reconocido por dominios de unión a Ub/Ubls. En el caso de Ub se los conoce como UBDs (del inglés *ubiquitin binding domains*) (Hurley et al., 2006), mientras que en el caso de SUMO, se denominan SIMs (Perry et al., 2008). En el caso de las proteínas como SF3A120, al tener el denominado dominio Ubl, se especula que alguna de sus interacciones proteína-proteína estaría mediada por este dominio. De hecho, ese es el caso de la proteína prp8, componente del tri-snRNP U4/U6-U5, cuya ubiquitinación es esencial para el correcto ensamblado del tri-snRNP (Bellare et al., 2008). Dicho efecto no es mediado por el proteasoma, sino por interacciones proteína-proteína (Bellare et al., 2008). Resulta muy tentador hipotetizar que la actividad involucrada en la ubiquitinación de prp8 reside en el mismo spliceosoma. En esta línea, se ha reportado que la proteína prp19 es tanto un factor esencial de *splicing* (Grillari et al., 2005) como una E3 ligasa de Ub (Hatakeyama et al., 2001). De esta manera, surge la posibilidad que dentro del spliceosoma ocurran ciclos de modificaciones por Ub/Ubls, existiendo dentro del mismo, no sólo sustratos sino también proteínas que faciliten dichas modificaciones. En esta línea, se ha reportado que la delección de la Ubl, Hub1, trae como consecuencia deficiencias en el *splicing* del pre-ARNm (Wilkinson et al., 2004). Si bien parecería que esta Ubl no es capaz de conjugarse a proteínas blanco, se ha determinado que es capaz de interactuar con el componente del tri-snRNP, Snu66, regulando su localización sub-celular (Wilkinson et al., 2004). En la misma línea, la E3 ligasa de SUMO, Topors, una proteína originalmente identificada por su capacidad de unión a Topoisomerasa I y por su actividad de ubiquitina E3 ligasa sobre p53 (Rajendra et al., 2004) fortalece la relación entre SUMO y los procesos relacionados con RNA. Tal como SF2/ASF, Topors estimula la SUMOilación tanto de Topo I como de p53 (Hammer et al., 2007, Weger et al., 2005). Recientemente, mediante un abordaje proteómico destinado a identificar sustratos de SUMOilación de Topors, se pudo observar que la mayoría son proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina y en el procesamiento de los pre-ARNm (Pungaliya et al., 2007). En resumen, existen proteínas del spliceosoma que son sustrato de conjugación de Ub o Ubls, y otras que directamente poseen el dominio Ubl en su estructura. En este contexto, SF2/ASF

podría ser un nexo entre las maquinarias de SUMOilación y las de *splicing*, exportación y traducción del ARNm.

Como se detalla en el párrafo anterior, existe una relación entre Ub/Ubls y el metabolismo del ARN, y SUMO no le escapa a esta afirmación. De hecho, de todas las Ubls, SUMO es la proteína que más se conjuga a proteínas relacionadas con el metabolismo del ARN. La purificación de proteínas SUMOiladas muestra un enriquecimiento en las categorías de ontología génica “unión al ARN”, “cromatina y transcripción” y “procesamiento del ARN” (Li et al., 2004, Navascues et al., 2008, Vassileva y Matunis, 2004, Vertegaal et al., 2004). Un estudio reciente ha demostrado que cuando se purifican sustratos de SUMO2 *in vivo*, la fracción de proteínas relacionadas con el procesamiento del ARN así como la de proteínas de unión al ARN están altamente enriquecidas (Blomster et al., 2009). En particular, un efecto de SUMOilación sobre la actividad de proteínas de unión al RNA ha sido reportado para Sam68 (Babic et al., 2006), la enzima de *editing* de RNA ADAR1 (Desterro et al., 2005), y los factores de procesamiento 3' del ARN, poli(A) polimerasa, CPSF-73 y simplekina (Vethantham et al., 2007, 2008). Estos últimos dos trabajos, publicados por el laboratorio de J. Manley, relacionan directamente la SUMOilación con el procesamiento 3' del ARN. La enzima poli(A) polimerasa interacciona físicamente con Ubc9 (Vethantham et al., 2008), mientras que los factores de procesamiento 3', CPSF-73 y simplekina, interaccionan con una isopeptidasa de SUMO (Vethantham et al., 2007). Estos trabajos representan las primeras evidencias de un rol directo de la SUMOilación en el procesamiento del ARN, llevando todas las hipótesis planteadas anteriormente por los estudios proteómicos, a un plano real. Dado que existe una probada relación entre las proteínas SR y el procesamiento 3' del ARN (Bjork et al., 2009, Ruegsegger et al., 1998), como así también con otros pasos del metabolismo de este ácido nucleico (Zhong et al., 2009), resultará interesante estudiar la función de la SUMOilación de proteínas, en particular aquella mediada por SF2/ASF, en diferentes aspectos del metabolismo del RNA, incluyendo la formación del extremo 3' y el *editing*.

Dentro del terreno especulativo, hemos encontrado que las tres familias de quinasas de proteínas SR, SRPKs, CLKs y AKTs poseen sitios candidatos de ser blancos de SUMOilación. Utilizando el software SUMOsp 2.0 (Ren et al., 2009), pudimos determinar que las proteínas SRPK1, 2 y 3, las CLK1, 2 y 3 y AKT1 y 2 poseen sitios consenso de alto puntaje según este programa y, en particular, los sitios de los miembros de las familias



CLK y SRPK son llamativamente similares (Ver Tabla D1).

Quinasa	aa	Sitio SUMO	Tipo de sitio
SRPK1	215	TDI <b>K</b> PEN	Ψ <b>K</b> XE
SRPK2	227	TDI <b>K</b> PEN	Ψ <b>K</b> XE
SRPK3	214	TDI <b>K</b> PEN	Ψ <b>K</b> XE
CLK1	290	TDL <b>K</b> PEN	Ψ <b>K</b> XE
CLK2	291	TDL <b>K</b> PEN	Ψ <b>K</b> XE
CLK3	433	TDL <b>K</b> PEN	Ψ <b>K</b> XE
AKT1	276	RDL <b>K</b> LEN	Ψ <b>K</b> XE
AKT2	277	RDI <b>K</b> LEN	Ψ <b>K</b> XE

Tabla D1 | **Predicción de SUMOilación en quinasa de proteínas SR.** Potenciales sitios de conjugación de SUMO en las quinasa de las familias SRPK, CLK y AKT, según el *software* SUMOsp 2.0.

En este sentido resultará interesante determinar si estas proteínas quinasa son efectivamente sustrato de modificación por SUMO y, en caso positivo, si SF2/ASF es capaz de regular dicha modificación. Siguiendo en el terreno hipotético, dado que los potenciales sitios de SUMOilación en SRPKs y CLKs se encuentran dentro de motivos de unión a ATP del *loop* catalítico de las quinasa, mientras que en el caso de AKT se encuentra en el sitio activo, la conjugación de SUMO y la posible regulación de la actividad quinasa podrían agregar un nivel extra de regulación en el eje SRPK/CLK/AKT-proteínas SR.

### 5.9. SF2/ASF, SUMOILACIÓN Y nSBs: REFORZANDO LA RELACIÓN ENTRE SUMO Y PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ARN

Los factores específicos, más allá de los componentes esenciales de la maquinaria de SUMOilación, involucrados en el aumento de la SUMOilación desencadenado por estrés térmico así como los mecanismos y las consecuencias de este fenómeno no han sido descritos aún. Recientemente, un artículo del laboratorio de Ron Hay, en Dundee,

postuló que un componente importante de esta regulación podrían ser las E3 ligasas de SUMO (Golebiowski et al., 2009). En cuanto a SF2/ASF, éste cambia su localización sub-nuclear en respuesta a estrés térmico, moviéndose desde los *speckles* a los nSBs, y este cambio de localización depende del dominio RRM2 (Chiodi et al., 2004). Dado que estos nSBs son sitios de acumulación de factores de procesamiento de pre-mRNA (Denegri et al., 2001), resulta interesante especular que en respuesta al estrés térmico, SF2/ASF estimula la SUMOilación de dichos factores. En este contexto, SF2/ASF aparecería como un factor clave en este proceso regulatorio.

Las E3 ligasas PIAS1, RanBP2 y Pc2 muestran asociación con estructuras sub-celulares particulares: PIAS se asocia con gránulos PML y otros gránulos nucleares (NBs), RanBP2 se encuentra asociada con el complejo del poro nuclear y Pc2 con los gránulos denominados *Polycomb group bodies* (Seeler y Dejean, 2003). Considerando estos datos, nuestros resultados sugieren que SF2/ASF podría actuar como una conexión molecular y funcional entre la maquinaria de procesamiento de pre-mRNAs y la maquinaria de SUMOilación en los *splicing speckles* en condiciones normales o bien en los nSBs en condiciones de estrés térmico.

En resumen, hemos descrito una nueva función para la proteína SR SF2/ASF en la vía de SUMOilación y hemos comenzado a descifrar su mecanismo de acción. SF2/ASF ejerce un papel positivo en la vía de conjugación de SUMO mediante su interacción directa con componentes de la maquinaria de SUMOilación y por otro lado mediante su función como sumo E3 ligasa. Como objetivo inmediato nos proponemos identificar blancos específicos de la actividad regulatoria de la SUMOilación de SF2/ASF así como su relevancia fisiológica.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Ahmad Y, Boisvert FM, Gregor P, Cobley A, & Lamond AI (2009) NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue):D181-184.
- Allemand E, Guil S, Myers M, Moscat J, Caceres JF, & Krainer AR (2005) Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(10):3605-3610.
- Amrein H, Gorman M, & Nothiger R (1988) The sex-determining gene tra-2 of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell* 55(6):1025-1035.
- Andersen FF, Tange TO, Sinnathamby T, Olesen JR, Andersen KE, Westergaard O, Kjems J, & Knudsen BR (2002) The RNA splicing factor ASF/SF2 inhibits human topoisomerase I mediated DNA relaxation. *J Mol Biol* 322(4):677-686.
- Andersen JB & Hassel BA (2006) The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev* 17(6):411-421.
- Andersen JS, Matic I, & Vertegaal AC (2009) Identification of SUMO target proteins by quantitative proteomics. *Methods Mol Biol* 497:19-31.
- Andrews EA, Palecek J, Sergeant J, Taylor E, Lehmann AR, & Watts FZ (2005) Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 25(1):185-196.
- Aubol BE, Nolen B, Shaffer J, Ghosh G, & Adams JA (2003) Novel destabilization of nucleotide binding by the gamma phosphate of ATP in the yeast SR protein kinase Sky1p. *Biochemistry* 42(44):12813-12820.
- Babic I, Cherry E, & Fujita DJ (2006) SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis. *Oncogene* 25(36):4955-4964.
- Bailey D & O'Hare P (2002) Herpes simplex virus 1 ICP0 co-localizes with a SUMO-specific protease. *J Gen Virol* 83(Pt 12):2951-2964.
- Bailey D & O'Hare P (2004) Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J Biol Chem* 279(1):692-703.
- Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, & Becker J (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280(2):275-286.

- Bellare P, Small EC, Huang X, Wohlschlegel JA, Staley JP, & Sontheimer EJ (2008) A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway. *Nat Struct Mol Biol* 15(5):444-451.
- Berget SM, Moore C, & Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(8):3171-3175.
- Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, & Melino G (2008) The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 14(1):10-21.
- Biamonti G (2004) Nuclear stress bodies: a heterochromatin affair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(6):493-498.
- Biamonti G & Caceres JF (2009) Cellular stress and RNA splicing. *Trends Biochem Sci* 34(3):146-153.
- Bjork P, Jin S, Zhao J, Singh OP, Persson JO, Hellman U, & Wieslander L (2009) Specific combinations of SR proteins associate with single pre-messenger RNAs in vivo and contribute different functions. *J Cell Biol* 184(4):555-568.
- Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291-336.
- Blaustein M, Pelisch F, Coso OA, Bissell MJ, Kornblihtt AR, & Srebrow A (2004) Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 279(20):21029-21037.
- Blaustein M, Pelisch F, & Srebrow A (2007) Signals, pathways and splicing regulation. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11):2031-2048.
- Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Munoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Caceres JF, Coso OA, & Srebrow A (2005) Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol* 12(12):1037-1044.
- Blaustein M, Quadrana L, Risso G, Mata Mde L, Pelisch F, & Srebrow A (2009) SF2/ASF regulates proteomic diversity by affecting the balance between translation initiation mechanisms. *J Cell Biochem* 107(4):826-833.
- Blomster HA, Hietakangas V, Wu J, Kouvonen P, Hautaniemi S, & Sistonen L (2009) Novel proteomics strategy brings insight into the prevalence of SUMO-2 target sites. *Mol Cell Proteomics* 8(6):1382-1390.
- Boddy MN, Howe K, Etkin LD, Solomon E, & Freemont PS (1996) 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(5):971-982.

- Boggs RT, Gregor P, Idriss S, Belote JM, & McKeown M (1987) Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the transformer gene. *Cell* 50(5):739-747.
- Boucher L, Ouzounis CA, Enright AJ, & Blencowe BJ (2001) A genome-wide survey of RS domain proteins. *RNA* 7(12):1693-1701.
- Brody E & Abelson J (1985) The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* 228(4702):963-967.
- Bubulya PA, Prasanth KV, Deerinck TJ, Gerlich D, Beaudouin J, Ellisman MH, Ellenberg J, & Spector DL (2004) Hypophosphorylated SR splicing factors transiently localize around active nucleolar organizing regions in telophase daughter nuclei. *J Cell Biol* 167(1):51-63.
- Buratti E, Stuani C, De Prato G, & Baralle FE (2007) SR protein-mediated inhibition of CFTR exon 9 inclusion: molecular characterization of the intronic splicing silencer. *Nucleic Acids Res* 35(13):4359-4368.
- Butcher SE & Brow DA (2005) Towards understanding the catalytic core structure of the spliceosome. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 3):447-449.
- Buxade M, Parra JL, Rousseau S, Shpiro N, Marquez R, Morrice N, Bain J, Espel E, & Proud CG (2005) The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity* 23(2):177-189.
- Caceres JF & Krainer AR (1993) Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J* 12(12):4715-4726.
- Caceres JF, Sreaton GR, & Krainer AR (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* 12(1):55-66.
- Caceres JF, Stamm S, Helfman DM, & Krainer AR (1994) Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* 265(5179):1706-1709.
- Cao W, Jamison SF, & Garcia-Blanco MA (1997) Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA* 3(12):1456-1467.
- Capili AD & Lima CD (2007) Structure and analysis of a complex between SUMO and Ubc9 illustrates features of a conserved E2-Ubl interaction. *J Mol Biol* 369(3):608-618.

- Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, Holsboer F, & Arzt E (2007) RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell* 131(2):309-323.
- Carter S & Vousden KH (2009) Modifications of p53: competing for the lysines. *Curr Opin Genet Dev* 19(1):18-24.
- Cazalla D, Sanford JR, & Caceres JF (2005) A rapid and efficient protocol to purify biologically active recombinant proteins from mammalian cells. *Protein Expr Purif* 42(1):54-58.
- Ciechanover A, Finley D, & Varshavsky A (1984) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem* 24(1):27-53.
- Clery A, Blatter M, & Allain FH (2008) RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* 18(3):290-298.
- Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, & Duncan PI (1996) The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J* 15(2):265-275.
- Cramer P, Caceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE, & Kornblihtt AR (1999) Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* 4(2):251-258.
- Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70:369-413.
- Chiodi I, Corioni M, Giordano M, Valgardsdottir R, Ghigna C, Cobianchi F, Xu RM, Riva S, & Biamonti G (2004) RNA recognition motif 2 directs the recruitment of SF2/ASF to nuclear stress bodies. *Nucleic Acids Res* 32(14):4127-4136.
- Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-159.
- Chou TB, Zachar Z, & Bingham PM (1987) Developmental expression of a regulatory gene is programmed at the level of splicing. *EMBO J* 6(13):4095-4104.
- Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, & Roberts RJ (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12(1):1-8.

- Chuikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, Ivanov GS, McKinney K, Tempst P, Prives C, Gamblin SJ, Barlev NA, & Reinberg D (2004) Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432(7015):353-360.
- Das R, Zhou Z, & Reed R (2000) Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. *Mol Cell* 5(5):779-787.
- Del Gatto-Konczak F, Olive M, Gesnel MC, & Breathnach R (1999) hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer. *Mol Cell Biol* 19(1):251-260.
- Denegri M, Chiodi I, Corioni M, Cobianchi F, Riva S, & Biamonti G (2001) Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell* 12(11):3502-3514.
- Denegri M, Moralli D, Rocchi M, Biggiogera M, Raimondi E, Cobianchi F, De Carli L, Riva S, & Biamonti G (2002) Human chromosomes 9, 12, and 15 contain the nucleation sites of stress-induced nuclear bodies. *Mol Biol Cell* 13(6):2069-2079.
- Deshaies RJ & Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78:399-434.
- Desterro JM, Keegan LP, Jaffray E, Hay RT, O'Connell MA, & Carmo-Fonseca M (2005) SUMO-1 modification alters ADAR1 editing activity. *Mol Biol Cell* 16(11):5115-5126.
- Desterro JM, Rodriguez MS, & Hay RT (1998) SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2(2):233-239.
- Desterro JM, Rodriguez MS, Kemp GD, & Hay RT (1999) Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* 274(15):10618-10624.
- Desterro JM, Thomson J, & Hay RT (1997) Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* 417(3):297-300.
- Ding JH, Zhong XY, Hagopian JC, Cruz MM, Ghosh G, Feramisco J, Adams JA, & Fu XD (2006) Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 17(2):876-885.
- Dorval V & Fraser PE (2007) SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1773(6):694-706.
- Drag M & Salvesen GS (2008) DeSUMOylating enzymes--SENPs. *IUBMB Life* 60(11):734-742.
- Dreyfuss G, Kim VN, & Kataoka N (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3):195-205.

- Drolet M, Broccoli S, Rallu F, Hraiky C, Fortin C, Masse E, & Baaklini I (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci* 8:d210-221.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, & Tuschl T (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20(23):6877-6888.
- Eperon IC, Ireland DC, Smith RA, Mayeda A, & Krainer AR (1993) Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *EMBO J* 12(9):3607-3617.
- Fiegen D, Haeusler LC, Blumenstein L, Herbrand U, Dvorsky R, Vetter IR, & Ahmadian MR (2004) Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *J Biol Chem* 279(6):4743-4749.
- Fu XD & Maniatis T (1990) Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 343(6257):437-441.
- Ge H & Manley JL (1990) A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62(1):25-34.
- Ge H, Zuo P, & Manley JL (1991) Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators. *Cell* 66(2):373-382.
- Geiss-Friedlander R & Melchior F (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12):947-956.
- Geng J & Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9(9):859-864.
- Ghigna C, Giordano S, Shen H, Benvenuto F, Castiglioni F, Comoglio PM, Green MR, Riva S, & Biamonti G (2005) Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Mol Cell* 20(6):881-890.
- Gill G (2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18(17):2046-2059.
- Girdwood DW, Tatham MH, & Hay RT (2004) SUMO and transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol* 15(2):201-210.
- Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, Cole C, Yin Y, Nakamura A, Cox J, Barton GJ, Mann M, & Hay RT (2009) System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci Signal* 2(72):ra24.
- Gong L, Li B, Millas S, & Yeh ET (1999) Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* 448(1):185-189.



- Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, & Del Sal G (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18(22):6462-6471.
- Graveley BR (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6(9):1197-1211.
- Grillari J, Ajuh P, Stadler G, Loscher M, Voglauer R, Ernst W, Chusainow J, Eisenhaber F, Pokar M, Fortschegger K, Grey M, Lamond AI, & Katinger H (2005) SNEV is an evolutionarily conserved splicing factor whose oligomerization is necessary for spliceosome assembly. *Nucleic Acids Res* 33(21):6868-6883.
- Groettrup M, Pelzer C, Schmidtke G, & Hofmann K (2008) Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci* 33(5):230-237.
- Gu W & Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90(4):595-606.
- Guil S & Caceres JF (2007) The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol* 14(7):591-596.
- Hagopian JC, Ma CT, Meade BR, Albuquerque CP, Ngo JC, Ghosh G, Jennings PA, Fu XD, & Adams JA (2008) Adaptable molecular interactions guide phosphorylation of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1. *J Mol Biol* 382(4):894-909.
- Hammer E, Heilbronn R, & Weger S (2007) The E3 ligase Topors induces the accumulation of polysumoylated forms of DNA topoisomerase I in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 581(28):5418-5424.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4):557-580.
- Harper JE & Manley JL (1992) Multiple activities of the human splicing factor ASF. *Gene Expr* 2(1):19-29.
- Harrison JC & Haber JE (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 40:209-235.
- Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, Ogata H, & Ohta T (2001) The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 276(18):14537-14540.
- Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, & Nakayama KI (2001) U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* 276(35):33111-33120.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, & Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387(6630):296-299.
- Hay RT (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18(1):1-12.

- Heideker J, Perry JJ, & Boddy MN (2009) Genome stability roles of SUMO-targeted ubiquitin ligases. *DNA Repair (Amst)* 8(4):517-524.
- Hershko A & Ciechanover A (1986) The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 33:19-56, 301.
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, & Sistonen L (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(1):45-50.
- Hochstrasser M (2000) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol* 2(8):E153-157.
- Hochstrasser M (2001) SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107(1):5-8.
- Hochstrasser M (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458(7237):422-429.
- Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK, & Sarge KD (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276(43):40263-40267.
- Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, & Berger SL (2006) Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* 444(7119):629-632.
- Huang S & Spector DL (1991) Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. *Genes Dev* 5(12A):2288-2302.
- Huang Y, Gattoni R, Stevenin J, & Steitz JA (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell* 11(3):837-843.
- Huang Y & Steitz JA (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell* 7(4):899-905.
- Huang Y & Steitz JA (2005) SRprises along a messenger's journey. *Mol Cell* 17(5):613-615.
- Huang Y, Yario TA, & Steitz JA (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26):9666-9670.
- Hurley JH, Lee S, & Prag G (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399(3):361-372.
- Ihara M, Stein P, & Schultz RM (2008) UBE2I (UBC9), a SUMO-conjugating enzyme, localizes to nuclear speckles and stimulates transcription in mouse oocytes. *Biol Reprod* 79(5):906-913.

- Joazeiro CA & Weissman AM (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102(5):549-552.
- Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73:355-382.
- Johnson ES & Blobel G (1997) Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* 272(43):26799-26802.
- Johnson ES & Gupta AA (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106(6):735-744.
- Johnson ES, Schwienhorst I, Dohmen RJ, & Blobel G (1997) The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J* 16(18):5509-5519.
- Jolly C, Konecny L, Grady DL, Kutsikova YA, Cotto JJ, Morimoto RI, & Vourc'h C (2002) In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol* 156(5):775-781.
- Jolly C, Metz A, Govin J, Vigneron M, Turner BM, Khochbin S, & Vourc'h C (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* 164(1):25-33.
- Jordan P, Brazao R, Boavida MG, Gespach C, & Chastre E (1999) Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* 18(48):6835-6839.
- Juan CC, Hwang JL, Liu AA, Whang-Peng J, Knutsen T, Huebner K, Croce CM, Zhang H, Wang JC, & Liu LF (1988) Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23):8910-8913.
- Jurica MS & Moore MJ (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell* 12(1):5-14.
- Kagey MH, Melhuish TA, Powers SE, & Wotton D (2005) Multiple activities contribute to Pc2 E3 function. *EMBO J* 24(1):108-119.
- Kagey MH, Melhuish TA, & Wotton D (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113(1):127-137.
- Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, & Krainer AR (2007) The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 14(3):185-193.
- Kerscher O, Felberbaum R, & Hochstrasser M (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:159-180.
- Kim JH & Baek SH (2009) Emerging roles of desumoylating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1792(3):155-162.

- Kirsh O, Seeler JS, Pichler A, Gast A, Muller S, Miska E, Mathieu M, Harel-Bellan A, Kouzarides T, Melchior F, & Dejean A (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J* 21(11):2682-2691.
- Knipscheer P, Flotho A, Klug H, Olsen JV, van Dijk WJ, Fish A, Johnson ES, Mann M, Sixma TK, & Pichler A (2008) Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell* 31(3):371-382.
- Koizumi J, Okamoto Y, Onogi H, Mayeda A, Krainer AR, & Hagiwara M (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem* 274(16):11125-11131.
- Kornblihtt AR (2007) Coupling transcription and alternative splicing. *Adv Exp Med Biol* 623:175-189.
- Kornblihtt AR, de la Mata M, Fededa JP, Munoz MJ, & Nogues G (2004) Multiple links between transcription and splicing. *RNA* 10(10):1489-1498.
- Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, & Palvimo JJ (2002) PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22(14):5222-5234.
- Kowalska-Loth B, Girstun A, Trzcinska AM, Piekielko-Witkowska A, & Staron K (2005) SF2/ASF protein binds to the cap region of human topoisomerase I through two RRM domains. *Biochem Biophys Res Commun* 331(2):398-403.
- Krainer AR, Conway GC, & Kozak D (1990) The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell* 62(1):35-42.
- Krainer AR, Conway GC, & Kozak D (1990) Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev* 4(7):1158-1171.
- Krainer AR, Mayeda A, Kozak D, & Binns G (1991) Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators. *Cell* 66(2):383-394.
- Kubbutat MH, Jones SN, & Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387(6630):299-303.
- Kwek SS, Derry J, Tyner AL, Shen Z, & Gudkov AV (2001) Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1. *Oncogene* 20(20):2587-2599.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lai MC, Lin RI, & Tarn WY (2001) Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10154-10159.

- Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, & Moore MJ (2000) The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* 19(24):6860-6869.
- Lee H, Quinn JC, Prasanth KV, Swiss VA, Economides KD, Camacho MM, Spector DL, & Abate-Shen C (2006) PIAS1 confers DNA-binding specificity on the Msx1 homeoprotein. *Genes Dev* 20(7):784-794.
- Lee KM & O'Connell MJ (2006) A new SUMO ligase in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 5(1):138-141.
- Lee MH, Lee SW, Lee EJ, Choi SJ, Chung SS, Lee JI, Cho JM, Seol JH, Baek SH, Kim KI, Chiba T, Tanaka K, Bang OS, & Chung CH (2006) SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nat Cell Biol* 8(12):1424-1431.
- Lejeune F & Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 17(3):309-315.
- Lemaire R, Prasad J, Kashima T, Gustafson J, Manley JL, & Lafyatis R (2002) Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins. *Genes Dev* 16(5):594-607.
- Li T, Evdokimov E, Shen RF, Chao CC, Tekle E, Wang T, Stadtman ER, Yang DC, & Chock PB (2004) Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(23):8551-8556.
- Li X & Manley JL (2005) Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* 122(3):365-378.
- Li X & Manley JL (2006) Alternative splicing and control of apoptotic DNA fragmentation. *Cell Cycle* 5(12):1286-1288.
- Li X & Manley JL (2006) Cotranscriptional processes and their influence on genome stability. *Genes Dev* 20(14):1838-1847.
- Li X, Wang J, & Manley JL (2005) Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev* 19(22):2705-2714.
- Lin D, Tatham MH, Yu B, Kim S, Hay RT, & Chen Y (2002) Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *J Biol Chem* 277(24):21740-21748.

- Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S, & Fu XD (2008) The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol* 15(8):819-826.
- Lin S & Fu XD (2007) SR proteins and related factors in alternative splicing. *Adv Exp Med Biol* 623:107-122.
- Lin S, Xiao R, Sun P, Xu X, & Fu XD (2005) Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. *Mol Cell* 20(3):413-425.
- Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, Muller S, & Scheffner M (2003) HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21):12009-12014.
- Long JC & Caceres JF (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* 417(1):15-27.
- Luna R, Jimeno S, Marin M, Huertas P, Garcia-Rubio M, & Aguilera A (2005) Interdependence between transcription and mRNP processing and export, and its impact on genetic stability. *Mol Cell* 18(6):711-722.
- Lyman SK, Gerace L, & Baserga SJ (1999) Human Nop5/Nop58 is a component common to the box C/D small nucleolar ribonucleoproteins. *RNA* 5(12):1597-1604.
- Ma CT, Hagopian JC, Ghosh G, Fu XD, & Adams JA (2009) Regiospecific phosphorylation control of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1. *J Mol Biol* 390(4):618-634.
- Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, & Melchior F (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88(1):97-107.
- Makarov EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M, & Luhrmann R (2002) Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* 298(5601):2205-2208.
- Malanga M, Czubaty A, Girstun A, Staron K, & Althaus FR (2008) Poly(ADP-ribose) binds to the splicing factor ASF/SF2 and regulates its phosphorylation by DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 283(29):19991-19998.
- Manley JL & Tacke R (1996) SR proteins and splicing control. *Genes Dev* 10(13):1569-1579.
- Mao Y, Sun M, Desai SD, & Liu LF (2000) SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8):4046-4051.

- Martin S, Wilkinson KA, Nishimune A, & Henley JM (2007) Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 8(12):948-959.
- Masse E & Drolet M (1999) Escherichia coli DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem* 274(23):16659-16664.
- Matos P, Collard JG, & Jordan P (2003) Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *J Biol Chem* 278(50):50442-50448.
- Matos P & Jordan P (2005) Expression of Rac1b stimulates NF-kappaB-mediated cell survival and G1/S progression. *Exp Cell Res* 305(2):292-299.
- Matos P & Jordan P (2008) Increased Rac1b expression sustains colorectal tumor cell survival. *Mol Cancer Res* 6(7):1178-1184.
- Matunis MJ, Coutavas E, & Blobel G (1996) 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(6 Pt 1):1457-1470.
- Mayeda A & Krainer AR (1992) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68(2):365-375.
- Melchior F (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:591-626.
- Melchior F & Hengst L (2002) SUMO-1 and p53. *Cell Cycle* 1(4):245-249.
- Melchior F, Schergaut M, & Pichler A (2003) SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* 28(11):612-618.
- Meluh PB & Koshland D (1995) Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* 6(7):793-807.
- Mermoud JE, Cohen PT, & Lamond AI (1994) Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J* 13(23):5679-5688.
- Merrill JC, Melhuish TA, Kagey MH, Yang SH, Sharrocks AD, & Wotton D (2010) A Role for Non-Covalent SUMO Interaction Motifs in Pc2/CBX4 E3 Activity. *PLoS One* 5(1):e8794.
- Metz A, Soret J, Vourc'h C, Tazi J, & Jolly C (2004) A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J Cell Sci* 117(Pt 19):4551-4558.

- Michlewski G, Sanford JR, & Caceres JF (2008) The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell* 30(2):179-189.
- Misteli T (2001) Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* 291(5505):843-847.
- Miyazono K, Kamiya Y, & Miyazawa K (2008) SUMO amplifies TGF-beta signalling. *Nat Cell Biol* 10(6):635-637.
- Mo YY, Yu Y, Shen Z, & Beck WT (2002) Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J Biol Chem* 277(4):2958-2964.
- Mohideen F, Capili AD, Bilimoria PM, Yamada T, Bonni A, & Lima CD (2009) A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nat Struct Mol Biol* 16(9):945-952.
- Moore MJ & Proudfoot NJ (2009) Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136(4):688-700.
- Mossessova E & Lima CD (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* 5(5):865-876.
- Mukhopadhyay D & Dasso M (2007) Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci* 32(6):286-295.
- Muller S, Berger M, Lehembre F, Seeler JS, Haupt Y, & Dejean A (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275(18):13321-13329.
- Navascues J, Bengoechea R, Tapia O, Casafont I, Berciano MT, & Lafarga M (2008) SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J Struct Biol* 163(2):137-146.
- Nayler O, Schnorrer F, Stamm S, & Ullrich A (1998) The cellular localization of the murine serine/arginine-rich protein kinase CLK2 is regulated by serine 141 autophosphorylation. *J Biol Chem* 273(51):34341-34348.
- Nayler O, Stratling W, Bourquin JP, Stagljar I, Lindemann L, Jasper H, Hartmann AM, Fackelmayer FO, Ullrich A, & Stamm S (1998) SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res* 26(15):3542-3549.
- Ngo JC, Chakrabarti S, Ding JH, Velazquez-Dones A, Nolen B, Aubol BE, Adams JA, Fu XD, & Ghosh G (2005) Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in



- phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Mol Cell* 20(1):77-89.
- Ngo JC, Giang K, Chakrabarti S, Ma CT, Huynh N, Hagopian JC, Dorrestein PC, Fu XD, Adams JA, & Ghosh G (2008) A sliding docking interaction is essential for sequential and processive phosphorylation of an SR protein by SRPK1. *Mol Cell* 29(5):563-576.
- Niksic M, Romano M, Buratti E, Pagani F, & Baralle FE (1999) Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9. *Hum Mol Genet* 8(13):2339-2349.
- Okura T, Gong L, Kamitani T, Wada T, Okura I, Wei CF, Chang HM, & Yeh ET (1996) Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 157(10):4277-4281.
- Ouyang J & Gill G (2009) SUMO engages multiple corepressors to regulate chromatin structure and transcription. *Epigenetics* 4(7):440-444.
- Palvimo JJ (2007) PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6):1405-1408.
- Patel NA, Kaneko S, Apostolatos HS, Bae SS, Watson JE, Davidowitz K, Chappell DS, Birnbaum MJ, Cheng JQ, & Cooper DR (2005) Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase CbetaII alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *J Biol Chem* 280(14):14302-14309.
- Pelisch F, Blaustein M, Kornblihtt AR, & Srebrow A (2005) Cross-talk between signaling pathways regulates alternative splicing: a novel role for JNK. *J Biol Chem* 280(27):25461-25469.
- Perry JJ, Tainer JA, & Boddy MN (2008) A simultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 33(5):201-208.
- Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, & Melchior F (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108(1):109-120.
- Pichler A, Knipscheer P, Saitoh H, Sixma TK, & Melchior F (2004) The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol* 11(10):984-991.
- Pilch B, Allemand E, Facompre M, Bailly C, Riou JF, Soret J, & Tazi J (2001) Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506. *Cancer Res* 61(18):6876-6884.

- Pitha-Rowe IF & Pitha PM (2007) Viral defense, carcinogenesis and ISG15: novel roles for an old ISG. *Cytokine Growth Factor Rev* 18(5-6):409-417.
- Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6(10):789-802.
- Poukka H, Karvonen U, Janne OA, & Palvimo JJ (2000) Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26):14145-14150.
- Proudfoot NJ, Furger A, & Dye MJ (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108(4):501-512.
- Pungaliya P, Kulkarni D, Park HJ, Marshall H, Zheng H, Lackland H, Saleem A, & Rubin EH (2007) TOPORS functions as a SUMO-1 E3 ligase for chromatin-modifying proteins. *J Proteome Res* 6(10):3918-3923.
- Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, Leake D, Godden EL, Albertson DG, Nieto MA, Werb Z, & Bissell MJ (2005) Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436(7047):123-127.
- Rajan P, Gaughan L, Dalgliesh C, El-Sherif A, Robson CN, Leung HY, & Elliott DJ (2008) Regulation of gene expression by the RNA-binding protein Sam68 in cancer. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 3):505-507.
- Rajendra R, Malegaonkar D, Pungaliya P, Marshall H, Rasheed Z, Brownell J, Liu LF, Lutzker S, Saleem A, & Rubin EH (2004) Topors functions as an E3 ubiquitin ligase with specific E2 enzymes and ubiquitinates p53. *J Biol Chem* 279(35):36440-36444.
- Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, & Mann M (2002) Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 12(8):1231-1245.
- Ren J, Gao X, Jin C, Zhu M, Wang X, Shaw A, Wen L, Yao X, & Xue Y (2009) Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics* 9(12):3409-3412.
- Reverter D & Lima CD (2005) Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* 435(7042):687-692.
- Ritchie KJ & Zhang DE (2004) ISG15: the immunological kin of ubiquitin. *Semin Cell Dev Biol* 15(2):237-246.
- Rodriguez MS, Dargemont C, & Hay RT (2001) SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276(16):12654-12659.

- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, & Hay RT (2000) Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20(22):8458-8467.
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, & Hay RT (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* 18(22):6455-6461.
- Rosas-Acosta G, Russell WK, Deyrieux A, Russell DH, & Wilson VG (2005) A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol Cell Proteomics* 4(1):56-72.
- Roscigno RF & Garcia-Blanco MA (1995) SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *RNA* 1(7):692-706.
- Rossi F, Labourier E, Forne T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, & Tazi J (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* 381(6577):80-82.
- Roth MB, Murphy C, & Gall JG (1990) A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope stains lampbrush chromosome loops and small granules in the amphibian germinal vesicle. *J Cell Biol* 111(6 Pt 1):2217-2223.
- Rotin D & Kumar S (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(6):398-409.
- Rueggsegger U, Blank D, & Keller W (1998) Human pre-mRNA cleavage factor Im is related to spliceosomal SR proteins and can be reconstituted in vitro from recombinant subunits. *Mol Cell* 1(2):243-253.
- Rytinki MM, Kaikkonen S, Pehkonen P, Jaaskelainen T, & Palvimo JJ (2009) PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol Life Sci* 66(18):3029-3041.
- Saitoh H & Hinchev J (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275(9):6252-6258.
- Sanford JR, Ellis JD, Cazalla D, & Caceres JF (2005) Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42):15042-15047.
- Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, & Caceres JF (2004) A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev* 18(7):755-768.
- Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F, & Suske G (2002) Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J* 21(19):5206-5215.

- Sapra AK, Anko ML, Grishina I, Lorenz M, Pabis M, Poser I, Rollins J, Weiland EM, & Neugebauer KM (2009) SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo. *Mol Cell* 34(2):179-190.
- Sarge KD, Murphy SP, & Morimoto RI (1993) Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 13(3):1392-1407.
- Savare J, Bonneaud N, & Girard F (2005) SUMO represses transcriptional activity of the *Drosophila* SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors. *Mol Biol Cell* 16(6):2660-2669.
- Schmidt D & Muller S (2002) 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(5):2872-2877.
- Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, & Lengyel E (2000) Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* 19(26):3013-3020.
- Schwartz AL & Ciechanover A (2009) Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:73-96.
- Schwartz DC & Hochstrasser M (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* 28(6):321-328.
- Seeler JS & Dejean A (2003) Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(9):690-699.
- Seu CS & Chen Y (2009) Identification of SUMO-binding motifs by NMR. *Methods Mol Biol* 497:121-138.
- Shen H & Green MR (2004) A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly. *Mol Cell* 16(3):363-373.
- Shen H, Kan JL, & Green MR (2004) Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol Cell* 13(3):367-376.
- Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, & Chen DJ (1996) UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36(2):271-279.

- Shi X, Kachirskaia I, Yamaguchi H, West LE, Wen H, Wang EW, Dutta S, Appella E, & Gozani O (2007) Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Mol Cell* 27(4):636-646.
- Shiio Y & Eisenman RN (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23):13225-13230.
- Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, Sondek J, & Der CJ (2004) Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene* 23(58):9369-9380.
- Smith DJ, Query CC, & Konarska MM (2008) "Nought may endure but mutability": spliceosome dynamics and the regulation of splicing. *Mol Cell* 30(6):657-666.
- Soret J, Gabut M, Dupon C, Kohlhagen G, Stevenin J, Pommier Y, & Tazi J (2003) Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in Mammalian cells lacking topoisomerase I. *Cancer Res* 63(23):8203-8211.
- Spector DL (2001) Nuclear domains. *J Cell Sci* 114(Pt 16):2891-2893.
- Spector DL, Fu XD, & Maniatis T (1991) Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J* 10(11):3467-3481.
- Spritz RA, Strunk K, Surowy CS, Hoch SO, Barton DE, & Francke U (1987) The human U1-70K snRNP protein: cDNA cloning, chromosomal localization, expression, alternative splicing and RNA-binding. *Nucleic Acids Res* 15(24):10373-10391.
- Srebrow A & Kornblihtt AR (2006) The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* 119(Pt 13):2635-2641.
- Staley JP & Guthrie C (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92(3):315-326.
- Stehmeier P & Muller S (2009) Regulation of p53 family members by the ubiquitin-like SUMO system. *DNA Repair (Amst)* 8(4):491-498.
- Sternsdorf T, Jensen K, Reich B, & Will H (1999) The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem* 274(18):12555-12566.
- Takahashi Y, Kahyo T, Toh EA, Yasuda H, & Kikuchi Y (2001) Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem* 276(52):48973-48977.
- Takahashi Y, Toh-e A, & Kikuchi Y (2001) A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene* 275(2):223-231.

- Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, & Hay RT (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276(38):35368-35374.
- Tempe D, Piechaczyk M, & Bossis G (2008) SUMO under stress. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5):874-878.
- Theissen H, Etzerodt M, Reuter R, Schneider C, Lottspeich F, Argos P, Luhrmann R, & Philipson L (1986) Cloning of the human cDNA for the U1 RNA-associated 70K protein. *EMBO J* 5(12):3209-3217.
- Ulrich HD (2008) The fast-growing business of SUMO chains. *Mol Cell* 32(3):301-305.
- Valgardsdottir R, Chiodi I, Giordano M, Cobianchi F, Riva S, & Biamonti G (2005) Structural and functional characterization of noncoding repetitive RNAs transcribed in stressed human cells. *Mol Biol Cell* 16(6):2597-2604.
- Valin A & Gill G (2007) Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6):1393-1396.
- van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco MT, Lozano J, Krainer AR, Moscat J, & Caceres JF (2000) The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol* 149(2):307-316.
- Vassileva MT & Matunis MJ (2004) SUMO modification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Mol Cell Biol* 24(9):3623-3632.
- Velazquez-Dones A, Hagopian JC, Ma CT, Zhong XY, Zhou H, Ghosh G, Fu XD, & Adams JA (2005) Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and Clk/Sty. *J Biol Chem* 280(50):41761-41768.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB,

- Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A & Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-1351.
- Verger A, Perdomo J, & Crossley M (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4(2):137-142.
- Vertegaal AC, Andersen JS, Ogg SC, Hay RT, Mann M, & Lamond AI (2006) Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 5(12):2298-2310.
- Vertegaal AC, Ogg SC, Jaffray E, Rodriguez MS, Hay RT, Andersen JS, Mann M, & Lamond AI (2004) A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem* 279(32):33791-33798.
- Vethantham V, Rao N, & Manley JL (2007) Sumoylation modulates the assembly and activity of the pre-mRNA 3' processing complex. *Mol Cell Biol* 27(24):8848-8858.

- Vethantham V, Rao N, & Manley JL (2008) Sumoylation regulates multiple aspects of mammalian poly(A) polymerase function. *Genes Dev* 22(4):499-511.
- Vijay-Kumar S, Bugg CE, & Cook WJ (1987) Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 194(3):531-544.
- Vijay-Kumar S, Bugg CE, Wilkinson KD, Vierstra RD, Hatfield PM, & Cook WJ (1987) Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *J Biol Chem* 262(13):6396-6399.
- Vousden KH & Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137(3):413-431.
- Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, & Zhang Y (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431(7010):873-878.
- Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, & Fu XD (1998) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol* 140(4):737-750.
- Weger S, Hammer E, & Engstler M (2003) The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumolation. *Exp Cell Res* 290(1):13-27.
- Weger S, Hammer E, & Heilbronn R (2005) Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 579(22):5007-5012.
- Wilkinson CR, Dittmar GA, Ohi MD, Uetz P, Jones N, & Finley D (2004) Ubiquitin-like protein Hub1 is required for pre-mRNA splicing and localization of an essential splicing factor in fission yeast. *Curr Biol* 14(24):2283-2288.
- Wilkinson KA, Nishimune A, & Henley JM (2008) Analysis of SUMO-1 modification of neuronal proteins containing consensus SUMOylation motifs. *Neurosci Lett* 436(2):239-244.
- Wu SY & Chiang CM (2009) Crosstalk between sumoylation and acetylation regulates p53-dependent chromatin transcription and DNA binding. *EMBO J*.
- Xiao R, Sun Y, Ding JH, Lin S, Rose DW, Rosenfeld MG, Fu XD, & Li X (2007) Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis. *Mol Cell Biol* 27(15):5393-5402.



- Xiao SH & Manley JL (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev* 11(3):334-344.
- Xirodimas DP (2008) Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5):802-806.
- Xirodimas DP, Chisholm J, Desterro JM, Lane DP, & Hay RT (2002) P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS Lett* 528(1-3):207-211.
- Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, Hay RT, & Lane DP (2004) Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* 118(1):83-97.
- Yang M, Hsu CT, Ting CY, Liu LF, & Hwang J (2006) Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro. *J Biol Chem* 281(12):8264-8274.
- Yang SH, Galanis A, Witty J, & Sharrocks AD (2006) An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J* 25(21):5083-5093.
- Yang SH, Jaffray E, Hay RT, & Sharrocks AD (2003) Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* 12(1):63-74.
- Yang SH & Sharrocks AD (2004) SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* 13(4):611-617.
- Yeakley JM, Tronchere H, Olesen J, Dyck JA, Wang HY, & Fu XD (1999) Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol* 145(3):447-455.
- Yeh ET (2009) SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J Biol Chem* 284(13):8223-8227.
- Yost HJ, Petersen RB, & Lindquist S (1990) RNA metabolism: strategies for regulation in the heat shock response. *Trends Genet* 6(7):223-227.
- Yun CY & Fu XD (2000) Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 150(4):707-718.
- Yunus AA & Lima CD (2006) Lysine activation and functional analysis of E2-mediated conjugation in the SUMO pathway. *Nat Struct Mol Biol* 13(6):491-499.
- Yunus AA & Lima CD (2009) Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Mol Cell* 35(5):669-682.
- Zahler AM, Lane WS, Stolk JA, & Roth MB (1992) SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev* 6(5):837-847.

- Zhang H, Wang JC, & Liu LF (1988) Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(4):1060-1064.
- Zhang QS, Manche L, Xu RM, & Krainer AR (2006) hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity. *RNA* 12(6):1116-1128.
- Zhang Z & Krainer AR (2004) Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol Cell* 16(4):597-607.
- Zhao TT, Graber TE, Jordan LE, Cloutier M, Lewis SM, Goulet I, Cote J, & Holcik M (2009) hnRNP A1 regulates UV-induced NF-kappaB signalling through destabilization of cIAP1 mRNA. *Cell Death Differ* 16(2):244-252.
- Zhao X & Blobel G (2005) 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(13):4777-4782.
- Zhong XY, Ding JH, Adams JA, Ghosh G, & Fu XD (2009) Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes Dev* 23(4):482-495.
- Zhong XY, Wang P, Han J, Rosenfeld MG, & Fu XD (2009) SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Mol Cell* 35(1):1-10.
- Zhou W, Ryan JJ, & Zhou H (2004) Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem* 279(31):32262-32268.