



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Dpto. de Anatomía y Biología Celular

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

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

5. Discusión

Las investigaciones realizadas en las dos últimas décadas sobre la organización estructural, molecular y funcional del núcleo celular han permitido caracterizar proteínas nucleadoras que son esenciales para el ensamblaje y estabilidad de distintos cuerpos nucleares. Ejemplos importantes son la coilina de los CBs (Cioce y Lamond, 2005; Morris 2008), la proteína PML de los cuerpos PML (Bernardi y Pandolfi, 2007) y la proteína Sam68, una proteína de unión a mRNAs implicada en regulación transcripcional y "splicing" (Matter y cols., 2002), en el caso de los cuerpos Sam68 (Chen y cols., 1999). Un aspecto importante es conocer que factores e interacciones moleculares determinan que estas proteínas nucleadoras sean capaces de reclutar otros componentes moleculares para un correcto ensamblaje de los cuerpos nucleares, un proceso esencial para que puedan ejercer sus funciones específicas.

Una propiedad común de estas proteínas nucleadoras es que por un mecanismo de autointeracción molecular generan el andamiaje inicial sobre el que se ensamblarán otros componentes moleculares del cuerpo nuclear. En el caso de la coilina, estudios previos de nuestro laboratorio, en colaboración con el laboratorio del Prof. Matera (Tucker y cols., 2001), han demostrado que los ratones knockout *coilina*^{-/-} son incapaces de formar CBs, pero la reposición del gen de la coilina en fibroblastos embrionarios *coilina*^{-/-} restablece la formación de CBs típicos. Similares resultados se han alcanzado recientemente en modelos knockout para *coilina*^{-/-} en *Drosophila melanogaster* (Liu y cols., 2009). Un segundo factor esencial para el ensamblaje de cuerpos nucleares es la modificación postraduccional de sus proteínas nucleadoras. Así, sabemos que la metilación de la coilina y de Sam68 en residuos de arginina es necesaria para el ensamblaje de CBs y cuerpos Sam68, respectivamente (Hebert y cols., 2002; Coté y cols., 2003). En el caso de los cuerpos PML, la conjugación con SUMO1 de la proteína PML es el mecanismo esencial que dirige el reclutamiento de otras proteínas de este cuerpo nuclear (Zhong y cols., 2000). Un tercer factor nucleador, que emerge con gran fuerza para entender la organización de los cuerpos nucleares y del nucleolo, es la existencia de proteínas "hub" que tienen múltiples sitios de interacción molecular en dominios desordenados de la molécula (Emmott y Hiscox, 2009). La interacción secuencial de moléculas diana con los múltiples sitios de unión de las proteínas "hub" dentro de un compartimento nuclear determina su tiempo de residencia y su actividad funcional.

En el contexto de lo anteriormente expuesto, los resultados del presente trabajo plantean, para su discusión, la importancia de dos modificaciones postraduccionales, metilación y sumoilación, de dos proteínas esenciales del CB, la coilina y el factor SMN, para determinar su destino nuclear y para el correcto ensamblaje de los CBs.

5.1 IMPORTANCIA DE LA METILACION DE LA COILINA PARA EL ENSAMBLAJE DE CBs Y PARA SU DESTINO NUCLEAR

Nuestros resultados demuestran que la línea celular MCF7 que tiene deletado el gen que codifica la enzima MTAP (Tang y cols., 2000; Basu y cols., 2007), enzima clave en el ciclo de recuperación de la metionina (Lubin y Lubin, 2009), representa un excelente modelo para explorar el efecto de la hipometilación endógena de proteínas sobre el comportamiento de los CBs y de sus componentes moleculares. Aproximadamente el 10% de las células MCF7 *MTAP*^{-/-} presentan patrones no convencionales de organización de los CBs y de la coilina consistentes en la disminución del número de CBs canónicos, acompañada de la aparición de microCBs y NoEC. Consideramos que estos efectos se deben a la hipometilación de la coilina demostrada bioquímicamente y con microscopía confocal con el anticuerpo Y12 (Boisvert y cols., 2002). Estos hallazgos nos han permitido demostrar que el grado de metilación de la coilina varía en función de su localización: sDMA-coilina se localiza en los CBs típicos y en los micro CBs y la coilina no metilada en el nucleolo.

Nuestros resultados aportan nuevos datos de gran interés para comprender la influencia de la modificación postraduccionales de la coilina por metilación sobre la organización y dinámica nuclear de esta proteína, incluyendo su reclutamiento nucleolar, una nueva localización de la coilina endógena cuya posible importancia funcional comentaremos más adelante. La redistribución de la coilina nucleolar detectada en una subpoblación de células MCF7 siempre se acompaña de una dramática reducción del número de CBs canónicos (2,1 en controles vs 0,4 en las células con NoEC) y de la aparición de microCBs, portadores de los componentes esenciales del CB tales como la sDMA-coilina, SMN y snRNPs. Puesto que los CBs juegan un papel fundamental en la biogénesis de snRNPs y snoRNPs (Cioce y Lamond, 2005; Morris, 2008), la disminución del número de CBs plantea la existencia de

compartimentos nucleares alternativos para desarrollar estas funciones nucleares, a la vez que enfatiza el papel de la metilación de la coilina para el ensamblaje de los CBs. De acuerdo con este último punto, se ha demostrado que la coilina tiene una caja RG donde se produce la dimetilación simétrica de múltiples residuos de arginina (sDMA), una modificación que modula la afinidad de la coilina por el complejo SMN de las snRNPs espliceosomales y favorece el reclutamiento de este complejo en los CBs (Herbert y cols., 2001, 2002; Boisvert y cols., 2002).

Un aspecto importante de nuestro estudio es conocer por qué sólo se afecta una proporción relativamente pequeña de células MCF7 *MTAP*^{-/-}. Consideramos que sólo en esta población se alcanza el umbral de hipometilación de la coilina requerido para inducir los cambios en la distribución de la coilina y en la organización de los CBs reseñados anteriormente. En la población restante, el déficit del ciclo de recuperación de la metionina podría ser parcialmente compensado por la actividad del ciclo de metilación principal (Nobori y cols., 1996; Tang y cols., 2000), por ello no se producen cambios significativos en la organización de los CBs. De acuerdo con esta explicación, la implicación funcional de la enzima MTAP en la regulación basal de la metilación queda confirmada con el tratamiento exógeno con MTA, ya que produjo en las células MCF7 *MTAP*^{-/-} un efecto agonista al generado por la delección del gen *MTAP*.

Antes de pasar a la discusión específica de los NoEC, de la formación de microCBs y de la presencia de CBs intranucleolares, queremos enfatizar que nuestro ensayo de transcripción *in situ*, basado en la incorporación de 5'-FU en el RNA naciente (Boisvert y cols., 2000), no demuestra cambios significativos en la tasa de transcripción nucleolar y extranucleolar entre las células MCF7 que presentan alteraciones en la organización de los CBs y las células del mismo cultivo con un patrón convencional de coilina y CBs. Sin embargo, estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado en diversos modelos neuronales que el CB es una estructura funcionalmente muy dinámica, cuyo tamaño y número está directamente relacionado con la actividad transcripcional (Lafarga y cols., 1998; Pena y cols., 2001; Berciano y cols., 2007). Por ello, nuestra observación de una tasa normal de transcripción en las células MCF7 que tienen reducido el número y tamaño de los CBs puede parecer, a priori, incongruente con la idea de que la presencia de CBs canónicos de gran tamaño (>0,5 µm) es necesaria para garantizar con máxima eficiencia la

actividad transcripcional, al menos en células metabólicamente muy activas como las neuronas (Lafarga y cols., 1998; Pena y cols., 2001; Cioce y Lamond, 2005). En este sentido, es generalmente aceptado que la concentración molecular de enzimas y sustratos en un dominio nuclear, como el CB canónico, incrementa las interacciones moleculares, facilitando, en el caso del CB, la biogénesis de snRNPs y snoRNPs requeridas para el procesamiento de pre-mRNAs y pre-rRNAs, respectivamente (Carvalho y cols., 1999; Cioce y Lamond, 2005; Morris, 2008). Sin embargo, en la subpoblación de células MCF7 que NoEC y microCBs, con una tasa de transcripción normal, la severa ausencia de CBs canónicos no parece interferir con la biogénesis de RNPs, que debe producirse en otros compartimentos nucleares como los microCBs y el nucleoplasma.

En nuestra opinión, la redistribución nucleolar de la coilina acompañada de una dramática reducción de CBs detectada en una subpoblación de células MCF7 no debe afectar a la supervivencia celular, dado que no compromete una actividad metabólica esencial de la célula como la transcripción. Por otra parte, esta reorganización nuclear de la coilina puede contribuir a explicar la utilidad funcional del "pool" de coilina nucleoplasmática que representa aproximadamente el 70% de la coilina celular (Whittom y cols., 2008). De acuerdo con otros autores (Klingauf y cols., 2006), consideramos que la coilina nucleoplasmática está implicada en las mismas funciones que el CB, pero con menor eficiencia. Así, la coilina nucleoplasmática podría compensar la ausencia de CBs canónicos en células que no tienen una actividad transcripcional muy elevada como los fibrocitos (Cioce y Lamond, 2005). Sobre la base de nuestros resultados, proponemos que la coilina nucleoplasmática representa un reservorio dinámico que, en función de la tasa de metilación (sDMA-coilina) y de la actividad transcripcional, se ensambla parcialmente en microCBs y en CBs canónicos.

Llegados a este punto de la discusión vamos a analizar con más detalle tres hallazgos esenciales en nuestro modelo de células MCF7 *MTAP*^{-/-}: la redistribución intranucleolar de la coilina, la presencia de CBs intranucleolares y la formación de los microCBs. La existencia de una relación espacial entre CBs y el nucleolo es conocida desde los clásicos estudios de microscopía electrónica (Hardin y cols., 1969; Lafarga y cols., 1983, 1991). Además los estudios de la movilidad de los CBs en células vivas demuestran la interacción dinámica de los CBs con el nucleolo, probablemente

relacionada con la transferencia directa desde el CB al nucleolo de las snoRNPs requeridas para el procesamiento de los pre-rRNAs (Platani y cols., 2000; Cioce y Lamond, 2005). Sin embargo, la distribución intranucleolar de la coilina bajo la forma de NoEC sólo se ha descrito en modelos experimentales de expresión ectópica de formas truncadas de la coilina GFP-coilina (1-248) y GFP-coilina (1-315) diseñadas para demostrar que la coilina dispone de una NoLS normalmente oculta (Hebert y cols., 2000). Las señales que enmascaran la NoLS de la coilina no son conocidas. Se ha propuesto que el dominio básico NoLS de la coilina puede formar interacciones electrostáticas con los dominios ácidos adyacentes, dando como resultado un patrón de plegamiento de la coilina que enmascara la NoLS e impide su reclutamiento en el nucleolo en condiciones normales (Hebert y Matera, 2000; Hebert y cols., 2001). De hecho, cuando se mutan los aa ácidos que flanquean la NoLS es cuando la coilina se importa al nucleolo (Hebert y Matera, 2000). Nuestro estudio aporta la primera evidencia de que la coilina silvestre endógena se convierte en una proteína residente del nucleolo cuando no está metilada.

En nuestro modelo de células MCF7, aproximadamente el 10% de las células muestran coilina intranucleolar, localización que ha sido confirmada por Western blotting de extractos nucleolares. Dentro del nucleolo, la coilina presenta un patrón reticular que colocaliza con la fibrilarina, un marcador molecular del CFD (Raska y cols., 2006). Nuestros estudios de inmunoelectrónica confirman la localización preferente de la coilina en el CFD del nucleolo. Es bien conocido que en esta localización se produce la transcripción de los genes ribosomales y el procesamiento temprano de los pre-rRNAs (Raska y cols., 2006; Casafont y cols., 2006; Boisvert y cols., 2007). En este contexto, nuestro ensayo de transcripción *in situ* demuestra una tasa normal de incorporación de 5'-FU en los NoEC, indicando que el reclutamiento de coilina en el CFD no interfiere con la transcripción nucleolar. De hecho, la morfología de las células MCF7 y de los NoEC es completamente normal.

Respecto a los factores que determinan el destino nucleolar de la coilina y su posible significación funcional, como se ha comentado anteriormente, el factor esencial es la hipometilación ocasionada por el déficit del gen *MTAP*. Así, el incremento de la hipometilación mediante el tratamiento con MTA aumenta dramáticamente la proporción de células con NoEC. De acuerdo con esta idea, nuestro estudio con el

anticuerpo Y12, que reconoce la sDMA de la coilina (Boisvert y cols., 2002), claramente demuestra por inmunofluorescencia y Western blotting de extractos nucleolares que la coilina intranucleolar, a diferencia de la coilina de los CBs y de los microCBs, no está metilada. Tiene gran interés que la hipometilación de la coilina no sólo afecta la interacción de la coilina con la SMN y con el complejo Sm de las snRNPs, que normalmente se produce en los CBs (Hebert y cols., 2002; Boisvert y cols., 2002), sino que también altera su destino nuclear, la coilina metilada se concentra en los CBs y la no metilada en el nucleolo. Además, la ausencia de SMN y de snRNPs en los NoEC descarta la participación de la coilina nucleolar en la biogénesis de snRNPs. Será muy interesante resolver en el futuro si la coilina nucleolar, en su estado no metilado, interviene en la maduración de snoRNPs nucleolares o participa en otras funciones biológicas nucleolares desconocidas por el momento.

Debemos resaltar que la formación de NoEC está asociada a un estado no metilado de la coilina o un nivel de metilación muy bajo, no detectable con el anticuerpo Y12, que se produce espontáneamente en las células MCF7 *MTAP*^{-/-} y no es reproducible en células *MTAP*^{+/+}, salvo en una condición extrema de un medio de cultivo desprovisto de metionina. De acuerdo con este criterio, la inducción de un estado de hipometilación de proteínas con MTA en células *MTAP*^{+/+}, tales como neuronas-like de la línea celular UR61 (Navascués y cols., 2004), neuronas de ganglio del trigémino de la rata (Navascués y cols., 2008) y células HeLa (presentes resultados), altera la formación de CBs y produce una redistribución de la coilina en rosetas perinucleolares, pero no induce la formación de NoEC. Curiosamente, las células HeLa tratadas con MTA presentan inmunomarcaje para la sDMA-coilina en las rosetas perinucleolares, aunque la intensidad de la señal es menor que la detectada en los CBs canónicos. Esta observación claramente indica que sólo la coilina no metilada, o con una tasa de metilación muy baja, se recluta en los NoEC, mientras que la coilina metilada puede agregarse en la superficie del nucleolo como rosetas perinucleolares, pero no se transporta al interior. Estos resultados también reflejan que la hipometilación inducida en las células *MTAP*^{+/+} con MTA es parcialmente compensada por las vías de metilación de la célula y no alcanza el umbral de hipometilación requerido para su translocación al nucleolo.

Diversos mecanismos, no excluyentes entre sí, pueden determinar el destino intranucleolar de la coilina no metilada. En primer lugar, el estado metilado de la

coilina, como ocurre con carácter general en otras proteínas celulares, modifica la formación de puentes de hidrogeno haciéndola más hidrofóbica e inmóvil (Lee y Stallcup, 2009; Bedford y Clarke, 2009) y favoreciendo su retención en un dominio nuclear concreto como el CB. Por lo contrario, en la coilina no metilada los múltiples residuos de arginina susceptibles de metilación en la caja RG (Hebert y cols., 2001) exponen sus cargas positivas, lo que debe conferir a la proteína una mayor hidrosolubilidad y movilidad entre CBs, nucleoplasma y nucleolo. Un segundo mecanismo que podría dirigir la coilina al nucleolo es que la NoLS se oculte o se exponga en función del nivel de metilación de la coilina. Sabemos que en condiciones fisiológicas la NoLS de la coilina metilada está enmascarada, lo que impide su localización en el nucleolo (Hebert y Matera, 2000). Nuestros resultados plantean la posibilidad de que la metilación cambie la conformación estructural de la coilina, como se ha demostrado con carácter general para diversas proteínas (Bedford y Clarke, 2009). Así, un cambio conformacional en la coilina no metilada podría exponer la NoLS y destinar la coilina al nucleolo. Se da la circunstancia que las construcciones de la coilina elaboradas por Hebert y colaboradores (2000) para delimitar la NoLS tienen deletada la caja RG del extremo C-terminal, donde se produce la sDMA de la coilina (Hebert y cols., 2001). Aunque estos autores no consideran que dicho dominio participe en el destino nucleolar de la coilina, están expresando formas no metiladas de la coilina que, en base a nuestros resultados, puede ser un factor adicional a la exposición de la NoLS para el destino intranucleolar de la coilina detectado en sus experimentos.

Un tercer mecanismo potencialmente implicado en la retención de coilina en el nucleolo es la existencia de proteínas "hub" que tengan múltiples sitios de interacción molecular de alta afinidad con la coilina no metilada, lo que determinaría un tiempo de residencia relativamente largo en el compartimento nucleolar. Las proteínas "hub" se caracterizan por disponer de segmentos desordenados que albergan microdominios muy ácidos que interactúan con secuencias básicas de las proteínas diana (Kim y cols., 2008), entre las que podría estar la coilina. Aunque desconocemos las proteínas nucleolares implicadas en el reclutamiento nucleolar de la coilina no metilada, proponemos dos posibles candidatas, la proteína B23 y la chaperona Nopp140. La primera pertenece a la familia de las proteínas "hub" nucleolares que tienen la

capacidad innata de interactuar con diversas moléculas y reclutarlas en el nucleolo (Kim y Gerstein, 2008; Emmott y Hiscox, 2009). En el caso de la Nopp140, se trata de una proteína residente del CB y del nucleolo que está en flujo constante entre ambas estructuras (Meier y Blobel, 1992). Esta chaperona tiene un dominio de interacción específico con la coilina y, además, posee múltiples minidominios ácidos con alta afinidad por secuencias básicas, como es la NoLS de la coilina (Isaac y cols., 1998; Shaw y cols., 2008). La posibilidad de que Nopp140 esté implicada en el destino intranucleolar de la coilina se refuerza por el hecho de que esta proteína es característica del CFD del nucleolo (Meier y Blobel, 1992), donde debe colocalizar con la coilina intranucleolar. Conocer si las proteínas B23 y Nopp140 participan en el transporte y estabilización de la coilina no metilada al nucleolo puede ser un interesante objetivo para investigar en el futuro.

Otro aspecto muy importante referido a la coilina nucleolar es determinar su papel en la fisiología del nucleolo. Como se ha comentado anteriormente, sabemos que no interfiere con la transcripción nucleolar y que no está asociada con SMN y snRNPs, lo que descarta su participación en la biogénesis de snRNPs espliceosomales. Nosotros planteamos que esta coilina representa un reservorio dinámico que puede ser reutilizado para ensamblar nuevos CBs cuando se restablezcan unas condiciones metabólicas que incrementen la metilación de la coilina. La coilina nucleolar podría ser una forma inactiva y protegida de su degradación. La retención de proteínas nucleares inactivadas, particularmente factores reguladores de la transcripción, en un compartimento nuclear ha sido demostrada en los cuerpos PML y cuerpos SUMO (Bernardi y Pandolfi, 2007; Navascués y cols., 2007). En esta línea, tiene gran interés que entre las nuevas funciones del nucleolo, no relacionadas con la transcripción y procesamiento de rRNAs, se incluye el depósito dinámico de algunas proteínas como la p53 que se retienen y liberan en función de la demanda metabólica de la célula (Pederson y Tsai, 2008). Finalmente, la asociación de la coilina no metilada con la fibrilarina en el CFD del nucleolo, similarmente a la que se produce en los CBs maduros, plantea también la posibilidad de que la coilina participe en la biogénesis de las snoRNPs.

La formación de CBs intranucleolares y de microCBs en el nucleoplasma son dos procesos importantes asociados también a la hipometilación de la coilina en las

células MCF7. La presencia de CBs intranucleolares ha sido previamente descrita en líneas tumorales de cáncer de mama (Ochs y cols., 1994) y en células HeLa tratadas con ácido okadáico, un inhibidor de las fosfatasa (Lyon y cols., 1997). Nuestros resultados confirman y amplían estas observaciones al demostrar la presencia de coilina metilada y SMN en este subtipo de CBs. También demuestran que la formación de CBs intranucleolares se asocia con la disminución de los CBs nucleoplasmáticos. En nuestra opinión, los intersticios del nucleolo proporcionan un microambiente alternativo al nucleoplasma para el ensamblaje de CBs presumiblemente funcionales, dado que contienen todos los componentes esenciales del CB (Gall, 2000; Cioce y Lamond, 2005). Finalmente, la presencia de CBs intranucleolares proporciona una prueba adicional de que el ensamblaje de CBs, independientemente de que ocurra en el nucleoplasma o en el nucleolo, requiere de la metilación de la coilina.

La presencia de numerosos microCBs descrita en nuestros resultados es otro exponente de la reorganización de la coilina inducida por su estado hipometilado, que siempre se asocia a la reducción del número de CBs canónicos. La presencia ocasional de mini- o microCBs ha sido descrita en varios tipos celulares (Cioce y Lamond, 2005). En un estudio sobre la dinámica de los CBs en células HeLa transfectadas con GFP-coilina (Platani y cols., 2000) se ha visto que estos microCBs pueden fusionarse en CBs canónicos o, por el contrario, pueden resultar de procesos de fisión de los CBs. En nuestro modelo experimental en células MCF7, los microCBs son muy abundantes, contienen los componentes relacionados con la biogénesis de snRNPs esliceosomales (coilina metilada, SMN y complejo Sm) pero carecen de fibrilarina. Dado que la fibrilarina establece interacciones con snoRNAs y scaRNAs en los CBs canónicos, que son necesarias para la biogénesis de las snoRNPs destinadas al nucleolo (para revisión, ver Carmo-Fonseca, 2002), la ausencia de fibrilarina en los microCBs descarta a estas estructuras como sitios de maduración de snoRNPs. En este contexto, se plantean dos posibilidades para interpretar la formación e importancia funcional de los microCBs. Primero, que sean un producto residual del desensamblaje de los CBs canónicos inducido por la hipometilación de la coilina. Segundo, que sean precursores tempranos de los CBs que, dependiendo del estado de metilación de la coilina, se fusionarían con los CBs canónicos. Sobre la base de su composición molecular, en ambos supuestos los microCBs podrían ser funcionales en la maduración de snRNPs.

El estudio comparativo del patrón de distribución de la coilina entre líneas celulares sin y con expresión del gen *MTAP* demuestra que la causa de la hipometilación de la coilina y de su redistribución nuclear es el déficit genético de la enzima MTAP. De acuerdo con este criterio, las líneas celulares *MTAP*^{+/+} estudiadas en el presente trabajo siempre mostraron una organización convencional de la coilina en condiciones normales. La implicación funcional de la enzima MTAP en la regulación de la metilación de la coilina fue confirmada al observar que en células MCF7 *MTAP*^{-/-} tratadas con MTA se incrementaba enormemente la población de células con alteraciones de la coilina y CBs. No obstante, la prueba definitiva la obtuvimos al observar que la reposición del gen *MTAP* en las células MCF7 *MTAP*^{-/-} restablecía completamente el patrón normal de la coilina y de los CBs. Además, cuando las células MCF7 *MTAP*^{-/-} que sobreexpresaban FLAG-MTAP se trataban con MTA se producía el desensamblaje de los CBs y la formación de microCBs, pero la coilina no se importaba al nucleolo. Esto indica que la existencia de la enzima MTAP ectópica activa la vía de reciclaje de metionina e impide la hipometilación severa de la coilina. Este comportamiento explica que las células MCF7 *MTAP*^{-/-} sean más proclives a la hipometilación endógena ya que, al no catabolizar la MTA, no pueden recuperar metionina endógena para el suministro del ciclo principal de metilación. Además, el acúmulo de MTA inhibe indirectamente las PRMTs (Williams-Ashman y cols., 1982; Avila y cols., 2003).

Tomados en su conjunto nuestros resultados nos permiten proponer el siguiente modelo de la dinámica nuclear de la coilina según su estado de metilación. Como se representa en la Figura 40, en condiciones fisiológicas, la formación de pre-CBs requiere que la coilina tenga un relativo grado de metilación de las argininas de la caja RG (1). La fusión de microCBs en CBs de mayor tamaño se produciría a demanda de transcripción y su organización estructural y funcional estaría directamente relacionada con la tasa de metilación de la coilina: el mayor nivel de sDMA-coilina favorece la homooligomerización, estabilidad y capacidad de interacción molecular con las snRNPs espliceosomales (2). Cuando la tasa de transcripción es baja, se producirían procesos de fisión que conducen al desensamblaje de CBs y la formación de microCBs (3).

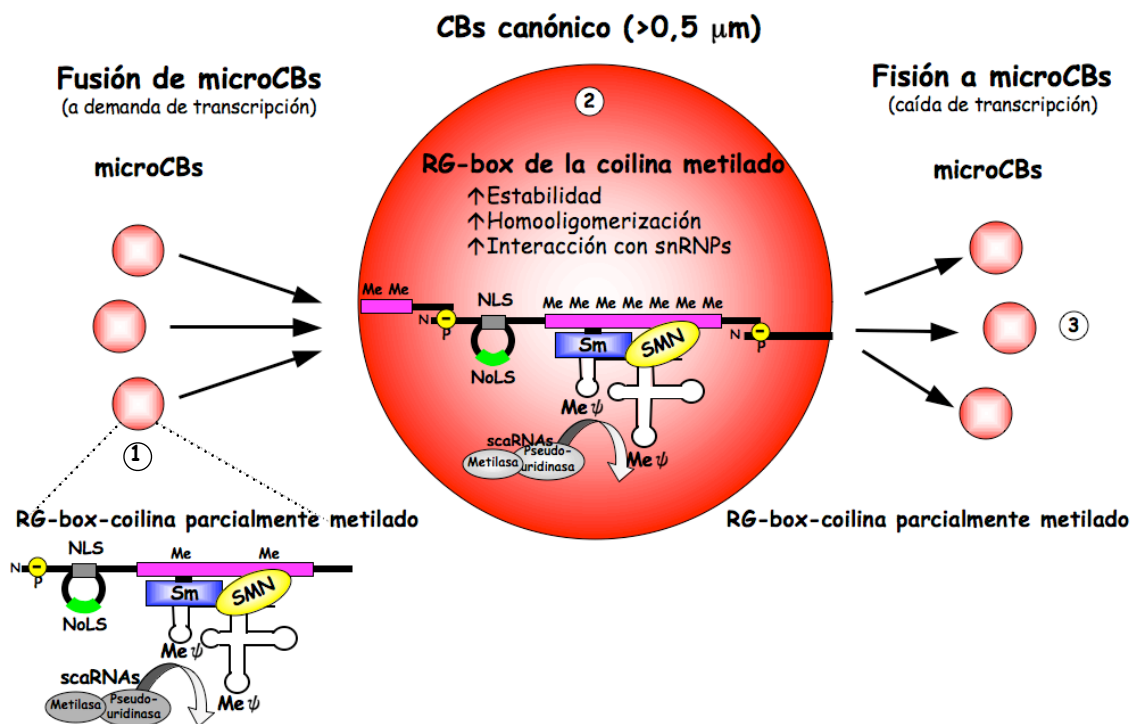


Figura 40. Movilidad nuclear de la coilina en condiciones fisiológicas

Mínimos desajustes de la metilación de la coilina pueden provocar su reorganización nuclear (Fig. 41). Así, en los microCBs un nivel bajo de sDMA-coilina sería suficiente para mantener la interacción con la proteína SMN y el complejo Sm-snRNP, así como la biogénesis de snRNPs. Sin embargo, si la coilina no alcanza un umbral de sDMA los microCBs no se fusionarían en típicos CBs (1). En estado no metilado, la coilina del nucleoplasma es muy inestable, incapaz de homooligomerizar en típicos CBs y de interactuar con las snRNPs (2). Además, el estado no metilado puede provocar un plegamiento alternativo de la coilina que favorezca la exposición de la NoLS y la interacción con proteínas "hub" nucleolares que reclutarían la coilina en el nucleolo (3). La importación de la coilina al nucleolo podría estar potenciada por la ganancia de hidrosolubilidad y difusibilidad que confiere el estado electrostático básico de la coilina no metilada (3). Los CBs que no pueden mantener su organización estructural se desensamblan en microCBs (4).

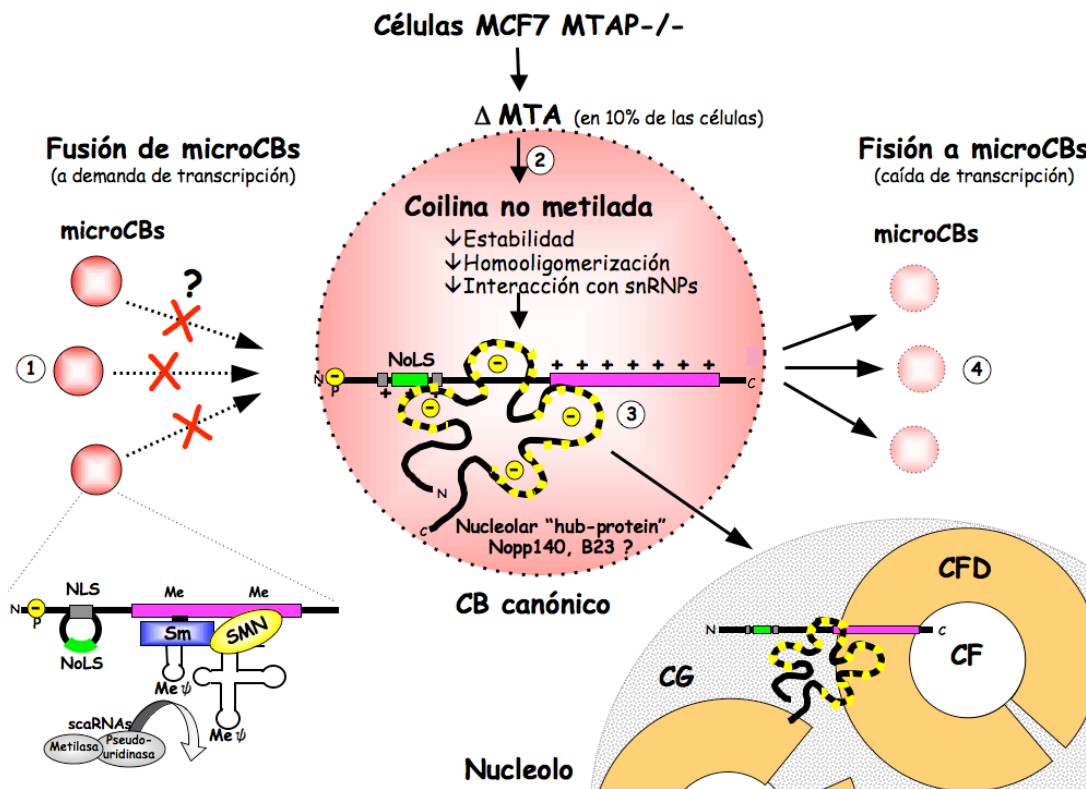


Figura 41. Movilidad nuclear de la coilina en células MCF7 MTAP^{-/-}

5.2 PARTICIPACION DE SUMO1 EN EL ENSAMBLAJE MOLECULAR DEL CUERPO DE CAJAL

La interacción molecular de SUMO1 con proteínas diana es otra modificación postraduccional esencial para el ensamblaje de complejos moleculares en determinadas estructuras nucleares como los cuerpos PML y SUMO (Zhong y cols. 2000; Navascués y cols. 2007) o el complejo del poro nuclear PML (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). Entre las funciones que la unión covalente de SUMO1 confiere al sustrato destacan modificaciones en las interacciones proteína-proteína, redistribución entre compartimentos nucleares y cambios funcionales (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). La conjugación con SUMO1 puede competir con la ubiquitilación, preservando algunas proteínas de su degradación, y provocar cambios conformacionales en las proteínas sustrato (Ulrich, 2009).

En este contexto, nuestros resultados demuestran por vez primera que SUMO1 está presente en un subtipo de CBs en diversas líneas celulares de diferentes

especies, tales como células UR61 (neurona-like) de la rata, células MCF7 de cáncer de mama humano y células N2A de neuroblastoma de ratón. Además, hemos detectado la presencia transitoria de SUMO1 en CBs de neuronas del tejido nervioso de la rata en respuesta al estrés neuronal. Estos hallazgos sugieren que la localización transitoria de SUMO1 en los CBs es un hecho común de las células de mamíferos y que ciertas proteínas del CB pueden conjugarse con SUMO1. En apoyo de esta hipótesis, hemos demostrado que la enzima Ubc9, la única conjugasa de SUMO1 conocida (Desterro y cols., 1997, Hay 2005), se localiza en los CBs. La existencia de una maquinaria de sumoilación en un subtipo de CBs ha sido confirmada mediante la expresión de vectores que codifican SUMO1 activo (GFP-SUMO1 activo, Gostissa y cols., 1999) y Ubc9 (DsRed-Ubc9) en experimentos de transfección celular. Las dos proteínas de fusión son reclutadas en CBs inmunomarcados para la coilina. Aunque por el momento no hemos podido detectar la presencia de SUMO E3 ligasas en el CB, estudios bioquímicos previos han demostrado que la ligasa E3 PIASy (Sachdev y cols., 2001) interacciona directamente con la coilina (Sun y cols., 2005). Sin embargo, estos últimos autores no pudieron demostrar la interacción molecular entre SUMO1 y coilina.

El análisis del comportamiento de los CBs con SUMO1, tanto en líneas celulares como en modelos experimentales en neuronas de la rata, nos demuestra que la presencia de SUMO1 en los CBs se correlaciona con procesos de reorganización molecular de los CBs asociados con la diferenciación celular y con la respuesta al estrés neuronal. Así, en las células UR61, nuestros resultados indican que la diferenciación a un fenotipo neurona-like se acompaña de una reducción significativa del número medio de CBs que contienen SUMO1, indicando que la mayor proporción de CBs positivos a SUMO1 corresponde al estado indiferenciado de las células UR61. Un estudio previo de nuestro laboratorio (Navascués y cols. 2004) demostró que en las células UR61 indiferenciadas dos proteínas esenciales del CB, coilina y SMN, se organizaban en tres categorías de cuerpos nucleares diferentes: cuerpos que concentran sólo coilina, cuerpos que concentran sólo SMN (géminis) y cuerpos que reclutan ambas moléculas o CBs canónicos. Sabemos también que la diferenciación a neurona-like de las células UR61 se acompaña de un importante aumento en la expresión de SMN (Navascués y cols. 2004) que favorece el ensamblaje de los CBs canónicos y la disminución paralela de los géminis y de los cuerpos coilina-positivos que carecen de SMN. Aunque no conocemos la importancia funcional de la sumoilación

de componentes del CB, nuestros resultados sugieren que el ciclo de sumoilación/desumoilación de proteínas del CB está implicado en la maduración de estas estructuras durante la diferenciación celular.

Respecto al comportamiento de SUMO1 en los modelos neuronales, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que los CBs de las neuronas del SON experimentan un ciclo de desensamblaje/ensamblaje, dependiente de transcripción, durante la respuesta al estrés osmótico (Lafarga y cols., 1998; Berciano y cols., 2002). En este modelo de reorganización molecular de los CBs, SUMO1 se detecta transitoriamente durante la fase de reformación de CBs, pero no está presente en los CBs de las neuronas recuperadas del estrés celular y en las neuronas control. En la respuesta al estrés osmótico, es muy interesante el hecho de que algunos CBs pequeños asociados al nucleolo concentran SUMO1. Tales CBs han sido considerados, tanto en neuronas (Lafarga y cols. 1998) como en ovocitos (Ferreira y Carmo-Fonseca, 1995), como precursores de los CBs canónicos que se ensamblan en la superficie del nucleolo para migrar posteriormente al nucleoplasma como CBs maduros. En este contexto, sugerimos que la sumoilación de ciertas proteínas del CB, particularmente la coilina y/o la SMN, puede estar involucrada en el ensamblaje molecular que comporta la reformación de CBs neuronales en la respuesta al estrés osmótico. La presencia en los CBs con SUMO1 de otros componentes esenciales de esta estructura como fibrilarina, SMN y snRNPs sugiere que este subtipo de CBs debe tener actividad funcional de biogénesis de snRNPs y snoRNPs (Cioce y Lamond, 2005; Morris, 2008). En nuestra opinión, la existencia de procesos de sumoilación en el CB debe ser universal en todos los tipos neuronales que experimenten cambios dramáticos en la expresión génica que comporten la reformación de CBs. De hecho, la localización transitoria de SUMO1 en CBs también se produce en neuronas del GT en respuesta a la inhibición de la metilación con AdOx. Como en las neuronas del SON, la presencia de SUMO1 se produce específicamente durante la fase de reformación de CBs, ratificando nuestro criterio de que la conjugación con SUMO de proteínas del CB está implicada en la nucleación y ensamblaje molecular de los CBs reformados. Un vez que se ha concluido el proceso de ensamblaje molecular del CB, SUMO1 se disocia de estas estructuras. De hecho SUMO1 no se detecta en los CBs de neuronas diferenciadas en condiciones normales.

Respecto a la identificación de los posibles sustratos de SUMO1 en los CBs, en este estudio nos hemos centrado en dos posibles candidatos: SMN y coilina. El análisis

bioinformático con el software SUMOplot™ muestra que la SMN humana tiene una secuencia consenso alrededor de la K119 y tres de alta probabilidad (K55, K209 y K93) y que la coilina, además de una secuencia consenso en la K84, posee cuatro secuencias de alta probabilidad (K297, K198, K526 y K458). Este análisis indica que ambas proteínas son candidatas putativas de interactuar con SUMO1.

La existencia en las células UR61 indiferenciadas de tres tipos distintos de cuerpos nucleares relacionados con los CBs, pero con distinta composición molecular (Navascues y cols., 2004), nos ha permitido identificar al factor SMN como el principal candidato de conjugación con SUMO1. De hecho SUMO1 y Ubc9 colocalizan con SMN en los cuerpos geminis, que carecen de coilina, y en los CBs canónicos (que concentran coilina y SMN), pero nunca se detectó SUMO1 y Ubc9 en los cuerpos coilina-positivos que carecían de SMN. Nuestros experimentos de co-inmunoprecipitación de SMN endógena y SUMO1 demuestran inequívocamente la interacción molecular entre estos dos componentes moleculares. Estos resultados incorporan al CB como una nueva factoría nuclear de modificación de proteínas nucleares, identifican al factor SMN como un nuevo sustrato de sumoilación y refuerzan la importancia de los procesos de sumoilación para el ensamblaje molecular de cuerpos nucleares.

Una vez establecido que SMN se modifica por sumoilación, procede discutir la importancia que tiene en este proceso la lisina 119, que forma parte de la secuencia consenso de conjugación con SUMO1 (Melchoir, 2000; Hay, 2005), y la lisina 55 de alta probabilidad de sumoilación. Por el momento se desconoce el significado funcional que puede tener que en una misma proteína coexistan varias secuencias con probabilidad de unión covalente a SUMO1. Ni siquiera conocemos si la lisina de una secuencia consenso confiere funciones específicas respecto a las que se localizan en secuencias no consenso, o si éstas últimas simplemente representan lisinas alternativas de sumoilación con idéntica función (Kerscher, 2007). En este sentido, nuestros resultados de los experimentos de mutación simple de las lisinas 55 (GFP-SMN K55A) o 119 (GFP-SMN K119A) y doble mutación de ambas lisinas (GFP-SMN K55AK119A) aportan datos muy interesantes cuya interpretación es compleja. La expresión de la forma mutada en K55 no produce variaciones ni en el fenotipo celular ni en el patrón de organización de los CBs respecto a las células que expresan la forma silvestre de la SMN (GFP-SMNwt). En ambos casos, una proporción equivalente

de CBs presentaban inmunomarcaje para SUMO1. Esta observación sugiere que la lisina 55 o bien no se conjuga con SUMO1 o su sumoilación no es esencial, al menos para el ensamblaje de los CBs. Sin embargo, la mutación K119A o la doble mutación K55AK119A provocan una proliferación dramática de microCBs que concentran SUMO1 acompañada de la disminución de CBs canónicos. Aunque la mutación de la K119 no impide el reclutamiento de SUMO1 en microCBs, pensamos que este efecto se debe a la sumoilación alternativa de otras lisinas del factor SMN y que la sumoilación de la K119 es necesaria para el normal ensamblaje de los CBs. De acuerdo con este criterio, nuestros estudios de co-inmunoprecipitación de las formas silvestre y mutadas de la SMN expresadas en experimentos de transfección celular revelan la conjugación con SUMO de todas las variantes estudiadas con un peso molecular de los complejos GFP-SMN-SUMO1 que corresponde a mono-sumoilación.

Otro aspecto importante que refuerza el protagonismo funcional de la secuencia consenso de sumoilación de la proteína SMN se refiere a sus propiedades electrostáticas que le confieren sus aminoácidos. Lógicamente el diseño de la secuencia consenso, en la que la K está flanqueada por un aa ácido y otro hidrofóbico, no solo favorece las interacciones electrostáticas entre proteína-proteína sino que también las intramoleculares de la propia secuencia para interactuar con mayor afinidad con SUMO1 (Kerscher, 2007). La interacción con SUMO1 puede provocar cambios conformacionales del sustrato que favorezcan sus interacciones moleculares con otras proteínas (Ulrich, 2005; Kerscher, 2007). En este contexto, podemos entender que la K119 de la SMN, flanqueada por fenilalanina y ácido glutámico, tenga una función diferente de la K55 que no está flanqueada por un aminoácido ácido. Además, se da la circunstancia de que la K119 se localiza en el dominio TUDOR de interacción de la SMN con la coilina (Renvoisé y cols., 2006). Nos planteamos como hipótesis que la sumoilación de K119 provoque un cambio conformacional del dominio TUDOR que favorezca la interacción molecular de la SMN asociada a las snRNPs con la coilina, un mecanismo fundamental para la nucleación y ensamblaje del CB (Boisvert y cols., 2002; Kaiser y cols., 2008; Misteli, 2008). Aunque nuestros hallazgos no nos permiten descartar la sumoilación de otras proteínas esenciales del CB, tales como la coilina o alguna de las 7 proteínas del complejo Sm de las snRNPs, claramente indican que la sumoilación de la K119 de la SMN es determinante para la correcta nucleación de CBs canónicos. Hasta el momento sabíamos que para la nucleación del CBs es

imprescindible la interacción de la sDMA-coilina con el factor SMN y con el complejo Sm de las las snRNPs espiiceosomales (Hebert y cols., 2002; Kaiser y cols., 2008). Nuestro trabajo de Tesis Doctoral demuestra que la lisina 119 del factor SMN es también esencial para este proceso.

Sobre la base de lo comentado anteriormente, en el esquema de la Figura 42 proponemos la siguiente secuencia teórica que explicaría la participación de SUMO1 en el ensamblaje CB: (1) La sumoilación de K119 provoca un cambio conformacional en el dominio TUDOR de la SMN que expone sitios adicionales de unión de alta afinidad con las sDMA de la caja RG de la coilina. (2) Una vez establecida la interacción entre el complejo snRNP y la coilina, el factor SMN se disocia de la snRNP, probablemente por desumoilación de la K119. (3) Los complejos snRNP-coilina sin SUMO1 dirigen el reclutamiento de otras moléculas necesarias para completar la maduración de las snRNPs y de snoRNPs (Morris, 2008). (4) En ausencia de K119, se produce la sumoilación alternativa en otras lisinas de menor probabilidad que no inducen el cambio conformacional que favorece la interacción con la coilina, la nucleación de complejos snRNP-coilina y el ensamblaje de CBs canónicos. (5) La presencia de SUMO1 en los microCBs inducidos por la mutación en la K119 puede deberse a un acúmulo de SMN sumoilizada en otras lisinas con poca afinidad por la coilina. Alternativamente, la retención de SUMO1 en los microCBs puede reflejar un déficit en el proceso de desumoilación del factor SMN.

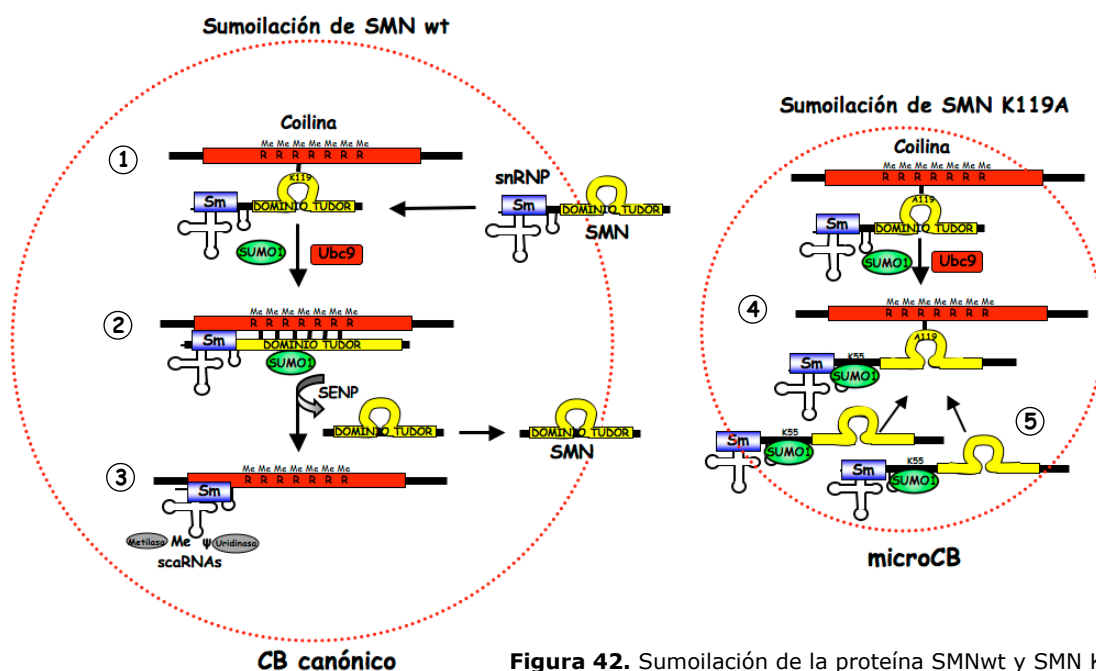


Figura 42. Sumoilación de la proteína SMNwt y SMN K119A

Estudios futuros estarán destinados a conocer con técnicas de FRAP y FLIP la dinámica molecular de los microCBs y CBs así como la existencia de procesos de fusión y fisión. Todo ello nos permitirá profundizar en el conocimiento de la conducta de los CBs en respuesta a diferentes situaciones experimentales.

6. Conclusiones

6.1 IMPORTANCIA DE LA METILACION DE LA COILINA PARA EL ENSAMBLAJE DEL CB Y PARA SUS INTERACCIONES MOLECULARES

1. La delección del gen *MTAP* conduce a un estado de hipometilación de proteínas en las células MCF7 *MTAP*^{-/-}, que afecta de modo particular a la coilina.
2. El estado de metilación de la coilina determina su destino nuclear.
3. La metilación de la coilina es necesaria para el ensamblaje y mantenimiento de los CBs en cualquier localización nuclear: libres en el nucleoplasma o intranucleolares.
4. La coilina no metilada no se ensambla en CBs, se compartimentaliza en el nucleolo, asociada el CFD, y no está implicada en la biogénesis de snRNPs.
5. La hipometilación de la coilina es probable que induzca cambios conformacionales que expongan la NoLS y/o favorezcan la interacción con proteínas residentes del nucleolo.
6. La coilina intranucleolar no interfiere con la transcripción de los genes ribosomales y puede representar un depósito de una forma inactiva de la proteína, pero reutilizable para la formación de nuevos CBs tras su metilación.
7. Los microCBs pueden representar precursores tempranos de los CBs que, dependiendo del estado de metilación de la coilina, se fusionan en CBs canónicos.

6.2. PARTICIPACION DE SUMO1 EN EL ENSAMBLAJE MOLECULAR DEL CUERPO NUCLEAR DE CAJAL

8. El CB es un compartimento nuclear que concentra SUMO1 activo, la enzima de conjugación Ubc9 y sustratos de SUMO1, por lo que representa un nuevo dominio nuclear donde se produce la conjugación con SUMO1.
9. SUMO1 está implicado en la reorganización molecular de los CBs durante la diferenciación de las células UR61 y en la reformación de CBs durante la respuesta neuronal al estrés.
10. El factor SMN es un sustrato de SUMO1. La lisina 119 de la secuencia consenso de sumoilación es esencial para el correcto ensamblaje de los CBs.

