

## Tesis Doctoral

# Regulación de la proteína quinasa Akt por conjugación a SUMO

Risso, Guillermo Javier

2013-03-27

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:

Risso, Guillermo Javier. (2013-03-27). Regulación de la proteína quinasa Akt por conjugación a SUMO. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Risso, Guillermo Javier. "Regulación de la proteína quinasa Akt por conjugación a SUMO". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-27.

**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

# Regulación de la proteína quinasa Akt por conjugación a SUMO

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Guillermo Javier Risso**

Director de tesis: **Dra. Anabella Srebrow**

Consejero de Estudios: **Dr. Alberto Kornblihtt**

Lugar de trabajo: IFIBYNE-CONICET; FCENyN-UBA

Buenos Aires, 2013

## **Regulación de la proteína quinasa Akt por conjugación a SUMO**

La proteína quinasa Akt está involucrada en una gran variedad de procesos celulares tales como supervivencia, crecimiento, proliferación, migración, angiogénesis, metabolismo, resistencia a estrés, entre otros. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral descubrimos una nueva modificación post-traducciona para esta quinasa, la conjugación a SUMO. Realizando mutaciones puntuales pudimos mapear los sitios blanco de SUMOilación en esta proteína, los aminoácidos lisina 276 y 301. Una proteína doble mutante en K276R y K301R (2KR) mostró niveles disminuidos de SUMOilación. De modo interesante, la sobre-expresión de Akt1 2KR no aumenta, y hasta inhibe, los niveles de fosforilación de un patrón global de sustratos de Akt. En este sentido demostramos que la conjugación de SUMO a Akt es necesaria para la mayoría de los procesos estudiados en los que esta quinasa participa, tales como activación del factor de transcripción NFκB, regulación del *splicing* alternativo, progresión del ciclo celular y supervivencia celular. Sin embargo, la función inhibitoria de Akt sobre el factor de transcripción FOXO1 no depende de su SUMOilación. Por otro lado, alteraciones en los niveles de fosforilación de Akt1 no afectan los niveles de SUMOilación de esta quinasa, y viceversa. Por último observamos altos niveles de SUMOilación en una variante hiperactiva de esta quinasa (Akt E17K) encontrada en diferentes tumores humanos. Esta hiperactividad de Akt E17K se ve afectada por la disminución en sus niveles de SUMOilación. Estos resultados son muy alentadores y permitirán en el futuro intentar determinar la relación de la conjugación de SUMO a Akt con la participación de esta proteína en el desarrollo y progresión tumoral.

Palabras Clave: AKT – SUMO – MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES – TRADUCCION DE SEÑALES – REGULACION DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

## **Regulation of Akt protein kinase by SUMO conjugation**

The protein kinase Akt is involved in a large variety of cellular processes such as survival, growth, proliferation, migration, angiogenesis, metabolism, stress resistance, among others. During the course of this thesis we discovered a new post-translational modification for this kinase, SUMO conjugation or SUMOylation. Performing point mutations we mapped the SUMO conjugation sites within this protein, the lysine residues 276 and 301. A double mutant protein K276R and K301R ("2KR") showed lower levels of SUMOylation. Interestingly, over-expression of Akt1 2KR does not increase, and even inhibits phosphorylation levels of a global pattern of Akt substrates. In this regard, we demonstrated that SUMO conjugation to Akt is necessary for most of the studied processes in which this kinase participates, such as activation of the transcription factor NFκB, alternative splicing regulation, cell cycle progression and cell survival. However, the inhibitory role of Akt on FOXO1 transcription factor does not depend on its SUMOylation. Furthermore, alteration of Akt1 phosphorylation levels does not affect its SUMOylation levels and vice versa. Finally, we observed increased levels of SUMOylation in a hyperactive variant of this kinase (Akt E17K) found in various human tumors. This hyperactivity of Akt E17K is affected by the decrease on its SUMOylation levels. These results are very encouraging and will allow determining the connection between the conjugation of SUMO to Akt with the participation of this protein in tumor development and progression.

Keywords: AKT – SUMO – POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS – SIGNAL TRANSDUCTION – GENE EXPRESSION REGULATION

## ..... Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, que me brindó educación con docentes y científicos de excelencia. Asimismo, agradecer al CONICET por haber hecho posible mi dedicación exclusiva a este proyecto.

Creo que ésta es la parte más importante de la tesis, y sí, puede ser que haya escrito un poquito demasiado, pero aun así estoy seguro de que me estoy olvidando de muchas personas.

A Anabella. Primero por haberme aceptado en laboratorio, hacerme sentir como en casa desde el primer día, haber confiado en mí para estos 5 años (que van a ser 7) trabajando juntos. Por estar siempre dispuesta a discutir los experimentos, dispuesta a ayudarme a resolver cada ínfimo problema que se me fue presentando en estos años. Por ser una gran docente (hasta casi me enseñaste a escribir!) con una dedicación envidiable. Pero por sobre todas las cosas por ser una gran persona. Siento orgullo de poder decir esto de “mi jefa”. No puedo haber tenido más suerte al elegir el laboratorio donde hacer mi tesis. Me enseñaste que se puede dirigir sin ponerte en el lugar de poder, si no aconsejándome, ayudándome, entendiéndome y dándome la libertad para hacer las locuras que se me ocurrían, a veces seguro sabiendo que ese no era el mejor camino, pero sabiendo que? era el mío. Me reafirmaste el verdadero orden de las cosas, para vos siempre están primero las personas, y después viene el resto (llámese experimentos, publicaciones, reconocimiento).

A Alberto, el motor invisible de las tan ricas discusiones científicas que se dan en el labo. El espíritu crítico que nos contagió a todos desde el primer día, las hace posibles. Observar el amor que tiene por la ciencia, incluso ante cada resultadito nuevo de todos los días, es algo que te llena de brillo. Realmente eligió la profesión correcta, y no porque se haya llenado de logros en el camino, si no por lo que siente todos los días. Y todo esto es algo que te llega, y mucho.

A los chicos del labo,

Vale: Un corazón gigante. Sin Vale nunca podría haber hecho este doctorado. Es el bastión principal del labo. Ella hace que todo funcione no solo dentro sino también

afuera del labo. Qué lindos asaditos hemos disfrutado! Creo que no tengo ídolos, pero de elegir algunos en la vida son vos y Martin. Ojalá sea una parte de lo copados que son uds!

Manu y Juan: Los más grandes del labo y mi primer choque con la realidad de la ida de los compañeros. Se fueron hace 4 años y todavía me quedan cosas de ellos, como esas charlas científicas nocturnas, del estilo: viste que mapearon y siguieron desde 0 a 1000 las células en la embriogénesis del *C. elegans*?

Mati: Un amigo. Desde que llegué al labo me enseñó muchas cosas, desde pipetear hasta por qué vale la pena luchar. Me enseñó a enroscarme un poco (y te odio por eso jeje), y el día de hoy seguimos colaborando, no sólo porque pensamos que pueden salir cosas buenas... si no porque nos gusta compartir!

Fede: Ufff cuantos sentimientos me hiciste tener en todos estos años. Gracias por haberme enseñado mucho de lo que sé para llevar a cabo este trabajo. La fuerza (tomada de todos lados), la claridad y la obsesión con la que encarás este trabajo todos los días son envidiables.

Mariano: Qué personaje! Cómo se extrañan los partiditos de futbol que organizabas, andá esperándome por las Europas con los botines puestos.

Petry: Gordito! El apoyo todos los días. Mi alma gemela en los fogones, aunque a veces toquemos sólo para nosotros dos. No puedo creer que ya te vas, pero que lindo ver que te vaya tan bien. Ahh y como te disfruté en cada uno de esos 10 minutos de soltería jaja. Lo único que tengo para decirte es: "Cómo será la laguna que el chanco la cruza al trote."

Manolo: Qué loco lindo! Las charlas de futbol, la música, los discos recomendados, la fuerza y obstinación con la que encara su trabajo...la verdad un ejemplo. Menos mal que te quedás, de paso tengo a alguien a quien preguntarle: Y, sabés si volvió Riquelme?

Nacho: Otro fogonero. Me supo decir de las cosas más duras y que a la vez me dé cuenta enseguida de que no fue mala onda. Cómo te exprimí científicamente, al principio y como gran persona al final.

Celi: Cómo me gusta que exista Celi. No paro de aprender de cosas extrañas, desde historia, matemática, pasando por física cuántica. Hasta aprendí que 0,999 no es igual a 1... o era que sí era igual...?? bueno no sé pero al menos pasamos un buen rato discutiéndolo.

Gwendal: El francés más renegado del mundo jajaja. Gracias por tener alguien con quien hablar de técnicas de proteínas, más allá del RNA.

Lucha: La reidora oficial de Petry. Me encanta (no es irónico) esa forma dura de decirme las cosas sin pelos en la lengua, con una seguridad que desmorona, que me sirvió muchas veces para abrir los ojos ante alguna pelotudez que estaba haciendo.

Ana Q: Una de las personas más lindas que conocí en mi vida, con una vocación de ayudar envidiable en todo sentido. Recuerdo esas noches en el labo cuando yo ya no quería largar más experimentos, pero seguía con la duda de hacerlo o no, y estaba ella al lado diciendo: Dale, dale largalos, dale que yo me quedo con vos! Cómo me mejoraste como persona!!

Berta: Que personaje curioso. Tu sueño es ser un poco esquiva, pero sos lo más transparente que existe. No me voy a olvidar nunca cómo me ayudaste con los experimentos en esta última etapa, sin nada a cambio. Fuiste una gran compañera en el afuera, divirtiéndome, escuchándome, muchas gracias bertuchi!

Mica, Anita y Nico: Los pendex del labo. Qué futuro! Jeje. Gracias Nico por los anticuerpos... ah no pará!, eras vos el que me los pedía! Jeje. Gracias Mica y Anita por la amabilidad y sonrisa de todos los días y por sobre todo por sus salidas extrañas (sobre todo para mí, con mi cabeza pueblerina), estoy seguro que me van a hacer reír todos los almuerzos de los próximos años!

Pablo y Lu G: los nuevos, les agradezco por adelantado jaja.

No me quiero olvidar de los chicos de otros labos del instituo que están ahí siempre firmes para prestar reactivos, aconsejar sobre protocolos y tomar un fernecito los viernes!! Archis (Jose, Fer, Maria, Marian, Andres, Carli, Sergio), Cosos (July, Dai, Sol), Cramer (Flor), Colmans (Lu, Rodri, Ali, Manu, Alan).

A Mr Orlando Andrada, qué baron!! De los con "b" larga. Me encanta tu predisposición a organizar y hacer cosas para los demás. Esos momentos disfrutando cada uno de tus platos exquisitos (empanadas, locro, lomo) me los llevo en el fondo del corazón.

A Dani por los mates delas mañanas y las risas de todo el día, y obvio por sacarme de esos enredos burocráticos, en los que nunca entiendo nada.

También por ésta tesis les debo mucho a dos personas que me ofrecieron siempre su ayuda sin tener por qué hacerlo, y se desvivieron para que llegue a Marzo con una tesis, muchas gracias a los técnicos Marie y Pepe.

A mis amigos. Qué puedo decir, todos saben que para mí los amigos lo son todo en la vida. Hasta diría que la vida es sólo el hecho de cosechar lindas personas en el camino. En el labo siempre me cargan, seguro que hay algún amigo de Guille que hace esto o aquello jaja, pero sepan que no me pueden decir nada más lindo. Yo, sin el apoyo de todas y cada una de estas personas no hubiera conseguido nada, repito...nada.

Primero mi familia de Buenos Aires. Cuando me vine de Carmen (ya hace como doce años) comencé a conocer gente y esa gente se fue convirtiendo de a poco en el apoyo de todos los días para disfrutar, sufrir, delirar y conquistar la “gran ciudad”. Por eso los llamo “mi flia de Bs As”. Para empezar, fueron las personas hicieron que yo termine esta carrera. Sin el apoyo y la ayuda de ellos yo nunca hubiera aprobado ni tan solo un parcial. Luego se agregaron muchos que de una y otra manera me hicieron crecer como persona y fueron un palenque donde apoyarse en toda esta etapa de mi vida porteña. Muchas, pero muchas gracias a todos. Cris, Rafa, Nico U, Nico R, Agos, Cecil (mi hna del alma), Chechu, Mechi, Marcos, Charly, Toti, Peter, Belén, Andy, Manu, Fer, Marto, Diego C, Maria G, Maria Z, Ali, Cami, Yas, José. En especial quiero agradecer a Rasco y Rafa por seguirme, y dejarme seguirlos a ellos en cuanto viaje y experiencia se nos ocurría, además teniendo charlas de esas que solo los científicos (y por ahí un poco nerds) podemos tener. Me alegro mucho de haber vivido esta etapa en Argentina y disfrutar a full todas estas personas.

Por otro lado quiero agradecer a mis amigos de Carmen que me hacen ver todos los días que la ciencia y la superación académica no es lo único que hay en la vida y me enseñan que hay cosas mucho más importantes que la superación personal, son mi cable a tierra. Coco, Paga, Alli, Gato, Chimi, Churry, Emi, Isoco, Cabezón, Mare, Marito, Emilio, Willy, Tony, Divi, Leo, Gabi, Ingles, Caru, Bren, Agus, Aldo.

A mis viejos. Cuando hablo de ellos se me hace muy difícil separarlos, porque siempre fueron uno. Y ahora sí, más que nunca pienso que suerte que tuve en la vida. Pero suerte posta! Me dieron de chiquito la libertad justa para que siempre me valga por mis propios medios. Así salí discutiendo (lo que incluye a la ciencia), pero siempre siempre estuvieron ahí, ahí y ahí. Un solo siempre y un solo ahí no reflejarían bien la realidad. Me apoyaron



y me incentivaron para que le dé para adelante con cualquier locura que se me ocurrió. Cuando no era hacer mil deportes, era ser presidente de una asociación ecológica (con programa de TV incluido) y coroné con un: "viejos voy a estudiar Biología" jeje. Salí con eso que ni siquiera yo sabía lo que significaba y me bancaron a muerte, y nunca dudaron ni un poco (ni siquiera en épocas más jodidas) que yo tenía que venir a estudiar a Bs As. Todo lo que soy es por y para ellos. No me va a alcanzar la vida para agradecerles suficiente, solo espero llegar a ser un 5% de lo que son uds como personas. Y ojala pueda ser tan claro como ustedes lo fueron conmigo. Gracias Mil!!

A mis hermanas Vero y Laura por haber soportado todo el depto despelotado cada vez que me quedaba un finde. Por haber sido ejemplos a seguir y haberme mostrado el camino de cómo podía realizarme profesionalmente. Y ahora también me siguen mostrando el camino de cómo seguir en esto de la vida. La personificación de esto son dos hermosisisisisisisisimos sobrinos: Borja y Male.

Llegó el momento de "La Flaca", uyyy que difícil!! Como agradecer tanto? La sonrisa de todos los días, el bancarme incondicionalmente con cualquier ocurrencia (cualquiera que me conozca un poco sabe que son muchas), las comidas juntos, la música, el escucharme paciente, la paz, pero por sobre todo las cosas la simpleza. Simpleza para decirme las cosas, simpleza para hacerme entenderlas, simpleza para esperar de mi, simpleza para dar, simpleza para andar, es decir la vida es mucho más simple con vos al lado!!

*"Cambiaré de opinión tantas veces y tan a menudo como adquiriera nuevos conocimientos. El día que perciba que mi cerebro ha dejado de ser apto para estos cambios dejaré de trabajar. Compadezco de todo corazón a todos los que después de haber adquirido y expresado una opinión no puedan abandonarla nunca más".*

Florentino Ameghino (1854 -1911)

# INDICE

---

<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1.1. PROTEÍNA QUINASA AKT</b>	<b>7</b>
1.1.1. Historia de una quinasa	7
1.1.2. Estructura proteica de Akt	8
1.1.3. Isoformas de la proteína quinasa Akt	10
1.1.4. Mecanismos clásicos de activacion/inactivación de akt	11
1.1.5. Sustratos de Akt	13
1.1.6. Procesos celulares en los que participa Akt	18
1.1.7. Modificaciones post-traduccionales de Akt	21
1.1.8. Akt y cancer	24
1.1.9. Antecedentes de nuestro grupo en el estudio de la proteína quinasa Akt	27
<b>1.2. MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL POR SUMO</b>	<b>30</b>
1.2.1. Un poco de historia – La familia de proteínas tipo ubiquitina	30
1.2.2. La familia SUMO	31
1.2.3. Mecanismo de conjugación	32
1.2.4. Secuencias blanco de SUMOilación	35
1.2.5. Proteasas específicas de SUMO	36
1.2.6. Consecuencias de la SUMOilación	37

1.2.7.	Antecedentes de nuestro grupo en el campo de la sumoilación de proteínas	40
<b>OBJETIVOS</b>		<b>42</b>
2.1.	<b>GENERAL</b>	42
2.2.	<b>ESPECÍFICOS</b>	42
<b>MATERIALES Y METODOS</b>		<b>43</b>
3.1.	<b>CULTIVO CELULAR</b>	43
3.1.1.	Líneas celulares	43
3.1.2.	Transfecciones con ADN	43
3.1.3.	Transfecciones con ARN	44
3.1.4.	Ensayos de Luciferasa	45
3.1.5.	Extracción diferencial de fracciones nucleares y citoplasmáticas	45
3.1.6.	Determinación de perfiles de ciclo celular por citometría de flujo	46
3.2.	<b>PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CONJUGADAS A 6XHIS-SUMO1</b>	47
3.3.	<b>TÉCNICAS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA</b>	48
3.3.1.	Inmunoprecipitación	48
3.3.2.	Ensayos de GST pull-down	48
3.4.	<b>PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y ENSAYOS IN VITRO</b>	49
3.4.1.	Producción de proteínas recombinantes en bacterias	49
3.4.2.	Producción de proteínas recombinantes en células HEK293T	50
3.4.3.	SUMOilación in vitro de Akt1	51
3.4.4.	Western blot y anticuerpos utilizados	51
3.5.	<b>PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS</b>	52
3.5.1.	Transformación de bacterias	52

3.5.2.	Preparación de plásmidos	52
3.5.3.	Cuantificación de los plásmidos	53
3.5.4.	MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	54
<b>3.6.</b>	<b>ARN, RT &amp; PCR</b>	<b>55</b>
3.6.1.	Purificación de ARN	55
3.6.2.	Transcripción reversa (RT)	56
3.6.3.	PCR: minigénes reporteros de <i>splicing</i> de EDI y BclX	57
<b>RESULTADOS</b>		<b>59</b>
<b>4.1.</b>	<b>AKT1, SRPK1 Y SRPK2 SON SUSTRATO DE SUMOILACIÓN</b>	<b>59</b>
<b>4.2.</b>	<b>SF2/ASF MODULA LA SUMOILACIÓN DE AKT1</b>	<b>64</b>
<b>4.3.</b>	<b>SUMOILACIÓN DE AKT1</b>	<b>68</b>
<b>4.4.</b>	<b>E3 LIGASAS DE LA VÍA DE SUMOILACIÓN Y AKT1</b>	<b>71</b>
<b>4.5.</b>	<b>RELACIÓN DE LA SUMOILACIÓN DE AKT1 CON RESPECTO A SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR</b>	<b>73</b>
<b>4.6.</b>	<b>LISINAS BLANCO DE SUMOILACIÓN DE AKT</b>	<b>75</b>
<b>4.7.</b>	<b>RELACIÓN ENTRE LA SUMOILACIÓN Y LA ACTIVIDAD GENERAL DE AKT1</b>	<b>82</b>
<b>4.8.</b>	<b>EFFECTOS DE AKT WT Y 2KR SOBRE LA ACTIVIDAD DE DOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, FOXO1 Y NFkB</b>	<b>84</b>
<b>4.9.</b>	<b>SUMOILACIÓN DE AKT Y LA REGULACION DEL <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO</b>	<b>89</b>
<b>4.10.</b>	<b>EFFECTOS DE AKT WT Y 2KR EN CICLO CELULAR</b>	<b>95</b>
<b>4.11.</b>	<b>RELACIÓN ENTRE LA SUMOILACIÓN Y LA FOSFORILACIÓN DE AKT</b>	<b>100</b>
<b>4.12.</b>	<b>SUMOILACIÓN DE AKT Y CANCER</b>	<b>107</b>
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>110</b>

<b>5.1. AKT Y SU RELACIÓN CON PROTEÍNAS E3 LIGASAS DE LA VÍA DE SUMOILACIÓN</b>	<b>111</b>
<b>5.2. UNA PROTEÍNA MUTANTE, AKT 2KR.</b>	<b>112</b>
<b>5.3. RELACIÓN ENTRE FOSFORILACIÓN Y SUMOILACIÓN DE AKT</b>	<b>115</b>
<b>5.4. REGULACIÓN DE AKT POR SUMOILACIÓN</b>	<b>115</b>
<b>5.5. EL ENIGMA DE SUMO</b>	<b>117</b>
<b>5.6. EL ENIGMA DE AKT</b>	<b>118</b>
<b>5.7. SUMOILACIÓN DE AKT Y CANCER</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>120</b>

## ABREVIATURAS

---

ADNc: AND copia

AGC: Protein kinase A, G, and C families

Akt: Proteína quinasa B

ARNm: ARN mensajero

Clk/Sty: Cdc2-like kinase

E1: Enzima activadora de Ub/Ubl

E2: Enzima conjugadora de Ub/Ubl

E3: Ligasa de Ub/Ubl

FBS: Fetal bovine serum

FOXO1: Forkhead box protein O1

GST: Glutathione S-transferase

KDa: Kilo Daltons

MDM2: Mouse double minute 2 homolog

NDSM: Negatively charged aminoacid-dependent SUMOylation motif

NF $\kappa$ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

nSBs: Nuclear stress bodies

Pc2: Polycomb group 2

PDSM: Phosphorylation-dependent SUMOylation motif

PH: pleckstrin homology

PKA/B/C: Proteína quinasa A/B/C

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

RTKs: Receptores tirosina quinasa

SAE: SUMO Activating Enzyme

SF2/ASF: Splicing Factor 2/Alternative Splicing Factor

SIM: SUMO-interacting motif

siRNA: small interfering RNA

snRNP: small nuclear Ribonucleoprotein Particle

SRPK: SR protein kinase

SUMO: Small Ubiquitin-Related Modifier

Topo I: Topoisomerasa I

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

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



# INTRODUCCIÓN

---

---

## 1.1. PROTEÍNA QUINASA AKT

---

### 1.1.1. HISTORIA DE UNA QUINASA

---

Los orígenes de las investigaciones sobre Akt se remontan a su descubrimiento por Staal y colaboradores en el año 1977, en un virus transformante de leucemia, en ratones con una alta incidencia de linfomas espontáneos (Staal et al., 1977). Este virus, llamado Akt8, producía focos de transformación maligna en la línea celular epitelial CCL-64. El grupo de Staal aisló este retrovirus a partir de la línea CCL-64 infectada con Akt8 y demostró que contenía una secuencia oncogénica procedente de la célula, a la cual llamaron Akt. A pesar de las características importantísimas de esta secuencia oncogénica llamada Akt, la verdadera identidad del oncogén transformante responsable de estos efectos permaneció desconocida por muchos años.

En 1991, tres grupos de investigación identificaron independientemente el gen correspondiente a Akt. El primero de estos reportes (Jones et al., 1991) identificó un gen que codificaba para una serina/treonina quinasa, a la que llamaron Rac (del inglés *related to protein kinase A and C*), posteriormente renombrada Akt/PKB. Estos autores demostraron su actividad quinasa *in vitro* utilizando histona H1 como sustrato. El mismo año, un segundo reporte de Bellacosa y colaboradores (Bellacosa et al., 1991) describió el clonado de v-Akt, previamente identificado por Staal y colaboradores. La proteína codificada por el ADNc que aislaron constituía una fusión entre la proteína viral Gag y la isoforma  $\alpha$  de PKB/Akt. En forma similar al reporte de Jones y colaboradores, describieron la semejanza de Akt con PKC y sugirieron que la migración retardada de la proteína en un SDS-PAGE era el resultado de la fosforilación de la misma. Finalmente, Coffey y Woodgett usaron una técnica de *screening* por PCR para identificar un nuevo ADNc de homología significativa con PKA y PKC, al que llamaron PKB (Coffey y Woodgett, 1991). Junto con el descubrimiento de una segunda isoforma Akt2/PKB $\beta$ ,

estos tres trabajos establecieron a Akt como una nueva proteína quinasa ampliamente expresada y allanaron el camino para futuros experimentos que determinarían la implicancia de esta quinasa en diversos procesos celulares.

---

### 1.1.2. ESTRUCTURA PROTEICA DE AKT

---

El análisis de la secuencia aminoacídica de Akt revela la existencia de una región N-terminal denominada *pleckstrin homology* (PH) que comprende cerca de 100 aminoácidos. Este motivo fue reconocido inicialmente en la pleckstrina, el principal sustrato de PKC en las plaquetas, pero luego de la secuenciación del genoma humano se lo describió en 223 genes diferentes. A pesar que el dominio PH no está altamente conservado entre estos genes a nivel secuencia, su estructura proteica sí lo está. Esta consta de siete láminas plegadas  $\beta$  anti-paralelas que forman un bolsillo hidrofóbico constituyendo módulos con afinidad de unión a lípidos, además de estar involucrados en interacciones proteína-proteína. A continuación del dominio PH, la secuencia de Akt consta de un pequeño segmento conector  $\alpha$ -hélice, un dominio catalítico o quinasa y un dominio hidrofóbico C-terminal regulatorio (Figura I1).

Akt pertenece al grupo de proteínas quinasas que integran la llamada familia AGC (proteína quinasa A, proteína quinasa dependiente de GMPc y proteína quinasa C). Las AGC quinasas contienen regiones de alta homología en sus dominios quinasa. Además, para su completa activación requieren ser fosforiladas tanto en un residuo del dominio quinasa (Treonina 308 -T308- para Akt1) como en otro ubicado en el dominio hidrofóbico C-terminal (Serina 473 -S473- para Akt1). (Figura I1)

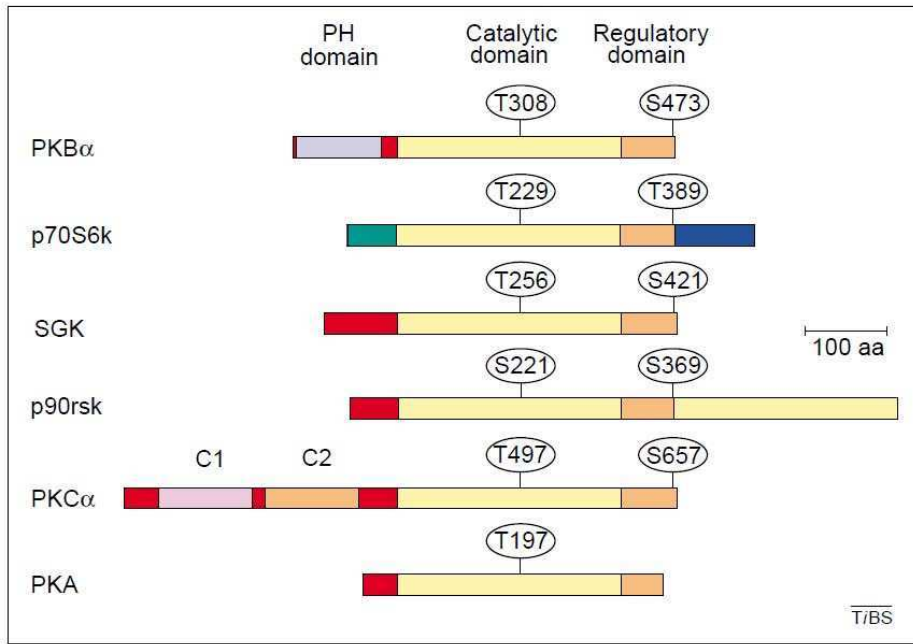


Figura 11 | **Estructura de dominios de la familia de proteínas quinasas AGC.** Se esquematizan en distintos colores los diferentes dominios de algunos miembros de la familia de proteína quinasas AGC. Tomado de (Brazil y Hemmings, 2001).

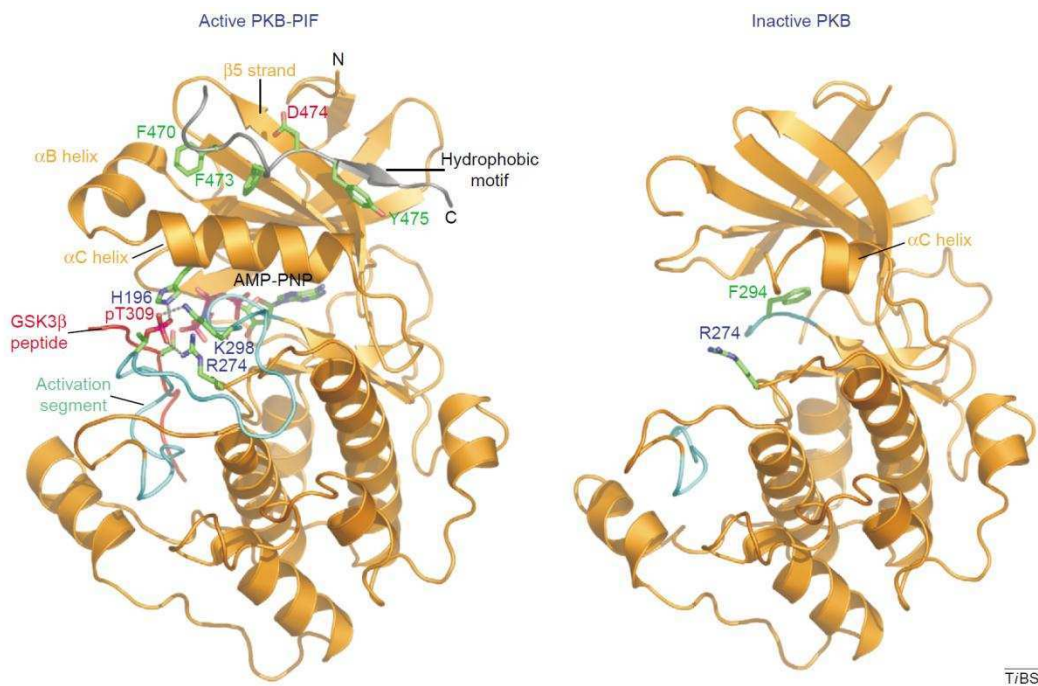


Figura 12 | **Estructura terciaria de Akt.** Diagrama de Ribbons en donde se muestra la estructura terciaria de los dominios quinasa e hidrofóbico de Akt, tanto de la quinasa cristalizada en estado inactivo (derecha) o como la cristalizada en estado activo (izquierda). Para lograr cristalizar esta última se cristalizó la quinasa en complejo con un péptido sustrato y un análogo de ATP (Yang et al., 2002).

---

### 1.1.3. ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA QUINASA AKT

---

Hasta la actualidad, se han identificado tres isoformas de Akt en células de mamíferos: Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  y Akt3/PKB $\gamma$  (Figura 13)(Brazil y Hemmings, 2001) involucradas en el metabolismo de la glucosa, regulación de la transcripción, proliferación celular, apoptosis, migración y angiogénesis. Las tres isoformas son muy similares en cuanto a secuencia aminoacídica y estructura proteica, y poseen los tres dominios antes descritos. Se encuentran codificadas por genes ubicados en distintas regiones cromosómicas, correspondiendo en humanos a la ubicación 14q32.32 para Akt1, 19q13.1-q13.2 para Akt2, y 1q43-q44 para Akt3. Estos tres genes dan lugar mayoritariamente a una sola isoforma de mRNA cada uno. Se han reportado variantes por *splicing* alternativo de los tres genes, pero estos mRNAs son poco abundantes.

Mientras que el gen de Akt1 se expresa casi ubicuamente en todos los tejidos, la expresión de Akt2 es elevada en tejidos que responden a la insulina, como la grasa parda, el músculo esquelético y el hígado. La distribución de Akt3 es más restringida, principalmente se encuentra en testículos y cerebro (Hers et al., 2011). Muchos esfuerzos se están realizando para conocer la actividad y/o sustratos específicos para cada una de estas isoformas pero aún esto no ha podido ser profundamente comprendido. Estudios recientes con ratones *knockout* para las diferentes isoformas proveyeron información valiosa para comenzar a entenderlo. Ratones *knockout* para la isoforma Akt1 muestran un incremento en la tasa de mortalidad neonatal y un retardo en el crecimiento (los ratones son más pequeños), y además, células nulas para Akt1 muestran mayores niveles de apoptosis. Esto indica un rol crítico para Akt1 en crecimiento y supervivencia celular. Ratones *knockout* para la isoforma Akt2 desarrollan resistencia a la insulina, síndrome similar a la diabetes tipo II y pérdida del tejido adiposo en edades avanzadas. Más aún, células derivadas de estos ratones muestran una utilización defectuosa de la glucosa. Todo esto sugiere un rol central de Akt2 en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa. Los ratones *knockout* para Akt3 se caracterizan por tener una reducción en el tamaño y peso del cerebro, lo que indica un rol esencial de esta isoforma en el desarrollo pos-natal del cerebro. Aunque estos datos apoyan fuertemente la hipótesis de que diferentes procesos celulares están principalmente bajo el control de distintas isoformas de Akt, análisis fenotípicos de ratones doble *knockout* para más de una isoforma de Akt revelan redundancia (o compensación) entre las isoformas. La depleción simultánea de Akt1 y Akt2 causa

letalidad rápidamente luego del nacimiento. Ratones dobles *knockout* para Akt1 y Akt3 son letales embrionarios. Sin embargo ratones con un único alelo funcional de Akt1 (Akt1+/- Akt2 -/- Akt3 -/-) son viables aunque muestran peso corporal reducido e intolerancia a la glucosa e insulina. (Figura I3)

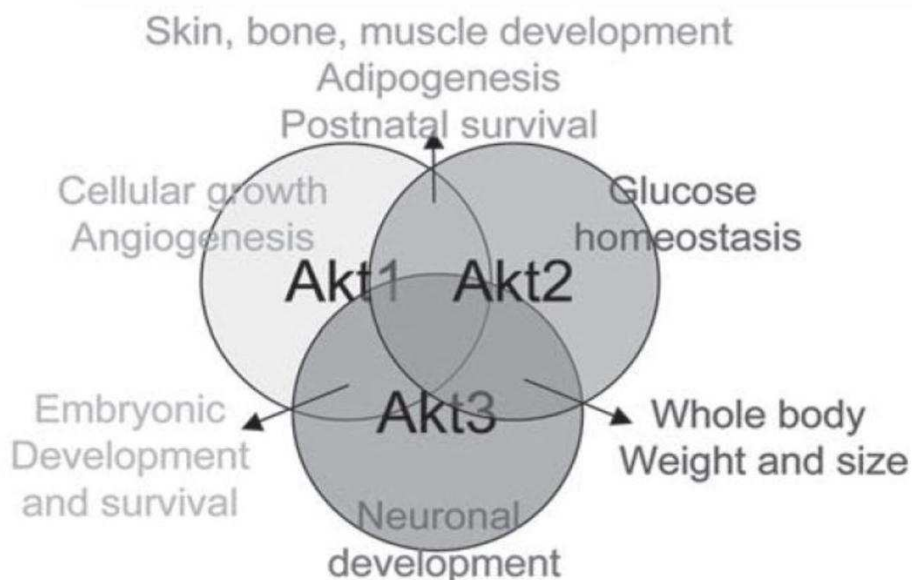


Figura I3 | **Funciones específicas y redundantes de las diferentes isoformas de Akt.** Tomado de (Gonzalez y McGraw, 2009)

---

#### 1.1.4. MECANISMOS CLÁSICOS DE ACTIVACION/INACTIVACIÓN DE AKT

---

Akt es activada clásicamente en respuesta a señales disparadas por factores de crecimiento y citoquinas, así como también estrés oxidativo, a través de receptores tirosina quinasa (RTKs). Al unir el ligando, estos receptores, activan la quinasa de fosfatidil-inositol 3 clase 1 (PI3K), ya sea por unión directa a esta o por fosforilación en tirosina de los factores *scaffold*, como IRS1, que luego unen a PI3K. Al activarse PI3K fosforila al fosfatidilinositol bifosfato (PI(4,5)P2) presente en la membrana plasmática generando fosfatidilinositol trifosfato (PI(3,4,5)P3). Tanto Akt como PDK1 (proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinositol 1), se posan en la membrana mediante la unión a

PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, a través de sus dominios PH. De esta manera, PDK1 fosforila a Akt en el *loop* de activación en el residuo T308. Por otro lado la señalización disparada por los RTKs también activa el complejo 2 de mTOR (mTORC2) que fosforila a Akt en el residuo S473, por un mecanismo aún desconocido. A diferencia de la fosforilación en T308 antes explicada, existe mucha controversia sobre cuál es la quinasa responsable de la fosforilación en la S473 de Akt. Han habido varios reportes de quinasas para esta serina entre las que se encuentran: PDK1, ILK1, MAPKAPK2, PKC\_II, PIKK, DNA-PK, ATM, y hasta se ha reportado auto-fosforilación de Akt para este sitio. Es probable que exista una actividad parcialmente redundante y que la identidad de la quinasa de S473 dependa del contexto fisiológico y celular dado (Fayard et al., 2005). Existen evidencias que sugieren que la fosforilación en S473 precede y facilita la fosforilación en T308 (Sarbasov et al., 2005). De hecho, la mutante que emula fosforilación en S473 (Akt1 S473D) y Akt1 monofosforilada en S473 por el mTORC2 son blancos más eficientes para PDK1 que Akt1 no fosforilada (Jacinto et al., 2006). Estos hallazgos sugieren que la fosforilación en S473 provee un sitio de anclaje para PDK1. La fosforilación de Akt1 en T308 causa un cambio conformacional inducido por la carga que permite al sustrato unirse con más afinidad y aumentar en forma considerable la tasa de catálisis, en forma similar a lo que ocurre con otros miembros de la familia de quinasas AGC. La fosforilación en T308 gobierna estrictamente la activación de PKB y su mutación a un residuo no fosforilable como alanina reduce significativamente su actividad (Alessi et al., 1996a).

Existen varios mecanismos que pueden revertir la activación de la vía de Akt. Uno de los mecanismos clásicos, y con mucha importancia debido a su relevancia clínica en cáncer, es el producido por acción de la proteína fosfatasa homóloga a tensina (PTEN). Esta fosfatasa puede llevar cabo la reacción de desfosforilación del PI(3,4,5)P<sub>3</sub> a PI(4,5)P<sub>2</sub>, y de esta manera impedir el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática y su consiguiente activación. Otro mecanismo clásico aún más indirecto proviene de la activación por Akt del complejo 1 de mTOR (mTORC1) a través de distintos mecanismos. Una vez activo, mTORC1 puede fosforilar residuos de serina en IRS1, lo que genera una marca en IRS1 para la degradación. Esto sirve como un mecanismo de retroalimentación negativa para atenuar la señalización PI3K/Akt. Además de estas vías, con el correr de los años se van encontrando más proteínas fosfatasa que pueden desfosforilar e inactivar directamente a Akt, como la proteína fosfatasa 1 (PP2A) o las proteínas fosfatasas de dominios PH y repeticiones de leucinas (PHLPP) (Figura I4) (Manning y Cantley, 2007).

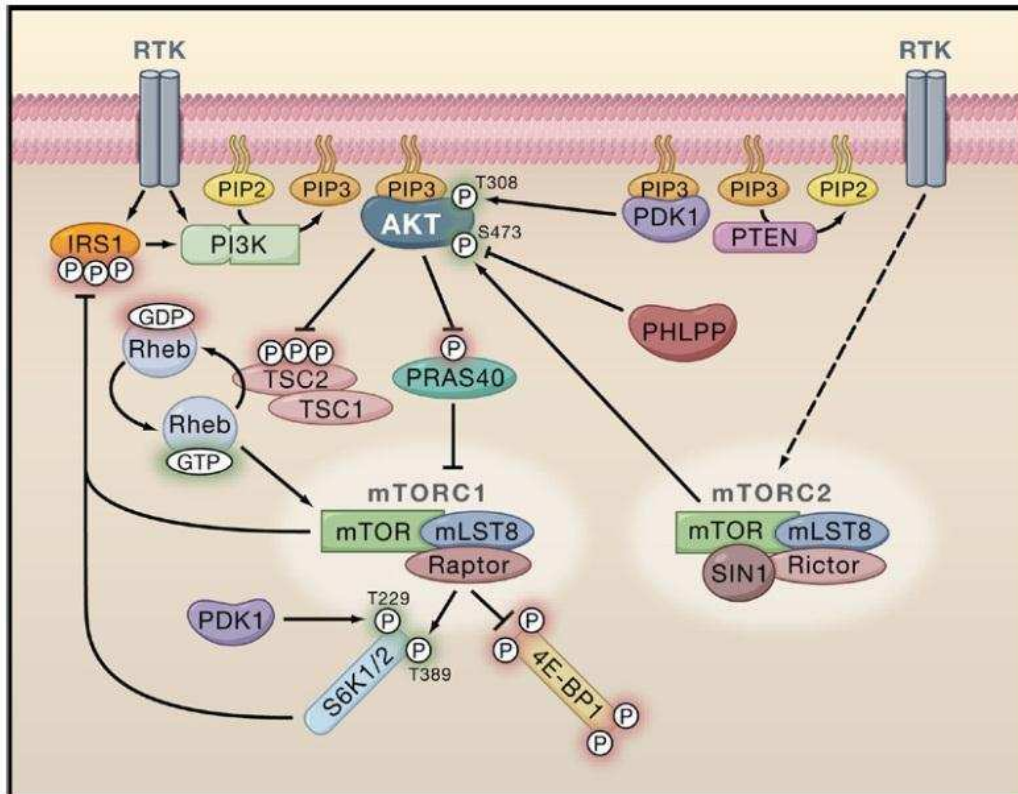


Figura 14 | Mecanismos de activación e inactivación de la quinasa Akt por factores de crecimiento. Tomado de (Manning y Cantley, 2007).

### 1.1.5. SUSTRATOS DE AKT

Tras la identificación de un residuo de la quinasa GSK3 como primer blanco directo de Akt en células de mamífero (Cross et al., 1995), experimentos pioneros con péptidos que contienen variantes de esta secuencia definieron el motivo mínimo de reconocimiento de Akt como sustrato en R-X-R-X-X-S/T-B (Alessi et al., 1996b), donde X representa cualquier aminoácido y B residuos hidrofóbicos voluminosos. El requisito fundamental de residuos R en las posiciones -5 y -3 (es decir, los residuos 5 y 3, respectivamente, N-terminal al sitio fosfo-aceptor) en péptidos eficientemente fosforilados por Akt distingue la especificidad de sustrato de Akt respecto de otras dos quinasas AGC



estimuladas por mitógenos, RSK (MAPKAP-K1) y S6K1 (p70S6K), que pueden tolerar K en estas posiciones.

Manning y Cantley realizaron una búsqueda cuidadosa en la literatura y se encontraron con más de 100 sustratos no redundantes de Akt, de los cuales aproximadamente un 25% no contienen en su secuencia peptídica un sitio con los requisitos mínimos de un sustrato de Akt (R-X-R-X-X-S/T). Además, muchos de los que contienen este motivo no han sido caracterizados más allá de ensayos de actividad quinasa *in vitro*. Estos investigadores se enfocaron en 18 sustratos para los que ha habido varios reportes publicados independientemente. Para dichos sustratos la Tabla 1 muestra los distintos análisis realizados y los criterios utilizados para definirlos como sustratos de Akt (Manning y Cantley, 2007).

Mediante la fosforilación de alguno de estos sustratos Akt puede regular directamente la actividad de los mismos, y por lo tanto, indirectamente la expresión génica tanto a nivel transcripcional, traduccional como postraduccional de muchos otros genes.

Target	Human Site(s) <sup>b</sup>	In Vitro <sup>c</sup>	In Vivo <sup>d</sup>			Genetic Evidence <sup>e</sup>	Regulatory Effect? <sup>f</sup>
			W/L	LOF	GOF		
FOXO1	T24, S256, S319	+	+	+	+	M, F, W	Inhibit
FOXO3A	T32, S253, S315	+	+	+	+	M, F, W	Inhibit
FOXO4	T32, S197, S262	+	+	+	+	M, F, W	Inhibit
TSC2	S939, T1462	+	+	+	+	M, F	Inhibit
GSK3 $\alpha/\beta$	S21/S9	+	+	+	+	M	Inhibit
RAF1	S259	+	+	+	+	-	Inhibit
PRAS40	T246	+	+	-	+	M	Inhibit
AS160	S588, T642	+	+	-	-	-	Inhibit
BAD	S99	+	+	+	+	-	Inhibit
WNK1	T60	+	+	+	-	M	?
MDM2	S166, S186	+	+	+	+	-	Activate
Chk1	S280	+	+	+	+	M	Inhibit
eNOS	S1177	+	+	+	+	M	Activate
ASK1	S83	+	+	+	+	-	Inhibit
IKK $\alpha$	T23	+	-	-	-	-	Activate
p21CIP1	T145	+	+	+	+	-	Inhibit
p27KIP1	T157	+	+	+	+	-	Inhibit
Casp9	S196	+	-	+	+	-	Inhibit

Tabla I1 | **Evidencias experimentales y características de algunos sustratos de Akt.** a) Nombre de la proteína sustrato de la quinasa Akt. b) Residuos fosforilados por Akt en células humanas. c) Evidencias de fosforilación del sustrato obtenida de ensayos de actividad quinasa *in vitro*. d) Evidencia de fosforilaciones dependientes de Akt en los sitios dados en células de mamífero que incluyen: W/L, sensibilidad a la inhibición de PI3K usando  $\leq 100\mu\text{M}$  wortmanina (W) y/o  $\leq 20\mu\text{M}$  de LY294002 (L); LOF, evidencia por pérdida de función de Akt usando mutantes dominantes negativos y/o estrategias de RNAi (RNA de interferencia); GOF evidencia por ganancia de función de Akt usando sobreexpresión



y/o mutantes constitutivamente activos. e) Evidencia genética en organismos modelo, que incluyen análisis de epítasis en *Drosophila* (F) o *C. Elegans* (W) o falta de fosforilación en ratones mutantes deficientes en Akt (M). f) Consecuencia funcional de la fosforilación mediada por Akt. Tomado de (Manning y Cantley, 2007).

A continuación ahondaremos en la información sobre sustratos o vías blanco de Akt pertinentes para esta tesis.

### ***Familia de factores de transcripción FoxO***

El primer estudio que muestra la regulación en mamíferos de la familia de factores de transcripción FoxO por Akt fue publicado por Brunet y colaboradores a principios de 1999 (Brunet et al., 1999). Este estudio demostró que Akt puede fosforilar FoxO3/FKHRL1 en los tres sitios predichos: T32, S253 y S315, tanto *in vitro* como *in vivo* y que esta fosforilación resulta en la exclusión nuclear de FoxO3. En consecuencia, el tratamiento de células con agonistas de PI3K tales como IGF-1 o suero, induce la fosforilación de FoxO3 y la exclusión nuclear, mientras que la inhibición de PI3K induce la desfosforilación de FoxO3 y su acumulación nuclear. Este estudio también demostró que las fosforilaciones en T32 y S253 median la unión de FoxO3 a la proteína adaptadora 14-3-3 $\zeta$ , lo que sugiere que las proteínas 14-3-3 facilitan el transporte núcleo/citoplasma de FoxO3. El estudio también identificó secuencias de ADN dentro de los promotores de los genes del IGF1R (secuencia de la insulina sensible, IRS) y el ligando Fas (forkhead elemento sensible, FHRE) que pueden funcionar como sitios de unión de FoxO3 y mostraron que la fosforilación por Akt regula la actividad transcripcional de FoxO3. Por último, el estudio mostró que la sobre-activación de FoxO3 puede inducir la apoptosis y por lo tanto, su inhibición por Akt puede explicar en parte la señalización de supervivencia dirigida por esta quinasa. En un estudio realizado en simultáneo al anterior (Kops y Burgering, 1999), se demostró una regulación similar de fosforilación y la actividad transcripcional de FoxO4/AFX por Akt. Estos fueron seguidos por numerosos estudios que demuestran la capacidad de Akt para fosforilar FoxO1/FKHR y otros miembros de la familia FoxO, corroborando este mecanismo regulador clave. Estos estudios fueron confirmados, también con DAF-16 y FoxO de

Drosophila, lo que demuestra la conservación de este mecanismo de regulación a través de la evolución (Tzivion et al., 2011).

Una de las preguntas abiertas relativa a los aspectos mecanísticos de la regulación de FoxO por Akt es en qué compartimento celular sucede la fosforilación. Aunque los estudios iniciales sobre la activación de Akt ofrecen un modelo en el que se produce la activación de Akt en la membrana plasmática seguido por la translocación de Akt activo al núcleo, la visión actual es que Akt también puede ser activado directamente en el núcleo por sub-grupos nucleares de PI3K que involucra la fosforilación por PDK1 y DNA-PK. Por lo tanto, es plausible que las proteínas FoxO puedan ser fosforiladas tanto en el citoplasma como en el núcleo, y que en diferentes condiciones distintos sub-grupos de Akt puedan dirigir la fosforilación de proteínas FoxO en diferentes compartimentos celulares. Se establece sin embargo que las proteínas FoxO fosforiladas en los sitios sustrato de Akt pueden ser detectadas principalmente en el citoplasma, mientras que FoxO nuclear está desprovista de fosforilación en estos sitios, lo que sugiere que incluso si las proteínas FoxO son fosforiladas en el núcleo, su vida media en este compartimento es corta.

### *Factor de transcripción NFκB*

Varios estudios han demostrado que la señalización de Akt puede activar al factor de transcripción NFκB frente una variedad de estímulos, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Ozes et al., 1999; Romashkova y Makarov, 1999). Es probable que existan múltiples niveles de entrecruzamiento entre las vías de PI3K-Akt y de NFκB. Un mecanismo que se ha propuesto implica la activación de la vía PI3K/Akt en respuesta al tratamiento de células en cultivo con TNF. Esto provocaría la fosforilación directa del aminoácido treonina 23 de IκB quinasa α (IKKα) por Akt, lo que conduce a la activación de esta quinasa río arriba de NFκB (Ozes et al., 1999). Al activarse IKKα, ésta fosforila al factor inhibitorio IκB, permitiendo la translocación de NFκB al núcleo, y por ende, aumentando su actividad transcripcional. Una mutante constitutivamente activa de Akt induce la actividad transcripcional de NFκB. La mutación por un residuo no fosforilable del aminoácido T23, blanco de fosforilación de Akt en IKKα, bloquea la activación de NFκB en respuesta a TNF.

Sin embargo, hasta la fecha esta conexión entre Akt y NFκB no se ha comprobado de manera concluyente *in vivo*. Más aún, existen trabajos con resultados controversiales a los anteriormente explicados en los que se concluye que la quinasa Akt es un blanco río abajo de la vía de NFκB.

### **MDM2 (Mouse double minute 2 homolog)**

La oncoproteína Mdm2 tiene actividad de E3 ligasa de ubiquitina. Promueve la supervivencia celular y la progresión del ciclo celular mediante la inhibición de la proteína supresora tumoral p53. Mdm2 regula la estabilidad de p53, promoviendo la ubiquitinación de p53 en el núcleo. La activación inducida por mitógenos de PI3K y por ende de la proteína quinasa Akt resulta en la fosforilación de las serinas 166 y 186 de Mdm2, mediada directamente por esta última quinasa (Ogawara et al., 2002). La fosforilación en estos sitios activa Mdm2. Por un lado la fosforilación de Mdm2 por Akt estabiliza a la proteína Mdm2 debido a que inhibe la auto-ubiquitinación constitutiva de esta proteína (Feng et al., 2004). Mas aún esta fosforilación también es necesaria para la translocación de Mdm2 desde el citoplasma al núcleo, donde lleva a cabo su función reguladora de p53 (Mayo y Donner, 2001). El bloqueo farmacológico de la vía PI3K/Akt o la sobre-expresión de un dominante-negativo de Akt inhibe la entrada de Mdm2 nuclear, aumenta los niveles celulares de p53 aumentando su actividad transcripcional. La expresión de una isoforma constitutivamente activa de Akt promueve la entrada de Mdm2 al núcleo, disminuye los niveles celulares de p53, y consecuentemente disminuye la actividad transcripcional de p53. La mutación de los sitios de fosforilación de Akt en Mdm2 produce una proteína mutante que es incapaz de entrar en el núcleo y aumenta la actividad de p53. Sin embargo existen otros trabajos que demuestran que la actividad de Akt no afecta la localización subcelular de Mdm2, demostrando que lo que afecta es su actividad como E3 ligasa de p53. Es decir los resultados de los efectos de Akt sobre la localización sub-celular de Mdm2 son aún controversiales. Sin embargo si está bien demostrado el efecto de la quinasa Akt sobre la actividad de Mdm2 y por ende sobre los niveles proteicos del factor de transcripción p53. La quinasa Akt puede fosforilar Mdm2 no sólo en respuesta a factores de crecimiento como estímulo, sino también por ejemplo en respuesta a agentes de daño al ADN (como la luz ultravioleta o drogas anti-tumorales), teniendo un rol muy importante en cáncer, en la resistencia a drogas anti-tumorales. Fibroblastos provenientes de ratones mutantes para Akt1 muestran altos

niveles de p53 y p21, y altos niveles de apoptosis frente al tratamiento con luz ultravioleta.

---

### 1.1.6. PROCESOS CELULARES EN LOS QUE PARTICIPA AKT

---

Hasta el momento han sido identificados un gran número de genes cuya expresión es regulada por Akt ya sea directa o indirectamente. Akt es una quinasa que fue involucrada en una gran cantidad de procesos tales como supervivencia celular, crecimiento, proliferación, angiogénesis, metabolismo, migración entre otros. A continuación se comentará como la actividad de Akt puede regular alguno de estos procesos, que resultan pertinentes para esta tesis.

#### *Inhibición de la apoptosis*

La inhibición de la apoptosis por Akt puede estar mediada por múltiples mecanismos, algunos de los cuales son célula-específicos. Akt inactiva por fosforilación los factores proapoptóticos Bad y procaspasa-9, así como también la familia de factores de transcripción Forkhead que inducen la expresión de factores proapoptóticos como Fas ligando, Bim y PUMA (p53-up-regulated mediator of apoptosis). La fosforilación de las proteínas Forkhead causa su localización citoplasmática posiblemente unidas a proteínas 14-3-3 y por lo tanto, son incapaces de mediar la transcripción en el núcleo. Además, la activación de Akt ha sido relacionada, en células cancerosas, con resistencia aumentada a la apoptosis inducida por TRAIL/APO-2L (TNF-related apoptosis-inducing ligand), un miembro de la superfamilia TNF que tiene actividad antitumoral (Kandasamy y Srivastava, 2002). Asimismo, Akt activa al factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding protein) y a la quinasa I $\kappa$ B (IKK), un regulador positivo de NF- $\kappa$ B, ambos reguladores de la expresión de genes con actividad antiapoptótica (Pugazhenti et al., 2000). La regulación de la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B ocurre primariamente por la modulación de su molécula inhibitoria asociada, I $\kappa$ B (inhibidor de NF- $\kappa$ B). I $\kappa$ B es fosforilada por un complejo quinasa que

consiste en IKK (I $\kappa$ B quinasa)  $\alpha$  e IKK $\beta$ , que marca a la proteína para su ubiquitinación y degradación, liberando el factor de transcripción activo. IKK $\alpha$  puede ser activado por múltiples quinasas, una de las cuales es Akt. NF- $\kappa$ B regula positivamente la expresión de Bcl-2, Bcl-xL y otras proteínas inhibitoras de la apoptosis o IAPs. Otro integrante de la familia Bcl-2 regulado por Akt es el factor proapoptótico Bax, que una vez inserto en la mitocondria es un regulador fundamental de la permeabilidad mitocondrial que conlleva a la apoptosis. Bax es fosforilado por Akt en su sitio inhibitorio (Ser184) cerca del dominio C-terminal que contribuye a la supresión de la muerte celular mediada por Bax en neutrófilos (Gardai et al., 2004). Bax forma un dímero con Bcl-2 y previene la actividad represora de muerte, por lo que la proporción de Bcl-2 y Bax determina la sensibilidad de las células a la apoptosis en respuesta a un estímulo específico. Por otra parte, Ahmed y colaboradores han demostrado que la activación de Akt induce la expresión de Bcl-2 (Ahmed et al., 1997). Estudios posteriores demostraron que la apoptosis neuronal inducida por ON (Óxido nítrico) estaba acompañada por una disminución en la expresión de Bcl-2 y un aumento de la síntesis de Bax. Asimismo, la activación de la quinasa es necesaria y suficiente para inhibir los cambios inducidos por .NO en la expresión de Bcl-2 y Bax en respuesta a la acción protectora de IGF-1 en células neuronales (Matsuzaki et al., 1999). Además, Akt1 activada puede causar un efecto protector en neuronas primarias de hipocampo a través de su asociación con la proteína de andamiaje JIP1 (JNK interacting protein 1), que actúa evitando el reclutamiento y ensamblaje de JNK retrasando el inicio de la apoptosis en respuesta a agentes inductores de exotoxicidad (Kim et al., 2002).

La mayoría de los estudios que demuestran la inhibición de la apoptosis por Akt han sido realizados en células en cultivo. Sin embargo, estudios más recientes han confirmado que Akt es capaz de inhibir la apoptosis *in vivo*. Los ratones con homocigotas mutantes para PTEN exhiben en el octavo día de gestación, regiones cefálicas severamente expandidas por inhibición de la apoptosis regulada durante el desarrollo (Stambolic et al., 1998). Asimismo, la protección de la apoptosis fue observada en fibroblastos embrionarios derivados de estos ratones, así como también en timocitos de ratones transgénicos para una isoforma de Akt constitutivamente activa (Malstrom et al., 2001).

## *Ciclo celular*

El control del ciclo celular mediado por Akt reside en la regulación de la localización subcelular de los miembros de la familia FOXO (Forkhead Box O), inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (p21CIP1 y p27KIP1) y  $\beta$ -catenina, y la concentración intracelular de p53 (vía estabilización de Mdm2) como ejes centrales de este camino de señalización (Figura I5).

La inhibición de GSK3 por Akt evita la fosforilación de  $\beta$ -catenina citoplasmática, impidiendo su degradación y de esta forma, es translocada al núcleo. Una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina se une a diferentes factores de transcripción favoreciendo la expresión de varios genes, como ciclina D1, que induce la progresión del ciclo celular a través de la hiperfosforilación e inactivación de la proteína de retinoblastoma (Rb). Además, la fosforilación disminuida de ciclina D1 por GSK3 promueve su estabilización (Diehl y col., 1998). Luego de la estimulación con factores de crecimiento, Mdm2 es fosforilado por Akt y entra al núcleo, donde induce una disminución en los niveles de p53. En ausencia del factor supresor de tumor p19/p14ARF, el complejo Mdm2-p53 abandona el núcleo y pasa al citoplasma donde p53 es degradado a través del sistema ubiquitín-proteasoma (Sherr y Weber, 2000).

La transición de la fase G1/S por Akt ocurre a través del bloqueo de los inhibidores del ciclo celular p21CIP y p27KIP vía fosforilación, que media la localización citoplasmática de los mismos y su unión a proteínas 14-3-3 (Datta et al., 1999). Por otra parte, los niveles de p21CIP y p27KIP son disminuídos a través de la fosforilación de los factores de transcripción de la familia FOXO, que una vez localizados en el citoplasma, son incapaces de promover la síntesis de los ARNm de dichos inhibidores (Figura I5) (Medema et al., 2000) (Brazil et al., 2004).

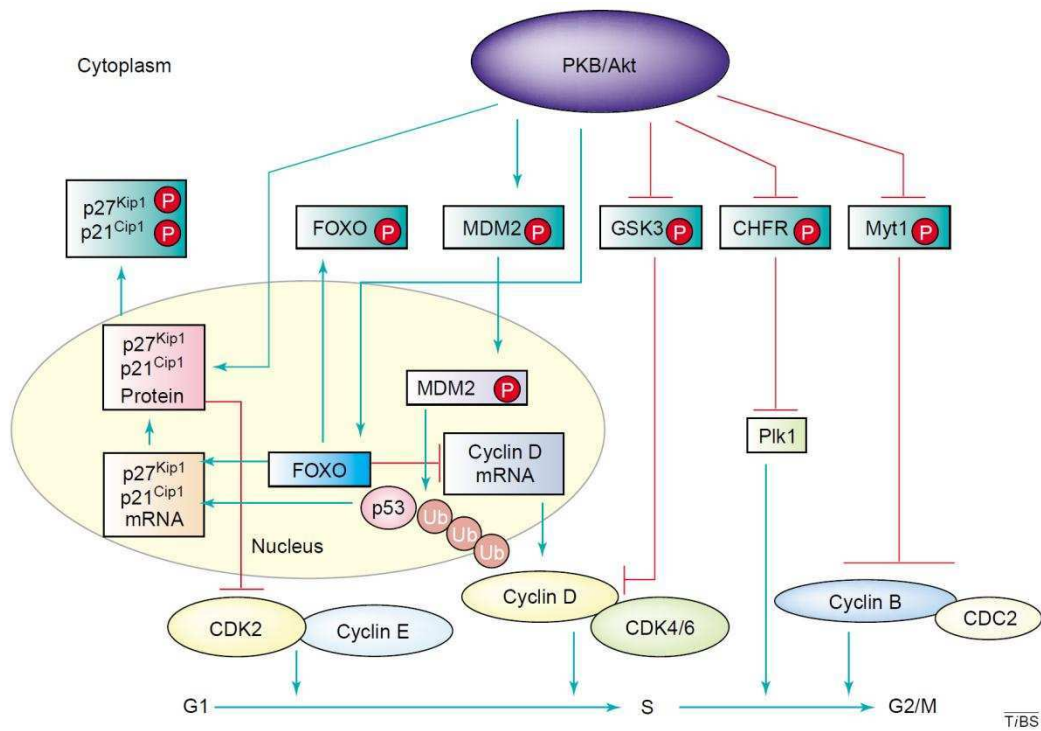


Figura 15 | **Progresión del ciclo celular mediada por Akt.** La progresión del ciclo celular regulada por Akt está mediada por la transición G1/S y la iniciación de la fase M. La fosforilación por Akt estabiliza Mdm2 y causa su translocación al núcleo, donde promueve la degradación de p53, favoreciendo la reducción de la transcripción de p21CIP. Por otra parte, la fosforilación de FOXO por Akt causa la permanencia de estos factores de transcripción en el citoplasma impidiendo la transcripción de p27KIP. Además p21CIP y p27KIP pueden ser fosforilados por Akt impidiendo su localización nuclear y por lo tanto evitando la inhibición de CDK2 que facilita la transición G1/S. Por otra parte, Akt aumenta la traducción del ARNm de ciclina D1 a través de la fosforilación y consecuente inhibición de GSK3, promoviendo el pasaje a la fase M del ciclo celular (Brazil et al., 2004).

### 1.1.7. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE AKT

Durante la última década se han centrado los estudios de Akt sobre un solo tipo de modificación, la fosforilación. Como se describió anteriormente, los mecanismos por los cuales Akt es fosforilada en los residuos T308 y S473, y consecuentemente activada son bastante conocidos. Sin embargo muy poco se conoce sobre otras modificaciones post-traduccionales de esta proteína, que podrían dar nueva información para resolver

algunos de los interrogantes actuales sobre la regulación de la actividad y/o activación de esta quinasa que aún resultan incomprensibles.

### *Otras fosforilaciones en Akt*

Desde hace ya muchos años se había encontrado a la proteína Akt constitutivamente fosforilada en el residuo T450 (Andjelkovic et al., 1997), pero solo recientemente, gracias a estudios del laboratorio de Estela Jacinto comenzamos a entender el mecanismo de regulación de esta modificación post-traducciona de Akt. Los mecanismos que acoplan la traducción y el procesamiento de proteínas son pobremente conocidos. Dicho grupo de investigación demostró que el complejo quinasa mTORC2 puede co-localizar con ribosomas traduccionalmente activos interaccionando establemente con una proteína presente en el túnel de salida del ribosoma (Oh et al., 2010). Exclusivamente durante la traducción de Akt, mTORC2 media la fosforilación de la proteína Akt naciente en su dominio hidrofóbico, más específicamente en el aminoácido T450. Esto inhibe la ubiquitinación co-traducciona de Akt. El complejo mTORC2 sólo puede fosforilar el residuo T450, debido a que el residuo S473 se encuentra aún dentro del túnel de salida del ribosoma. Estos resultados demuestran que esta fosforilación mediada por mTORC2 puede ser un mecanismo de control de calidad durante la producción de Akt.

Por otro lado, Mahajan y colaboradores (Mahajan et al., 2010) describieron como la unión de factores de crecimiento a RTKs puede llevar a la activación de una quinasa llamada Ack1, que no pertenece a la familia de los RTKs. Esta quinasa fosforila directamente el residuo tirosina (Y) 176 del dominio quinasa de Akt. La proteína Akt fosforilada en ese sitio se localiza en la membrana plasmática y promueve la fosforilación de Akt en los sitios T308 y S473, llevando a la activación de la quinasa. Ratones que expresan Ack1 activada específicamente en células prostáticas desarrollan neoplasia intra-epitelial prostática.

Existen otros trabajos en los cuales se postulan otros sitios de fosforilación de Akt, como por ejemplo Y315 y Y326 que pueden ser fosforilados por la quinasa Src, T195 que puede ser fosforilado por la quinasa TBK1 y S137 por la quinasa IKKε. La fosforilación en estos sitios aún no ha sido estudiada profundamente.



## *Ubiquitinación de Akt*

Dos trabajos recientes demuestran como la ubiquitinación de Akt es importante para su activación. El primero de estos trabajos fue publicado por el laboratorio de Hui-Kuan Lin. En este trabajo se demuestra que se produce un aumento en la ubiquitinación de Akt en respuesta a diferentes estímulos conocidos que inducen la activación de Akt, como factores de crecimiento o citoquinas (Yang et al., 2009). Interesantemente esta ubiquitinación no es degradativa, ocurre a través del residuo K63 de ubiquitina y no por el K48, con lo cual no afecta la estabilidad de la proteína, pero si su activación. Se determinó además que la E3 ligasa de la vía de ubiquitina TRAF6 es la encargada de producir esta modificación en respuesta a diferentes estímulos, la cual promueve el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática, y por ende su posterior activación. A pesar de que el dominio PH, al interactuar con PI(3,4,5) P3, es totalmente necesario para la estabilización de Akt en la membrana plasmática, no se conocía aún el mecanismo por el cual Akt se dirigía hacia ese compartimento celular. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, y el hecho de que la E3 ligasa TRAF6 no puede activar a un mutante que ya posee ubicación en la membrana (Myr-Akt), fue demostrado que la ubiquitinación de Akt es necesaria para su transporte desde el citoplasma a la membrana plasmática. Este mismo laboratorio publicó posteriormente un trabajo en el que demuestran que distintas E3 ligasas de ubiquitina son las responsables de la ubiquitinación de Akt frente a distintos factores de crecimiento utilizados como estímulos extracelulares para activar la vía. Si bien, como habían demostrado anteriormente, la E3 ligasa TRAF6 es necesaria para la completa activación de Akt al estimular el factor de crecimiento IGF-1, en el caso de la activación de la vía con el factor de crecimiento EGF (a través de los receptores ErbB), es el complejo E3 ligasa Skp2 SCF el que media la ubiquitinación de Akt, y por ende, su reclutamiento a la membrana plasmática. Siguiendo este último modelo fue demostrado que deficiencias en Skp2 inhiben la activación de Akt, la captación de glucosa y la glicolisis, y más importante la progresión del cáncer de mama en varios modelos tumorales utilizados (Chan et al., 2012).

En los últimos años el estudio de la ubiquitinación de Akt ha tomado mucha relevancia y eso llevó a la publicación de numerosos trabajos sobre este tema. En estos trabajos se

presentan nuevas E3 ligasas de ubiquitina para Akt como por ejemplo, MULAN, NEDD4-1, CYLD, CHIP y TTC3 (Bae et al., 2012; Fan et al., 2012) (Lim et al., 2012) (Su et al., 2011) (Suizu et al., 2009). Muchos de estos trabajos presentan resultados contradictorios, incluso trabajando con las mismas líneas celulares, por lo que aún falta tiempo para que se pueda determinar algún mecanismo más general con respecto a esta modificación post-traducciona de Akt.

### *Acetilación de Akt*

Nagalingam y colaboradores demostraron recientemente que tanto la proteína quinasa Akt como su quinasa PDK1 sufren otra modificación post-traducciona, la acetilación (Sundaresan et al., 2011). La acetilación de estas proteínas se produce en un residuo perteneciente al dominio PH que ambas poseen y que media la unión a PI(3,4,5)P3. La acetilación bloquea la unión de Akt y PDK1 a PI(3,4,5)P3, lo que impide la asociación de las mismas con la membrana plasmática y la fosforilación de Akt. La deacetilación por la enzima deacetilasa SIRT1 promueve la unión de Akt y PDK1 a PI(3,4,5)P3 a la membrana plasmática y estimula su activación. Ratones inyectados con células que expresan una proteína mutante que emula una forma constitutivamente acetilada de Akt desarrollaron tumores más pequeños que los inyectados con las células que expresan Akt de tipo salvaje. Por otra parte, la reducción de la activación de Akt en los corazones de los ratones deficientes en SIRT1 se asocia con una reducción de la hipertrofia cardíaca en respuesta al ejercicio físico y a angiotensina II. Estos hallazgos descubren una modificación post-traducciona clave de Akt que es importante para sus actividades oncogénicas e hipertróficas.

---

#### **1.1.8. AKT Y CANCER**

---

En el desarrollo de un cáncer se ven alterados diversos procesos celulares cuyo control es imprescindible. La supervivencia celular (en balance con la apoptosis), la proliferación (siendo éste el aumento del número de células) y el crecimiento celular (el aumento del tamaño celular). En general, el desarrollo del cáncer se podría definir como

una pérdida del equilibrio crítico proliferación/apoptosis. Se sabe ahora que la proteína quinasa Akt desempeña un papel central en este equilibrio, y cuando está desregulada, puede contribuir al desarrollo o progresión del cáncer ya que la expresión de multitud de oncogenes es regulada por la vía PI3-K/Akt.

Muchos cánceres humanos, incluyendo carcinomas, glioblastoma multiforme y diversas neoplasias hematológicas, exhiben frecuente activación de Akt (Tabla 2). Numerosos investigadores han reportado correlaciones entre la actividad de Akt en tumores y diversos parámetros clínico-patológicos (Bellacosa et al., 2005). En particular, la activación de Akt ha demostrado correlacionar con la enfermedad avanzada o el mal pronóstico en algunos tipos de tumor. Por ejemplo, en un estudio, aproximadamente el 40% de cáncer de ovario y de mama y más del 50% de los carcinomas de próstata mostraron mayor actividad de la quinasa Akt1; y casi el 80% de los tumores con Akt1 activado fueron carcinomas de alto grado en fase III/ IV (Sun et al., 2001). En otros estudios, se observó la activación de la quinasa Akt2 en 30% a 40% de los cánceres de páncreas y ovarios (Yuan et al., 2000) (Altomare et al., 2002). Además, ha sido reportada una elevada actividad de Akt3 en cánceres de mama deficientes en el receptor de estrógeno y en líneas celulares de cáncer de próstata insensibles a andrógenos (Nakatani et al., 1999), sugiriendo que AKT3 puede contribuir a la agresividad de los carcinomas insensibles a hormonas esteroideas (Altomare y Testa, 2005).

<i>Tumor type</i>	<i>% Tumors with active AKT</i>
Glioma	~ 55
Thyroid carcinoma	80–100
Breast carcinoma	20–55
Small-cell lung carcinoma	~ 60
Non-small-cell lung carcinoma	30–75
Gastric carcinoma	~ 80
Gastrointestinal stromal tumors	~ 30
Pancreatic carcinoma	30–70
Bile duct carcinoma	~ 85
Ovarian carcinoma	40–70
Endometrial carcinoma	> 35
Prostate carcinoma	45–55
Renal cell carcinoma	~ 40
Anaplastic large-cell lymphoma	100
Acute myeloid leukemia	~ 70
Multiple myeloma	~ 90
Malignant mesothelioma <sup>a</sup>	~ 65
Malignant melanoma <sup>b</sup>	43–67

Tabla 12 | Niveles de activación de Akt en cáncer humano. Tomado de (Altomare y Testa, 2005).

Las desregulación en cáncer de las vías de señales gatilladas por Akt se puede dar de diferentes formas: 1) Amplificación, mutaciones, deleciones o sustituciones en genes río arriba de Akt, que constitutivamente activen la vía (por ejemplo mutante constitutivamente activo de PI3K, PI3KCA), 2) Pérdida de función de factores que regulan negativamente la vía (Ej: mutantes inactivos de PTEN), 3) Amplificación o mutantes constitutivamente activos del gen de Akt (Ej: Akt1 E17K). Cualquiera de estos modelos de activación aberrante de Akt transmite señales crónicas pro-crecimiento, pro-proliferativas, pro-supervivencia. Debido a esto una gran variedad de componentes químicos que puedan inhibir esta vía están siendo utilizados en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer. Esta es la segunda vía blanco con más drogas siendo testeadas en este momento (después de la vía del famoso oncogén p53(Cheok et al., 2011)).

Un ejemplo pertinente en esta tesis es el reciente descubrimiento de una mutación somática en AKT1 que fue encontrada en 8% (5 de 81) de cánceres de mama, 6% (3 de 51) de los cánceres colorectales y 2 % (1 de 50) de cánceres de ovario. Específicamente, es una mutación G>A en el nucleótido 49 que resulta en una sustitución de lisina por glutámico en el aminoácido 17 (E17K), situado en el dominio PH (Carpten et al., 2007). Esta mutación parece permitir la unión promiscua de Akt a la membrana plasmática en ausencia de fosfoinosítidos PI(3,4,5)P3. Curiosamente, este mutante mostró fosforilación constitutiva de S473 en ausencia de suero. Por el contrario, la fosforilación de T308 seguía siendo sensible al suero, planteando la posibilidad de los cánceres con esta mutación pueden aún requerir cierta actividad de PI3K para activación completa de Akt. En el trabajo detallado anteriormente de laboratorio del doctor Hui-Kuan Lin, donde demuestran que la ubiquitinación de Akt es necesaria para su activación, también observan que este mutante E17K posee niveles exacerbados de ubiquitinación. Estos altos niveles promueven un mayor transporte de Akt hacia la membrana plasmática, por ende, una mayor activación. Interesantemente, el mutante de E17K muestra sensibilidad diferencial a un inhibidor de Akt que interactúa con el dominio PH. Por lo tanto, podría ser una oportunidad para identificar inhibidores que se unan al dominio PH y que preferentemente inhiban al mutante de E17K sobre el tipo salvaje Akt.

Desde el descubrimiento inicial de la mutación E17K en cáncer, ha habido otros estudios que determinaron la frecuencia de esta mutación en cáncer. Un estudio encontró esta mutación en 4% (4 de 93) de los cánceres de mama, pero no se la encontró en ningún cáncer de pulmón de células no pequeñas (n = 157) o en leucemias mieloide agudas (n =

95) (Kim et al., 2008). Otro estudio identificó la mutación E17K en 5,6% (2 de 36) de carcinomas de pulmón de células escamosas (Malanga et al., 2008). Recientemente, se observó una mutación idéntica en AKT3 en muestras de melanoma y líneas celulares (Davies et al., 2008). Además, mutaciones en el dominio de quinasa Akt2 fueron observadas con poca frecuencia en cánceres colorrectales (Parsons et al., 2005). La presencia de mutaciones en isoformas individuales de Akt sugieren que inhibidores específicos de isoforma pueden desempeñar un papel potencial en terapia. Por otro lado se han encontrado mutaciones somáticas de PTEN, PIK3CA, PIK3R1 y Akt, y algunos tipos de cáncer tienen amplificaciones AKT1, AKT2 y PIK3CA (revisado en (Zhao y Vogt, 2008) (Shah et al., 2008)). Sin embargo, no se entiende bien cómo estas amplificaciones cualitativa o cuantitativamente afectan la señalización de PI3K y si obvian los habituales mecanismos para la activación de PI3K (Engelman, 2009).

---

#### 1.1.9. ANTECEDENTES DE NUESTRO GRUPO EN EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA QUINASA AKT

---

Desde el año 2000, nuestro laboratorio estudia la regulación del *splicing* alternativo dentro del contexto de la interacción epitelio-mesenquimal, la diferenciación epitelial mamaria murina disparada por matriz extracelular y la transición epitelio-mesenquimal. En particular, nos enfocamos en eventos de *splicing* alternativo que tienen lugar en el pre-ARNm de fibronectina (FN) y de Rac1.

En relación a la interacción epitelio-mesenquimal, nuestro laboratorio ha reportado que factores solubles secretados por células mesenquimales, o ciertos factores de crecimiento de origen mesenquimal (HGF/SF; KGF; FGF) activan la vía de señalización Ras/PI3K/Akt estimulando la inclusión de dos regiones alternativas (EDI y IIICS) en el ARNm maduro de FN, en células epiteliales mamarias (Blaustein et al., 2004). Esta regulación ocurre también en otros tipos celulares, es independiente de la estructura del promotor que da origen a los transcritos e independiente de síntesis proteica pero requiere la presencia de ciertos elementos de secuencia (*splicing enhancer*) dentro del exón EDI a los que se unen proteínas regulatorias del *splicing*. Demostramos que este

efecto es mediado por dos miembros de la familia de factores de *splicing* SR (proteínas ricas en serina y arginina), SF2/ASF y 9G8 (recientemente renombradas SRSF1 y SRSF7) y que Akt es capaz de fosforilar a dichas proteínas. Además, observamos que la sobreexpresión de las quinasas clásicas de proteínas SR (miembros de las familias SRPK o CLK) tiene el efecto opuesto a la activación de Akt en relación a la localización subcelular de SF2/ASF y al patrón de *splicing* de FN. Estos resultados nos permitieron proponer a Akt como una nueva quinasa de proteínas SR (Figura I6). En colaboración con el laboratorio del Dr. Cáceres (Edimburgo, Reino Unido) encontramos que la activación de la vía de PI3K/Akt también influye sobre la traducción de ARNm reporteros que contienen un *splicing enhancer* proveniente del exón EDI de FN, en forma dependiente de las proteínas SR 9G8 y SF2/ASF. Estos resultados muestran como la activación de un camino de señalización regula concertadamente la actividad de ciertas proteínas SR al menos a dos niveles del metabolismo del ARNm: *splicing* y traducción (Blaustein et al., 2005), posiblemente incrementando la velocidad e intensidad de la respuesta celular frente a un determinado estímulo externo. Reportes de otros laboratorios también han implicado a Akt en la regulación del *splicing* alternativo, reforzando y expandiendo nuestros hallazgos (Patel et al., 2005; Shultz et al., 2010; White et al., 2010; Zhou et al., 2012).

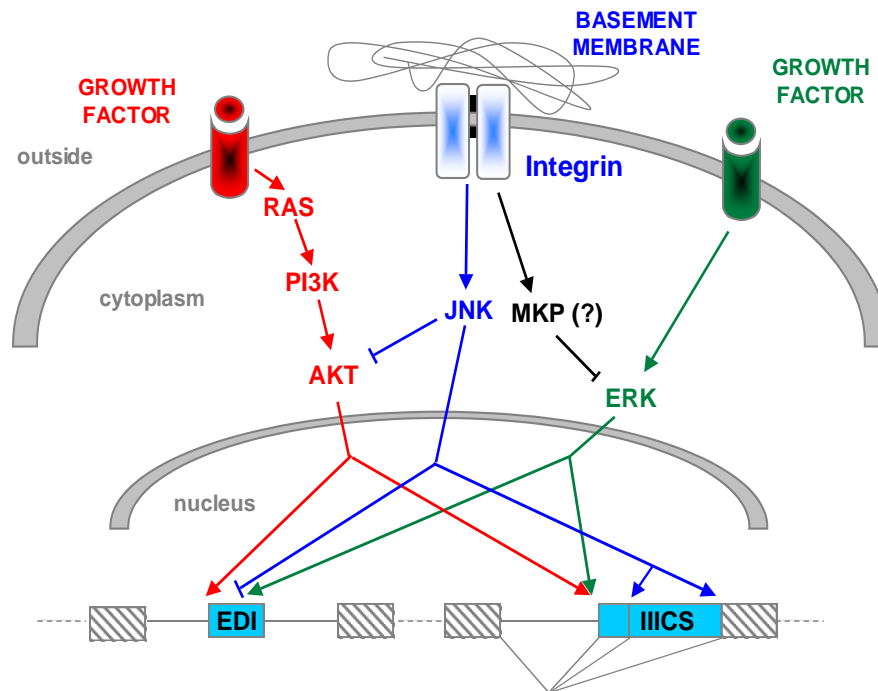


Figura 16 | **Regulación del *splicing* alternativo por distintas vías de señales.** La vía de PI3K-Akt estimula la inclusión del exón alternativo EDI fortaleciendo el sitio 3' débil y estimula la utilización del primer sitio aceptor (proximal) de la región alternativa IIICS (flechas rojas). La vía de ERK (flechas negras) contribuye con la vía de PI3K estimulando la inclusión. Por el contrario, la vía de JNK activada por la interacción de las células con una matriz extracelular de tipo membrana basal inhibe la inclusión de EDI y favorece la utilización de sitios aceptores más distales de IIICS (flechas azules) (Pelisch et al., 2005). La vía de JNK es capaz de antagonizar el efecto de las vías de PI3K y ERK. Aún resta confirmar la posible participación de alguna fosfatasa de MAPKs (MKP).

## 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 blanco, 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 I3), 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>u</sup>	UBA6	No identificada
<b>ISG15</b>	32 y 37 <sup>u</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 I3 | **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>u</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 interaccionar 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 *Saccharomyces cerevisiae*, *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 tioéster 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 tioéster, 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 tioéster (Ubc9~S~SUMO) cataliza la formación de la unión isopeptídica entre SUMO y el 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.

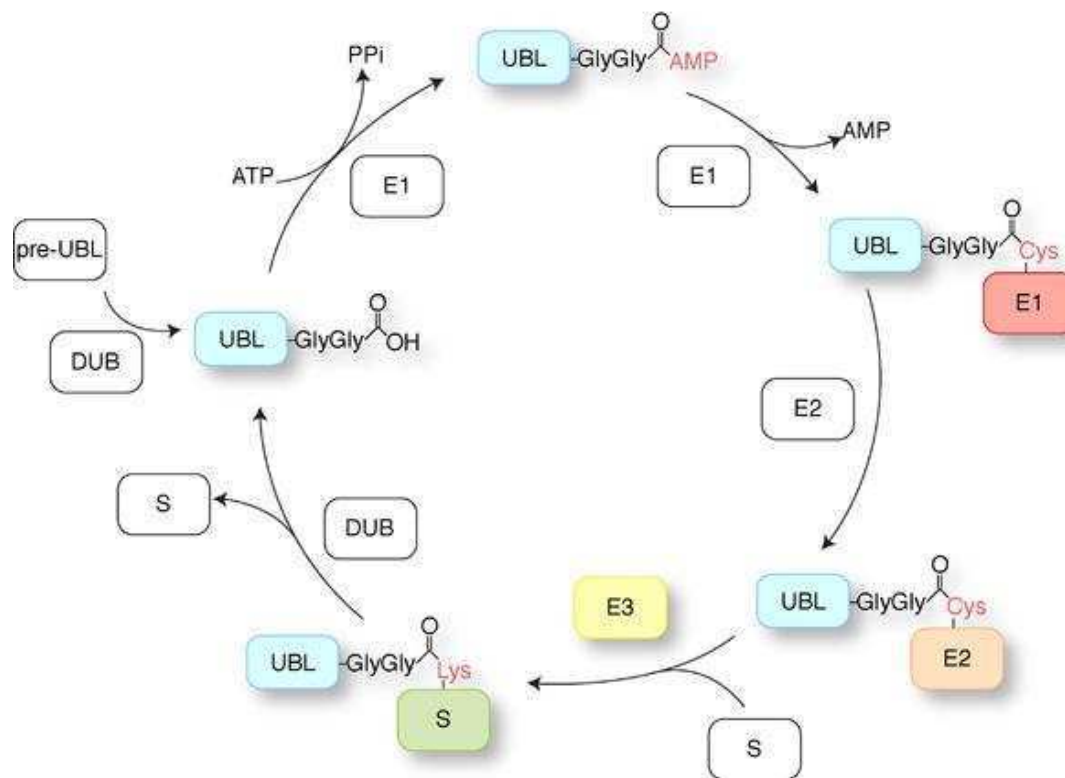


Figura 17 | **Visión esquemática de los pasos involucrados en la conjugación de Ubis.** Se esquematizan los pasos implicados en la conjugación de Ubis a proteínas blanco. Pre-UBL, Ubi inmaduro; DUB, *de-ubiquitinating enzymes*; S, sustrato.

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., 2001a; Takahashi et al., 2001b). 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 (Rodríguez 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 interactuar con una región ácida de la proteína blanco (Mohideen et al., 2009; Yang et al., 2006). Más aún, con el uso de nuevas técnicas, en particular con la contribución de trabajos a gran

escala que utilizaron la identificación sitio específica de lisinas SUMOiladas por espectrometría de masa, se pudo observar que el porcentaje de sitios de SUMOilación que no respetan la secuencia consenso canónica, es mas alto de lo que se creía. Asi se identificaron nuevos sitios consenso como lo son el ICM (del inglés “*Inverted Consensus Motif*”) o el HCSM (del inglés “*Hydrophobiy Cluster SUMOylation Motif*”) (Da Silva-Ferrada et al., 2012; Matic et al., 2010) Ver figura I8.

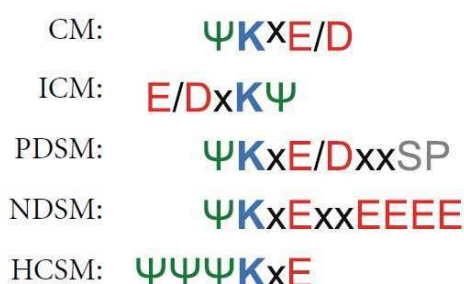


Figura I8 | **Motivos consenso de SUMOilación.** Se muestran las secuencias aminoacidicas de los distintos motivos consenso de SUMOilación CM, ICM, PDSM, NDSM y HCSM. En la secuencia se representa Ψ como un aminoácido grande e hidrofóbico, K es la lisina blanco de la reacción, X es cualquier aminoácido, D es ácido glutámico, E es ácido aspártico, S es serina, P es prolina. Figura adaptada de (Da Silva-Ferrada et al., 2012).

---

### 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., 1987a; Vijay-Kumar et al., 1987b) (Figura 19).

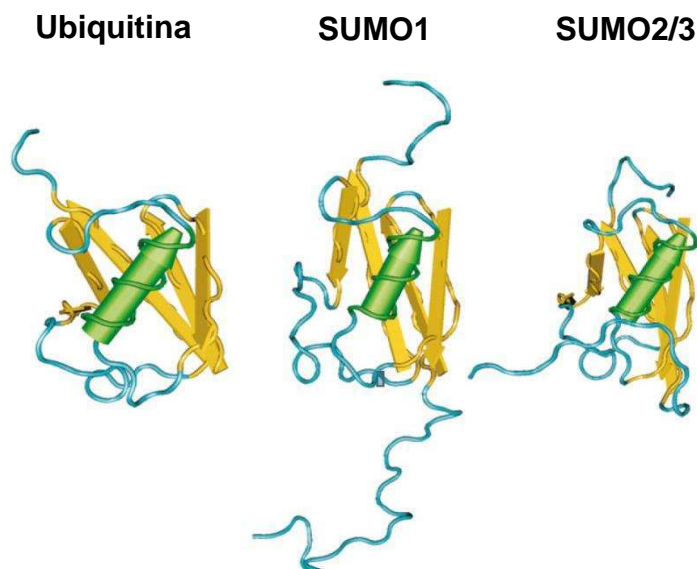


Figura 19 | Estructura tridimensional de Ub y SUMO. Esquema comparativo de las estructuras tridimensionales de Ub, SUMO1 y SUMO3. Tomado de (Martin et al., 2007b).

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 o dominios proteicos 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 spliceosoma (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 interaccionan 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 I10).

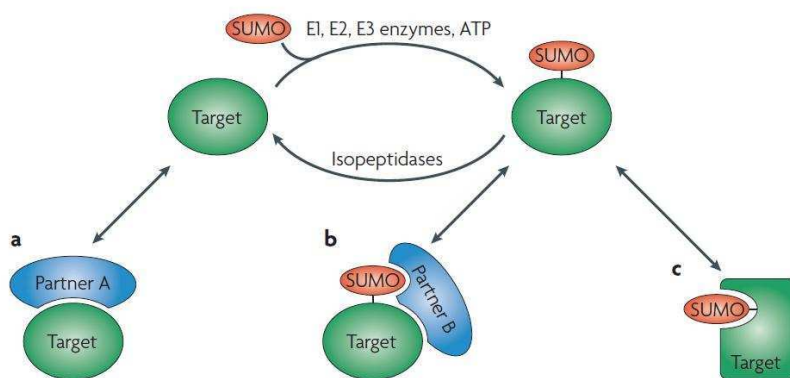


Figura I10 | Consecuencias moleculares de la conjugación de SUMO. Se toma como ejemplo una proteína blanco de SUMOilación (*Target*) que interacciona con la proteína A (*Partner A*)

cuando no se encuentra conjugada a SUMO (a). Al SUMOilarse, la proteína blanco puede cambiar el repertorio de proteínas con las que interacciona (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., 2007b; Navascues et al., 2008; Wilkinson et al., 2008).

### *SUMO y señalización celular*

La SUMOilación es una modificación post-traducciona transitoria con alta tasa de reversibilidad, esto hace que este proceso pueda ser beneficioso para la célula cuando se requiere una alta velocidad de respuesta y alta capacidad reacción. Anteriormente explicamos los mecanismos generales mediante los cuales la conjugación por SUMO puede afectar la actividad de una determinada proteína sustrato y, dependiendo de que actividad realice la proteína, vimos que esto puede afectar distintos procesos celulares. En este apartado vamos a interiorizarnos en algunos ejemplos de proteínas cuya modificación por SUMO tiene implicancia a nivel de señalización celular, centrándonos en cascadas de fosforilaciones.

Uno de los trabajos más relevantes en este campo ha sido llevado a cabo en el laboratorio de Mutsuhiro Takekawa. Este grupo de investigación pudo comprobar que la modificación post-traducciona por SUMO regula la actividad de la quinasa MEK (quinasa de MAPK-ERK), dentro del contexto de la cascada de señalización Raf-MEK-ERK. Esta cascada media la señalización por mitógenos, y se encuentra frecuentemente activada en distintos tipos de cáncer. En dicho trabajo los autores reportaron que la SUMOilación de MEK regula negativamente la vía de señalización de la quinasa ERK (quinasa regulada por señales extracelulares). La SUMOilación de MEK bloquea la activación de ERK ya que disrumpe la interacción entre MEK y ERK. La sobre-expresión de un mutante no SUMOilable de MEK aumenta la activación de ERK, la diferenciación celular, la proliferación celular y la transformación maligna disparada por los oncogenes ErbB2 o Raf, pero no por el oncogén Ras. Más aun la SUMOilación de MEK se ve disminuida en células cancerígenas que poseen mutaciones con alta actividad de Ras. Efectivamente Ras inhibe la SUMOilación de MEK, afectando la actividad de la E3 ligasa de SUMOilación específica de MEK. Así pudieron concluir de que el oncogén Ras activa la vía de señalización de ERK tanto activando la proteína Raf (mecanismo ya conocido)

como inhibiendo la SUMOilación de la quinasa MEK, y por lo tanto promoviendo la carcinogénesis.

Con respecto a proteínas involucradas en el eje de señalización de la quinasa Akt, se han publicado recientemente dos trabajos que hacen mención a la regulación por SUMOilación de la proteína fosfatasa PTEN. Recordemos que esta fosfatasa puede llevar cabo la reacción de desfosforilación del PI(3,4,5)P3 a PI(4,5)P2, y de esta manera impedir el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática y su activación. En el primero de estos trabajos, Jian Huang y colaboradores describieron que la SUMOilación de PTEN tiene un rol central en la asociación de esta fosfatasa con la membrana, donde ejerce su actividad. La conjugación de PTEN por SUMO1 en su lisina 266, facilita la unión cooperativa de PTEN a la membrana plasmática mediada por interacciones electroestáticas. Un mutante con cambio de lisina por arginina en esa posición, que por lo tanto no puede ser SUMOilado en ese residuo, pierde la actividad supresora de tumores característica de esta proteína. Es decir la SUMOilación de PTEN es requerida para ejercer su actividad de inhibir la vía PI3K/Akt y así inhibir el crecimiento de tumores dependientes de esta vía. En el otro trabajo González-Santamaría y colaboradores observaron también SUMOilación de PTEN en su lisinas 266 y 289, y demostraron un entrecruzamiento entre esta modificación y la ubiquitinación de PTEN. Además observaron un aumento en los niveles de SUMOilación de PTEN frente a la infección viral de células, lo que induciría la localización en la membrana plasmática de PTEN. Por último reportaron que la SUMOilación de PTEN es necesaria para el control de infecciones virales dirigido por PTEN.

---

### 1.2.7. ANTECEDENTES DE NUESTRO GRUPO EN EL CAMPO DE LA SUMOILACIÓN DE PROTEÍNAS

---

Hemos demostrado recientemente 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. SF2/ASF (recientemente renombrado SRSF1), es capaz de estimular la SUMOilación de

proteínas (Pelisch et al., 2010). Experimentos de depleción por ARN de interferencia muestran que SF2/ASF es también, esencial para mantener los niveles celulares normales de SUMOilación. Más aún, hemos demostrado que SF2/ASF interacciona con la E2, Ubc9, y con distintos sustratos promoviendo la transferencia de SUMO al sustrato, cumpliendo con los requisitos funcionales de una E3 ligasa. De este modo, hemos reportado una nueva actividad para la proteína SF2/ASF y un nuevo componente en la vía de SUMO. 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. El dominio RRM2 (del inglés *RNA Recognition Motif 2*) no sólo es necesario, sino suficiente para ejercer esta actividad estimuladora de la SUMOilación. 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 podría ser un factor molecular capaz de relacionar las maquinarias de SUMOilación y del metabolismo del ARN.

## OBJETIVOS

---

### 2.1. GENERAL

---

El objetivo general planteado en este trabajo fue el de estudiar el posible rol de una nueva modificación post-traducciona de la proteína quinasa Akt, la conjugación de SUMO. De este objetivo general se desprenden una serie de objetivos particulares que se detallan a continuación:

### 2.2. ESPECÍFICOS

---

- Explorar una posible retroalimentación en el eje PI3K-Akt-proteínas SR que involucre la modificación de proteínas por conjugación de SUMO.
- Evaluar las consecuencias de la SUMOilación de Akt sobre su modificación post- traducciona más estudiada hasta el momento, la fosforilación, y viceversa.
- Evaluar si la conjugación por SUMO es necesaria y/o afecta la actividad quinasa de la proteína Akt.
- Estudiar las consecuencias de la SUMOilación de Akt sobre las funciones celulares ya descriptas para esta quinasa, tanto en condiciones normales como patológicas.

## 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, para utilizar el medio completo con posterioridad a las dos semanas de preparación, se agregó también L-glutamina en una concentración final de 2,9 g/L. Antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspiró 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 detuvo la reacción con 9 ml de medio completo, se re-plaqueó entre 1/5 y 1/20 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se llevó a 12 ml de volumen final con medio completo. Las células fueron congeladas en N<sub>2</sub> líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales. Las células HeLa (ATCC #CCL-2) y HCT-116 (ATCC #CCL-247) fueron mantenidas de la misma manera pero en medio carente de piruvato de sodio.

#### 3.1.2. TRANSFECCIONES CON ADN

---

Las células HEK293T ( $5 \times 10^5$ ), HeLa ( $2,5 \times 10^5$ ) o HCT-116 ( $5 \times 10^5$ ) fueron transfectadas en placas de cultivo de 35 mm con 6 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 2 µg de ADN total o en placas de 24 pocillos con 1,2 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 400 ng de ADN total por pocillo. Brevemente, el protocolo de transfección con lipofectamina

que utilizamos en nuestro laboratorio es el siguiente (se ejemplifica utilizando las cantidades de los reactivos adecuadas para pocillos de 35mm):

Se coloca 2 µg totales de ADN plasmídico en un tubo *ependorf* que contiene 250 µl de Opti-MEM (Invitrogen).

Se colocan 6 µl de lipofectamina 2000 en un tubo polipropileno de 5 ml con tapa que contiene 250 µl 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-cati3n y el ADN.

Se lavan las c3lulas con PBS para eliminar trazas de suero y antibi3ticos que inhiban la transfecci3n, y se dejan en 2 ml de Opti-MEM.

Se agregan por goteo 500 µl de los complejos en cada pocillo.

Se dejan las c3lulas en el incubador durante 4 a 6 hs aproximadamente para que ocurra la transfecci3n.

Luego se aspira el medio para eliminar la lipofectamina 2000, que de lo contrario tiene efectos t3xicos 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 c3lulas HEK293T ( $5 \times 10^5$ ), HeLa ( $2,5 \times 10^5$ ) o HCT-116 ( $5 \times 10^5$ ) fueron transfectadas en placas de cultivo de 35 mm con 3 µl Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 10-25 nM siRNA. El procedimiento es el mismo que el detallado para la transfecci3n con ADN. La secuencia de los siRNAs se detalla a continuaci3n:

siRNA Akt 3'UTR: 5'-GGGUUUACCCAGUGGGACA(dT)(dT)-3' (Hara et al., 2008)

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

---

### 3.1.4. ENSAYOS DE LUCIFERASA

---

Las células HEK 293T o HeLa fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos ( $1 \times 10^5$  células por pocillo). Luego de 24 h fueron transfectadas y a las 24 o 48 horas posteriores fueron cosechados los lisados celulares.

La actividad de Luciferasa en los lisados celulares fue medida utilizando el kit *Luciferase Assay System* (Promega). Para ello 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, Berlthold, Bad Wildbad, Germany).

---

### 3.1.5. EXTRACCIÓN DIFERENCIAL DE FRACCIONES NUCLEARES Y CITOPLASMÁTICAS

---

Transfectamos y/o tratamos células HEK293T plaqueadas en pocillos de 35 mm. Luego de 48/72hs las células fueron cosechadas en PBS, y centrifugadas por 5 minutos a 500g. El pellet de células fue resuspendido en 50  $\mu$ l de Buffer A. Se le agregó Triton X-100 a una concentración final de 0,1 %, teniendo en cuenta el volumen total, incluyendo el volumen celular. Las células fueron incubadas 8 minutos en hielo y luego la solución fue centrifugada por 5 minutos a 1300 g. Se separó la fracción soluble que corresponde a la fracción citoplasmática. El pellet fue lavado una vez con Buffer A y centrifugado 5 min a 1300 g.

En el caso de usar estos extractos para una posterior purificación en resina de níquel, al 5% de cada fracción se le agregó *Cracking Buffer 2X* y esto fue tomado como input. Al resto de cada una de las fracciones se le agregó 1 ml de buffer de extracción, y se procedió con la extracción (ver purificación de proteínas en una matriz de níquel).

Buffer A:

10 mM HEPES, pH 7.9

10 mM KCl

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

0.34 M Sucrose

10 % Glycerol

1 mM DTT

---

### 3.1.6. DETERMINACIÓN DE PERFILES DE CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

---

Células HEK293T plaqueadas en pocillos de 35 mm fueron transfectadas y/o tratadas. Luego de 48/72hs las células fueron tripsinizadas y centrifugadas en tubos falcon de 15 ml, por 5 minutos a 500g. Las células fueron lavadas con PBS frío y finalmente resuspendidas en 1,5 ml de PBS frío, manteniéndolas siempre en hielo. Mientras se vortexaban las células a velocidad media, se le agregó 3,5 ml de etanol 100%, y luego fueron incubadas por al menos un día a -20°C. Se centrifugaron las células por 5 minutos a 800g, y se lavaron con 5 ml de PBS frío. Se resuspendió en pellet de células en 500 µl de PBS conteniendo 120 µg/ml de RNasa A y 50ng/ml de Ioduro de propidio. Se incubó por 30-60' en oscuridad a 37°C. Se analizaron las células en un citómetro de flujo, midiendo entre 10000 y 20000 eventos. Es importante mantener el frío en todo momento para evitar el agregado de las células, que redundará en un menor número de eventos leído en el citómetro, y hasta pueden llegar a tapar el filtro de este.



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

---

Células HEK293T ( $1 \times 10^6$ ) fueron plaquedas en placas de 35mm y 24 h más tarde transfectadas de acuerdo con el protocolo. Alternativamente se usaron células HeLa transfectadas establemente para la construcción de SUMO1, SUMO2 o Ubiquitina etiquetadas con una hexada de Histidina. Luego de 48 h, las células fueron lavadas con PBS y se tomó el 5% como alícuota *input* y se le agregó directamente *cracking buffer* 2X. El resto se lisó en 1 ml de *buffer* de extracción. Los lisados fueron sonicados brevemente para disminuirles la viscosidad y se le agregó 40  $\mu$ l de la resina Ni<sup>2+</sup>-NTA (QIAGEN). Luego de incubar 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 *eppendorf*. 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 eluyeron las proteínas unida a la resina incubando por 20 min con 40  $\mu$ l de *buffer* de elución.

Buffer de extracción (pH 8): guanidinio-HCl 6M, Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100, imidazol 5 mM y iodoacetamida 10 mM.

Buffer Urea I (pH 8): Urea 8M, Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, imidazol 5 mM y iodoacetamida 10 mM.

Buffer Urea II (pH 6,3): Urea 8M, Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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%,  $\beta$ -mercaptoetanol 720 mM, imidazol 200 mM.

### 3.3. TÉCNICAS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA- PROTEÍNA

---

#### 3.3.1. INMUNOPRECIPITACIÓN

---

Células HEK293T ( $3 \times 10^6$ ) fueron cosechadas en PBS frío 24-36 horas luego de ser transfectadas. Fueron centrifugadas 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  $\mu$ g de anti-HA (Covance) más 30  $\mu$ l 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).

#### 3.3.2. 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  $\mu$ g de GST (clarificación o *pre-clear*). Posteriormente se añadieron 20  $\mu$ l de resina glutatión-sefarosa 4B (GE Healthcare) y se centrifugó para eliminar del lisado las proteínas que interaccionan 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  $\mu$ g de GST (control) o GST-Ubc9. Luego

de 3 lavados con *buffer* de lisis y 1 lavado con PBS, las proteínas asociadas a la matriz de glutatión-sefarosa fueron resuspendidas en *cracking buffer* 2X (Laemmli, 1970).

### 3.4. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y ENSAYOS IN VITRO

---

#### 3.4.1. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BACTERIAS

---

Una alícuota de 30 ml de cultivo bacteriano 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 30 min en hielo. Luego de sonicar en frío (6 pulsos de 10 seg cada uno a un 40% de amplitud), 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, ésta fue utilizada 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 3 semanas. En el caso de proteínas eluidas, las mismas fueron cuantificadas, alicuotadas, 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.

---

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

---

HA-Akt1 fue purificada a partir de células HEK293T mediante protocolos previamente descrito (Cazalla et al., 2005). Cuatro placas confluentes de 15 cm de diámetro con células HEK293T fueron transfectadas con 42 µg del vector de expresión HA-Akt1 WT y 112 µl 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 transfirió la suspensión a un tubo falcon de 50 ml. Las células se centrifugaron y posteriormente fueron lisadas en 20 ml de un *buffer* conteniendo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Tween-20 0,1%, β-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-HA (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 de *buffer* de lisis, se procedió a eluir las proteínas pegadas a la resina. Para ello se fue agregando 800 µl de *buffer* de elución (ácido cítrico 100 mM pH 2,2, β-glicerofosfato 5 mM, KF 5 mM) y las muestras fueron colectadas en tubos eppendorf conteniendo 200 µl 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.

---

### 3.4.3. SUMOILACIÓN IN VITRO DE AKT1

---

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 µg, ~ 4,5 µM) 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 µl. Las reacciones se iniciaron por la adición de ATP 2 mM. El sustrato HA-Akt1 recombinante (250 ng, ~ 236 nM) fueron incubados por 3hs a 30°C. Las reacciones fueron finalizadas por adición de un volumen de *Laemmli sample buffer 2X*.

---

### 3.4.4. 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-Akt (Cell Signaling) , anti-pAkt T308 (Cell Signaling), anti-pAkt S473 (Cell Signaling), , anti-Akt Substrate (Cell Signaling), anti-HA (Covance), anti-T7 (Bethyl Laboratories and Novagen), anti-FLAG (Sigma), anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology), anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology), anti-Myc (Santa Cruz Biotechnology).

## 3.5. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

---

### 3.5.1. 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<sup>7</sup>-1.10<sup>9</sup> UFC/ $\mu$ g DNA).

### 3.5.2. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

---

#### *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 adaptado utilizado y cuando la aplicación subsiguiente demandaba una más alta calidad del plásmido, se utilizó un *kit* de Invitrogen (*PureLink HiPure Plasmid Miniprep*).

### *Preparación de plásmidos a gran escala o maxipreps*

Las columnas de intercambio aniónico de Qiagen permiten obtener unos 100 µg de DNA plasmídico (columnas tip 100) o 500 µg (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.

---

### **3.5.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS**

---

Para conocer la concentración de ADN o ARN en solución se midió absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (NanoDrop). 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).

---

### 3.5.4. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

---

Fueron diseñados primers *forward* y *reverse* conteniendo la mutación deseada y fueron realizados 20 ciclos de amplificación por PCR a partir del plásmido templado. La reacción de amplificación contiene:

Buffer PCR para Pfu ADN Polimerasa	5 $\mu$ l
Plásmido templado	50 ng
Primer Fw	125 ng
Primer Rev	125 ng
dNTPs 10 mM	1 $\mu$ l
<i>PfuTurbo</i> ADN polimerasa (2.5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H2O	c.s.p. 50 $\mu$ l

La reacción de PCR consistió en:

Nº de ciclos	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
1	94	30 seg
18	94	30 seg
	55	60 seg
	72	60 seg/kb de templado
1	72	10 min

Para la digestión, 1  $\mu$ l de la enzima de restricción Dpn I (NEB) fue agregada a cada reacción de amplificación e incubada durante 3 horas a 37 $^{\circ}$ C. Bacterias competentes químicas de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* fueron transformadas con 5  $\mu$ l de la reacción de digestión. Finalmente la mutagénesis fue corroborada por secuenciación de algunos de los clones obtenidos (Macrogen Inc.).



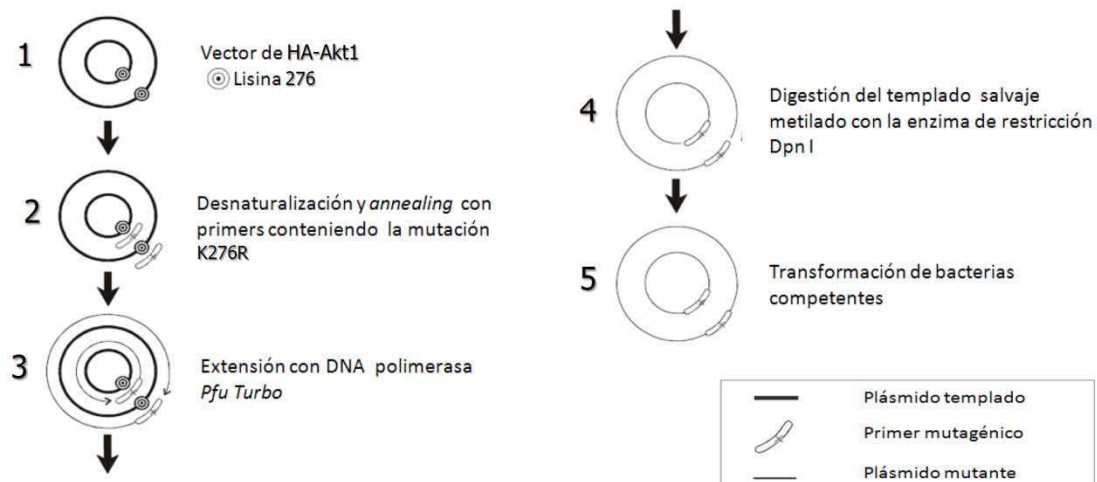


Figura M1: Esquema experimental del método de mutagénesis mediada por Dpn I.

### 3.6. ARN, RT & PCR

#### 3.6.1. 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  $\mu\text{g}$  de RNA a partir de células cultivadas en 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  $\mu\text{l}$  de solución D, que ya contiene  $\beta$ -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, 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 µl de β-mercaptoetanol y 40 µg de glucógeno por cada ml de solución desnaturizante.

---

### 3.6.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

---

El protocolo para la obtención de ADN copia a partir de ARN se detalla a continuación. El mismo 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 de reacción 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.

---

### 3.6.3. PCR: MINIGÉNES REPORTEROS DE *SPLICING* DE EDI Y BCLX

---

Se utilizan 2  $\mu$ l de reacción de RT que contiene el cDNA que servirá de 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  $\mu$ l de *primer forward* 20  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ l de *primer reverse* 20  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,3  $\mu$ l de

Taq polimerasa 5 U/ $\mu$ l, 0,1  $\mu$ l de dCTP radiactivo (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l, act. esp.: 3000 Ci/mmol), H<sub>2</sub>O c.s.p. 48  $\mu$ l.

Los *primers* para EDI fueron:

pSV5'j: 5'-CACTGCCTGCTGGTACTCGA-3'

pSV3'j: 5'-GCGGCCAGGGTCACGAT-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.

Los *primers* para Bcl-x fueron:

pminiBclx FW: 5'-GGAGCTGGTGGTTGACTTTCT -3'

pminiBclx REV: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

La reacción de PCR consistió en: 1) 45 seg a 94°C, 2) 30 ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg a 55°C y 30 seg a 72°C.

## RESULTADOS

---

---

En base a resultados de nuestro laboratorio descritos en las secciones 1.1.9 y 1.2.7 de la introducción que muestran la participación de la vía de PI3K/Akt en la regulación del *splicing* alternativo, definen a Akt como una quinasa de proteínas SR entre ellas SF2/ASF e identifican a la proteína SF2/ASF como un factor regulatorio de la cascada de conjugación de SUMO, decidimos centrarnos en esta nueva actividad de SF2/ASF en el proceso de SUMOilación como punto de partida para el estudio de un posible mecanismo regulatorio del eje PI3K-Akt-proteínas SRs que involucre no sólo la modificación de proteínas por fosforilación sino también por conjugación de SUMO.

### 4.1. AKT1, SRPK1 Y SRPK2 SON SUSTRATO DE SUMOILACIÓN

---

Como primera aproximación a estudiar la funcionalidad de esta nueva actividad de la proteína SR SF2/ASF como factor regulatorio de la conjugación por SUMO en el eje de señalización descrito por nuestro grupo (Eje PI3K-Akt-SF2/ASF), nos preguntamos si esta actividad podría estar afectando a alguna de las quinasas regulatorias ya descritas para esta proteína SR. Entre las quinasas descritas elegimos la familia de las SRPKs, las CLKs y Akts.

Inicialmente nos preguntamos si algún miembro de estas familias de quinasas era efectivamente sustrato de SUMOilación. Mediante un análisis bioinformático con un software de predicción de sitios de SUMOilación encontramos tanto para la quinasas Akt1 y 2, así como para SRPKs y CLKs, sitios putativos de SUMOilación con alto puntaje o *score* (mayor probabilidad de ser un sitio real de conjugación de SUMO) (Tabla R1).

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 R1 | **Predicción de SUMOilación en quinzasas de proteínas SR.** Potenciales sitios de conjugación de SUMO en las quinzasas de las familias SRPK, CLK y Akt, según el *software* SUMOsp 2.0.

Se sabe que la SUMOilación es una modificación altamente reversible e inestable, lo que dificulta mucho su detección (existen muchos trabajos dedicados a generar o modificar métodos para aumentar la sensibilidad de su detección) (Da Silva-Ferrada et al., 2012). Para facilitar su detección decidimos co-transfectar distintas líneas celulares con vectores de expresión para cada una estas proteínas (con alguna etiqueta), junto con vectores de expresión para SUMO-2, y con un vector de expresión para Ubc9 (enzima E2 o conjugadora de SUMO). Observamos mediante western-blot, utilizando anticuerpos contra las distintas etiquetas de las proteínas de estudio, que aparecían en algunos casos, bandas de menor movilidad electroforética que la correspondiente al peso molecular de la proteína, lo que sería congruente con su posible conjugación a SUMO. En la figura R1 se muestra como ejemplo de estos ensayos el caso de HA-Akt1. Las bandas de menor movilidad electroforética aumentan cuando se co-expresan los vectores de expresión para SUMO2 y Ubc9. Además, se observa en la figura R1b que estas bandas desaparecen en presencia de la proteasa de SUMO SENP1, lo que aumenta las probabilidades de que estas bandas de menor movilidad electroforética correspondan a la proteína HA-Akt1 conjugada a SUMO.

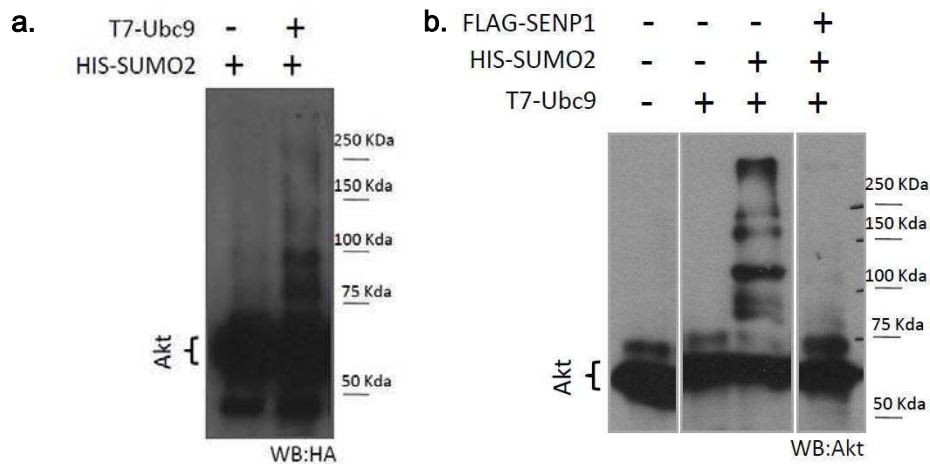


Figura R1 | **Co-expresión de SUMO y putativas proteínas blanco de SUMOilación (Akt1)**. Células HEK293T fueron transfectadas con HA-Akt1 junto con los vectores de expresión indicados y 48 h más tarde lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. A la derecha se indica el peso molecular (en KDa) según marcadores correspondientes utilizados en la electroforesis.

Para corroborar que estas bandas de menor movilidad electroforética corresponden efectivamente a variantes SUMOiladas de las proteínas estudiadas; realizamos experimentos de purificación de proteínas conteniendo héxadas de histidina (6xHis) con una matriz de níquel. El experimento consiste en realizar una transfección equivalente a la explicada anteriormente, utilizando vectores de expresión de SUMO con una etiqueta de 6xHis (“His-SUMO”), para luego someter al lisado total de las células a una purificación por níquel. De este modo, es posible enriquecer la preparación en proteínas celulares conjugadas a His-SUMO (SUMOiladas)(figura R2), además de la proteína His-SUMO libre, sin conjugar. Mediante western-blot se analiza la presencia de la proteína de interés tanto en el *input* como en la fracción eludida de la resina de níquel, y se observa si esta fue purificada como una proteína conjugada a SUMO. 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. Esta técnica será la utilizada a lo largo de esta tesis en la mayoría de los casos en los que se evalúen niveles de SUMOilación de una proteína.

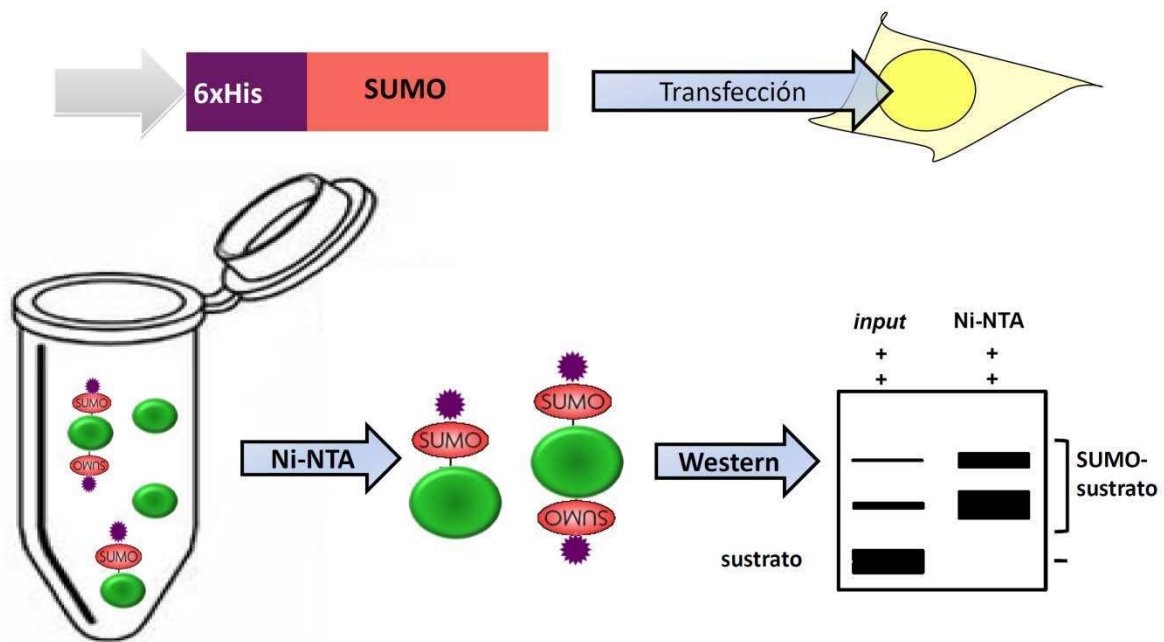


Figura R2 | **Esquema del método utilizado para la detección de proteínas SUMOiladas.** Células en cultivo son transfectadas con los vectores de expresión HIS-SUMO1,2 o 3 (S1,S2,S3). Luego de 48 h, las células son lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturizantes. Una fracción de los lisados (3%) es utilizada como *input*. Las proteínas purificadas son eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS. Las muestras son sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*.

Utilizando esta técnica pudimos detectar SUMOilación de Akt1, Akt2, SRPK1 y SRPK2; mientras que no detectamos SUMOilación de ninguna de las CLKs. Este resultado fue muy interesante ya que abrió interrogantes con respecto no sólo a conocer si esta modificación podría ser regulada por SF2/ASF, sino también a dilucidar cómo esta nueva modificación encontrada puede estar afectando actividades ya conocidas de estas proteínas. Por este motivo significó un muy buen punto de partida para esta tesis de doctorado, en la cual tratamos de desentrañar ambos interrogantes. Como ejemplo mostramos en la figura R3 los experimentos correspondientes a la SUMOilación de Akt1 y SRPK1.



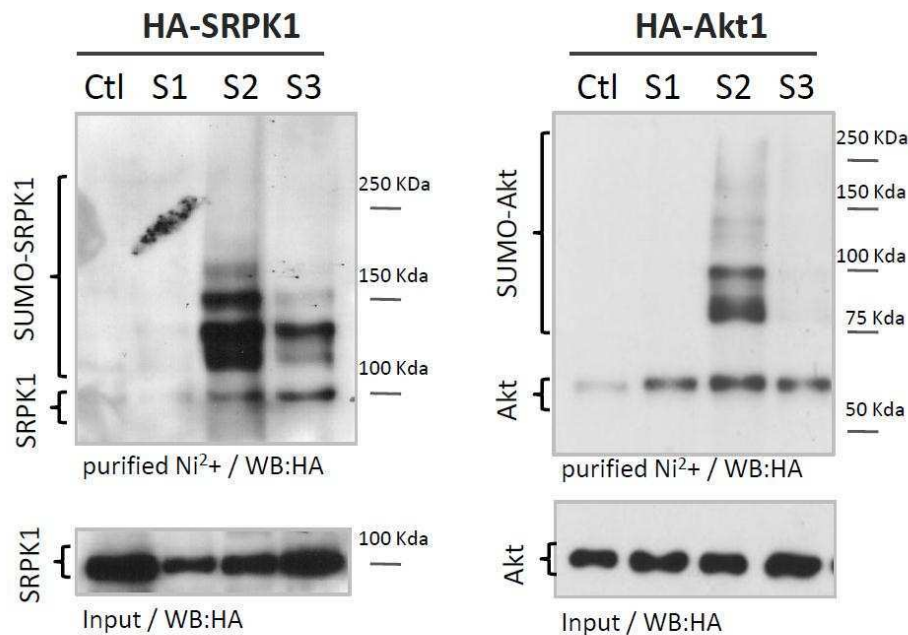


Figura R3 | **SUMOilación de Akt1 y SRPK1.** Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HIS-SUMO1, 2 o 3 (S1,S2,S3) y con los vectores de expresión que se indican. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturalizantes. Una fracción de los lisados (3%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel.

En la figura R3 se observa que se detectó SUMOilación para el caso de co-expresión de las quinasas con SUMO2 (S2) y SUMO3(S3), pero no para SUMO1(S1). Esto pareció interesante en un principio, pero nos resultó sospechoso que para todas las proteínas blanco utilizadas fuera más intenso el patrón de SUMOilación detectado utilizando SUMO2, un poco menos el detectado con SUMO3 y casi indetectable el de SUMO1. Entonces chequeamos los niveles de expresión de estas tres isoformas de SUMO expresadas por nuestros vectores y pudimos observar efectivamente que SUMO2 se expresaba aproximadamente 40 veces más que SUMO1 y 5 veces más que SUMO3, con lo cual determinamos que las diferencias de niveles de SUMOilación de las proteínas sustrato con los distintos SUMOs podrían deberse a esta causa técnica y no a una afinidad diferencial de las proteínas por las distintas isoformas de SUMO.

**Las proteínas Akt1, Akt2, SRPK1, SRPK2 son sustrato de SUMOilación**

## 4.2. SF2/ASF MODULA LA SUMOILACIÓN DE AKT1

---

Teniendo en nuestras manos la observación de que algunas de las quinasas regulatorias de SF2/ASF son sustrato de SUMOilación, nos decidimos a dilucidar si SF2/ASF estaría regulando los niveles de SUMOilación de estas quinasas. Iniciamos nuestros estudios con una de las quinasas estudiadas. Elegimos Akt1 por distintos motivos. Por un lado por tratarse de la quinasa de SF2/ASF descrita por nuestro grupo, con lo cual contamos con numerosas herramientas para estudiarla. Además, nos pareció muy interesante ya que es una de las proteínas quinasas mayormente estudiadas, con gran incidencia en cáncer (está referida en más de 35.000 trabajos originales, 5.500 sólo en el último año).

Para evaluar si la conjugación de SUMO a Akt1 podía ser regulada por el factor de *splicing* SF2/ASF, analizamos los niveles de SUMOilación de Akt1 (con la técnica anteriormente explicada), frente a una curva de co-sobre-expresión transfectando con cantidades crecientes de plásmido de expresión para SF2/ASF. Este experimento lo realizamos tanto para la modificación de Akt1 por SUMO 2 como por SUMO 3. Solo en el caso de la conjugación de SUMO 3 obtuvimos mayores niveles de SUMOilación de Akt1 a mayores niveles de sobre-expresión de SF2/ASF, con lo cual concluimos que esta proteína podría estar ejerciendo una actividad de tipo E3 ligasa de SUMO para Akt1, específicamente para la conjugación de esta a SUMO-3(Figura R4).

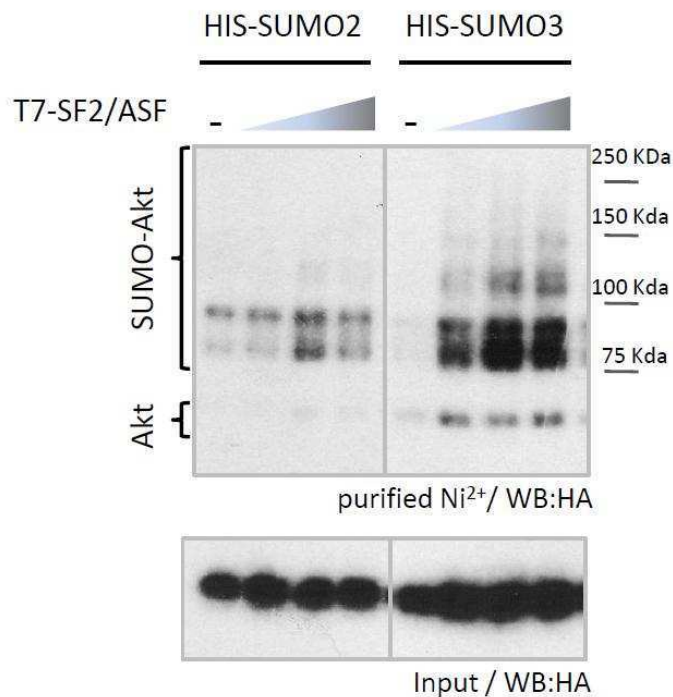


Figura R4 | **La sobre-expresión de SF2/ASF estimula la SUMOilación de Akt1.** Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HA-Akt1, HIS-SUMO2 o HIS-SUMO3 y diferentes cantidades del vector de expresión T7-SF2/ASF (5, 20, 100 ng). Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturalizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel.

Para profundizar en este hallazgo analizamos el nivel de SUMOilación de Akt1 frente a la sobre-expresión de distintos mutantes de SF2/ASF en los cuales se delecionó cada uno de los tres dominios caracterizados para esta proteína (dos dominios de unión a ARN, RRM1 y RRM2, y un dominio RS de repetición de argininas y serinas). Por datos previos ya publicados por nuestro grupo, sabíamos que el dominio RRM2 de SF2/ASF es necesario y suficiente para generar un aumento en la SUMOilación global de proteínas en células en cultivo. Coincidentemente, obtuvimos como resultado que el aumento en la SUMOilación de Akt1 determinado por SF2/ASF depende de la presencia del dominio RRM2 en esta última proteína. Más aun, la sobre-expresión de una proteína formada sólo por este dominio RRM2 ya es suficiente para generar un aumento en la SUMOilación de Akt1 (Figura R5).

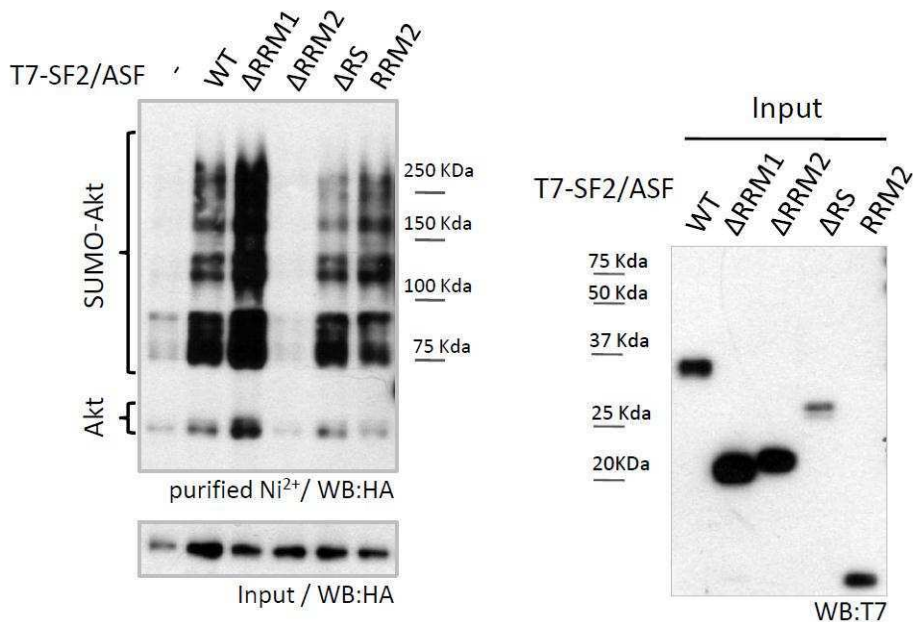


Figura R5 | El dominio RRM2 de SF2/ASF es necesario y suficiente para generar un aumento en la SUMOilación de Akt1. Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HA-Akt1, HIS-SUMO3 y las diferentes mutantes de delección de la proteína T7-SF2/ASF. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel.

**La sobre-expresión de SF2/ASF aumenta la SUMOilación de Akt1 de manera dependiente de su dominio RRM2**

El hecho de que SF2/ASF pueda aumentar la SUMOilación de Akt1 sugiere que podría existir alguna clase de retroalimentación en el eje estudiado. Alternativamente el aumento en la fosforilación de SF2/ASF (determinado por Akt1) y el aumento en la SUMOilación de Akt1 (disparado por SF2/ASF) podrían ser eventos totalmente independientes. Para comenzar a descifrar la conexión entre ambos eventos decidimos evaluar si SF2/ASF podía generar un aumento en la SUMOilación de un mutante de Akt1 que carece de actividad quinasas (Akt KM). Observamos que SF2/ASF es capaz de

aumentar también la SUMOilación de este mutante así como lo hace para la proteína Akt salvaje (figura R6). Estos experimentos y resultados no permiten aún asegurar la existencia o no de algún tipo de retroalimentación en el eje PI3k-Akt-SF2/ASF debida a una interconexión de los eventos estudiados (fosforilación de SF2/ASF y SUMOilación de Akt). Otros experimentos serían necesarios para concluir sobre esta posible regulación cruzada.

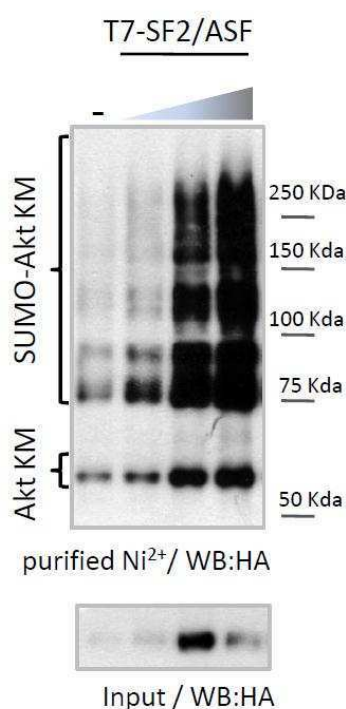


Figura R6 | **La sobre-expresión de SF2/ASF estimula la SUMOilación de Akt1 KM.** Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HA-Akt1 KM, HIS-SUMO3 y diferentes cantidades del vector de expresión T7-SF2/ASF (5, 20, 100 ng). Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina *Ni<sup>2+</sup>-NTA* en condiciones desnaturizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel.

### 4.3. SUMOILACIÓN DE AKT1

---

En los resultados expuestos anteriormente demostramos por primera vez que la proteína quinasa Akt1 es sustrato de conjugación por SUMO y que los niveles de SUMOilación pueden ser regulados por la proteína SR SF2/ASF. Llegado este punto nos preguntamos qué efecto podría tener esta nueva modificación post-traducciona en la actividad de Akt1. Desde el momento de este descubrimiento surgieron muchos interrogantes que intentamos responder a lo largo del desarrollo de esta tesis. Algunos de ellos se enumeran a continuación: ¿Es necesaria la SUMOilación para la actividad quinasa de Akt1? ¿Es diferencialmente necesaria para algunas de las vías de señalización disparadas por Akt1? ¿Tiene alguna interacción con otras modificaciones post-traduccionales conocidas para esta proteína? Dado que Akt cambia de localización subcelular, por ejemplo durante su activación, ¿Dónde ocurre la SUMOilación de Akt? ¿Hay algún compartimento celular en el que Akt1 se encuentra más SUMOilada?, y por ultimo ¿La SUMOilación de Akt1 tiene alguna relevancia en la actividad tumorigénica de esta proteína?.

Para seguir profundizando y validando la SUMOilación de Akt1, testeamos si Akt1 es capaz de interaccionar con la enzima conjugadora E2, Ubc9. Como se explicó en la introducción, para la vía de la SUMOilación existe sólo una proteína E2 descrita. Expresamos la proteína GST o la proteína de fusión GST-Ubc9 en bacterias, la purificamos, la incubamos con extractos de células HEK293T sobre-expresando HA-Akt1 salvaje 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 R7, HA-Akt1 fue precipitada por GST-Ubc9 pero no por GST solo.

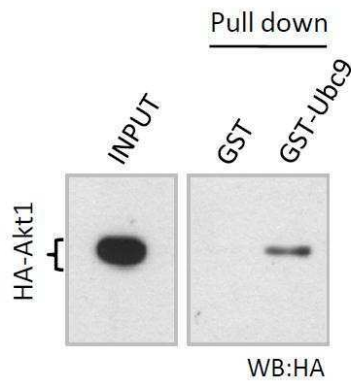


Figura R7 | **Ensayo de pulldown de Akt1, con GST y GST-Ubc9.** Células HEK293T fueron transfectadas con vector de expresión para HA-Akt1 y cuando alcanzaron una confluencia aproximada del 90% fueron lisadas. Luego de tomar una alícuota de los lisados como material de partida (*input*), los mismos fueron incubados con GST o GST-Ubc9 para realizar el ensayo de *GST pull-down*. El producto final fue resuelto en *SDS-PAGE* y el *western blot* fue llevado a cabo con un anticuerpo anti-HA.

**Akt1 interacciona específicamente con Ubc9**

A continuación decidimos testear si la SUMOilación de Akt1 podía reproducirse en un sistema libre de células, un sistema de SUMOilación *in vitro*.

La enzima recombinante E1 fue combinada con SUMO1 o SUMO2 e incubadas sin o con cantidades crecientes de la enzima E2 (Ubc9), usando como sustrato de SUMOilación a HA-Akt1 recombinante purificada de células HEK293T. En la figura R8 se observan bandas de menor movilidad electroforética (correspondientes a Akt1 SUMOilada) que aumentan en concordancia con el aumento de la cantidad de enzima E2 utilizada. Estas bandas no se detectan en ausencia de la enzima E2.

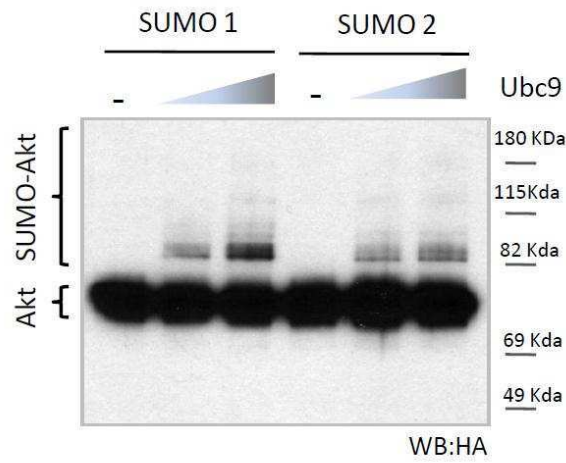


Figura R8 | **SUMOilación de Akt1 *in vitro***. Las reacciones de SUMOilación *in vitro* se llevaron a cabo utilizando como sustrato 250 ng de HA-Akt1 recombinante purificada de células HEK293T. El sustrato fue incubado con 150 ng de la enzima activadora de SUMO, E1, y sin o con cantidades crecientes (0, 100 y 500 ng respectivamente) de la enzima conjugadora de SUMO, E2 y 1  $\mu$ g de SUMO1 o SUMO2. Las reacciones fueron frenadas luego de 3hs de incubación a 30 grados. Luego de realizado un *SDS-PAGE*, la SUMOilación de Akt1 fue evaluada por *western blot* con un anticuerpo anti-HA.

**Akt1 puede ser SUMOilada *in vitro***



#### 4.4. E3 LIGASAS DE LA VÍA DE SUMOILACIÓN Y AKT1

---

Sabemos que a diferencia de la ubiquitinación, el proceso de SUMOilación *in vitro* no necesita una enzima E3 ligasa. A pesar de estos resultados muchos autores sostienen que la actividad E3 ligasa de SUMO es indispensable *in vivo*, tanto para que ocurra como para regular este proceso en condiciones menos favorables que las de una reacción *in vitro* en la que se agregan cantidades muy elevadas de las enzimas E1 y E2.

Ya vimos que SF2/ASF podría estar actuando como E3 ligasa de Akt1 en células en cultivo, pero para no estar sesgados a esta única proteína estudiada en nuestro grupo decidimos testear otras E3 ligasas de SUMO ya descritas como son PIAS1, Pc2 y TOPORS.

Co-expresamos en células HEK293T vectores de expresión para cada una de estas E3 ligasas (etiquetadas con FLAG) junto con vectores de expresión para HIS-SUMO2 y HA-Akt1. Además usamos como control positivo del aumento de SUMOilación la transfección con un vector de expresión para la E2 conjugadora Ubc9. Realizamos la purificación en una resina de níquel, e hicimos western-blot con un anticuerpo anti-HA tanto para la fracción purificada como para el *input*. Además chequeamos el nivel de expresión de las E3 ligasas sobre-expresadas por western-blot con anticuerpo anti-FLAG.

En la figura R9 se ve que la sobre-expresión de PIAS1 aumenta fuertemente el nivel de SUMOilación de Akt1, casi al nivel de la sobre-expresión de la enzima E2, Ubc9. La sobre-expresión de TOPORS también genera un aumento de la SUMOilación de Akt1 en menor medida, mientras que la sobre-expresión de Pc2 no tiene ningún efecto (cabe aclarar que esta última si tiene efectos sobre la SUMOilación de otras proteínas estudiadas por nuestro laboratorio, como por ejemplo hnRNP K) (Pelisch et al., 2012). Los niveles de expresión de estas proteínas son similares salvo por el menor nivel en la expresión de TOPORS, que podría explicar el menor aumento de la SUMOilación de Akt1 que provocó, con respecto a PIAS1.

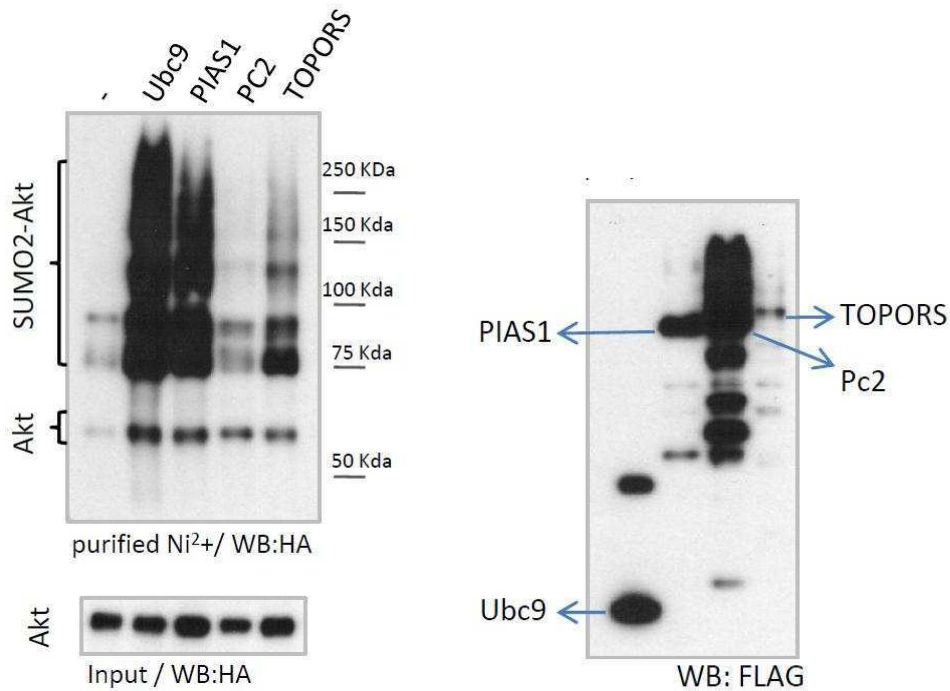


Figura R9 | **SUMOilación de Akt1 en respuesta a la sobre-expresión de las E3 ligasas PIAS1, Pc2 y TOPORS.** Células HEK293T fueron transfectadas con vectores de expresión HA-Akt1, HIS-SUMO2 y según se indica, FLAG-Ubc9, FLAG-PIAS1, FLAG-Pc2 o FLAG-TOPORS. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina *Ni<sup>2+</sup>-NTA* en condiciones desnaturizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel.

**La sobre-expresión de las E3 ligasas PIAS1 y TOPORS, pero no de Pc2, estimula la SUMOilación de Akt1**

#### 4.5. RELACIÓN DE LA SUMOILACIÓN DE AKT1 CON RESPECTO A SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

---

Debido a diversos trabajos que describen el movimiento intracelular de Akt sabemos que podemos encontrar esta proteína en diferentes compartimentos subcelulares, tanto en la membrana plasmática, el citoplasma, la membrana nuclear, el nucleoplasma y hasta en el retículo endoplásmico. Nos preguntamos si la versión SUMOilada de Akt1 que detectamos en experimentos anteriores está o no confinada a uno de estos compartimentos.

Para responder esta pregunta transfectamos células HEK293T con vectores de expresión para Ubc9, HIS-SUMO2 y HA-Akt1. Luego levantamos las células intactas y realizamos una extracción por diferencia de tonicidad (ver Materiales y Métodos), con la cual pudimos obtener una fracción citoplasmática (citoplasma y membrana plasmática) y una fracción nuclear (nucleoplasma y membrana nuclear). Tomamos una alícuota *input* de cada fracción y con el resto realizamos purificaciones por resina de níquel. Analizamos los purificados e *inputs* por western-blot, manteniendo la relación de cantidad entre las fracciones para poder compararlas. Al analizar la figura R10 observamos una gran diferencia en los niveles de SUMOilación de Akt1 proveniente de las distintas fracciones. La proteína Akt1 SUMOilada se encuentra casi exclusivamente en la fracción nuclear, habiendo muy poca cantidad en la fracción citoplasmática. La proteína nuclear Histona 3 (H3) fue utilizada para controlar la pureza de las fracciones.

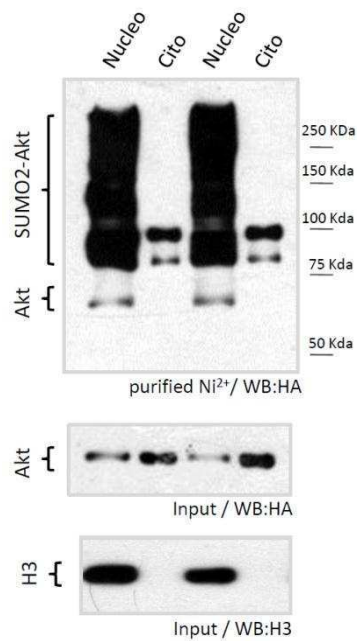


Figura R10 | Niveles de SUMOilación de Akt1 en la fracción nuclear y citoplasmática. Células HEK293T fueron transfectadas con vectores de expresión para HIS-SUMO2, HA-Akt1 y Ubc9. Luego de 48 h, las células fueron levantadas y se procedió con el fraccionamiento de núcleo y citoplasma (Cito). Ambos extractos fueron sometidos al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturalizantes. Una fracción de los lisados (3%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel.

**Existen mayores niveles de SUMOilación en la fracción nuclear de Akt que en la fracción citoplasmática.**

#### 4.6. LISINAS BLANCO DE SUMOILACIÓN DE AKT

---

Una de las mayores dificultades para estudiar cómo afecta la SUMOilación de Akt1 (o cualquier otro sustrato) a su actividad, es el hecho de lograr regular esta modificación específicamente en Akt1. Es decir, podríamos realizar la sobre-expresión o depleción de la E2 ligasa Ubc9 o algún factor primordial de la vía de SUMOilación y medir la actividad de Akt1, pero de esta manera estaríamos afectando la SUMOilación global de la célula sin poder separar los correspondientes efectos indirectos debido a cambios en la SUMOilación de otras proteínas celulares sobre la actividad que queremos testear. Un poco más específico, sería realizar esto mismo pero con la sobre-expresión y/o silenciamiento de las E3 ligasas de SUMOilación antes observadas para Akt1, pero se sabe que en la vía de SUMOilación estas proteínas son bastante promiscuas y afectan la conjugación por SUMO de un número no menor de proteínas. Uno de los enfoques más utilizados en trabajos publicados para intentar resolver este problema es generar proteínas mutantes para los aminoácidos lisinas blanco de SUMOilación en la proteína sustrato estudiada. Generalmente se realiza el mutante de sustitución de aminoácido lisina por arginina, que es un aminoácido con la misma carga neta pero no es sustrato de SUMOilación, con la intención de no generar cambios estructurales fuertes en la proteína blanco.

Para este fin, analizamos mediante el uso de dos programas de computación (*software*) especializados (SUMOplot y SUMOsp) los posibles sitios blanco de SUMOilación (aminoácidos lisinas) más cercanos al consenso conocido para esta modificación (“ΨKxD/E” donde Ψ es un aminoácido grande e hidrofóbico) dentro de la estructura primaria de la proteína. Las lisinas blanco putativas se muestran en naranja en la figura R11. El color naranja más oscuro indica que esos sitios se acercan más al consenso.

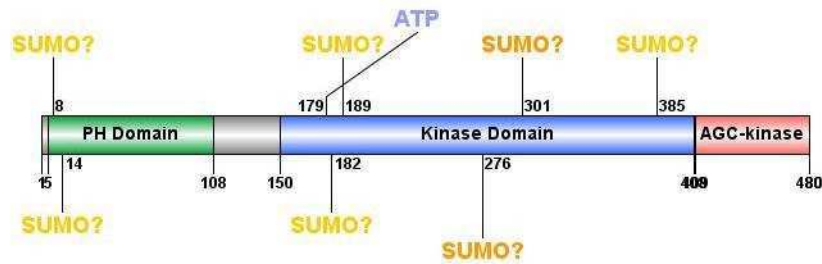


Figura R11 | **Esquema de sitios putativos de SUMOilación de Akt1.** El esquema muestra los tres dominios clásicos de Akt1, dominio PH, dominio quinasa y dominio hidrófobo N-terminal conservado entre las AGC quinasa. Bajo el rótulo “SUMO?” se identifican los sitios putativos de SUMOilación de Akt1 predichos por bioinformática. El naranja mas oscuro significa que esos sitios tienen mejor mayor probabilidad de ser sitios reales de SUMOilación. Bajo el rótulo ATP se encuentra marcado el aminoácido responsable de la unión de ATP para ejercer la actividad quinasa.

Realizamos mutagénesis dirigida (ver Materiales y Métodos) generando un cambio de lisina (K) por arginina (R) en la proteína Akt1 para cada una de las putativas lisinas blanco de SUMOilación. Además, utilizamos también mutantes provistos gentilmente por el laboratorio del doctor Hui-Kuan Lin los cuales habían sido utilizados para mapear sitios de ubiquitinación. Transfectamos todos estos mutantes (todos ellos con etiqueta HA) en células HEK293T junto con vectores de expresión para Ubc9 y HIS-SUMO2. Realizamos la purificación en una resina de níquel, e hicimos western-blot con un anticuerpo anti-HA tanto para la fracción purificada como para el *input*. Comparando el nivel de SUMOilación de los distintos mutantes con el de Akt1 WT, observamos una disminución, marcada y reproducible, en el nivel de SUMOilación de los mutantes K276R y K301R (lisina número 276 y 301, respectivamente)(figura R12).

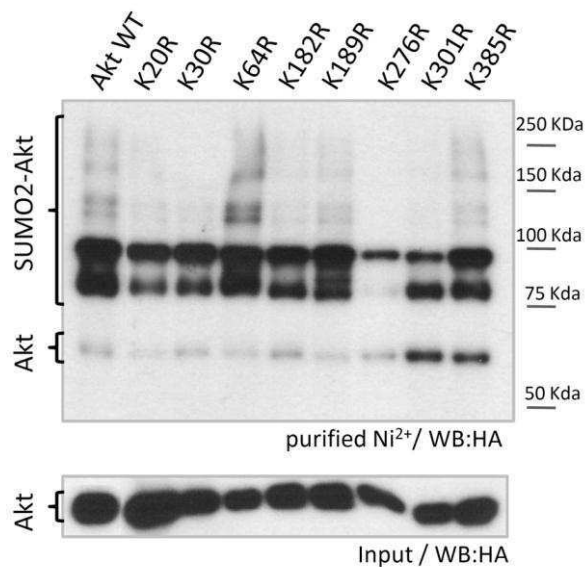


Figura R12 | **SUMOilación de distintos mutantes puntuales de Akt1.** Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión de FLAG-Ubc9 y HIS-SUMO2, y según se indica en la parte superior de la figura, vectores de expresión de HA-Akt1 salvaje o sus respectivos mutantes KR. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturalizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel

Si bien observamos que la SUMOilación en estos mutantes no se suprime completamente, conocemos por diversos casos descriptos en la bibliografía que muchas veces es necesario mutar más de una lisina blanco para generar una fuerte disminución de la SUMOilación de una determinada proteína. Por un lado porque se sabe que existen proteínas que pueden ser SUMOiladas en más de una lisina blanco, y por otro lado, se especula que como el sitio consenso de SUMOilación no es totalmente estricto, al mutar alguna de las lisinas blanco la maquinaria de SUMOilación puede comenzar a usar otras lisinas cercanas que en la proteína salvaje no eran utilizadas (lisinas crípticas). Esto ha llevado en algunos casos, como para la proteína Scc1, a tener que mutar 15 lisinas blanco para obtener una disminución considerable en la SUMOilación de esta proteína(Wu et al., 2012).

En base a los resultados anteriores decidimos generar el doble mutante K276R y K301R, al cual nos referiremos de ahora en más en esta tesis como Akt1 2KR (figura R13).

Comprobamos que al mutar ambas lisinas los niveles de SUMOilación de la mutante Akt1 2KR bajan considerablemente respecto de Akt1 WT.

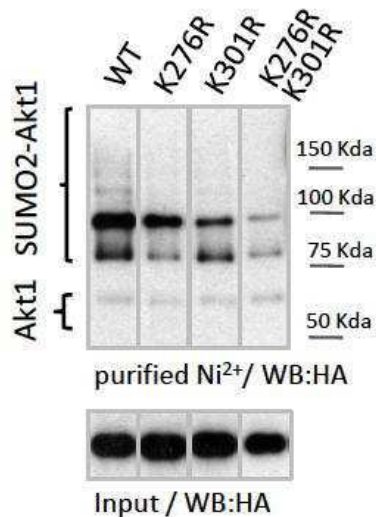


Figura R13 | **SUMOilación de distintos mutantes KR y 2KR de Akt1 en células HEK293T.** Células HEK293T fueron transfectadas con vectores de expresión para FLAG-Ubc9 y HIS-SUMO2, y según se indica, vectores de expresión de HA-Akt1 salvaje o sus respectivos mutantes KR. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina *Ni<sup>2+</sup>-NTA* en condiciones desnaturizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel.

Vale la pena mencionar que cuando estos mismos mutantes fueron transfectados en otra línea celular, células HeLa, los resultados fueron levemente diferentes, siendo suficiente la mutación en K276 para lograr una fuerte disminución en los niveles de SUMOilación de Akt1 (figura R14). Frente a estas leves diferencias entre líneas celulares, optamos por utilizar el mutante Akt1 2KR, cuya SUMOilación se encuentra fuertemente disminuida en todas las líneas celulares testeadas, para posteriores experimentos relacionados con la relevancia funcional de la SUMOilación de Akt.



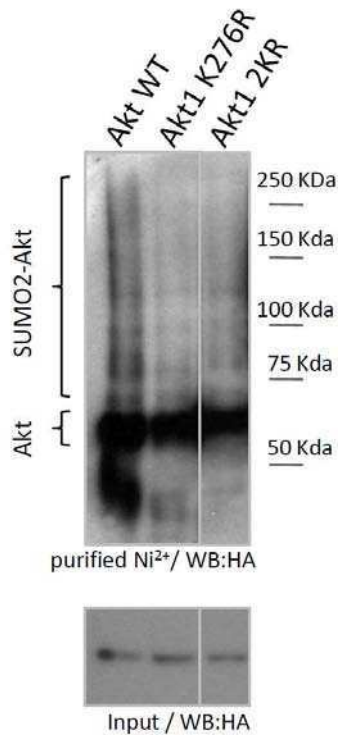


Figura R14 | **SUMOilación de distintos mutantes KR y 2KR de Akt1 en células HeLa.** Células HeLa transfectadas establemente con la construcción HIS-SUMO2, fueron re-transfectadas con vectores de expresión para FLAG-Ubc9, y según se indica, vectores de expresión de HA-Akt1 salvaje o sus respectivos mutantes KR. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturalizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel.

Adicionalmente, procedimos a generar un nuevo mutante para afectar la secuencia consenso de SUMOilación correspondiente a la lisina 276 pero sin modificar este residuo propiamente dicho. Dicha secuencia consenso es un caso particular, por un lado es una secuencia consenso canónica de SUMOilación (CM) pero a su vez cumple con los requisitos de una secuencia consenso invertida de SUMOilación (ICM). A este caso que contiene dos tipos de motivos consenso de SUMOilación, decidimos llamarle PCM (del inglés *palindromic consensus motif*)(figura R15). Para más detalles ver la sección 1.2.4 del capítulo introducción de esta tesis.

CM:		Ψ	K	X	E/D	
ICM:	E/D	X	K	Ψ		
PCM:	E/D	Ψ	K	Ψ	E/D	
Akt1:	R	D	L	K	L	E N
		274		276		278

Figura R15 | **Comparación entre motivos consenso de SUMOilación y la secuencia aledaña a la lisina 276 de Akt1** . Se muestran las secuencias aminoacídicas de los distintos motivos consenso de SUMOilación descriptos CM, ICM y PCM. En la secuencia se representa Ψ como un aminoácido grande e hidrofóbico, K es la lisina blanco de la reacción, X es cualquier aminoácido, D es ácido glutámico, E es ácido aspártico, L es leucina, R es arginina y N es asparragina. En la parte inferior se indica el número de aminoácido correspondiente a la estructura primaria de Akt1 de humanos.

Decidimos reemplazar por mutagenesis dirigida los residuos ácido aspártico 274 y ácido glutámico 278 por los residuos asparragina y glutamina respectivamente. A este mutante en el consenso de SUMOilación lo llamamos Akt1 DN,EQ. Al transfectar esta construcción en células HEK293T, observamos que sus niveles de SUMOilación son similares a los niveles de SUMOilación que presenta el mutante en la lisina 276 (Akt1 K276R), y a su vez ambos son inferiores a los niveles de SUMOilación presentados por la proteína Akt WT (figura R16). Este resultado sugiere fuertemente que la lisina 276 es un sitio de SUMOilación de Akt1, y minimiza las posibilidades de haber detectado disminución en la SUMOilación del mutante K276R debido a efectos indirectos de otras modificaciones post-traduccionales que estén teniendo lugar en dicha lisina.

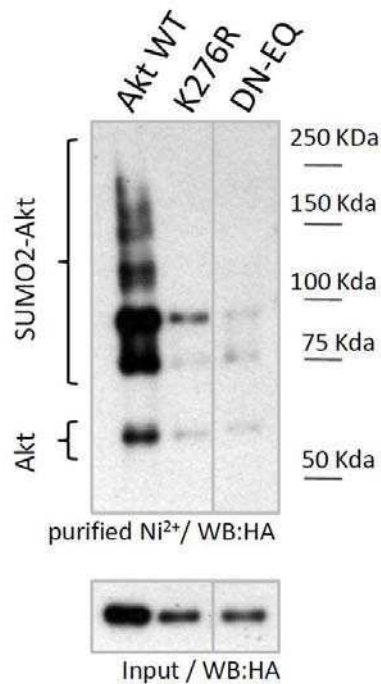


Figura R16 | **SUMOilación del mutante de Akt1 en el sitio consenso de SUMOilación correspondiente a la lisina 276.** Células HEK293T fueron transfectadas con vectores de expresión para FLAG-Ubc9 y HIS-SUMO2, y según se indica, vectores de expresión de HA-Akt1 salvaje o sus respectivos mutantes. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel.

En la actualidad, para confirmar estos datos, estamos realizando experimentos de espectrometría de masa de Akt1 SUMOilado *in vitro* en colaboración con el laboratorio del profesor Ron Hay, en Dundee, Reino Unido. Así, mediante una técnica de detección de SUMOilación sitio específica, podremos mapear directamente el/los aminoácido/s lisina blanco de conjugación por SUMO en la proteína Akt1.

**Las proteínas mutantes Akt1 K276R, K301R, y más aún 2KR, presentan una fuerte disminución en sus niveles de SUMOilación**

#### 4.7. RELACIÓN ENTRE LA SUMOILACIÓN Y LA ACTIVIDAD GENERAL DE AKT1

---

Teniendo en nuestras manos como herramienta la proteína mutante Akt1 2KR, la cual tiene muy disminuida la SUMOilación, nos propusimos comenzar a explorar si estaba afectada la actividad quinasa de este mutante en células en cultivo. Para realizar esto sobre-expresamos en células HEK293T y HeLa, tanto Akt1 WT como Akt1 2KR, y como control positivo una mutante constitutivamente activa de Akt llamada Akt-Myr. Preparamos lisados celulares e hicimos ensayos de western-blot con un anticuerpo llamado anti-*Akt Substrate* (Cell Signalling), el cual fue obtenido usando como epítotope un péptido correspondiente al sitio blanco consenso de fosforilación de Akt, en su estado fosforilado. Por lo tanto este anticuerpo es capaz de reconocer una gran cantidad de sustratos de Akt en su estado fosforilado. Como se observa en las figura R17 un western-blot de extracto total de células utilizando este anticuerpo da como resultado muchas bandas de distinta movilidad electroforética correspondientes a distintos sustratos de Akt fosforilados. Si comparamos las calles correspondientes a la sobre-expresión de Akt1 WT con respecto a las calles control podemos notar un leve aumento en la intensidad de las bandas. En cambio en el caso de la sobre-expresión de Akt1 2KR, no sólo no vemos ese aumento, sino que podemos observar una disminución de la intensidad, sugiriendo que este mutante podría estar actuando como dominante negativo del Akt1 endógeno. El aumento en la intensidad general correspondiente a los sustratos fosforilados de Akt es aún más notorio en las calles correspondientes a la sobre-expresión de Akt1-Myr para algunas bandas específicas. En el panel inferior se muestra el western-blot con anticuerpo anti-HA donde se ve que los niveles de expresión de las diferentes variantes de Akt1 fueron similares.

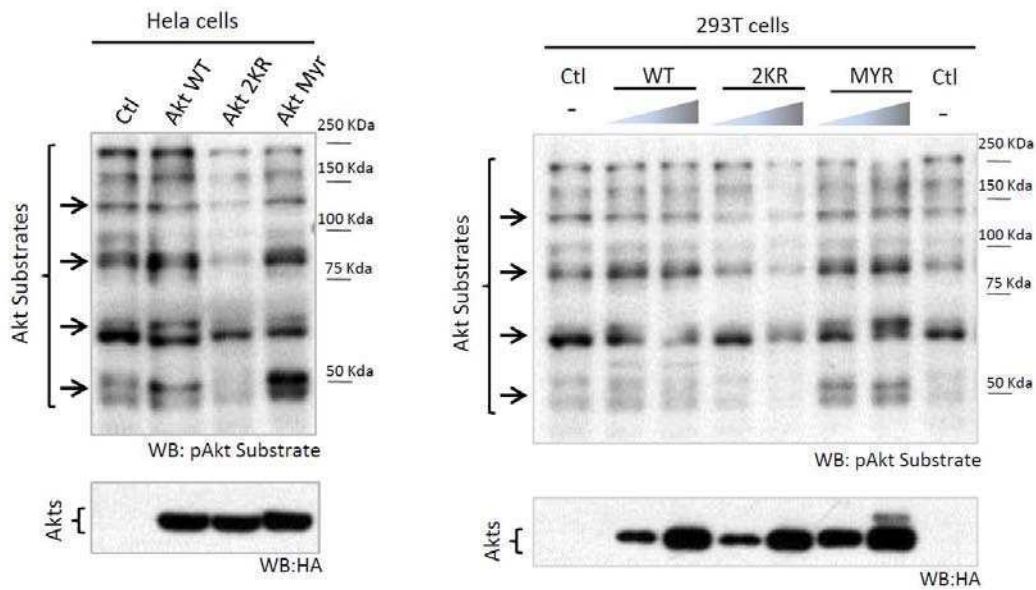


Figura R17 | **Niveles de fosforilación de sustratos de Akt frente a la sobre-expresión de Akt1 WT, 2KR y Myr.** En el panel de la izquierda: Células HeLa fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados en la parte superior y 48 h más tarde lisadas para ser sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot*, según se indica en la parte inferior derecha de cada panel. En el panel de la derecha: Células HEK293T fueron transfectadas con dos cantidades diferentes de los vectores de expresión indicados en la parte superior 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.

**La sobre-expresión de Akt1 2KR no aumenta, y hasta disminuye, los niveles de fosforilación de varios sustratos de Akt**

#### **4.8. EFECTOS DE AKT WT Y 2KR SOBRE LA ACTIVIDAD DE DOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, FOXO1 Y NFκB**

---

Sabemos que la quinasa Akt tiene la capacidad de modular la actividad de muchos factores de transcripción (ver introducción). Para estudiar esta actividad utilizamos vectores reporteros de la actividad transcripcional de dos factores que son modulados por Akt, FOXO1 y NFκB. Estos reporteros constan de un promotor mínimo al que se le clonaron río arriba varios sitios de unión para cada uno de estos factores de transcripción, y el cual dirige la expresión de la secuencia codificante del gen de la luciferasa clonado río abajo (ver recuadros figuras R18 y R20). De esta manera, midiendo actividad de la proteína luciferasa podemos hacer inferencia sobre cuan activos estaban dichos promotores, y por ende, los factores de transcripción que se unen a ellos. Co-transfectamos estos reporteros junto con diferentes cantidades de vectores de expresión para Akt1 ya sea WT o 2KR (de SUMOilación disminuida), y luego medimos actividad luciferasa en los extractos celulares.

Para el caso del factor de transcripción FOXO1 el resultado esperado según bibliografía era que la sobre-expresión de Akt1 promueva su fosforilación provocando la retención de este factor en citoplasma, y consecuentemente, disminuyendo su actividad transcripcional. Efectivamente eso es lo que observamos, tanto para la sobre-expresión de Akt1 WT y Akt1 Myr como para Akt1 2KR, no encontrando diferencias entre estos (figura R18). Los niveles de expresión de las distintas proteínas mutantes utilizadas fueron chequeados por western-blot.

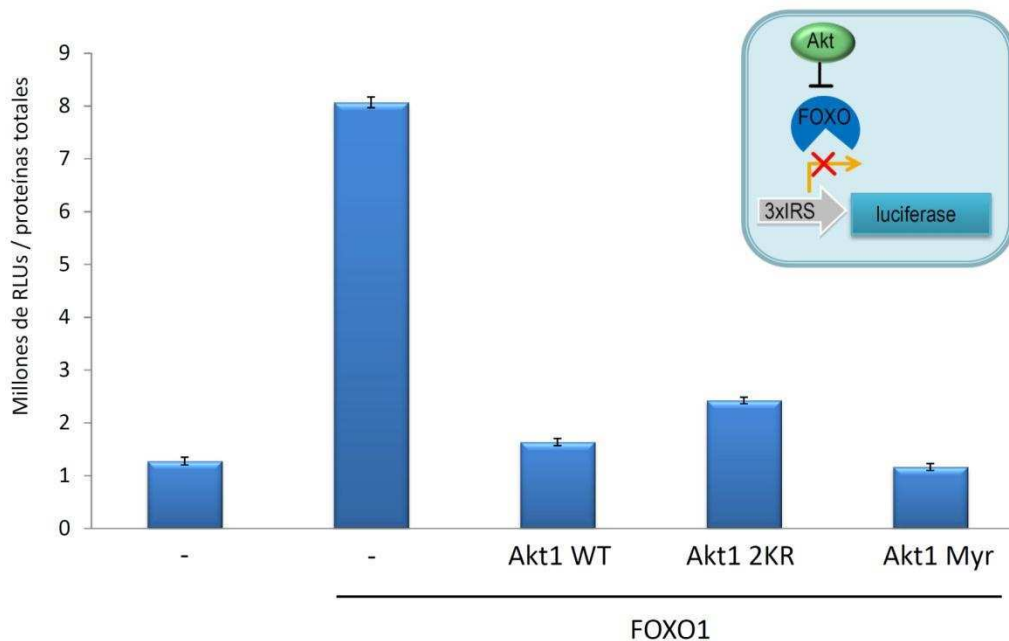


Figura R18 | **Actividad transcripcional de FOXO1 frente a la sobre-expresión de Akt1 WT o 2KR.** Células HEK293T, fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados en la parte inferior del gráfico junto con el reportero transcripcional de FOXO1. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y la actividad de Luciferasa fue medida según se indica en "Materiales y Métodos".

Con los tres vectores sobre-expresados se ve un efecto casi completo de inhibición de la actividad de FOXO1. Nos preguntamos si encontraríamos diferencias en la regulación transfectando distintas cantidades (más bajas) de las variantes proteicas WT y 2KR. Para responder esta pregunta realizamos el mismo experimento, pero esta vez sobre-expresamos las proteínas utilizando tres cantidades distintas de sus respectivos vectores de expresión. En este caso tampoco pudimos observar ninguna diferencia entre las curvas dosis respuesta para Akt1 WT y 2KR (figura R19).

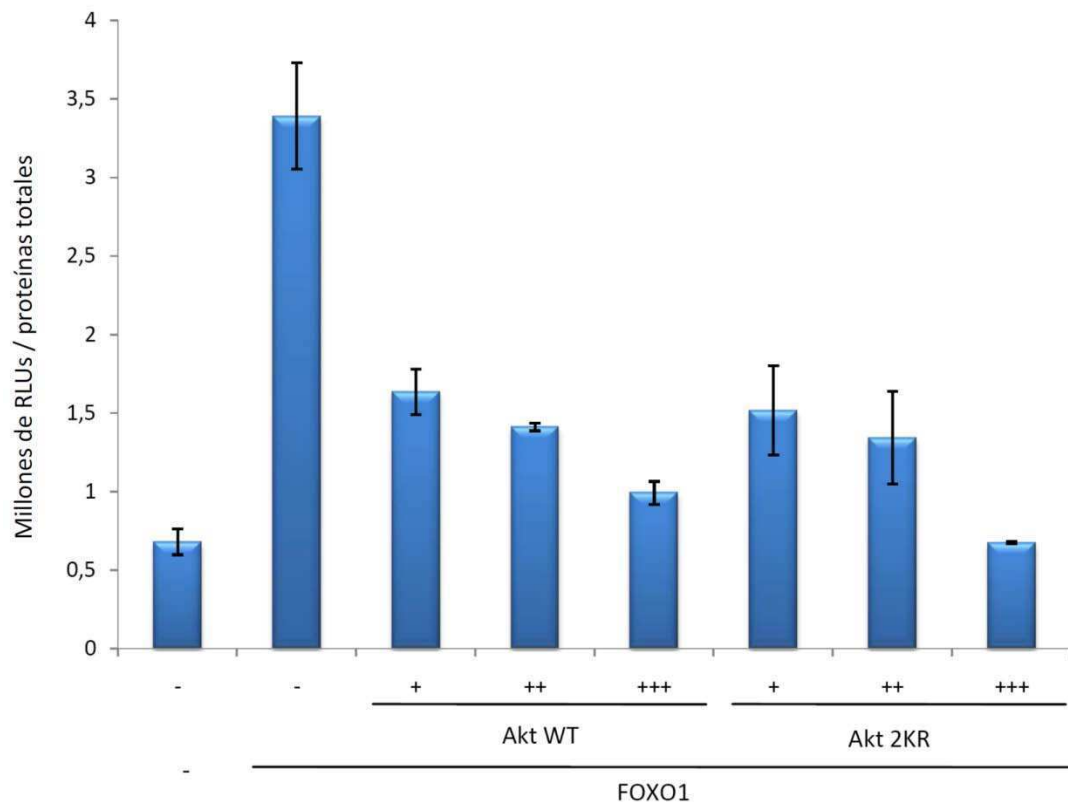


Figura R19 | **Actividad transcripcional de FOXO1 frente a la sobre-expresión de Akt1 WT y 2KR.** Células HEK293T, fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados en la parte inferior del gráfico junto con el reportero transcripcional de FOXO1(para HA-Akts; +:10ng, ++:40ng, +++:100ng). Luego de 48 h, las células fueron lisadas y la actividad de Luciferasa fue medida según se indica en “Materiales y Métodos”.

Como se explicó anteriormente realizamos en simultáneo experimentos para medir la actividad del factor de transcripción NFκB. Para el caso de este factor el resultado esperado según la bibliografía era que la sobre-expresión de Akt promueva la actividad transcripcional de este. Esto fue lo que observamos para la sobre-expresión de Akt1 WT. Sin embargo, no pudimos observar un aumento en la actividad de NFκB con la sobre-expresión de Akt1 2KR (figura R20).



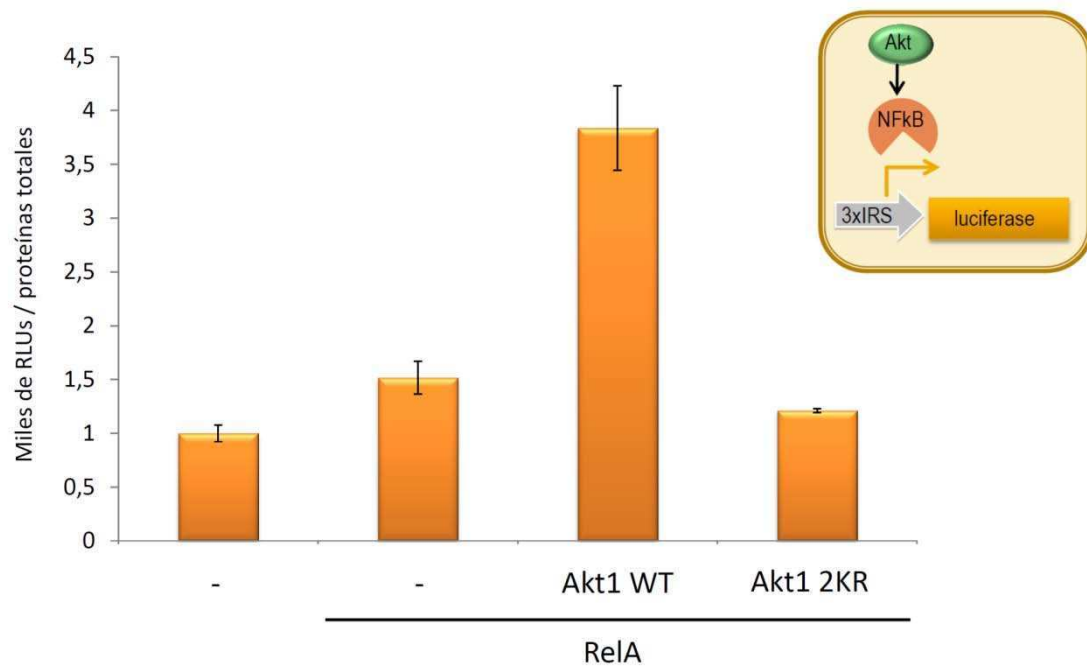


Figura R20 | **Actividad transcripcional de NFκB frente a la sobre-expresión de Akt1 WT y 2KR.** Células HeLa, fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados en la parte inferior del gráfico junto con el reportero transcripcional de NFκB. RelA corresponde a una de las dos subunidades del factor de transcripción NFκB. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y la actividad de Luciferasa fue medida según se indica en “Materiales y Métodos”.

También para este caso sobre-expresamos las proteínas Akt utilizando tres cantidades distintas de sus respectivos vectores de expresión. Si bien para Akt1 WT el aumento en la actividad del factor de transcripción NFκB correlaciona con el aumento de proteína sobre-expresada, no se observa ningún efecto de la sobre-expresión de Akt1 2KR (figura R21) ni si quiera en las más altas dosis.

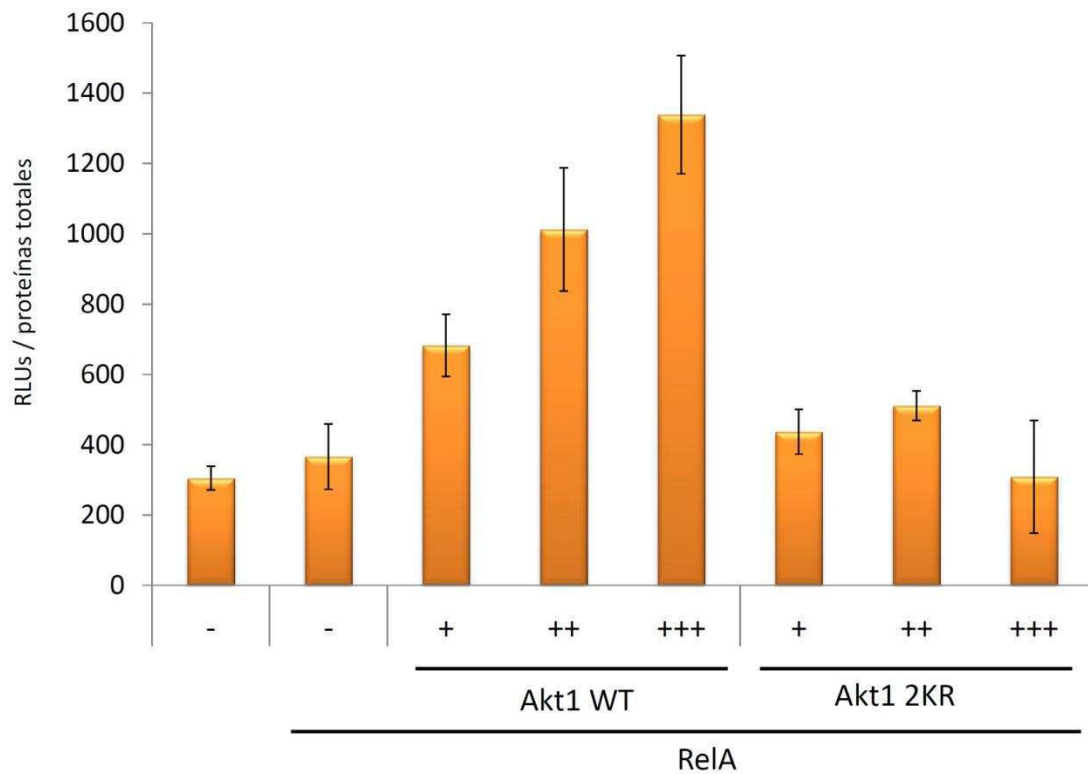


Figura R21 | **Actividad transcripcional de NFκB frente a la sobre-expresión de Akt1 WT y 2KR.** Células HeLa, fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados en la parte inferior del gráfico junto con el reportero transcripcional de NFκB (para HA-Akts; +:10ng, ++:40ng, +++:100ng). Luego de 48 h, las células fueron lisadas y la actividad de Luciferasa fue medida según se indica en “Materiales y Métodos”

**La SUMOilación de Akt1 sería indispensable para la actividad de esta proteína como regulador de la actividad del factor de transcripción NFκB pero no es necesaria para regular la actividad de FOXO1**

#### 4.9. SUMOILACIÓN DE AKT Y LA REGULACION DEL *SPLICING* ALTERNATIVO

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio demostramos que la actividad de Akt regula los patrones de *splicing* alternativo de distintos genes (en particular el exón EDI del gen de fibronectina) y le hemos asignado un nuevo rol como quinasa de proteínas SR (específicamente de SF2/ASF y 9G8, miembros de dicha familia) (Blaustein et al., 2004; Blaustein et al., 2005).

Nos preguntamos si la SUMOilación de Akt tendría alguna relevancia para su actividad como molécula reguladora del *splicing* alternativo. Para responder este interrogante analizamos la actividad del Akt mutante para SUMOilación (Akt1 2KR), en este eje de señalización estudiado por nuestro grupo (Eje PI3K-Akt-proteínas SR), teniendo como respuesta biológica final cambios en el *splicing* alternativo del gen de fibronectina. Utilizamos como herramienta un minigén reportero de *splicing* correspondiente al exón EDI de fibronectina (figura R22) ampliamente utilizado por nuestro laboratorio y otros (Caputi et al., 1994). Co-transfectamos en células en cultivo el minigén reportero, junto con Akt1 WT o 2KR. A su vez hicimos este mismo experimento en presencia de una mutante constitutivamente activa de la proteína Ras (pequeña GTPasa río arriba de PI3K en el eje), para observar la respuesta de estas variantes de Akt frente a la sobre-activación de la vía de estudio.

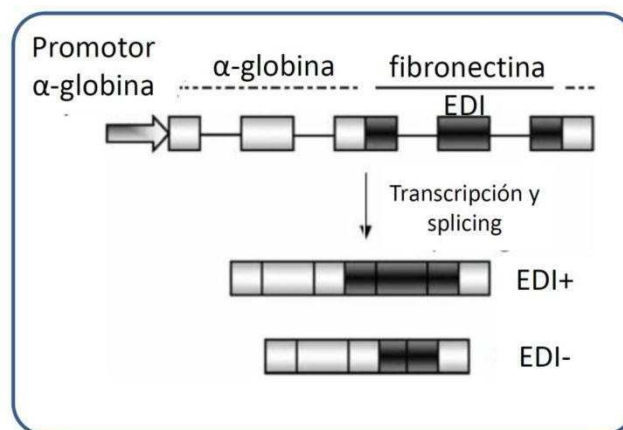


Figura R22 | Minigén reportero de *splicing* del exón EDI de fibronectina. Esquema del minigén reportero de *splicing* del exón EDI de fibronectina, junto con las dos isoformas de ARNm a las que puede dar origen a partir de un único pre-ARNm.

En concordancia con resultados previos de nuestro laboratorio, observamos que Akt1 WT aumenta la inclusión del exón EDI en ARNm maduros provenientes del minigén de fibronectina. Sin embargo, Akt1 2KR es incapaz de hacerlo (figura R23). Además, este aumento para Akt1 WT se hace aún más notorio en presencia de la sobre-activación de la vía por la sobre-expresión de una isoforma constitutivamente activa de Ras, mientras que Akt1 2KR se muestra insensible ante este estímulo. Se puede concluir que el papel de Akt dentro del eje PI3K-Akt-proteínas SR estudiado por nuestro grupo es totalmente dependiente de sus residuos K276 y/o K301.

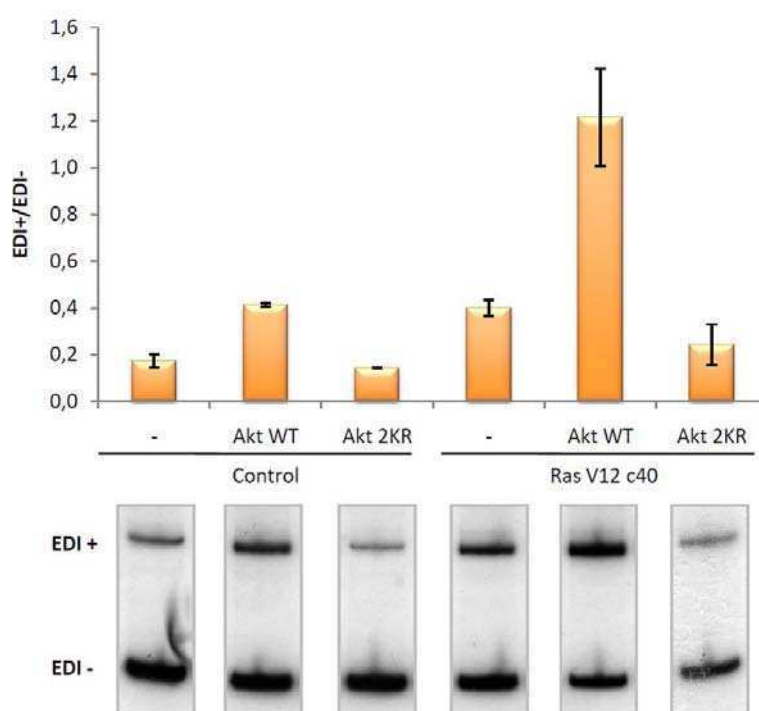


Figura R23 | Efecto de Akt1 WT y 2KR sobre el *splicing* del exón EDI de fibronectina. Células HeLa fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados en la parte inferior del gráfico (500 ng de minigén de EDI y 500 ng de HA-Akt WT o 2KR, 50ng de Ras V12 c40) y posteriormente lisadas para extraer el ARN. Luego de las reacciones de transcripción reversa (RT) y PCR radioactiva, las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida nativos, los cuales fueron secados y expuestos a placas radiográficas. Las bandas fueron cortadas y la radioactividad fue medida por el método Cherenkov (Cramer et al., 1999). Se muestra en un gráfico de barras la cuantificación de los resultados mostrados en el panel inferior.

Resultados similares a los anteriores fueron obtenidos utilizando un sistema de rescate de la actividad de Akt1 endógeno, con los dos mutantes. El sistema consiste en silenciar la proteína Akt1 endógena transfectando siRNA complementarios a la secuencia 3'UTR del ARNm de Akt1 endógeno. De esta manera se puede co-transfectar en estas células un vector de expresión de Akt1 que no posee la secuencia 3'UTR del Akt1 endógeno, y por lo tanto su expresión no será afectada por el siRNA utilizado. Así podremos observar si se recupera actividad de Akt1 en células transfectadas con el siRNA 3'UTR de Akt1 junto con vectores de expresión para Akt1 WT, 2KR o control, insensibles al siRNA. En la figura R24 observamos que la inclusión del exón EDI del minigén de fibronectina disminuye cuando el Akt1 endógeno es silenciado. Este efecto puede ser recuperado con la co-transfección con cantidades crecientes del vector de expresión para Akt1 WT, pero no con el vector de expresión para Akt1 2KR.

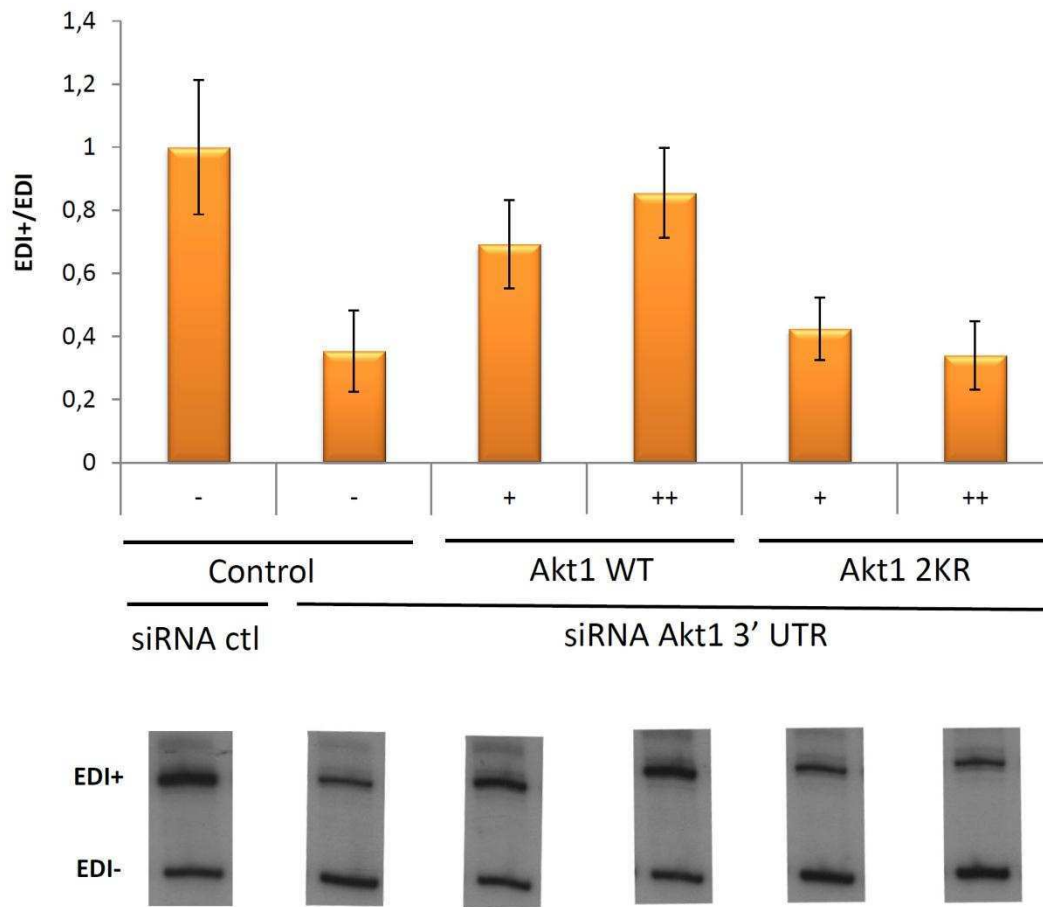


Figura R24 | **Rescate de actividad de Akt1 sobre el *splicing* del exón EDI de fibronectina.** Células HeLa fueron transfectadas con los siRNA indicados. 24 horas después fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados y posteriormente lisadas para extraer el ARN. Luego de las reacciones de RT y PCR radioactiva, las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida nativos, los cuales fueron secados y expuestos a placas radiográficas. Las bandas fueron cortadas y la radioactividad fue medida por el método Cherenkov (Cramer et al., 1999). Se muestra en gráficos de barra la cuantificación de los resultados mostrados en el panel inferior de la figura.

**La sobre-expresión de Akt1 WT, pero no de Akt1 2KR aumenta la inclusión del exón EDI del minigén de fibronectina**

Con el objetivo de continuar analizando si la SUMOilación de Akt es necesaria para su actividad regulatoria del *splicing* alternativo, realizamos experimentos similares pero en este caso usando el minigén reportero de *splicing* alternativo del gen Bcl-x. El gen Bcl-x puede dar dos isoformas de ARNm debido al uso diferencial de dos sitios 5'

alternativos de *splicing* en el segundo intron. Esto determinará dos variantes del exon 2 a nivel de ARNm maduro. Estas dos isoformas son conocidas como Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-x<sub>S</sub>. La isoforma mas larga, Bcl-x<sub>L</sub>, codifica para una proteína con características pro-supervivencia, mientras que la isoforma mas corta, Bcl-x<sub>S</sub> da lugar a una proteína con características pro-apoptóticas. Dado que la proteína quinasa Akt regula por variados mecanismos el equilibrio supervivencia/apoptosis celular, nos interesó saber si podría estar afectando este equilibrio también a través de la regulación del *splicing* alternativo de Bcl-x. Y mas aún, si esta actividad podría depender de su conjugación a SUMO.

Co-transfectamos en células HEK293T el minigén reportero de *splicing* de Bcl-x junto con Akt1 WT o 2KR. De modo ineresante observamos que la sobre-expresión de Akt1 WT, pero no de Akt1 2KR, tiene la capacidad de aumentar la proporción de la isoforma Bcl-x<sub>L</sub> sobre la de Bcl-x<sub>S</sub> provenientes del minigén de Bcl-x (figura R25). Por un lado este resultado es el primer indicio de que la vía de Akt regula el balance de las isoformas de actividades opuestas de Bcl-x. Por otro lado observamos que regula positivamente la expresión de la isoforma Bcl-x<sub>L</sub>, la cual tiene actividades pro-supervivencia, actividad que ha sido propuesta para Akt mediante otros mecanismos. Por último vemos que su SUMOilación es necesaria para esta actividad, lo que nos hace pensar que también puede ser necesaria para su ya conocida regulación de la supervivencia y ciclo celular.

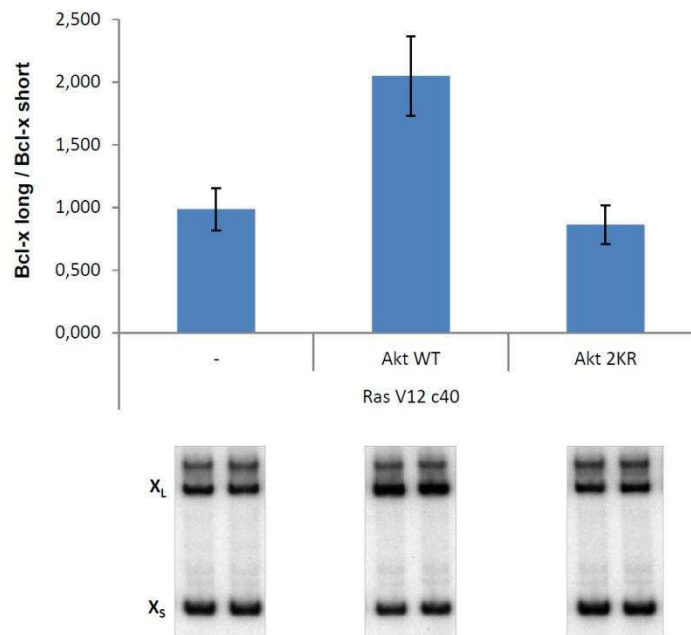


Figura R25 | Efecto de Akt1 WT y 2KR sobre el *splicing* alternativo del pre-ARNm proveniente del minigén de Bcl-x. Células HeLa fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng de minigén de EDI y 500 ng de HA-Akt WT o 2KR) y posteriormente lisadas para extraer el ARN. Luego de las reacciones de RT y PCR radioactiva, las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida nativos, los cuales fueron secados y expuestos a placas radiográficas. Las bandas fueron cortadas y la radioactividad fue medida por el método Cherenkov. (Cramer et al., 1999). Se muestra en gráfico de barras la cuantificación de los resultados mostrados en el panel inferior.

**La sobre-expresión de Akt1 Wt, pero no la de Akt1 2KR, aumenta la proporción de la isoforma Bcl-x<sub>L</sub> sobre la Bcl-x<sub>S</sub> del minigén de Bcl-x**



#### 4.10. EFECTOS DE AKT WT Y 2KR EN CICLO CELULAR

---

Como fue descrito en la introducción, la vía de señalización disparada por la quinasa Akt1 tiene un rol muy importante en la progresión del ciclo celular. Se cree que Akt1 regula este proceso mediando la transición G1/S y la iniciación de la fase M del ciclo. Uno de los mecanismos descritos es a través de la fosforilación de la proteína MDM2. La fosforilación por Akt lleva a la inhibición de la degradación de la proteína MDM2. Debido a su estabilización y translocación al núcleo, MDM2 estimula la degradación de p53, y de esta manera, estimula la progresión del ciclo celular.

Para estudiar si el rol de Akt1 en ciclo celular se ve afectado en la mutante Akt1 2KR, se co-transfectaron células HEK293T con los vectores de expresión para Myc-MDM2, junto con HA-Akt1 WT o 2KR. Mediante ensayos de western blot se observaron mayores niveles de Myc-MDM2 ante la sobre-expresión de Akt1 WT que ante una transfección control, que pueden ser debido al ya reportado efecto de Akt1 sobre el aumento de la estabilidad de MDM2 (Feng et al., 2004). En el caso de la sobre-expresión de Akt1 2KR no sólo no se detecta este aumento en la estabilidad de MDM2, sino que se observan aún menores niveles de MDM2 que en el tratamiento control, sugiriendo que esta mutante actuaría como dominante negativo del Akt endógeno (figura R26).

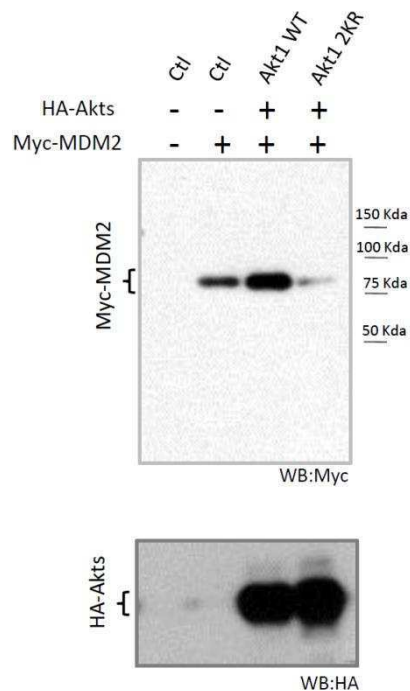


Figura R26 | **Niveles proteicos de MDM2 frente a la sobre-expresión de Akt WT y 2KR.** (A) Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados en la parte superior de la figura y posteriormente fueron lisadas. Los lisados celulares fueron resueltos en *SDS-PAGE* y el *western blot* fue llevado a cabo con el anticuerpo indicado en la parte inferior derecha de cada panel.

A continuación decidimos medir el porcentaje de células HEK293T en distintas fases del ciclo celular frente a la sobre-expresión de Akt1 WT o 2KR. Las células fueron transfectadas, levantadas a las 48 h, y fijadas. Se realizó una tinción de ADN con yoduro de propidio, y se procedió a medir la incorporación de este compuesto en células individuales, utilizando citometría de flujo.

Sobre-expresando Akt1 WT se encuentra un mayor porcentaje de células en fase S y G2, y menor número de células en fase G1; comparado con una transfección control o con sobre-expresión de Akt1 2KR (figura R27). Estos resultados sugieren que la sobre-expresión Akt1 WT, pero no de Akt1 2KR, estaría afectando la transición de fases G1/S del ciclo celular.

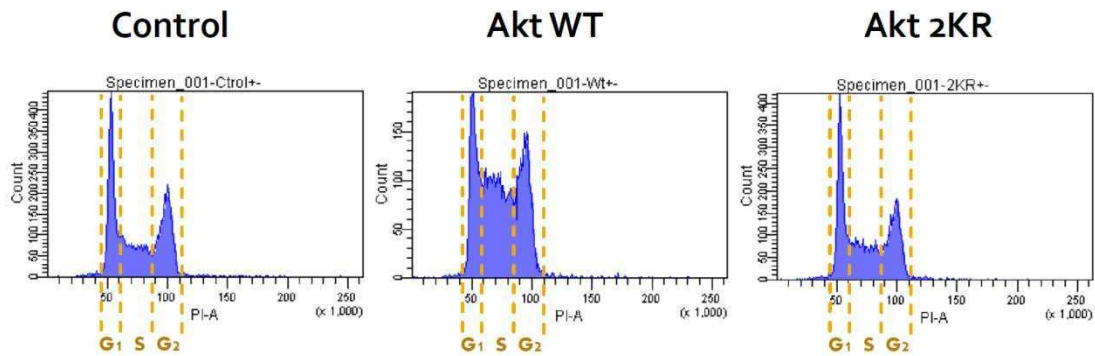


Figura R27 | **Perfiles de ciclo celular frente a la sobre-expresión de Akt WT o 2KR.** Células HEK293T fueron transfectadas con vectores de expresión para HA-Akt1 WT, HA-Akt1 2KR o control. Las células fueron transfectadas, levantadas a las 48 hs, y fijadas. Se realizó una tinción de ADN con yoduro de propidio, y se procedió a medir la incorporación de este químico utilizando citometría de flujo. Se realizó un histograma contando el número de células que poseen una determinada cantidad de fluorescencia. Ilustrativamente en cada panel se demarco en líneas de puntos el sector del perfil correspondiente a cada fase del ciclo celular.

En este mismo experimento quisimos ver si la sobre-expresión de Akt podía rescatar a las células del arresto en fase S del ciclo celular producido por un agente genotóxico llamado cis-platino. Se sabe que este agente puede producir apoptosis celular cuando se co-incuba las células con el inhibidor de la vía de PI3K/Akt, LY 294002 (Gagnon et al., 2004).

Se transfectaron células HEK293T con los vectores de expresión para HA-Akt1 WT, 2KR o control. Luego de 24 h de incubación, las células fueron tratadas con cis-platino (10 $\mu$ M) durante 24 h y posteriormente removidas de las placas por tripsinización. Se procesaron las muestras, y se midió el perfil de ciclo celular en un citómetro de flujo. Efectivamente se observa un aumento en la proporción de células en la fase S, pero no G2/M, en el caso de las células control tratadas con cis-platino (figura R28). La sobre-expresión de Akt1 WT puede revertir muy levemente este arresto en fase S, generando un muy pequeño aumento de la proporción de células en fase G2/M; mientras que esto no sucede en el caso de la sobre-expresión de Akt1 2KR. Llamativamente también se denota un cambio global de menor proporción de células en todas las fases del ciclo.

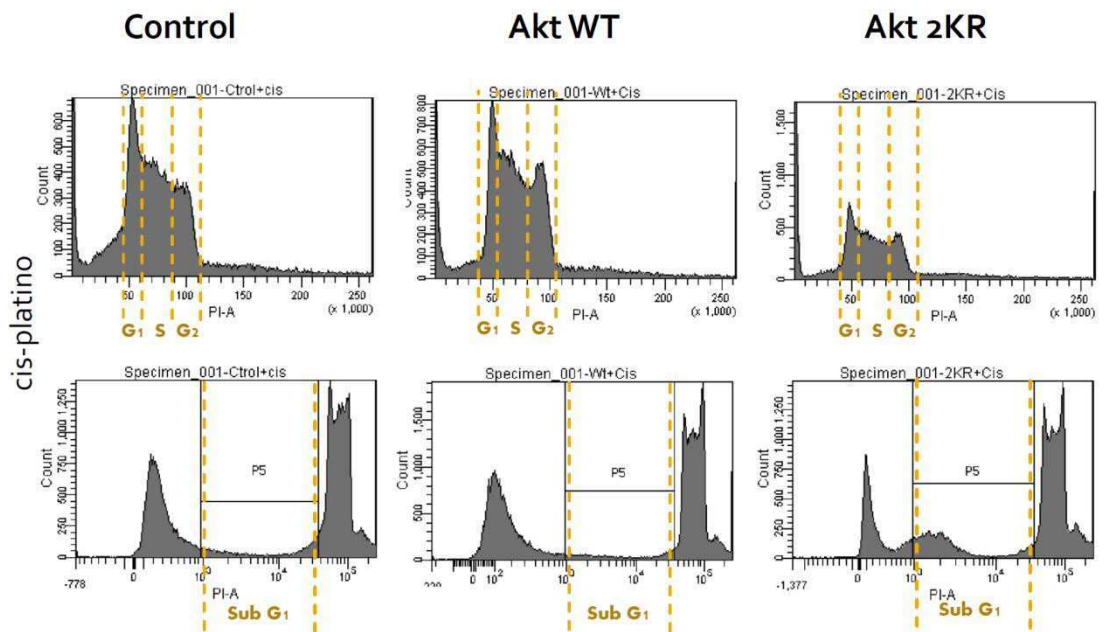


Figura R28 | **Perfiles de ciclo celular frente a la sobre-expresión de Akt WT o 2KR en células tratadas con cis-platino.** Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HA-Akt1 WT, HA-Akt1 2KR o control. 24 hs antes de ser levantadas y fijadas fueron tratadas con cis-platino 10uM. Se realizó una tinción de ADN con yoduro de propidio, y se procedió a medir la incorporación de este químico utilizando citometría de flujo. Se realizó un histograma contando el número de células que poseen una determinada cantidad de fluorescencia. Ilustrativamente en cada panel se demarcó en líneas de puntos el sector del perfil correspondiente a cada fase del ciclo celular.

Observando minuciosamente los perfiles nos dimos cuenta de que esto se debía a un aumento en la region Sub G1 del perfil del ciclo celular, la cual se la asocia directamente con la apoptosis celular (figura R28). Es decir, detectamos una mayor sensibilidad hacia el tratamiento con el agente cis-platino en las células que sobre-expresan Akt1 2KR con respecto a las que sobre-expresan Akt1 WT o el control. Esto indica que el cis-platino genera un aumento en la apoptosis celular en las células que sobre-expresan Akt1 2KR, similar a lo que ocurre cuando se utilizan los inhibidores de la vía PI3K/Akt (figura R29). Esto es un indicio más de que el mutante no SUMOilable Akt1 2KR podría estar actuando como dominante negativo.

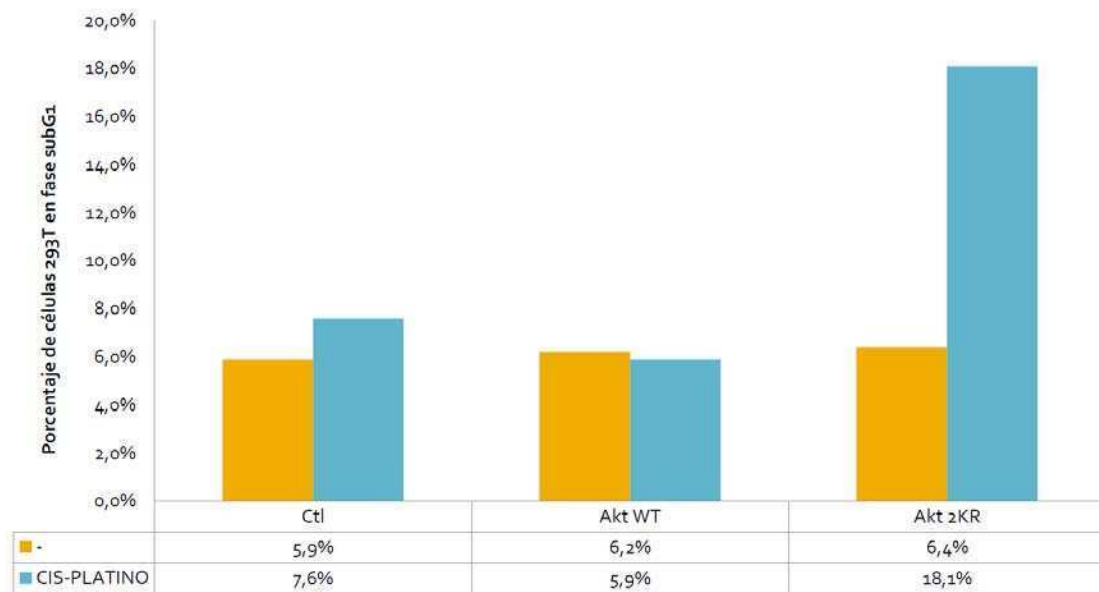


Figura R29 | **Porcentaje de células en fase Sub G1 frente a la sobre-expresión de Akt1 WT o 2KR, y al tratamiento con cis-platino.** Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HA-Akt1 WT, HA-Akt1 2KR o control. 24 hs antes de ser levantadas y fijadas fueron tratadas con cis-platino 10 $\mu$ M o con vehículo control. Se realizó una tinción de ADN con ioduro de propidio, y se procedió a medir la incorporación de este químico en célula individuales, utilizando citometría de flujo. En la figura se muestra la cuantificación de los datos obtenidos.

#### 4.11. RELACIÓN ENTRE LA SUMOILACIÓN Y LA FOSFORILACIÓN DE AKT

---

El parámetro más utilizado a lo largo de los últimos 25 años para medir la actividad de Akt1 en la célula es su nivel de fosforilación en los residuos T308 y S473. Como todos los integrantes de la familia de quinasas AGC, la fosforilación en estos dos residuos es necesaria para la completa activación de esta quinasa. Dada la relevancia que tienen estas modificaciones post-traduccionales en la actividad de Akt, decidimos tratar de dilucidar cuál es la relación que existe entre las mismas y la conjugación por SUMO de Akt.

Lo primero que hicimos fue medir los niveles de SUMOilación de Akt en respuesta a la alteración de los niveles de fosforilación de Akt. Para este fin, transfectamos células HEK293T con los vectores de expresión para HIS-SUMO2 y HA-Akt1, junto con Ubc9 o un vector control. 24 hs antes de levantar las células, las tratamos con el inhibidor de PI3K LY 294002, o con solución vehículo. Luego procedimos a hacer la purificación de proteínas en matriz de níquel y posteriormente SDS-PAGE y western blot, tanto del purificado como del *input*.

En la figura R30 se observan niveles inferiores de fosforilación de Akt, tanto en T308 como en S473, en el caso de las células que fueron previamente tratadas con el inhibidor LY 294002. Sin embargo, a pesar de este cambio en la fosforilación, los niveles de SUMOilación de Akt se mantienen similares en ambas condiciones. Esto se observa ya sea para células con un *background* de bajos niveles de SUMOilación (células control) de Akt, como para células con un *background* de altos niveles de SUMOilación de Akt (células con sobre-expresión de Ubc9). Además, no se observan cambios en la fosforilación de Akt frente a cambios en los niveles de SUMOilación de Akt dados por la sobre-expresión de Ubc9. Estos resultados indicarían que no hay subordinación entre estas diferentes modificaciones post-traduccionales.

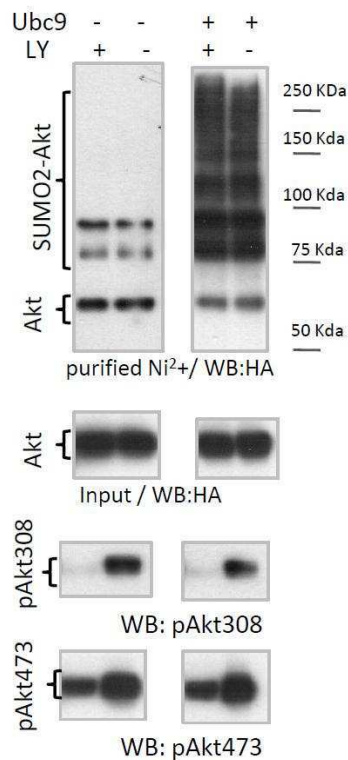


Figura R30 | **SUMOilación de Akt1 en distintas condiciones de inhibición de la vía PI3K/Akt y activación de la vía de SUMOilación.** Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HA-Akt1, FLAG-Ubc9 y HIS-SUMO2, y según se indica, fueron tratadas por 18 horas con el inhibidor LY. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina *Ni<sup>2+</sup>-NTA* en condiciones desnaturalizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. Las proteínas purificadas fueron eluidas con imidazol 100 mM y 2% SDS (*purified*). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte inferior de cada panel

Por otro lado utilizamos diferentes vectores de expresión de Akt que nos ayudaron a sumar evidencias en este mismo sentido. Uno de ellos es el doble mutante T308D y S473D, que emula la fosforilación constitutiva de Akt1 en estos dos sitios. Además utilizamos el simple mutante T308A, que tiene el cambio de aminoácido treonina por alanina en la posición 308, y por lo tanto no puede ser fosforilado en este sitio. Comparamos los niveles de SUMOilación de estos mutantes con respecto a Akt1 WT, y no se observaron diferencias. Las pequeñas diferencias que se observan en el purificado también se observan en *input*, con lo cual son atribuibles a una pequeña diferencia de expresión entre estas tres variantes de Akt1 sobre-expresadas (figura R31).

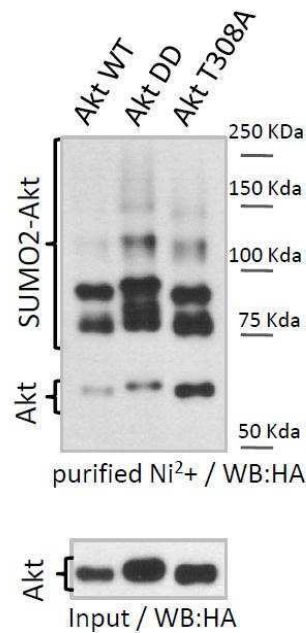


Figura R31 | **SUMOilación de distintos mutantes de fosforilación de Akt1.** Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión para FLAG-Ubc9 y HIS-SUMO2, y según se indica en la parte superior del gráfico, vectores de expresión de HA-Akt1 o sus respectivos mutantes. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturalizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. 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 de cada panel

Posteriormente, medimos los niveles constitutivos de fosforilación de Akt WT y 2KR (deficiente en SUMOilación), tanto en células HEK293T crecidas en medio libre de suero (0% FBS) como en células cultivadas en medio con 10% de suero fetal bovino (10% FBS). Estas células fueron transfectadas con los vectores de expresión para HA-Akt1 WT o 2KR, e incubadas durante 48 hs utilizando medios con las diferentes cantidades de suero antes señaladas. Se lisaron las células, y se procedió a la inmuno-precipitación con anticuerpo anti-HA. Esto fue realizado para luego poder diferenciar los niveles de fosforilación de las variantes Akt1 sobre-expresadas del Akt WT endógeno. Se realizaron ensayos de *western-blot* de los inmunoprecipitados, y no pudieron observarse diferencias en los niveles de fosforilación entre HA-Akt WT y 2KR (figura R32).



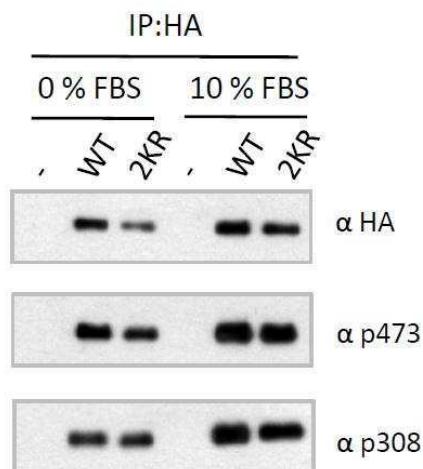


Figura R32 | **Niveles de fosforilación de Akt1 WT y 2KR.** Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores de expresión HA-Akt1 o HA-Akt1 2KR. Luego de 48 h incubadas en medio con 0% o 10% de suero fetal bovino, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de inmuno-precipitación utilizando un anticuerpo anti-HA.. Los inmuno-precipitados fueron sometidos a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte derecha de cada panel.

Todos estos resultados demuestran que los cambios en los niveles constitutivos de estas modificaciones post-traduccionales de Akt, la fosforilación en T308/S473 y la SUMOilación en K276/K301, no están correlacionados. Resta saber aún, si por ejemplo frente a la activación de la vía PI3K/Akt, los cambios transitorios en la fosforilación de Akt (o bien la cinética de estos cambios) se ven afectados en el mutante no SUMOilable de Akt1, Akt1 2KR.

Para responder este interrogante realizamos experimentos de rescate de Akt1 endógeno en células HeLa. Como ya fue explicado en la sección “SUMOilación de Akt y la regulación del *splicing* alternativo”, silenciamos la proteína Akt1 endógena transfectando siRNA complementarios a la secuencia 3'UTR del ARNm Akt1 endógeno. Al día siguiente transfectamos estas células con dos cantidades (100 y 500 ng) de los vectores de expresión para Akt1 WT o para Akt1 2KR. Luego de 36 hs, lavamos las células con PBS y las incubamos 12 hs en medio libre de suero. Por último tratamos las células 30 minutos con el factor de crecimiento IGF-1 en una concentración de 100 ng/ml o con solución vehículo. Utilizamos estos lisados en ensayos de *western-blot* utilizando distintos anticuerpos indicados en la figura 33.

Comparando las calles 1 y 2 con las calles 3 y 4 pudimos observar una disminución en la señal utilizando el anticuerpo Akt total, comprobando el silenciamiento por el siRNA utilizado. La señal aumentó drásticamente en las calles 5 a 12 que son las correspondientes a la sobre-expresión de las dos variantes de Akt.

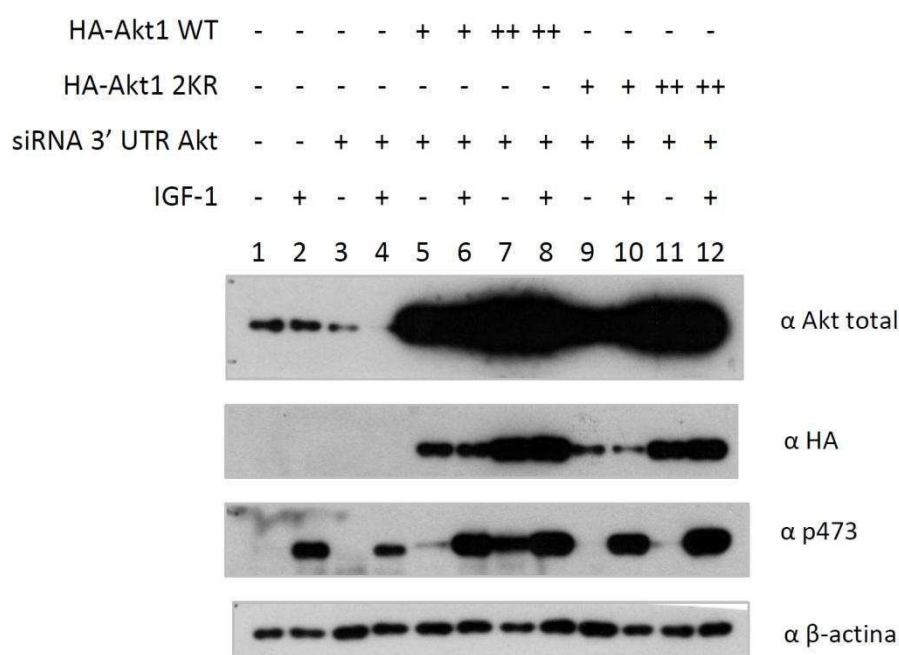


Figura R33 | **Niveles de fosforilación de Akt1 WT y 2KR.** Células HEK293T fueron transfectadas con siRNA control o siRNA 3'UTR Akt. Luego de 24 hs fueron transfectadas con dos cantidades (100 y 500 ng) de los vectores de expresión HA-Akt1 o HA-Akt1 2KR. Luego de 36 h, fueron incubadas por 12 hs en medio con 0% suero. 30 minutos antes de levantarlas fueron tratadas con el factor de crecimiento IGF-1 (100ng/ml). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte derecha de cada panel.

Si observamos los niveles de fosforilación de Akt podemos notar un aumento con el tratamiento con IGF-1 en la situación control (comparar calle 2 con respecto a 1). Este aumento es menor en el caso de células transfectadas con el siRNA 3'UTR de Akt1, lo que correlaciona con que se observa menor cantidad de Akt endógeno en esta situación (comparar calles 3,4 con 1,2). Por último, vemos que este aumento en la fosforilación en S473 con el tratamiento con el factor de crecimiento IGF-1 se incrementa tanto para la sobre-expresión de Akt1 WT como de Akt1 2KR (comparar calles 5 a 12 con calles 3 y 4). Esto indicaría que el mutante Akt1 2KR se estaría fosforilando en respuesta a IGF-1, y

por lo tanto estaría respondiendo a este estímulo de manera similar a Akt1 WT (comparar calles 5 y 6 con 11 y 12 que tienen niveles similares de sobre-expresión de Akt WT y 2KR).

Este experimento es muy sugestivo pero aún tiene el problema que no podemos separar la fosforilación de las proteínas sobre-expresadas de la fosforilación de la proteína Akt endógena, debido a que estas proteínas tienen la misma movilidad electroforética. Una explicación alternativa del fenómeno observado podría ser el hecho de que la mutante Akt1 2KR estimule la fosforilación de Akt endógeno. Para resolver esta duda estamos realizando experimentos de inmuno-precipitación de las proteínas sobre-expresadas, para analizar específicamente la fosforilación de estas proteínas en respuesta al estímulo utilizado en este experimento.

**No existe subordinación entre la fosforilación y la SUMOilación de Akt, al menos para las modificaciones en los residuos estudiados**

Dado que parece que ambos mutantes aumentan su fosforilación frente al estímulo con el factor de crecimiento IGF-1, quisimos observar si este aumento en la fosforilación correlacionaba con un aumento en la actividad de estas proteínas. Para este propósito tomamos los mismos extractos proteicos del experimento anterior y realizamos ensayos de western blot utilizando el anticuerpo anti-*Akt Substrate* antes mencionado. De modo interesante observamos que al menos para dos sustratos (no identificados) diferentes (marcados con una flecha en la figura 34), la sobre-expresión del Akt 2KR no pudo rescatar el aumento en la fosforilación de dichos sustratos disparado por la activación por IGF-1. Si observamos la figura 34, podemos ver que en las calles control aumentan los niveles de señal en las bandas marcadas con la flecha, ante el estímulo con IGF-1 (comparar calle 1 con 2). Este aumento es menor o nulo en el caso de células transfectadas con el siRNA 3'UTR de Akt1, lo que correlaciona con que se observa menor cantidad de Akt endógeno en esta situación (comparar calles 3 y 4 con 1 y 2). Cuando rescatamos el noqueo de Akt1 endógeno mediante la sobre-expresión de Akt WT se vuelve a observar el aumento en la señal de estas bandas, lo que no puede observarse al rescatar con la sobre-expresión de Akt 2KR. Este resultado es muy interesante porque seguíere que a pesar de que la proteína Akt 2KR puede responder al estímulo mediante un aumento en su fosforilación, esta no es capaz de fosforilar ciertos sustratos.

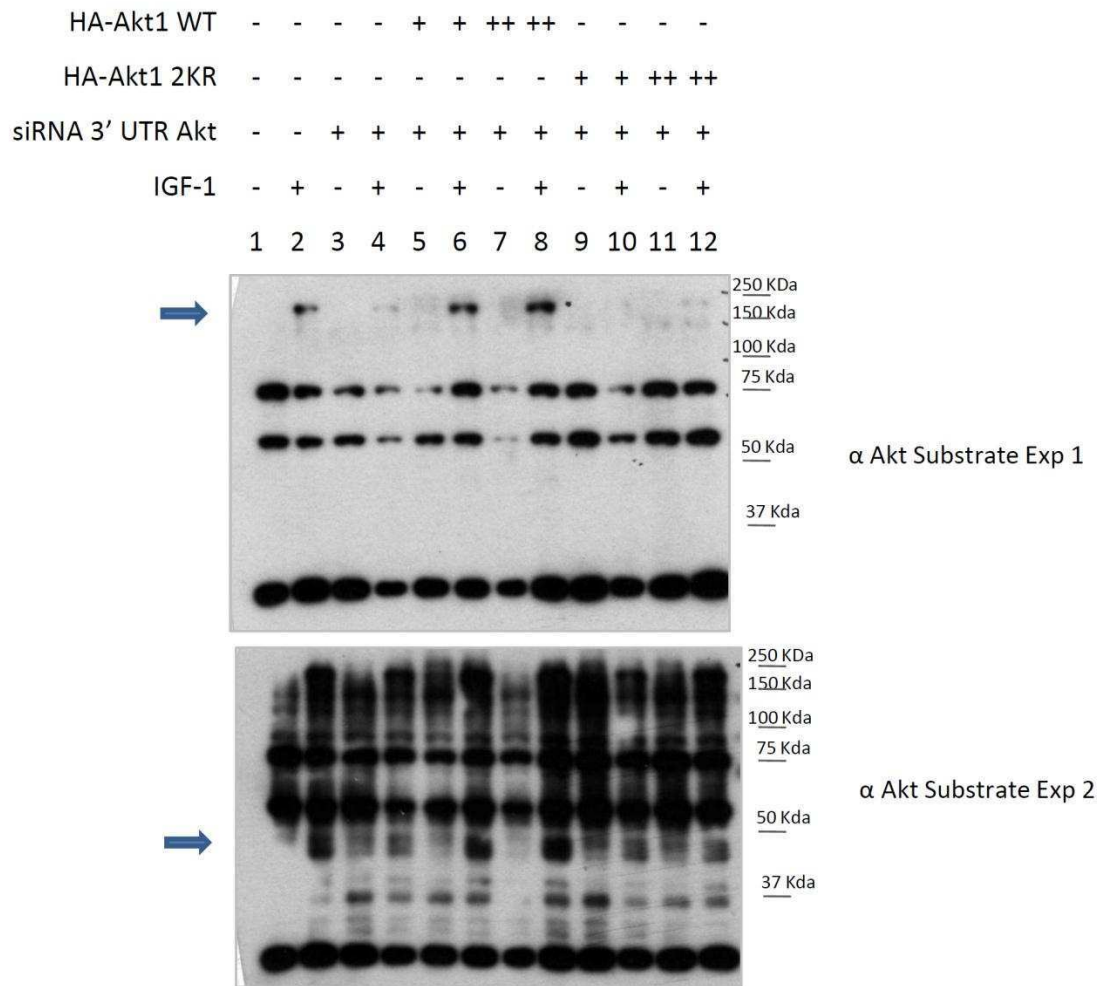


Figura R34 | Niveles de fosforilación de sustratos de Akt1 WT y 2KR. Células HEK293T fueron transfectadas con siRNA control o siRNA 3'UTR Akt. Luego de 24 hs fueron transfectadas con dos cantidades (100 y 500 ng) de los vectores de expresión HA-Akt1 o HA-Akt1 2KR. Luego de 36 h fueron incubadas por 12 hs en medio con 0% suero. 30 minutos antes de levantarlas fueron tratadas con el factor de crecimiento IGF-1 (100ng/ml). Las muestras fueron sometidas a *SDS-PAGE* y *western blot* según se indica en la parte derecha de cada panel.

#### 4.12. SUMOILACIÓN DE AKT Y CANCER

---

Por último nos propusimos estudiar la relación entre la SUMOilación de Akt y su conocida influencia en el desarrollo y progresión tumoral. En los últimos años comenzó a cobrar importancia el descubrimiento de una mutación en el gen de AKT1 con gran incidencia en la enfermedad del cáncer. Esta mutación G>A en el nucleótido 49 de su secuencia codificante resulta en una sustitución de lisina por glutámico en el aminoácido 17 (E17K). Lo primero que hicimos fue estudiar si había alguna alteración en los niveles de SUMOilación de este mutante de Akt1, y además nos preguntamos qué pasaba si combinábamos este mutante con la doble mutación K276R y K301R. Para tal fin generamos por la técnica de mutagénesis dirigida los vectores de expresión para Akt1 E17K, y Akt1 E17K 2KR.

Transfectamos estos mutantes generados (todos con etiqueta HA) en células HEK293T conjuntamente con vectores de expresión para Ubc9 y HIS-SUMO2. Realizamos la purificación en una resina de níquel, e hicimos western-blot con un anticuerpo anti-HA tanto para la fracción purificada como para el *input*. De modo interesante, cuando comparamos el nivel de SUMOilación de los mutantes generados con el de Akt1 WT, vimos un fuerte aumento en el nivel de SUMOilación del mutante E17K, que es revertido cuando se agregan las mutaciones K276R y K301R (mutante E17K 2KR) (figura R35).

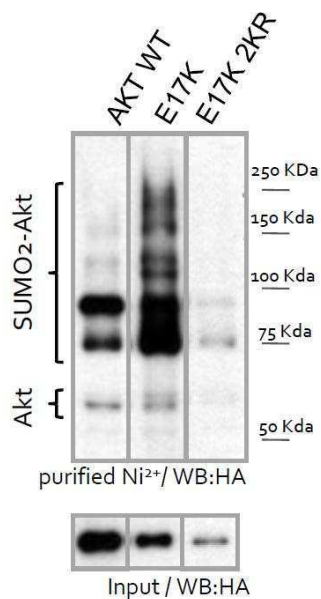


Figura R35 | **SUMOilación de distintos mutantes de Akt1.** Células HEK293T fueron transfectadas con vectores de expresión para FLAG-Ubc9 y HIS-SUMO2, y según se indica en la parte superior de la figura, vectores de expresión de HA-Akt1 WT o sus respectivos mutantes. Luego de 48 h, las células fueron lisadas y sometidas al protocolo de purificación con la resina  $Ni^{2+}$ -NTA en condiciones desnaturizantes. Una fracción de los lisados (1%) fue utilizada como *input*. 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 de cada panel

Frente a estos resultados decidimos comparar el nivel de actividad de estos mutantes de Akt1. Como primera aproximación utilizamos como herramienta el minigén reportero de *splicing* del exón EDI de fibronectina (ya explicado anteriormente). La sobre-expresión de Akt1 E17K genera un aumento aún mayor en la inclusión del exón EDI que la sobre-expresión de Akt1 WT, denotando un mayor nivel de actividad para este mutante, coincidente con los datos de la literatura que reportan su hiperactividad. En ambos casos, tanto para Akt1 WT como para Akt1 E17K, la mutación 2KR inhibe completamente el efecto estimulador de la inclusión de EDI (figura R36).

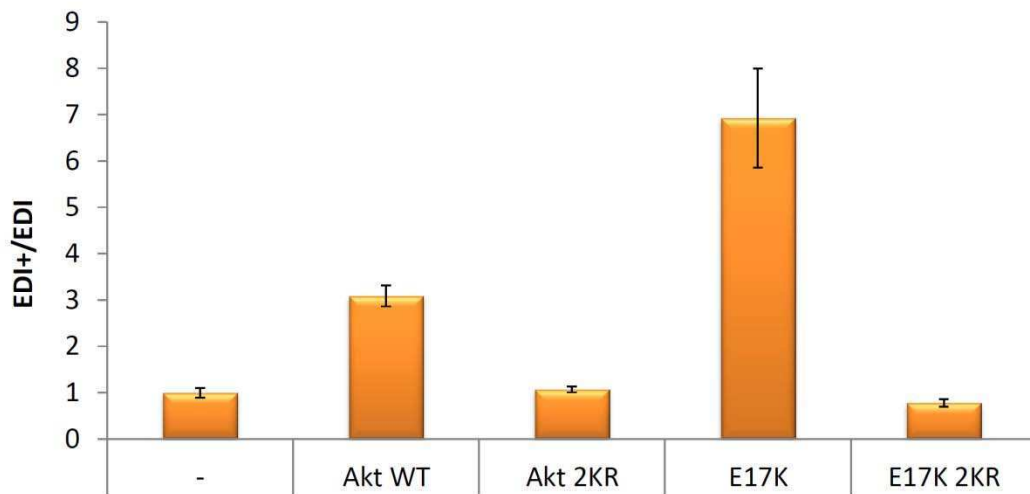


Figura R36 | **Efecto de Akt1 WT, 2KR, E17K y E17K 2KR sobre el *splicing* del exón EDI de fibronectina.** Células HeLa fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (500 ng de minigén de EDI y 500 ng de HA-Akts) y posteriormente lisadas para extraer el ARN. Luego de las reacciones de RT y PCR radioactiva, las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida nativos, los cuales fueron secados y expuestos a placas radiográficas. Las bandas fueron cortadas y la radioactividad fue medida por el método Cherenkov). Se muestra en gráfico de barras la cuantificación de los resultados obtenidos.

**La mutante Akt1 E17K muestra niveles aumentados de SUMOilación, los cuales son revertidos al mutar los residuos K276 y K301.**

## DISCUSIÓN

---

---

Comenzamos esta tesis indagando acerca del rol que podría tener la actividad estimuladora de la conjugación de SUMO de la proteína SR SF2/ASF, recientemente hallada y descrita por nuestro grupo, en la función de proteínas con la que la misma interacciona, en particular algunas de sus proteínas quinasas regulatorias. Para saber esto fue necesario conocer si alguna de estas proteínas podría ser sustrato de conjugación por SUMO. De modo interesante, observamos que Akt1 y Akt2 (entre otras quinasas), son sustrato de SUMOilación.

En los últimos 25 años, los estudios basados en la quinasa Akt han ido incrementando notablemente. Tal es así que hasta el año 2012 se han publicado más de 35.000 trabajos sobre esta quinasa de los cuales 5.500 fueron publicados tan sólo en 2011. El mayor interés viene dado por su importantísimo rol en la enfermedad del cáncer. De hecho, entre 50-80% de todos los tumores presentan una actividad elevada de Akt. En la actualidad, existen varias drogas diseñadas para perturbar esta vía de señalización en fase experimental clínica I, II y III(Engelman, 2009). Uno de los mayores problemas encontrados es la generación de resistencia a estas drogas, que puede ser debido en gran parte a la versatilidad y redundancia en la activación de esta quinasa por distintos factores, muchos de los cuales aún no son conocidos. En este sentido, el hallazgo de una nueva modificación post-traducciona en Akt, abre las puertas ofreciendo un nuevo nivel de regulación para las funciones de esta proteína.

El estudio de la conjugación por SUMO a un determinado sustrato es una tarea ardua. La SUMOilación es una modificación altamente reversible, y altamente inestable lo cual dificulta mucho su detección (Da Silva-Ferrada et al., 2012). La mayoría de los estudios clásicos sobre esta modificación fueron hechos con los sustratos con más altos niveles de SUMOilación de la célula, como por ejemplo, la proteína RanGAP1. En la última década ha habido un mejoramiento en algunas técnicas de detección, lo cual permitió trabajos muy interesantes sobre esta modificación y consecuentemente llevó a un aumento en el interés de la comunidad científica. Aún así, el uso de sistemas de sobre-expresión en células en cultivo es crítico en estos estudios, y probablemente sea una de las mayores debilidades de esta tesis. Por eso en estos momentos estamos doblando nuestros esfuerzos para lograr una aceptable detección de niveles endógenos de SUMOilación de nuestro sustrato estudiado, la proteína quinasa Akt.



## 5.1. AKT Y SU RELACIÓN CON PROTEÍNAS E3 LIGASAS DE LA VÍA DE SUMOILACIÓN

---

Demostramos que Akt1 interacciona con Ubc9 (la única E2 ligasa de la vía de SUMOilación descrita hasta el momento) y puede sufrir conjugación por SUMO tanto en células en cultivo como *in vitro*. También demostramos que la sobre-expresión de distintas E3 ligasas de SUMO como PIAS1 y TOPORS, así como también de la proteína SR SF2/ASF la cual presenta ciertas características de E3 ligasa, puede aumentar considerablemente los niveles de SUMOilación de Akt. Por el contrario, esto no ocurre con otra E3 ligasa llamada Pc2. De modo interesante ya existen evidencias de interacción de Akt con estas proteínas lo cual hace pensar que la regulación de los niveles de SUMOilación de Akt podría ocurrir frente a diferentes estímulos celulares que regulen la expresión de estas proteínas. Por un lado, existen datos en la bibliografía que evidencian la interacción física entre PIAS1 y Akt1 a partir de datos provenientes de experimentos de interacción realizados a gran escala (*Interologous Interaction Database*). Por otro lado, en nuestro grupo se presentó por primera vez a Akt como quinasa de proteínas SR, entre ellas SF2/ASF. El hecho de que SF2/ASF pueda aumentar la SUMOilación de Akt, sugiere que podría existir alguna tipo de retroalimentación en el eje descrito, pero no determina que exista, ya que el aumento en la fosforilación de SF2/ASF (determinado por Akt) y el aumento en la SUMOilación de Akt (disparado por SF2/ASF); podrían ser eventos totalmente independientes. Para comenzar a descifrar la conexión entre ambos eventos, decidimos evaluar si SF2/ASF podía generar un aumento en la SUMOilación de un mutante de Akt que carece de actividad quinasa (Akt KM). Observamos que SF2/ASF puede aumentar la SUMOilación de este mutante así como lo hace para la proteína Akt WT. Estos experimentos y resultados aún no son suficientes para concluir acerca de la existencia o no de algún tipo de retroalimentación en el eje PI3k-Akt-SF2/ASF debida a una interconexión de los eventos estudiados (fosforilación de SF2/ASF y SUMOilación de Akt). Este interrogante nos parece muy interesante, y seguirá siendo abordado en el laboratorio mediante nuevas estrategias. Por ejemplo, utilizando mutantes de SF2/ASF insensibles a la fosforilación por Akt y observar si mantienen su capacidad de aumentar la SUMOilación de Akt tanto en células en cultivo como en reacciones de SUMOilación *in vitro*.

## 5.2. UNA PROTEÍNA MUTANTE, AKT 2KR.

---

Tal como ya se describió en la sección de Resultados (sección 4.6) para estudiar como afecta la modificación por conjugación a SUMO a la actividad de un determinado sustrato pueden usarse diversas estrategias. Por ejemplo se puede inhibir o estimular la vía general de SUMOilación variando los niveles de las enzimas componentes de la vía como la enzima conjugadora E2 o las enzimas ligasas E3 que actúan sobre ese sustrato y luego en estas condiciones medir la actividad del sustrato elegido. El problema de este tipo de estrategias es que en estas condiciones se está afectando la SUMOilación global de la célula, y por lo tanto no podemos separar los correspondientes efectos indirectos debido a cambios en la SUMOilación de otras proteínas celulares sobre la actividad que queremos testear. Uno de los enfoques más utilizados en trabajos anteriores para intentar resolver este problema es generar proteínas mutantes para los aminoácidos lisina blanco de SUMOilación en el sustrato estudiado, en este caso Akt1. Luego de un análisis informático, y mediante estrategias de mutagénesis dirigida, construimos vectores de expresión para proteínas de Akt mutantes K por R, en unos 8 sitios putativos de SUMOilación. De esta manera, pudimos determinar que la SUMOilación de Akt1 parece tener lugar principalmente en las lisinas 276 y 301. La existencia de multiples lisinas de conjugación a SUMO en un sustrato se ha reportado reiteradamente en la literatura, y pareciera ser aún más común que la existencia de un sitio único. Un ejemplo de esto es la proteína Scc1, en la cual los autores tuvieron que mutar 15 lisinas de su dominio central de unión para lograr una disminución en sus niveles de SUMOilación (Wu et al., 2012). Si observamos la estructura terciaria de Akt inferida por cristalografía de rayos X de un fragmento comprendido entre los aminoácidos 144 y 478 de Akt1 realizada en el laboratorio de David Barford (Yang et al., 2002), podemos ver que ambos residuos blanco de SUMOilación (lisinas 276 y 301) se encuentran en la superficie de la proteína. Por otro lado, a diferencia de la lisina 301, la lisina 276 esta conservada entre las tres isoformas de Akt (Akt1, Akt2 y Akt3), y además se encuentra conservada a lo largo de distintas especies desde el gusano de seda hasta los mamíferos. Esto datos conjuntamente con el resultado presentado en esta tesis en el que observamos que en otra línea celular (HeLa) la lisina blanco de SUMOilación parece ser sólo la 276, y no la 301, indica que probablemente la lisina 301 aparezca como un blanco críptico de SUMOilación frente a la imposibilidad de conjugación por SUMO en la lisina

276, sobre todo en células HEK293T que presentan una alta capacidad de sobre-expresión y por lo tanto logramos tener un mayor nivel de actividad de la vía de SUMOilación. Aún cabe la posibilidad de que la mutación K276R esté afectando a otra modificación post-traducciona que se tenga lugar en ese sitio y podría afectar indirectamente los niveles de SUMOilación en la proteína Akt. Otra evidencia que fortalece la hipótesis de que esta lisina 276 es un sitio blanco de SUMOilación es que la secuencia que la rodea cumple los requisitos no solo de uno, sino de dos diferentes motivos consenso de SUMOilación un CM y un ICM (del inglés “*consensus motif*” e “*inverted consensus motif*” respectivamente). A este doble motivo consenso lo llamamos PCM (del inglés “*palindromic consensus motif*”). Además si variamos por mutagenesis dirigida esta secuencia consenso sin afectar a la lisina blanco, obtenemos una proteína de Akt1 que presenta niveles inferiores de SUMOilación que la proteína Akt1 WT y similares a la proteína mutante Akt1 K276R. Esta mutación en el sitio consenso de SUMOilación de Akt1 no debería afectar a otras modificaciones post-traduccionales que pudiesen ocurrir en esa lisina, y por lo tanto sugiere fuertemente que la lisina 276 es un sitio de SUMOilación de Akt1. Una última evidencia que aporta a esta discusión es el hecho de que existe un cambio de aminoácido en la secuencia consenso de SUMOilación correspondiente al sitio 277 de Akt2, con respecto a Akt1. Sin embargo esta variación es el cambio de un residuo leucina por un residuo isoleucina, lo que indica que se estaría conservando un aminoácido grande e hidrofóbico en la segunda posición del consenso.

El mutante Akt1 2KR generado, resultó ser una herramienta muy útil para evaluar la importancia de la SUMOilación en algunos de los procesos celulares en los que la quinasa Akt1 participa. De modo interesante, la sobre-expresión de Akt1 2KR no aumenta, y hasta inhibe, los niveles de fosforilación de un patrón global de sustratos de Akt. En este sentido demostramos que la conjugación de SUMO a Akt es necesaria para la mayoría de los procesos estudiados regulados por esta quinasa, tales como activación del factor de transcripción NFκB, regulación del *splicing* alternativo, ciclo celular y supervivencia celular. Sorprendentemente, la función de Akt de inhibir al factor de transcripción FOXO1 no depende de su SUMOilación, es decir, tanto Akt WT como 2KR fueron capaces de inhibir su actividad transcripcional en células en cultivo.

El uso de una proteína mutante con sustitución de aminoácidos para dilucidar la importancia de la SUMOilación sobre la actividad de Akt tiene sus ventajas y desventajas. Su fortaleza es permitir realizar experimentos sencillos ya sea de mera

sobre-expresión sin manipular la expresión de la proteína endógena, o bien de “rescate” en aquellos casos en los que la proteína endógena ha sido silenciada, y comparar fácilmente los niveles de actividad de la proteína mutante con respecto a su contraparte salvaje. Por otro lado, su debilidad es basarse justamente en el uso de una proteína mutante a la cual se le podrían atribuir efectos debido a la mutación en sí misma, pero independientes de la regulación por SUMOilación de la proteína. El cambio de aminoácido realizado en esta mutante es de aminoácido lisina a arginina. Estos dos aminoácidos tienen tamaño y estructura similar, y la misma carga neta con lo cual no se espera que afecten fuertemente las estructuras secundaria y terciaria de la proteína. Otro indicio de que la estructura no se encuentra afectada en el mutante Akt1 2KR es el hecho de que encontramos que puede ser modificada por fosforilación y acetilación de la misma manera que lo es Akt WT, con lo cual se puede concluir que los factores responsables de estas modificaciones post-traduccionales están reconociendo e interaccionando perfectamente con la mutante. Así y todo aún existe la posibilidad de que esté afectada por algún motivo la actividad quinasa de Akt. Sin embargo, este no pareciera ser el caso ya que Akt 2KR mantiene al menos su capacidad de inhibir la actividad del factor de transcripción FOXO1, lo que sugiere que su actividad quinasa no estaría afectada en este caso, ya que la regulación de FOXO1 está dada por fosforilación directa por Akt. Por último, existe la posibilidad de que este cambio aminoácido en la mutante esté también afectando a otras modificaciones post-traduccionales que utilizan lisinas como aminoácido blanco. Algunas de estas son la acetilación, ubiquitinación, neddilación, metilación, etc. Las primeras dos son las únicas que ya fueron reportadas para esta proteína, y datos no mostrados en esta tesis demuestran que la acetilación no se ve afectada en la mutante. Todas estas evidencias avalan el uso del mutante Akt1 2KR como una buena herramienta para el estudio de la conjugación por SUMO de Akt.

En la actualidad, para confirmar estos datos, estamos realizando experimentos de espectrometría de masa de Akt1 SUMOilado *in vitro* en colaboración con el laboratorio del profesor Ron Hay, en Dundee (Reino Unido). Así, mediante una técnica de detección de SUMOilación sitio específica, podremos mapear físicamente el/los aminoácido/s lisina blanco de conjugación a SUMO en la proteína Akt1.

### **5.3. RELACIÓN ENTRE FOSFORILACIÓN Y SUMOILACIÓN DE AKT**

---

Por diferentes experimentos demostramos que al menos la alteración de los niveles constitutivos de fosforilación no afectan los niveles constitutivos de SUMOilación de Akt1, y viceversa. Esta falta de subordinación entre estas modificaciones post-traduccionales resulta muy interesante y relevante. Durante los últimos 25 años se utilizaron los niveles de fosforilación en T308 y S473 como indicadores de la activación de Akt. Sin embargo, resultados presentados en esta tesis sugieren que eso no es cierto para todos los casos. Observamos que los niveles de fosforilación del mutante Akt1 2KR son similares a los de Akt1 salvaje, pero sin embargo, esta variante parece fallar en la regulación de la mayoría de los blancos de la vía de Akt. Mas aún pudimos detectar que tanto Akt WT como Akt 2KR aumentaron sus niveles de fosforilación en respuesta al factor de crecimiento IGF-1. Aún resta investigar profundamente si frente a la activación de esta vía con diferentes estímulos, los cambios transitorios en la fosforilación de Akt o bien la cinética de estos cambios se ven afectados para el mutante no SUMOilable de Akt, Akt1 2KR. Estos experimentos están en curso, y nos van a permitir ahondar en la discusión sobre la validez de la utilización de anticuerpos anti-T308 y S473 de Akt1 como marcadores de activación de Akt, y de mal pronóstico en la enfermedad del cáncer.

### **5.4. REGULACIÓN DE AKT POR SUMOILACIÓN**

---

En esta tesis proponemos un nuevo nivel de regulación de la quinasa Akt, su modificación por conjugación de SUMO. Este parece ser un mecanismo conservado ya que las tres isoformas de Akt pueden ser sustrato de SUMOilación. Un aspecto muy interesante de nuestro hallazgo es que la regulación de la actividad de Akt ejercida por su conjugación a SUMO pareciera ser un evento río abajo del proceso de activación por fosforilación de Akt. Como fue explicado en la introducción, en los últimos años se han

descripto otras modificaciones post-traduccionales que pueden regular la actividad de Akt, aparte de las extensamente estudiadas fosforilaciones en T308 y S473 que dirigen la activación de la quinasa. Algunos ejemplos de estas son la ubiquitinación, acetilación, fosforilación en Y176, entre otras. Tanto la ubiquitinación como la fosforilación en Y176 promueven el direccionamiento de Akt a la membrana plasmática. En el caso de la acetilación, esta modificación inhibe la interacción del dominio PH de Akt con los fosfolípidos de membrana plasmática, inhibiendo el reclutamiento de Akt a ese compartimento subcelular. Estas modificaciones regulan eventos río arriba de la activación, y por ende su consecuencia común es regular los niveles de fosforilación en T308 y S473. De esta manera, perturbando estas modificaciones post-traduccionales uno puede obtener una hiper o una hipo (dependiendo cual sea la modificación) activación de Akt. La modificación post-traduccionales de Akt por conjugación a SUMO estudiada en esta tesis parece diferenciarse de las anteriores. El mutante Akt 2KR parece activarse del mismo modo que la proteína Akt salvaje, frente a estímulos tales como el factor de crecimiento IGF-1 o suero. Por lo tanto, es posible sugerir que la SUMOilación estaría regulando algún evento río abajo de la activación canónica de Akt. Además, observamos que esta modificación de Akt no es necesaria para la fosforilación y consecuente inhibición de uno de los sustratos conocidos de Akt, el factor de transcripción FOXO1, pero es totalmente necesaria para otros sustratos y/o eventos regulados por esta quinasa tales como el *splicing* alternativo y la actividad del factor de transcripción NFκB. Esto nos puede dar una idea de que la SUMOilación podría estar dirigiendo la selectividad de sustrato de Akt, lo cual podría ocurrir por ejemplo por interacción diferencial de Akt SUMOilado con los distintos sustratos y/o complejos en los que ejerce su actividad quinasa. Al respecto, no podemos dejar de lado el hecho de que la mayor parte del Akt SUMOilado en la célula parece estar concentrado en un compartimento celular especial, el núcleo. De esta manera podríamos pensar, por un lado, que la conjugación de SUMO a Akt podría estar regulando su localización subcelular (los experimentos para poner a prueba esta hipótesis están en curso). Alternativamente, podríamos pensar que la SUMOilación es necesaria para la fosforilación de sustratos en el núcleo y no para la fosforilación de sustratos en el citoplasma. En este sentido, ha sido reportado que Akt puede ejercer su actividad quinasa tanto en el citoplasma como en núcleo. Hicimos una búsqueda para saber por ejemplo en qué compartimento celular Akt podría estar fosforilando a FOXO1, y observamos que existe mucha controversia al respecto. Resulta una tarea muy ardua llegar a una conclusión fehaciente en estos

estudios, dado que es sencillo saber donde un sustrato se encuentra más fosforilado, pero uno no puede saber si éste pudo haber cambiado su ubicación subcelular inmediatamente luego del evento de fosforilación. Se ha construido recientemente una herramienta muy interesante en este sentido. La misma consiste en una proteína de fusión de dos proteínas fluorescentes separadas por un péptido sustrato de Akt. Cuando este péptido nexa es fosforilado por Akt cambia la distancia entre las proteínas fluorescentes y por ende cambia la transferencia de energía entre estas. Estos cambios en la transferencia de energía de las proteínas puede ser medido en tiempo real por un microscopio especializado y por lo tanto es posible conocer en que compartimiento celular está actuando Akt en un determinado instante. Esta herramienta puede resultar muy útil para observar si es que existen diferencias entre la proteína Akt salvaje y la proteína Akt 2KR deficiente en SUMOilación.

## **5.5. EL ENIGMA DE SUMO**

---

Una típica observación a primera vista que contradice la intuición es el hecho de que sólo una muy pequeña proporción de una proteína sustrato se encuentra SUMOilada en la célula, y la pregunta es cómo esto puede tener un efecto fuerte en la regulación de la actividad de dicho sustrato. Esto es conocido en la literatura como “el enigma de SUMO” (Hay, 2005). A pesar de que los mecanismos exactos por los cuales esto puede estar sucediendo aún no han sido extensamente estudiados, existen explicaciones elegantes basadas en la naturaleza dinámica de los ciclos de SUMOilación. Por ejemplo, en neuronas, la modificación por SUMO de la subunidad 6 del receptor de glutamato (GluR6) lleva a su endocitosis desde la membrana plasmática (Martin et al., 2007a). Aunque una proporción muy pequeña del receptor SUMOilado puede ser detectada en un determinado tiempo, una gran proporción de GluR6 sufre endocitosis mediada por SUMOilación. El bajo nivel de SUMOilación detectado en GluR6 es probablemente debido a la acción de las SENPs (proteasas de SUMO), que remueven el SUMO rápidamente. Sin embargo, los efectos funcionales de la SUMOilación de GluR6 persisten luego de la de-conjugación de SUMO. Esto es, una vez que la SUMOilación ha mediado la endocitosis del receptor, el péptido SUMO ya puede ser removido, y dicho

receptor va a ser físicamente indistinguible de uno que no haya sido SUMOilado nunca. Es decir que la SUMOilación puede ocurrir en un intervalo de tiempo muy acotado dentro del “tiempo de vida” de una proteína en la célula, pero esto puede ser totalmente necesario para disparar un determinado mecanismo celular, posibilitando interacciones proteicas y procesos que luego persisten más allá de la de-conjugación de SUMO de la proteína sustrato.

## **5.6. EL ENIGMA DE AKT**

---

A lo largo estos 35 años desde el descubrimiento de la quinasa Akt, ésta ha sido involucrada en una gran cantidad de procesos tales como supervivencia celular, crecimiento, proliferación, angiogénesis, metabolismo, migración, resistencia a estrés, entre otros. En concordancia, fueron reportados estímulos muy diversos capaces de dirigir la activación de Akt por fosforilación. Algunos ejemplos son: múltiples factores de crecimiento, estrés genotóxico, estímulos inflamatorios, estrés térmico, estrés por hipoxia (Mahajan y Mahajan, 2012). Se ha estudiado, en algunos casos en profundidad, cómo cada uno de estos estímulos, mediante mecanismos específicos lleva a la activación de la quinasa Akt. Siguiendo esta línea de pensamiento también se ha reportado que Akt puede regular por fosforilación sustratos específicos que lleven a cabo la respuesta celular correspondiente a cada uno de estos estímulos. La gran mayoría de los trabajos están dedicados a estudiar un tipo de estímulo, que lleva a la regulación de unos pocos sustratos de Akt que tienen relación con un dado proceso estudiado. Existe un gran vacío en lo que respecta al entendimiento de los mecanismos que permiten y determinan que la activación de una misma quinasa pueda llevar a respuestas celulares tan diversas ante distintas condiciones extracelulares. Es decir, bajo estímulos tan distintos como factores de crecimiento y estrés genotóxico se estudia el aumento en los niveles de fosforilación en T308 y S473 de Akt. Evidentemente, dentro de la célula tiene que existir algún tipo de control que dirija a Akt a los sustratos indicados para generar una respuesta específica ante cada estímulo. Claro que este control debe depender del contexto celular dado, sin olvidarnos además que cada estímulo puede activar múltiples vías además de la de Akt. En este sentido, el



descubrimiento de nuevas modificaciones post-traduccionales, que además puedan dirigir la selección de sustratos (como parece ser el caso de la SUMOilación), puede llevar a un entendimiento más profundo de cómo una misma proteína quinasa puede regular la activación de distintos procesos en un contexto celular determinado.

## 5.7. SUMOILACIÓN DE AKT Y CANCER

---

Con respecto a la relación entre esta nueva modificación post-traducciona de Akt y la participación de esta quinasa en la carcinogénesis, comenzamos estudios sobre la importancia de la SUMOilación en la hiperactividad de un mutante en el gen de AKT1 con gran incidencia en esta enfermedad, que aparece espontáneamente en tumores humanos. Esta mutación G>A en el nucleótido 49 de su secuencia codificante resulta en una sustitución de lisina por glutámico en el aminoácido 17 (E17K) (Carpten et al., 2007). Observamos que este mutante presenta niveles muy superiores de SUMOilación con respecto a la proteína salvaje. Esto a su vez correlaciona con una mayor actividad del Akt mutante al menos en lo que respecta a la regulación del *splicing* alternativo estudiada por nuestro laboratorio, que se ve anulada por la disminución de la SUMOilación lograda por la combinación de la mutación E17K con las mutaciones K276R y K301R. Estos resultados son muy alentadores y abren interrogantes que hemos tomado como objetivos próximos de nuestro laboratorio. Específicamente, nuestra perspectiva es ahondar sobre las consecuencias de la modificación de Akt por conjugación de SUMO sobre la capacidad tumorigénica de esta quinasa. Para ello, generaremos líneas celulares estables en las que intentaremos anular la expresión de Akt1 endógena y rescatarla con la expresión de Akt1 E17K o bien Akt1 E17K 2KR. Analizaremos el comportamiento de estas líneas celulares con respecto a distintos parámetros relacionados con la transformación maligna y la capacidad oncogénica. La formación de focos, el crecimiento en agar blando y la formación de tumores en ratones atómicos son los ensayos que se prevén para el futuro inmediato.

## BIBLIOGRAFIA

---

---

Ahmed, N.N., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Chan, T.O., y Tschlis, P.N. (1997). Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3627-3632.

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., y Hemmings, B.A. (1996a). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15, 6541-6551.

Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., y Cohen, P. (1996b). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS letters* 399, 333-338.

Altomare, D.A., Tanno, S., De Rienzo, A., Klein-Szanto, A.J., Skele, K.L., Hoffman, J.P., y Testa, J.R. (2002). Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *Journal of cellular biochemistry* 87, 470-476.

Altomare, D.A., y Testa, J.R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455-7464.

Andersen, J.B., y Hassel, B.A. (2006). The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 411-421.

Andersen, J.S., Matic, I., y Vertegaal, A.C. (2009). Identification of SUMO target proteins by quantitative proteomics. *Methods Mol Biol* 497, 19-31.

Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., y Hemmings, B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* 272, 31515-31524.

Andrews, E.A., Palecek, J., Sergeant, J., Taylor, E., Lehmann, A.R., y Watts, F.Z. (2005). Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* 25, 185-196.

- Bae, S., Kim, S.Y., Jung, J.H., Yoon, Y., Cha, H.J., Lee, H., Kim, K., Kim, J., An, I.S., Um, H.D., *et al.* (2012). Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase. *Cell research* 22, 873-885.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., y Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-286.
- Bellacosa, A., Kumar, C.C., Di Cristofano, A., y Testa, J.R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in cancer research* 94, 29-86.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., y Tschlis, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274-277.
- Bellare, P., Small, E.C., Huang, X., Wohlschlegel, J.A., Staley, J.P., y Sontheimer, E.J. (2008). A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway. *Nat Struct Mol Biol* 15, 444-451.
- Blaustein, M., Pelisch, F., Coso, O.A., Bissell, M.J., Kornblihtt, A.R., y Srebrow, A. (2004). Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 279, 21029-21037.
- Blaustein, M., Pelisch, F., Tanos, T., Munoz, M.J., Wengier, D., Quadrana, L., Sanford, J.R., Muschietti, J.P., Kornblihtt, A.R., Caceres, J.F., *et al.* (2005). Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1037-1044.
- Blomster, H.A., Hietakangas, V., Wu, J., Kouvonen, P., Hautaniemi, S., y Sistonen, L. (2009). Novel proteomics strategy brings insight into the prevalence of SUMO-2 target sites. *Mol Cell Proteomics* 8, 1382-1390.
- Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E., y Freemont, P.S. (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, 971-982.
- Brazil, D.P., y Hemmings, B.A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in biochemical sciences* 26, 657-664.

Brazil, D.P., Yang, Z.Z., y Hemmings, B.A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in biochemical sciences* 29, 233-242.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., y Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Capili, A.D., y Lima, C.D. (2007). Taking it step by step: mechanistic insights from structural studies of ubiquitin/ubiquitin-like protein modification pathways. *Curr Opin Struct Biol* 17, 726-735.

Caputi, M., Casari, G., Guenzi, S., Tagliabue, R., Sidoli, A., Melo, C.A., y Baralle, F.E. (1994). A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon. *Nucleic Acids Res* 22, 1018-1022.

Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G.K., Holsboer, F., y Arzt, E. (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 $\alpha$  during hypoxia. *Cell* 131, 309-323.

Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., *et al.* (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448, 439-444.

Cazalla, D., Sanford, J.R., y Caceres, J.F. (2005). A rapid and efficient protocol to purify biologically active recombinant proteins from mammalian cells. *Protein Expr Purif* 42, 54-58.

Ciechanover, A., Finley, D., y Varshavsky, A. (1984). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *Journal of cellular biochemistry* 24, 27-53.

Coffer, P.J., y Woodgett, J.R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *European journal of biochemistry / FEBS* 201, 475-481.

Cramer, P., Caceres, J.F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A.F., Baralle, F.E., y Kornblihtt, A.R. (1999). Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Molecular cell* 4, 251-258.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., y Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.

Chan, C.H., Li, C.F., Yang, W.L., Gao, Y., Lee, S.W., Feng, Z., Huang, H.Y., Tsai, K.K., Flores, L.G., Shao, Y., *et al.* (2012). The Skp2-SCF E3 Ligase Regulates Akt Ubiquitination, Glycolysis, Herceptin Sensitivity, and Tumorigenesis. *Cell* 149, 1098-1111.

Cheok, C.F., Verma, C.S., Baselga, J., y Lane, D.P. (2011). Translating p53 into the clinic. *Nature reviews Clinical oncology* 8, 25-37.

Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-159.

Da Silva-Ferrada, E., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., Rodriguez, M.S., y Matthiesen, R. (2012). Strategies to Identify Recognition Signals and Targets of SUMOylation. *Biochemistry research international* 2012, 875148.

Datta, S.R., Brunet, A., y Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* 13, 2905-2927.

Davies, M.A., Stemke-Hale, K., Tellez, C., Calderone, T.L., Deng, W., Prieto, V.G., Lazar, A.J., Gershenwald, J.E., y Mills, G.B. (2008). A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *British journal of cancer* 99, 1265-1268.

Deshaies, R.J., y Joazeiro, C.A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399-434.

Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., Kemp, G.D., y Hay, R.T. (1999). Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *The Journal of biological chemistry* 274, 10618-10624.

Desterro, J.M., Thomson, J., y Hay, R.T. (1997). Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS letters* 417, 297-300.

Dorval, V., y Fraser, P.E. (2007). SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1773, 694-706.

Drag, M., y Salvesen, G.S. (2008). DeSUMOylating enzymes--SENPs. *IUBMB Life* 60, 734-742.

Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., y Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO journal* 20, 6877-6888.

Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews Cancer* 9, 550-562.

Fan, C.D., Lum, M.A., Xu, C., Black, J.D., y Wang, X. (2012). Ubiquitin-dependent regulation of phospho-AKT dynamics by the ubiquitin E3 ligase, NEDD4-1, in the IGF-1 response. *The Journal of biological chemistry*.

Fayard, E., Tintignac, L.A., Baudry, A., y Hemmings, B.A. (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *Journal of cell science* 118, 5675-5678.

Feng, J., Tamaskovic, R., Yang, Z., Brazil, D.P., Merlo, A., Hess, D., y Hemmings, B.A. (2004). Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 279, 35510-35517.

Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., y Asselin, E. (2004). AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecologic oncology* 94, 785-795.

Gardai, S.J., Hildeman, D.A., Frankel, S.K., Whitlock, B.B., Frasch, S.C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D.L., y Henson, P.M. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 279, 21085-21095.

Geiss-Friedlander, R., y Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956.

Geng, J., y Klionsky, D.J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9, 859-864.

Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes & development* 18, 2046-2059.

Gong, L., Li, B., Millas, S., y Yeh, E.T. (1999). Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS letters* 448, 185-189.

Gonzalez, E., y McGraw, T.E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8, 2502-2508.

Groettrup, M., Pelzer, C., Schmidtke, G., y Hofmann, K. (2008). Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends in biochemical sciences* 33, 230-237.

Hammer, E., Heilbronn, R., y Weger, S. (2007). The E3 ligase Topors induces the accumulation of polysumoylated forms of DNA topoisomerase I in vitro and in vivo. *FEBS letters* 581, 5418-5424.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

Hara, S., Nakashiro, K., Goda, H., y Hamakawa, H. (2008). Role of Akt isoforms in HGF-induced invasive growth of human salivary gland cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 370, 123-128.

Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Molecular cell* 18, 1-12.

Heideker, J., Perry, J.J., y Boddy, M.N. (2009). Genome stability roles of SUMO-targeted ubiquitin ligases. *DNA Repair (Amst)* 8, 517-524.

Hers, I., Vincent, E.E., y Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling* 23, 1515-1527.

Hershko, A., y 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, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., y Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 45-50.

Hochstrasser, M. (2000). Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nature cell biology* 2, E153-157.

- Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107, 5-8.
- Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458, 422-429.
- Hurley, J.H., Lee, S., y Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399, 361-372.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., y Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125-137.
- Joazeiro, C.A., y Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.
- Johnson, E.S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73, 355-382.
- Johnson, E.S., y Blobel, G. (1997). Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *The Journal of biological chemistry* 272, 26799-26802.
- Johnson, E.S., y Gupta, A.A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-744.
- Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J., y Blobel, G. (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *The EMBO journal* 16, 5509-5519.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., y Hemmings, B.A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4171-4175.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A., y Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, 127-137.
- Kandasamy, K., y Srivastava, R.K. (2002). Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer research* 62, 4929-4937.



Kerscher, O., Felberbaum, R., y Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159-180.

Kim, A.H., Yano, H., Cho, H., Meyer, D., Monks, B., Margolis, B., Birnbaum, M.J., y Chao, M.V. (2002). Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* 35, 697-709.

Kim, J.H., y Baek, S.H. (2009). Emerging roles of desumoylating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1792, 155-162.

Kim, M.S., Jeong, E.G., Yoo, N.J., y Lee, S.H. (2008). Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *British journal of cancer* 98, 1533-1535.

Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., *et al.* (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *The EMBO journal* 21, 2682-2691.

Knipscheer, P., Flotho, A., Klug, H., Olsen, J.V., van Dijk, W.J., Fish, A., Johnson, E.S., Mann, M., Sixma, T.K., y Pichler, A. (2008). Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Molecular cell* 31, 371-382.

Kops, G.J., y Burgering, B.M. (1999). Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med (Berl)* 77, 656-665.

Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O.A., y Palvimo, J.J. (2002). PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Molecular and cellular biology* 22, 5222-5234.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee, K.M., y O'Connell, M.J. (2006). A new SUMO ligase in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 5, 138-141.

Lim, J.H., Jono, H., Komatsu, K., Woo, C.H., Lee, J., Miyata, M., Matsuno, T., Xu, X., Huang, Y., Zhang, W., *et al.* (2012). CYLD negatively regulates transforming growth factor-beta-signalling via deubiquitinating Akt. *Nature communications* 3, 771.

Lin, D., Tatham, M.H., Yu, B., Kim, S., Hay, R.T., y Chen, Y. (2002). Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *The Journal of biological chemistry* 277, 21740-21748.

Mahajan, K., Coppola, D., Challa, S., Fang, B., Chen, Y.A., Zhu, W., Lopez, A.S., Koomen, J., Engelman, R.W., Rivera, C., *et al.* (2010). Ack1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation. *PloS one* 5, e9646.

Mahajan, K., y Mahajan, N.P. (2012). PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol* 227, 3178-3184.

Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., y Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.

Malanga, D., Scrima, M., De Marco, C., Fabiani, F., De Rosa, N., De Gisi, S., Malara, N., Savino, R., Rocco, G., Chiappetta, G., *et al.* (2008). Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle* 7, 665-669.

Malstrom, S., Tili, E., Kappes, D., Ceci, J.D., y Tschlis, P.N. (2001). Tumor induction by an Lck-MyrAkt transgene is delayed by mechanisms controlling the size of the thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14967-14972.

Manning, B.D., y Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.

Martin, S., Nishimune, A., Mellor, J.R., y Henley, J.M. (2007a). SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 447, 321-325.

Martin, S., Wilkinson, K.A., Nishimune, A., y Henley, J.M. (2007b). Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 8, 948-959.

Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I.A., van Santen, M.A., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M., y Vertegaal, A.C. (2010). Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Molecular cell* 39, 641-652.

- Matsuzaki, H., Tamatani, M., Mitsuda, N., Namikawa, K., Kiyama, H., Miyake, S., y Tohyama, M. (1999). Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* 73, 2037-2046.
- Matunis, M.J., Coutavas, E., y 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, 1457-1470.
- Mayo, L.D., y Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11598-11603.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., y Burgering, B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.
- Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 591-626.
- Melchior, F., Schergaut, M., y Pichler, A. (2003). SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends in biochemical sciences* 28, 612-618.
- Meluh, P.B., y 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, 793-807.
- Merrill, J.C., Melhuish, T.A., Kagey, M.H., Yang, S.H., Sharrocks, A.D., y Wotton, D. (2010). A Role for Non-Covalent SUMO Interaction Motifs in Pc2/CBX4 E3 Activity. *PloS one* 5, e8794.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., y Miyazawa, K. (2008). SUMO amplifies TGF-beta signalling. *Nature cell biology* 10, 635-637.
- Mohideen, F., Capili, A.D., Bilimoria, P.M., Yamada, T., Bonni, A., y Lima, C.D. (2009). A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nat Struct Mol Biol* 16, 945-952.

Mossesso, E., y Lima, C.D. (2000). Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Molecular cell* 5, 865-876.

Mukhopadhyay, D., y Dasso, M. (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends in biochemical sciences* 32, 286-295.

Nakatani, K., Thompson, D.A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R.J., y Roth, R.A. (1999). Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *The Journal of biological chemistry* 274, 21528-21532.

Navascues, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, M.T., y Lafarga, M. (2008). SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J Struct Biol* 163, 137-146.

Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., y Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *The Journal of biological chemistry* 277, 21843-21850.

Oh, W.J., Wu, C.C., Kim, S.J., Facchinetti, V., Julien, L.A., Finlan, M., Roux, P.P., Su, B., y Jacinto, E. (2010). mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *The EMBO journal* 29, 3939-3951.

Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C.F., Chang, H.M., y Yeh, E.T. (1996). Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 157, 4277-4281.

Ouyang, J., y Gill, G. (2009). SUMO engages multiple corepressors to regulate chromatin structure and transcription. *Epigenetics* 4, 440-444.

Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., y Donner, D.B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-85.

Palvimo, J.J. (2007). PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans* 35, 1405-1408.

Parsons, D.W., Wang, T.L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J.M., DeLong, L., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J.K., *et al.* (2005). Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 436, 792.

Patel, N.A., Kaneko, S., Apostolatos, H.S., Bae, S.S., Watson, J.E., Davidowitz, K., Chappell, D.S., Birnbaum, M.J., Cheng, J.Q., y Cooper, D.R. (2005). Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase CbetaII alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *The Journal of biological chemistry* 280, 14302-14309.

Pelisch, F., Blaustein, M., Kornblihtt, A.R., y Srebrow, A. (2005). Cross-talk between signaling pathways regulates alternative splicing: a novel role for JNK. *The Journal of biological chemistry* 280, 25461-25469.

Pelisch, F., Gerez, J., Druker, J., Schor, I.E., Munoz, M.J., Risso, G., Petrillo, E., Westman, B.J., Lamond, A.I., Arzt, E., *et al.* (2010). The serine/arginine-rich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 16119-16124.

Pelisch, F., Pozzi, B., Risso, G., Munoz, M.J., y Srebrow, A. (2012). DNA damage-induced heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K sumoylation regulates p53 transcriptional activation. *The Journal of biological chemistry* 287, 30789-30799.

Perry, J.J., Tainer, J.A., y Boddy, M.N. (2008). A simultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends in biochemical sciences* 33, 201-208.

Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., y Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-120.

Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T.K., y Melchior, F. (2004). The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol* 11, 984-991.

Pitha-Rowe, I.F., y Pitha, P.M. (2007). Viral defense, carcinogenesis and ISG15: novel roles for an old ISG. *Cytokine Growth Factor Rev* 18, 409-417.

Pugazhenthii, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., Heasley, L.E., y Reusch, J.E. (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 275, 10761-10766.

- Reverter, D., y Lima, C.D. (2005). Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* *435*, 687-692.
- Ritchie, K.J., y Zhang, D.E. (2004). ISG15: the immunological kin of ubiquitin. *Semin Cell Dev Biol* *15*, 237-246.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C., y Hay, R.T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *The Journal of biological chemistry* *276*, 12654-12659.
- Romashkova, J.A., y Makarov, S.S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* *401*, 86-90.
- Rosas-Acosta, G., Russell, W.K., Deyrieux, A., Russell, D.H., y Wilson, V.G. (2005). A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol Cell Proteomics* *4*, 56-72.
- Rytinki, M.M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jaaskelainen, T., y Palvimo, J.J. (2009). PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *66*, 3029-3041.
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., y Suske, G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *The EMBO journal* *21*, 5206-5215.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., y Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* *307*, 1098-1101.
- Savare, J., Bonneaud, N., y Girard, F. (2005). SUMO represses transcriptional activity of the Drosophila SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors. *Mol Biol Cell* *16*, 2660-2669.
- Schwartz, A.L., y Ciechanover, A. (2009). Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *49*, 73-96.
- Schwartz, D.C., y Hochstrasser, M. (2003). A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends in biochemical sciences* *28*, 321-328.

Seu, C.S., y Chen, Y. (2009). Identification of SUMO-binding motifs by NMR. *Methods Mol Biol* 497, 121-138.

Shah, N.P., Kasap, C., Weier, C., Balbas, M., Nicoll, J.M., Bleickardt, E., Nicaise, C., y Sawyers, C.L. (2008). Transient potent BCR-ABL inhibition is sufficient to commit chronic myeloid leukemia cells irreversibly to apoptosis. *Cancer cell* 14, 485-493.

Shen, Z., Pardington-Purtymun, P.E., Comeaux, J.C., Moyzis, R.K., y Chen, D.J. (1996). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36, 271-279.

Sherr, C.J., y Weber, J.D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Current opinion in genetics & development* 10, 94-99.

Shultz, J.C., Goehe, R.W., Wijesinghe, D.S., Murudkar, C., Hawkins, A.J., Shay, J.W., Minna, J.D., y Chalfant, C.E. (2010). Alternative splicing of caspase 9 is modulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway via phosphorylation of SRp30a. *Cancer research* 70, 9185-9196.

Staal, S.P., Hartley, J.W., y Rowe, W.P. (1977). Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 3065-3067.

Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., y Mak, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39.

Su, C.H., Wang, C.Y., Lan, K.H., Li, C.P., Chao, Y., Lin, H.C., Lee, S.D., y Lee, W.P. (2011). Akt phosphorylation at Thr308 and Ser473 is required for CHIP-mediated ubiquitination of the kinase. *Cellular signalling* 23, 1824-1830.

Suizu, F., Hiramuki, Y., Okumura, F., Matsuda, M., Okumura, A.J., Hirata, N., Narita, M., Kohno, T., Yokota, J., Bohgaki, M., *et al.* (2009). The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev Cell* 17, 800-810.

Sun, M., Wang, G., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z.Q., Ma, X.L., Shelley, S.A., Jove, R., Tsiichlis, P.N., Nicosia, S.V., *et al.* (2001). AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *The American journal of pathology* 159, 431-437.

Sundaresan, N.R., Pillai, V.B., Wolfgeher, D., Samant, S., Vasudevan, P., Parekh, V., Raghuraman, H., Cunningham, J.M., Gupta, M., y Gupta, M.P. (2011). The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Science signaling* 4, ra46.

Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E.A., Yasuda, H., y Kikuchi, Y. (2001a). Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *The Journal of biological chemistry* 276, 48973-48977.

Takahashi, Y., Toh-e, A., y Kikuchi, Y. (2001b). A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene* 275, 223-231.

Tzivion, G., Dobson, M., y Ramakrishnan, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1938-1945.

Valin, A., y Gill, G. (2007). Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochem Soc Trans* 35, 1393-1396.

Verger, A., Perdomo, J., y Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4, 137-142.

Vertegaal, A.C., Andersen, J.S., Ogg, S.C., Hay, R.T., Mann, M., y Lamond, A.I. (2006). Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 5, 2298-2310.

Vertegaal, A.C., Ogg, S.C., Jaffray, E., Rodriguez, M.S., Hay, R.T., Andersen, J.S., Mann, M., y Lamond, A.I. (2004). A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *The Journal of biological chemistry* 279, 33791-33798.

Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., y Cook, W.J. (1987a). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 194, 531-544.

Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., Wilkinson, K.D., Vierstra, R.D., Hatfield, P.M., y Cook, W.J. (1987b). Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *The Journal of biological chemistry* 262, 6396-6399.

Weger, S., Hammer, E., y Heilbronn, R. (2005). Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS letters* 579, 5007-5012.



White, E.S., Sagana, R.L., Booth, A.J., Yan, M., Cornett, A.M., Bloomheart, C.A., Tsui, J.L., Wilke, C.A., Moore, B.B., Ritzenthaler, J.D., *et al.* (2010). Control of fibroblast fibronectin expression and alternative splicing via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Exp Cell Res* 316, 2644-2653.

Wilkinson, K.A., Nishimune, A., y Henley, J.M. (2008). Analysis of SUMO-1 modification of neuronal proteins containing consensus SUMOylation motifs. *Neuroscience letters* 436, 239-244.

Wu, N., Kong, X., Ji, Z., Zeng, W., Potts, P.R., Yokomori, K., y Yu, H. (2012). Scc1 sumoylation by Mms21 promotes sister chromatid recombination through counteracting Wapl. *Genes & development* 26, 1473-1485.

Xirodimas, D.P. (2008). Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem Soc Trans* 36, 802-806.

Yang, J., Cron, P., Good, V.M., Thompson, V., Hemmings, B.A., y Barford, D. (2002). Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol* 9, 940-944.

Yang, S.H., Galanis, A., Witty, J., y Sharrocks, A.D. (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *The EMBO journal* 25, 5083-5093.

Yang, S.H., Jaffray, E., Hay, R.T., y Sharrocks, A.D. (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Molecular cell* 12, 63-74.

Yang, S.H., y Sharrocks, A.D. (2004). SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Molecular cell* 13, 611-617.

Yang, W.L., Wang, J., Chan, C.H., Lee, S.W., Campos, A.D., Lamothe, B., Hur, L., Grabiner, B.C., Lin, X., Darnay, B.G., *et al.* (2009). The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 325, 1134-1138.

Yeh, E.T. (2009). SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *The Journal of biological chemistry* 284, 8223-8227.

Yuan, Z.Q., Sun, M., Feldman, R.I., Wang, G., Ma, X., Jiang, C., Coppola, D., Nicosia, S.V., y Cheng, J.Q. (2000). Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition

of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 19, 2324-2330.

Yunus, A.A., y Lima, C.D. (2006). Lysine activation and functional analysis of E2-mediated conjugation in the SUMO pathway. *Nat Struct Mol Biol* 13, 491-499.

Yunus, A.A., y Lima, C.D. (2009). Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Molecular cell* 35, 669-682.

Zhao, L., y Vogt, P.K. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27, 5486-5496.

Zhao, X., y Blobel, G. (2005). A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4777-4782.

Zhou, Z., Qiu, J., Liu, W., Zhou, Y., Plocinik, R.M., Li, H., Hu, Q., Ghosh, G., Adams, J.A., Rosenfeld, M.G., *et al.* (2012). The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Molecular cell* 47, 422-433.